

**Funktion und Regulation von Mastzellen bei der
Immunantwort der Maus (*Mus musculus*; Linnaeus, 1758) auf
den Darmparasiten *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925)**

Dissertation

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

vorgelegt von

Martina Reitz

Hamburg, 2016

“Oh, they are the vicious cells that cause allergy and make us sneeze and wheeze.”

Datum der Disputation: 22.04.2016

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

Prof. Dr. Christian Lohr

Priv.-Doz. Dr. Minka Breloer

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Gastrointestinale Nematodeninfektionen	1
1.2. <i>Strongyloides ratti</i> als Modell für eine transiente, parasitäre, gastrointestinale Nematodeninfektion	2
1.3. Immunantwort der Maus gegen eine <i>Strongyloides</i> Infektion	3
1.4. Mastzellen	5
1.4.1. Mastzellentwicklung	5
1.4.2. Aktivierung von Mastzellen	6
1.4.3. Funktion von Mastzellen	7
1.5. Mastzelldefiziente Mausstämme	9
1.6. Ziel der Arbeit	11
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Material	13
2.1.1. Laborgeräte	13
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien	15
2.1.4. Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	16
2.1.5. Antikörper	17
2.1.6. Oligonukleotide	17
2.1.7. Kits	18
2.1.8. Tiere und Parasiten	18
2.1.9. Software	19
2.2. Methoden	19
2.2.1. Zellbiologische Methoden	19
2.2.1.1. Grundsätze der Zellkultur	19
2.2.1.2. Präparation muriner Milz- und Lymphknotenzellen	20
2.2.1.3. Präparation muriner peripherer Blutzellen	20
2.2.1.4. Gewinnung von Zellen aus dem Peritoneum	20
2.2.1.5. Gewinnung von Knochenmarkzellen	20
2.2.1.6. Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mittels Trypanblau	20
2.2.1.7. <i>In vitro</i> Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen	21
2.2.1.8. Durchflusszytometrische Analysen	21
2.2.2. Biochemische Methoden	22
2.2.2.1. ELISA zur Quantifizierung von Zytokinen im Zellkulturüberstand	22
2.2.2.2. ELISA zur Quantifizierung von Interleukin-9 im Zellkulturüberstand	23
2.2.2.3. ELISA zur Quantifizierung von Maus-Mastzellprotease-1 (mMCPT-1) im Serum	23
2.2.2.4. ELISA von <i>S. ratti</i> -spezifischen Immunglobulinen im Serum	23
2.2.2.5. ELISA zur Quantifizierung von polyklonalem IgE im Serum	24
2.2.3. Molekularbiologische Methoden	24
2.2.3.1. Isolierung von DNA aus Gewebeproben	24

2.2.3.2.	Isolierung von DNA aus Stuhlproben	24
2.2.3.3.	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	25
2.2.3.4.	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung von transgenen Mäusen	25
2.2.3.5.	Agarosegelelektrophorese	26
2.2.3.6.	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	26
2.2.4.	Parasitologische Methoden und Tierversuche	27
2.2.4.1.	Laborzyklus von <i>S. ratti</i> und Präparation der infektiösen dritten Larven (L3i)	27
2.2.4.2.	Infektion von Mäusen und Ratten mit L3i <i>S. ratti</i>	28
2.2.4.3.	Bestimmung der wandernden Larven in Kopf, Lunge und Darm	28
2.2.4.4.	Bestimmung der adulten <i>S. ratti</i> im Darm	28
2.2.4.5.	Nachweis von <i>S. ratti</i> -DNA in Stuhlproben	28
2.2.4.6.	Gewinnung von Serum	28
2.2.4.7.	Herstellung von hochtitrigem Antiserum	29
2.2.4.8.	Behandlung der Mäuse mit Immuneserum.....	29
2.2.4.9.	Depletion von Treg	29
2.2.4.10.	Herstellung von gemischten Knochenmarkchimären.....	29
2.2.4.11.	Histologie - Herstellung von Swiss Rolls	30
3.	ERGEBNISSE	31
3.1.	Induktion und Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems während einer <i>S. ratti</i> Infektion	31
3.2.	Einfluss einer Mastzelldefizienz auf den <i>S. ratti</i> Infektionsverlauf in der Maus	33
3.2.1.	Vergleich der Zellrekrutierung in den Darm während der <i>S. ratti</i> Infektion von mastzellkompetenten und mastzelldefizienten BALB/c Mäusen	33
3.2.2.	Mastzellen sind wichtig für die Kontrolle der Parasitenlast im Darm und für die Terminierung der <i>S. ratti</i> Infektion	35
3.2.3.	Mastzellen haben keinen Einfluss auf die Etablierung einer Th2 Immunantwort	41
3.2.4.	Zusätzliches Fehlen der adaptiven Immunantwort in Cpa3 ^{Cre} Mäusen führt zu keiner verschlechterten Kontrolle der <i>S. ratti</i> Infektion.....	47
3.3.	Aktivierung und Regulation von Mastzellen	49
3.3.1.	Antikörper-vermittelte Aktivierung von Mastzellen	49
3.3.2.	IL-9 vermittelte Mastzellaktivierung und Klärung der <i>S. ratti</i> Infektion	52
3.3.3.	Regulation von Mastzellen durch Interleukin-9 während der frühen Phase der <i>S. ratti</i> Infektion.....	55
4.	DISKUSSION	57
4.1.	Die Rolle von Mastzellen bei der Kontrolle einer <i>S. ratti</i> Infektion.....	57
4.1.1.	Funktion von Mastzellen während der frühen Phase der <i>S. ratti</i> Infektion.....	57
4.1.2.	Unterschiedliche Funktion von ctMCs und mMCs während der <i>S. ratti</i> Infektion	60
4.2.	Sind Mastzellen Effektoren oder Initiatoren der Immunantwort während der <i>S. ratti</i> Infektion?	62
4.3.	Die Effektorfunktion von Mastzellen während der <i>S. ratti</i> Infektion	64
5.	AUSBLICK.....	71

6. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT 74

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	Alpha
Ag	Antigen
APC	Allophycocyanin
AK	Antikörper
β	Beta
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropnemedizin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
γ	Gamma
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cpa3	Carboxypeptidase A3
ctMC	Bindegewebsmastzelle (<i>connective tissue mast cell</i>)
δ	Delta
DEREG	<i>Depletion of regulatory T cell</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
ε	Epsilon
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Ezym-gekoppelter Immunoabsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat

G	Gauge
g	Gramm
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinsulfonat
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
KIT	Stammzellenwachstumsfaktor-Rezeptor
L1	erstes Larvenstadium
L2	zweites Larvenstadium
L3i	infektiöses drittes Larvenstadium
M	molar
MC	Mastzelle (<i>mast cell</i>)
MC _T	humane Mastzellen, die vorwiegend Tryptasen in Granula gespeichert haben
MC _{TC}	humane Mastzellen, die Tryptasen und Chymasen in Granula gespeichert haben
Mcpt5	Mastzellprotease 5 (<i>mast cell protease 5</i>)
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minuten
mLN	mesenteriale Lymphknoten
µm	Mikrometer
mM	millimolar
mMC	mukosale Mastzelle
mMCPT-1	Maus-Mastzellprotease 1
n	Anzahl
O ₂	Sauerstoff
p	Wahrscheinlichkeit

PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PAS	<i>periodic acid</i> Schiff-Reaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphat-buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H_3O^+ -Ionen (<i>potentia hygrogenii</i>)
p.i.	nach Infektion (<i>post infectionem</i>)
RAG1	Rekombinations-Aktivierungsgen 1 (<i>recombination-activating gene 1</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (<i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCF	Stammzellenwachstumsfaktor (<i>stem cell growth factor</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
STH	<i>soil transmitted</i> Helminthen
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
Treg	regulatorische T Zelle
TZR	T Zell-Rezeptor

Danksagung

Zu Anfang möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Minka Breloer für die herzliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des spannenden Arbeitsthemas, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die unermüdliche Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Christian Lohr möchte ich für die Bereitschaft danken diese Arbeit als Gutachter zu bewerten.

Ein großer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe. Dabei besonders Marie-Luise Brunn, die mir im Labor mit Rat und Tat zu jeder Zeit zur Seite stand und Wiebke Hartmann, die ich mittlerweile eine gute Freundin ist. Wiebke, vielen lieben Dank für die vielen netten, produktiven und fachlichen Gespräche und die lustigen Kaffeepausen, als auch für das super entspannte Arbeiten nebeneinander und miteinander!

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden und meine ehemaligen Mitdoktoranden in der Arbeitsgruppe Breloer und der gesamten immunologischen Abteilung bedanken. Anna, Anna, Alex, Mele, Konny, Swantje, Irma und Julie, vielen Dank!

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich all die Jahre unterstützt und gefördert haben. Ohne euch wäre das nicht möglich gewesen. Ich liebe euch! Dank gilt auch meiner restlichen Familie, die auch in schweren Zeiten Rückhalt gegeben haben und immer für einen da sind.

Lieber Jan – „Hello“

In liebevoller Erinnerung – Micha ♥

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe bei der Erhebung der Daten keine weiteren als die angeführten Hilfsmittel oder Hilfen in Anspruch genommen und die aus anderen Quellen entnommenen Stellen oder Daten als solche gekennzeichnet.

Hamburg, den _____

Unterschrift

1. Einleitung

1.1. Gastrointestinale Nematodeninfektionen

Als Helminthen werden multizelluläre, parasitäre Würmer bezeichnet. Innerhalb der Phyla der Rundwürmer (Nematoda) und der Plattwürmer (Plathelminthes) finden sich Würmer mit parasitärer Lebensweise, welche unabhängig in beiden Phyla homolog entstanden sind. Die Plattwürmer teilen sich auf in die nicht parasitär lebenden Strudelwürmer (Tubellaria) und die parasitären Bandwürmer (Cestoda) und Saugwürmer (Trematoda). Auch innerhalb der Rundwürmer finden sich sowohl freilebende Würmer, als auch partiell und obligat parasitäre Würmer, die den Menschen, aber auch Pflanzen und Tiere befallen.

Zu den Rundwürmern zählen zum einen die Filarien (Fadenwürmer), darunter z.B. *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Loa loa* und *Onchocerca volvulus* welche die humane Filariose und Onchozerkose hervorrufen [1-3]. Zum anderen gastrointestinale Würmer, welche die größte Gruppe der Rundwürmer die den Menschen infizieren bilden. Sie infizieren ihren Wirt oftmals, wenn dieser direkten Kontakt zu kontaminierte Erde hat, weshalb sie auch als *soil-transmitted* Helminthen (STH) bezeichnet werden. Dabei kann es zu einer fäkal-oralen Übertragung kommen, z.B. durch den Verzehr von kontaminierten Pflanzen und Früchten oder aber zur direkten Infektion durch frei lebenden Larvenstadien des Nematoden, welche direkt die Haut des Wirtes penetrieren können. Zu den STH gehören folgende Gruppen an Nematoden: die Spulwürmer (z.B. *Ascaris lumbricoides*), die Peitschenwürmer (z.B. *Trichuris trichiura*), die Hakenwürmer (z.B. *Ancylostoma duodenale*), der Madenwurm (*Enterobius vermicularis*) und der Zwergfadenwurm *Strongyloides stercoralis*.

Weltweit sind ca. 2 Milliarden Menschen mit gastrointestinalen Nematoden infiziert. Besonders betroffen sind dabei Regionen mit großer Armut in Entwicklungsländern, wo der hygienische Standard teilweise sehr gering ist. Kinder und Jugendliche sind am stärksten von gastrointestinalen Nematodeninfektionen betroffen. Nach der Welt Gesundheitsorganisation kann eine Infektionen mit hoher Parasitenlast zu Unterernährung, einem beeinträchtigtem Wachstum und zu einer geistigen und intellektuellen Retardierung führen. Während der Schwangerschaft können Infektionen mit gastrointestinalen Nematoden das Risiko einer maternalen Anämie erhöhen und zu einem verringerten Geburtsgewicht und einem schlechteren Überleben des Neugeborenen führen [4]. Eine Infektion kann asymptomatisch verlaufen, aber auch zu Durchfallerkrankungen und zu abdominalen Schmerzen führen. Verbleibt sie unbehandelt so kann es zu einer chronischen Infektion kommen. Die Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen und die Beteiligung und Interaktion von Immunzellen, die zur Abstoßung bzw. zum Verbleib des Nematoden im Darm des Wirtes beitragen, kann zur Entwicklung neuer Therapien, Medikamente und Impfstoffe beitragen.

1.2. *Strongyloides ratti* als Modell für eine transiente, parasitäre, gastrointestinale Nematodeninfektion

Die Gattung *Strongyloides* umfasst 50 Spezies von obligat parasitär im Gastrointestinaltrakt von Vertebraten lebenden Nematoden, die sowohl Vögel, Reptilien, Amphibien, als auch Menschen infizieren [5]. Menschen können von zwei Arten infiziert werden, *Strongyloides stercoralis* und *Strongyloides fuelleborni*. Infektionen des Menschen mit diesen Nematoden treten meist in tropischen und subtropischen Gebieten auf [6], wobei *S. fuelleborni* meist in afrikanischen Primaten gefunden wird, welche die Infektion auf den Menschen übertragen können [7]. Der Lebenszyklus von *Strongyloides* ist komplex und umfasst neben parasitären Stadien auch eine freilebende, adulte Generation. Ein Wirt infiziert sich mit *Strongyloides*, indem sich die infektiöse dritte Larve (L3i) in die Haut bohrt. Diese wandert durch das Gewebe und die Lunge bis hin zum Rachen, wo sie verschluckt wird und ihr eigentliches Ziel, den Darm erreicht. Die dritte Larve (L3) häutet sich dort über ein viertes Larvenstadium hin zum adulten Weibchen, welches sich in der Mukosa des Darms einbettet und über mitotische Parthenogenese vermehrt [5, 8, 9]. Eier und bereits geschlüpfte erste Larven (L1) werden dann mit dem Stuhl des Wirtes ausgeschieden. Außerhalb des Wirtes können sich die L1 zum einen direkt zu L3i entwickeln (ungeschlechtliche Entwicklung), oder aber sie häuten sich über drei weitere Larvenstadien hin zum freilebenden adulten Männchen oder Weibchen, welche sich geschlechtlich fortpflanzen (geschlechtliche Entwicklung). Das Geschlecht der Würmer wird dabei schon bei der Produktion der Eier im parasitären Weibchen getroffen und beruht auf einem XX/X0, Weibchen/Männchen Geschlechtschromosomensystem. Dabei verliert das Männchen bei der mitotischen Parthenogenese ein X Chromosom und trägt somit ein X Chromosom weniger als das Weibchen [10]. Somit produzieren die parasitären Weibchen im Darm XX tragende weibliche und X0 tragende männliche Larven. Die männlichen Larven entwickeln sich außerhalb des Wirtes ausschließlich in männliche, adulte Würmer, wohingegen die weiblichen Larven sich, abhängig von Umweltfaktoren, entweder direkt zur infektiösen dritten Larve entwickeln oder aber zum freilebenden adulten Weibchen heranwachsen. Bei hohen Temperaturen im Boden und in der Umwelt entwickeln sich weibliche Larven vermehrt zu adulten Weibchen [11]. Neben äußeren Umweltfaktoren hat auch die etablierte anti-*S. ratti* Immunantwort des Wirtes einen Einfluss auf die Entwicklung der freilebenden Generation [12, 13]. So führt der Immundruck zu einer verstärkten Entwicklung von adulten, freilebenden Männchen und Weibchen, die sich geschlechtlich fortpflanzen und Eier produzieren. Aus den Eiern schlüpfen L1, welche sich über zwei weitere Larvenstadien zu L3i entwickeln. L3i sind sehr widerstandsfähig und können für längere Zeit in der Umwelt überleben bevor sie einen neuen Wirt infizieren [5].

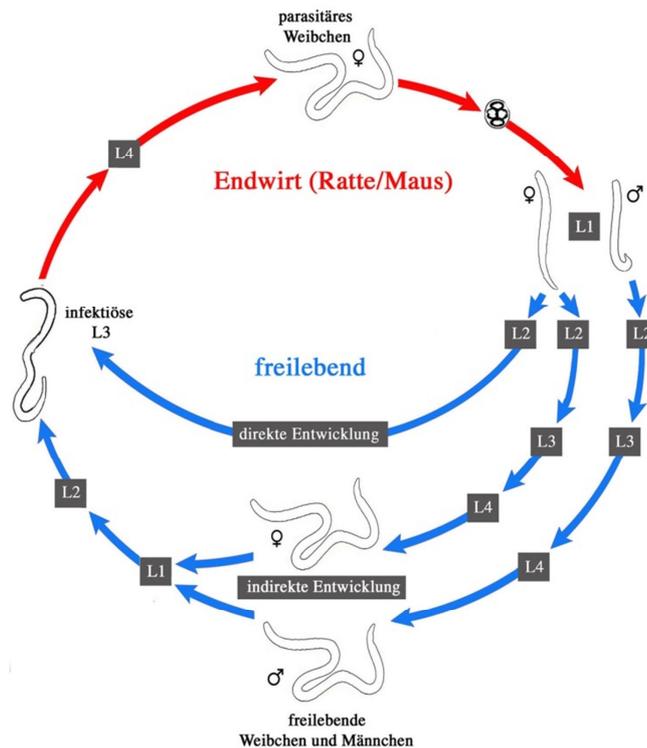


Abb.1.1. *S. ratti* Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *Strongyloides* ist komplex und umfasst neben parasitären Stadien auch eine frei-lebende, adulte Generation, die sich geschlechtlich fortpflanzt. Die infektiöse dritte Larve (L3i) bohrt sich in die Haut des Wirtes und wandert durch das Gewebe und die Lunge zum Rachen. Sie wird verschluckt und erreicht den Darm, wo sich die Larve über ein weiteres Larvenstadium zum parasitären Weibchen häutet, welches eingebettet im Mukus des Darms und zwischen den Epithelzellen verbleibt und sich über mitotische Parthenogenese vermehrt. Eier und geschlüpfte erste Larven werden mit dem Stuhl des Wirtes ausgeschieden wo sich die Larven zum einen direkt zu L3i entwickeln, oder aber sie häuten sich über drei weitere Larvenstadien hin zum adulten Männchen oder Weibchen, welche sich dann geschlechtlich fortpflanzen und Eier und L1 produzieren, die sich wiederum zu L3i entwickeln [14-16].

1.3. Immunantwort der Maus gegen eine *Strongyloides* Infektion

Der humanpathogene *S. stercoralis* kann in Mäusen keine patente Infektion etablieren. Die infektiösen dritten Larven im Gewebe gelangen nicht in den Darm um sich zum adulten Weibchen zu entwickeln [17]. Um die Immunantwort im Darm zu analysieren wurde die rattenspezifische Spezies *S. ratti*, als auch die nah verwandte Spezies *S. venezuelensis* verwendet [18, 19]. Beide Spezies können BALB/c und C57BL/6 Mäuse patent infizieren, ihren Lebenszyklus beenden und sich vermehren. Infektionen mit *S. ratti* und *S. venezuelensis* werden in immunkompetenten Mäusen innerhalb von vier Wochen beendet [16, 19]. In Mäusen wird dabei eine Typ 2 Immunantwort ausgelöst, welche gekennzeichnet ist durch die Produktion von Zytokinen wie Interleukin (IL) -13, IL-4, IL-5, IL-3, IL-9 und IL-10, als auch durch die Induktion von Parasit-spezifischen Immunglobulinen (Ig), vor allem IgM und IgG [20-22]. Eine erfolgreich beendete Infektion hinterlässt eine Teil-Resistenz gegenüber einer zweiten Infektion, bei der über 90% der infektiösen Larven im Gewebe effizient abgetötet werden und nur vereinzelte

Larven den Darm erreichen und sich dort zu adulten Weibchen entwickeln [16, 18]. Trotz der fehlenden gastrointestinalen Phase konnte das *S. stercoralis* Modell verwendet werden, um die Immunantwort gegenüber den Larven im Gewebe zu analysieren [23]. Diese Studien zeigen, dass die Larven im Gewebe durch Komplement und natürliche Antikörper opsoniert und durch eosinophile und neutrophile Granulozyten attackiert und getötet werden [16, 22, 24-27]. IL-5 ist dabei ein wichtiges Zytokin in der Immunantwort gegen *Strongyloides spp.* [28-30] und rekrutiert während einer Infektion eosinophile Granulozyten (Eosinophile) in der Haut, in die Lunge und in den Darm [28, 31-33]. Dabei unterstützen Eosinophile die neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) bei der Tötung der Larven in der Haut und dienen zudem als Antigen-präsentierende Zellen, welche die Zytokinproduktion in CD4⁺ T Zellen stimulieren [24, 34-36]. In der Haut können sie aber auch selbst über die Produktion von MBP (*major basic protein*) und ECP (*eosinophil cationic protein*) Larven töten [36, 37]. Neutrophile werden in der Haut über den Chemokinrezeptor CXCR2 und das Protein Gai2 rekrutiert, setzen Larven über extrazelluläre DNA-Netze (sogenannte NET's) fest und töten die Larven über einen Toll-like Rezeptor (TLR) 4 und Myeloperoxidase abhängigen Mechanismus [24, 25, 36, 38, 39]. Auch Makrophagen sind an der Tötung der Larven im Gewebe beteiligt [24].

Neben der Bekämpfung der migrierenden Larven im Gewebe ist die Immunantwort im Darm für die Expulsion des adulten Wurms und für die Terminierung der Infektion essentiell. Jedoch ist über die gastrointestinale Immunantwort gegen *Strongyloides* wesentlich weniger bekannt. Einige Hinweise lassen vermuten, dass Mastzellen die Abstoßung der Parasiten aus dem Darm fördern. IL-3 ist dabei ein zentrales Zytokin für die Expansion und Aktivierung von Mastzellen [40]. Die Administration von IL-3 führt zu einer gesteigerten Anzahl an Mastzellen im Darm und zu einer Reduzierung der Parasitenlast [41, 42]. Die reziproke Abwesenheit in IL-3 defizienten Mäusen führt zu einer verringerten Anzahl an Mastzellen und basophilen Granulozyten (Basophilen) und zu einer verzögerten Terminierung der *S. venezuelensis* Infektion [43]. Neben IL-3 führt auch die Administration des Zytokins IL-9, welches ebenfalls Mastzellen aktivieren kann, zu einer verringerten Parasitenlast; die Neutralisierung von IL-9 mittels Antikörpern führt zu einer Erhöhung der Parasitenlast [20]. KIT-mutante Mäuse, die trotz der im Folgenden erläuterten Probleme als Mausmodell für Mastzelldefizienz benutzt werden, zeigen ebenfalls eine verzögerte Expulsion von adulten *S. rattii* und *S. venezuelensis* Weibchen aus dem Darm [44, 45].

1.4. Mastzellen

1.4.1. Mastzellentwicklung

Der Mediziner Paul Ehrlich beschrieb 1878 zum ersten Mal die bis dahin unbekanntesten Mastzellen in seiner Doktorarbeit, welche er mit Hilfe von basischen Anilinfarbstoffen in humanem Gewebe anfärben konnte. Mastzellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen. Sie zirkulieren als undifferenzierte Vorläuferzellen in der Blutbahn und differenzieren sich erst bei der Einwanderung ins Gewebe aus [46, 47]. Ausdifferenzierte Mastzellen finden sich in Wirbeltieren in vielen Geweben, meist sind sie aber in der Nähe von Oberflächen zur Außenwelt lokalisiert, was ihnen ermöglicht schon früh und direkt mit eindringenden Pathogenen, Allergenen, Toxinen und anderen Umweltantigenen in Kontakt zu kommen. Die wichtigsten Wachstumsfaktoren für Mastzellen *in vivo* im Mausmodell sind IL-3 und der Stammzellenwachstumsfaktor (*stem-cell growth factor*) SCF auch KIT-Ligand genannt [48, 49]. Ein Defekt in diesem Faktor oder in seinem Rezeptor, der Rezeptor Tyrosinkinase KIT (KIT – *stem-cell growth factor receptor*) führt zur Reduktion der Mastzellpopulation bzw. zu einer Mastzelldefizienz (siehe 1.5.) [49].

In Mäusen wie auch in Menschen können zwei Arten von Mastzellen unterschieden werden. Die Unterscheidung beruht dabei zum einen auf der Lokalisierung innerhalb des Gewebes und zum anderen auf der Speicherung von Mastzell-assoziierten Proteoglykanen, Serinproteasen (Chymasen; Tryptasen) und anderen Enzymen. Mukosale Mastzellen in der Maus sind, wie der Name impliziert, in mukosalen Geweben z.B. von Darm und Lunge zu finden und zeichnen sich durch die geringe Speicherung von Histamin und die hohe Expression von Maus-Mastzellprotease 1 (mMCPT-1) aus. mMCPT-1 ist eine Chymase und im Mausmodell spezifisch für mukosale Mastzellen [50]. Ihre Freisetzung kann als Aktivierungsmarker für mukosale Mastzellen verwendet werden. Im Bindegewebe, in der Haut, in der Nähe von Muskeln, Nerven, Gefäßen und in Körperhöhlen wie der Peritonealhöhle oder der Pleurahöhle finden sich in Mäusen Bindegewebsmastzellen, die Heparin und hohe Mengen an Histamin gespeichert haben und im Gegensatz zu mukosalen Mastzellen, welche nur Chymasen exprimieren zusätzlich auch Tryptasen gespeichert haben [51]. Im Menschen finden sich Mastzellen, die zum einen vorwiegend Tryptasen in den Granula gespeichert haben und vermehrt in mukosalen Geweben lokalisiert sind. Diese Mastzellen werden als MC_T bezeichnet. Zum anderen finden sich MC_{TC}, welche Tryptasen, und Chymasen gespeichert haben [52].

1.4.2. Aktivierung von Mastzellen

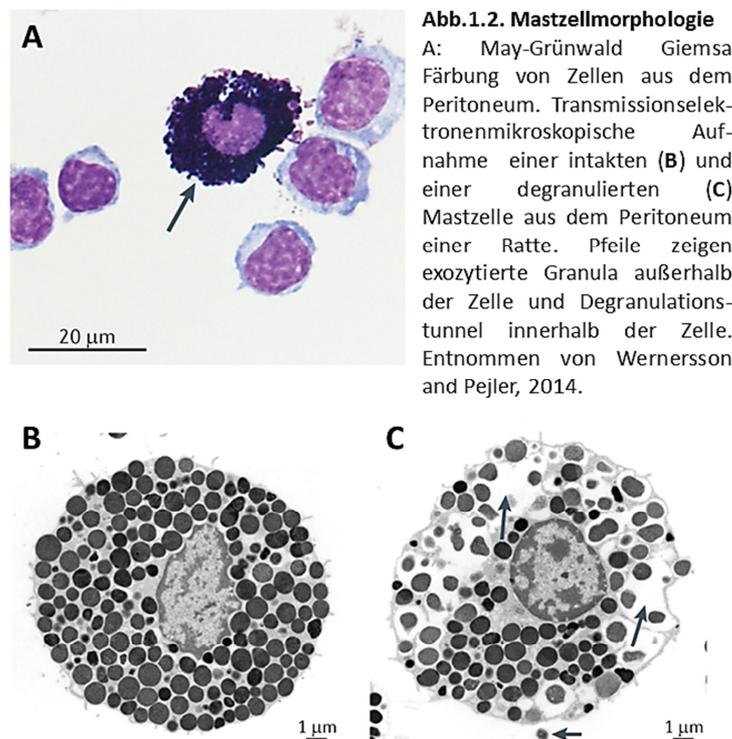
Durch ihre Lokalisierung an den Grenzflächen des Körpers zur Außenwelt sind Mastzellen eine der ersten Zellpopulationen, die eintretende Pathogene wahrnehmen und auf diese reagieren können. Ermöglicht wird diese Erkennung durch die Expression von unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren. So exprimieren Mastzellen z.B. Toll-like Rezeptoren (TLR), welche durch konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (*pathogen associated molecular pattern*: PAMP) aktiviert werden können. Mastzellen können somit Pathogene direkt erkennen. Dabei kann die TLR-Bindung zu unterschiedlichen Aktivierungsmustern der Mastzelle führen. So kommt es bei der Stimulation von TLR-4 durch Lipopolysaccharide vermehrt zur Zytokinproduktion und deren selektiven Freisetzung, jedoch nicht zu einer vollständigen Degranulation. Die Aktivierung von TLR-2 durch Peptidoglykane führt aber sowohl zur Degranulation, als auch zur Zytokinfreisetzung [53]. Neben TLRs besitzen Mastzellen auch Komplementrezeptoren, die Mastzellen aktivieren können und auch im Menschen für die Chemotaxis von Mastzellen hin zu den Anaphylatoxinen C3a und C5a dienen. Diese werden bei der Komplementaktivierung des unspezifischen Immunsystems freigesetzt und haben eine entzündliche Wirkung [54, 55]. Weitere endogene Entzündungsfaktoren, wie Neurotensin, Substanz P und Endothelin 1 können über die Bindung an ihre Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche zur Freisetzung von Mastzellmediatoren führen [56, 57]. Mastzellen degranulieren auch durch Stimuli, die nicht direkt durch ein Pathogen verursacht werden. Dazu zählen z.B. Komponenten des Wespengiftes oder des Mosquitospeichels [58, 59]. Der wohl bekannteste und wichtigste Aktivierungsweg für Mastzellen ist die Kreuzvernetzung von hoch affinen Fcε Rezeptoren (FcεRI) auf der Mastzelloberfläche durch IgE gebundenes Antigen. Diese Art der Aktivierung die meist zur vollständigen Degranulation der Mastzelle führt wurde detailliert im Allergie- und Asthmamodell charakterisiert [60, 61]. Die IgE vermittelte Mastzellaktivierung führt auch bei Infektionen mit parasitären Nematoden zu einer verbesserten Klärung der Infektion [62]. Neben dem FcεRI besitzen Mastzellen auch Fcγ Rezeptoren über die IgG gebunden und Mastzellen aktiviert und inhibiert werden können [63, 64]. Mastzellen können ebenfalls durch bakterielle Superantigene, welche durch unterschiedliche Antikörperklassen gebunden werden und an Fc-Rezeptoren binden aktiviert werden [65]. Des Weiteren besitzen Mastzellen Chemokinrezeptoren die zur Chemotaxis dienen und können über Zytokinrezeptoren, wie den IL-3 Rezeptor aktiviert und expandiert werden [42, 66-68].

Die Aktivierung von Mastzellen kann sowohl zur vollständigen Degranulation innerhalb von Sekunden bis Minuten, aber auch zur partiellen Sekretion und *de novo* Synthese von spezifischen Mediatoren führen [69]. Die Degranulation kann dabei auf zwei Weisen erfolgen. Zum einen

durch die klassische anaphylaktische Degranulation, bei der Mastzellen alle ihre Granula auf einmal freisetzen, oder aber es tritt eine partielle Degranulation auf, bei der der Inhalt der Granula nach und nach sekretiert wird. Jede Mastzelle hat die Möglichkeit ihre Granula erneut aufzubauen und erneut zu degranulieren [70]. Die wiederholte Degranulation bestimmt in vielen Fällen die Schwere der Pathologie bei Erkrankungen, bei der die Mastzellantwort einen proinflammatorischen Effekt hat.

1.4.3. Funktion von Mastzellen

Mastzellen können sowohl während der angeborenen, als auch während der adaptiven Immunantwort als Effektorzellen fungieren. Neben dem Töten von Pathogenen zählen die Rekrutierung von weiteren Immunzellen zur Infektionsstelle, die Degradierung von toxischen Peptiden und Giftbestandteilen und die Gewebshomöostase zu den Aufgaben von Mastzellen [71, 72]. Ermöglicht wird dieses breite Spektrum an Funktionen durch die Speicherung von einer Vielzahl an Mediatoren in den Mastzellgranula [73]. Dabei werden die Enzyme und Stoffe innerhalb der Granula in ihrer aktiven Form gespeichert. Als wichtiges „Speichergerüst“



innerhalb der Granula dienen dabei anionische Proteoglykane, wie Heparin oder Chondroitinsulfate vom Seryglycin-Typ. Diese sind auch ursächlich für das metachromatische Färbeverhalten der Mastzellen mit kationischen Farbstoffen. Unter den gespeicherten Molekülen

finde sich biogene Amine, wie der Neurotransmitter Serotonin oder auch Histamin. Die Ausschüttung von Histamin führt zur Bronchokonstriktion, einer Vasodilatation und zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität [74]. Zusätzlich sind lysosomale Enzyme wie die β -Hexosaminidase und Cathepsine in den Granula gespeichert. Die genaue Funktion dieser Enzyme ist bis auf die mögliche Beteiligung an lysosomalen Degradierungsprozessen noch nicht geklärt. Mastzellen speichern in ihren Granula auch eine Vielzahl an Zytokinen, wie IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 und TNF- α , welches ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort ist, da es zur Rekrutierung, Aktivierung und der Verstärkung der Antigenpräsentation von dendritischen Zellen (DCs) führt [75, 76]. Neben regulatorischen Zytokinen wie TGF- β (*transforming growth factor β*) speichern Mastzellen auch Wachstumsfaktoren, wie VEGF (*vascular epidermal growth factor*). Der Hauptteil an gespeicherten Mediatoren sind aber Proteasen. Darunter finden sich Mastzell-spezifische Proteasen, wie Trypsasen, Chymasen und die Carboxypeptidase A3, aber auch Mastzell-unspezifische Proteasen, wie Granzym B oder die Metalloproteinase 9 [73]. Neben der Speicherung von aktiven Mediatoren kommt es nach Aktivierung durch den Fc ϵ RI oder KIT zu einer schnellen Synthese von inflammatorischen Lipiden, darunter Prostaglandine, Leukotriene und den Blutplättchen-aktivierenden Faktor [77]. Diese Lipide erhöhen die mikrovaskuläre Permeabilität und führen zu einer langanhaltenden Quaddel-Erythem-Reaktion der Haut und zur Bronchokonstriktion in der Lunge während allergischer Reaktionen [78].

Mastzellen können mit Neuronen interagieren. Dabei beeinflusst die Freisetzung von Histamin, Serotonin und Trypsasen die Aktivität von sensorischen Neuronen und reziprok können Mediatoren, die durch Neurone freigesetzt werden (Substanz-P, Endothelin-1), Mastzellen aktivieren [79, 80]. Innerhalb des Darms z.B. reguliert die Interaktion von Neuronen und Mastzellen den Ionentransport und die sekretorische Aktivität des Epithels, die vaskuläre Permeabilität und die intestinale Motilität [81]. Mastzellen speichern und setzen zudem Enzyme frei, welche die giftige Wirkung von Skorpionen-, Schlangen- und Honigbienengift reduzieren, indem sie diese proteolytisch abbauen [82, 83]. Da Mastzellen vorwiegend an Grenzflächen zur Außenwelt lokalisiert sind, nehmen sie die Rolle eines „Wächters“ ein, der eindringende Pathogene sofort erkennen und abwehren kann. Es wurde gezeigt, dass Mastzellen an der Bekämpfung von Bakterien direkt, durch Phagozytose des Pathogens oder indirekt, durch die Freisetzung antimikrobieller Peptide beteiligt sind [84, 85]. Neben der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen tragen Mastzellen auch zur Bekämpfung von intrazellulären Protozoen wie *Toxoplasma gondii* und zur Expulsion von intestinalen Helminthen bei [86, 87]. Obwohl Mastzellen von einigen Viren infiziert werden können, darunter HIV, CMV und Dengue Virus, konnte bisher noch keine protektive Wirkung von Mastzellen während einer viralen Infektion festgestellt werden [88].

Die gleichen Charakteristika, welche Mastzellen ermöglichen auf unterschiedliche Umwelteinflüsse (Gewebszerstörung, Infektion) zu reagieren und Mediatoren zum Schutz freizusetzen, können durch eine Fehlregulation auch zur Schädigung des Wirtes führen. Dabei sind Mastzellen besonders bekannt für ihre Beteiligung an der IgE-vermittelten Typ I Hypersensitivitätsreaktion, wie sie bei Allergie und allergischem Asthma auftritt. Dabei führt die Aktivierung von Mastzellen in der akuten Phase zur Freisetzung von Mediatoren die zur Pathologie beitragen, darunter die Erhöhung der vaskulären Permeabilität, die Kontraktion der glatten Muskulatur und die Induktion der Mukussekretion [89]. Die Anaphylaxie ist dabei das klassische Beispiel für eine allergische Akutreaktion.

Bisher wurde angenommen, dass Mastzellen an jedem Schritt der Wundheilung beteiligt sind [90, 91]. Sowohl an der Initiierung der Entzündungsantwort, welche gefolgt wird vom erneuten Wachstum von Epithel und Gefäßen innerhalb des geschädigten Gewebes, bis hin zur finalen Kollagenablagerung. Neuer Studien widerlegen diese Beteiligung aber [92]. Auch die Beteiligung von Mastzellen an Autoimmunerkrankungen [93-95], der Entstehung von Tumoren und kardiovaskulären Erkrankungen [96, 97] und der Regulation und Modulation einer adaptiven Immunantwort [71, 98], wird mittlerweile kontrovers diskutiert, da diese Beobachtungen zumeist mit KIT-mutanten Mausmodellen gemacht wurden, bei denen ein beobachtetes Phänotyp nicht unbedingt auf das alleinige Fehlen von Mastzellen zurückgeführt werden kann [99]. Zudem konnten neuere Studien mit neu generierten mastzelldefizienten Mausmodellen, wie in Abschnitt 1.5. weiter dargestellt, z.B. die Beteiligung von Mastzellen an Autoimmunerkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis und der experimentellen Encephalomyelitis (das Mausmodell der humanen Erkrankung Multiple Sklerose) widerlegen [93].

Die Unterdrückung der Mastzellaktivierung, die zu einer Schädigung des Körper führt, wird heutzutage als Therapie für die Behandlung von Allergien angewendet [100-102]. Auf der anderen Seite ist es aber auch vorstellbar, dass eine Verstärkung der Mastzellaktivität auch von Nutzen sein kann, besonders in Bezug auf eine unterstützende Funktion von Mastzellen bei der Etablierung einer adaptiven, schützenden Immunantwort. Durch die Erhöhung der Mastzellaktivität könnte ein adjuvantiver Effekt erreicht werden [103].

1.5. Mastzelldefiziente Mausstämme

Zur Analyse der Funktion von Mastzellen im Immunsystem wurden bisher Mäuse verwendet, die verschiedene Defekte in KIT, dem Rezeptor für den Stammzellenwachstumsfaktor besitzen, welcher eine Rezeptortyrosinkinase vom Typ III ist [49, 104, 105]. Diese Mäuse werden auch als KIT-mutante Mäuse bezeichnet. In den bisherigen Studien wurden vor allem WBB6F₁-*Kit*^{W/W-v}

und C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh} Mäuse verwendet. Dabei beschreibt *Kit*^W eine Punktmutation welche dazu führt, dass KIT nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Bei der *W-v* Mutante ist die Kinaseaktivität des Rezeptors eingeschränkt und *Kit*^{W-sh} Mäuse besitzen eine Inversionsmutation in regulatorischen Elementen des Transkriptionsstarts des *c-kit* Gens [104, 106, 107]. Probleme dieser Mäuse sind zum einen der teilweise nicht reine genetische Hintergrund (WBB6F₁) und zum anderen die Expression von KIT. Denn KIT wird sowohl auf hämatopoetischen Vorläuferzellen der myeloiden und lymphoiden Reihe, als auch außerhalb des hämatopoetischen Systems, z.B. auf Melanozyten exprimiert [108]. Innerhalb des Immunsystems ist KIT ein wichtiger Wachstumsfaktor, welcher vorwiegend in der frühen Phase der Differenzierung der myeloiden und lymphoiden Vorläuferimmunzellen exprimiert wird und bei Ausdifferenzierung der Immunzelle zurückgeht. Auf Mastzellen ist KIT aber während der gesamten Entwicklung wichtig [109, 110]. Die Tatsache, dass KIT nicht exklusiv auf der Mastzelloberfläche exprimiert wird führt dazu, dass diese Mausmodelle, neben der Mastzelldefizienz, auch andere immunologisch relevante und nicht immunologische Beeinträchtigungen aufweisen. Dazu zählen eine veränderte Anzahl an Neutrophilen und Basophilen [111-113], Anämie und Sterilität [114, 115], als auch eine beeinträchtigte T-Zell Entwicklung im Thymus [116], vermehrt T-Zellrezeptor (TZR) $\alpha\beta$ im Gegensatz zu TZR $\gamma\delta$ tragende intraepitheliale T-Zellen im Darm [117] und eine Defizienz der interstitiellen Cajalzellen im Darm, welche für die Peristaltik des Darms wichtig sind [114].

Da KIT-mutante Mäuse also zahlreiche andere Defekte aufweisen kann ihr Phänotyp in Infektionsmodellen nicht eindeutig auf die Mastzelldefizienz zurückgeführt werden. Deswegen wurden in den vergangenen Jahren neue, KIT-unabhängige mastzelldefiziente Mausstämme generiert. Zu diesen zählt die *Cpa3*^{Cre} Maus [93]. Diese exprimiert die CRE-Rekombinase unter Kontrolle des Promoters der Mastzell-assoziierten Carboxypeptidase A3 (*Cpa3*) mit einhergehender Deletion der ersten 28 Nukleotide des ersten Exons des *Cpa3* Gens. Die heterozygote Expression der Rekombinase allein führt dabei bereits zum Tod der Mastzellen und einem vollständigen Fehlen, sowohl von mukosalen Mastzellen (mMCs), als auch von Bindegewebsmastzellen (ctMCs). Da *Cpa3* auch in Basophilen exprimiert wird zeigen diese mastzelldefizienten Mäuse auch eine 60%ige Reduktion an Basophilen in der Milz [93]. Studien mit diesen Mäusen reproduzierten die Mastzellabhängigkeit der IgE-vermittelten systemischen und lokalen passiven Anaphylaxie und den Einfluss von Mastzellen bei der Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion, die durch KIT-mutante Modelle angenommen wurde [93, 118]. Andere, aufgrund der KIT-mutanten Modelle angenommenen Mastzellfunktionen wurden jedoch widerlegt. So zeigte sich bei der Analyse dieser Mäuse, dass Mastzellen keine Rolle bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis und der autoimmunen Arthritis spielen, Mastzellen nicht an der allgemeinen Wundheilung beteiligt sind und auch nicht vor Übergewicht

und Insulinresistenz schützen [92, 93, 119]. Auch die Beteiligung von Mastzellen an der Pathologie des postoperativen Ileus konnte nicht bestätigt werden [120]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Funktion von Mastzellen während entzündlicher Erkrankungen und Infektionen noch nicht vollständig geklärt ist.

Ein Modell für die spezifische Defizienz von ctMCs konnten Dudeck *et al.* mit der *Mcpt5^{Cre}* R-DTA Maus generieren. Dieser Maus fehlen konstitutiv nur die Bindegewebsmastzellen, sie besitzt aber eine normale Anzahl an mukosalen Mastzellen. Zur Generierung dieses Phänotyps wird ein Mausstamm, der die CRE Rekombinase unter Kontrolle des Mastzellprotease 5 (*Mcpt5*) Promotors exprimiert mit einem Mausstamm gekreuzt, der das Gen für die α -Kette des Diphtheriatoxins A (DTA) im Genom trägt. Dieses Gen besitzt in 5'Richtung ein Stoppcodon, welches von *loxP*-Seiten flankiert ist. Solange dieses Stoppcodon vorhanden ist kann das Gen für die α -Kette des Diphtheriatoxins A nicht exprimiert werden. Die Expression der CRE Rekombinase unter Kontrolle des *Mcpt5* Promotors führt dazu, dass in allen Zellen, die *Mcpt5* exprimieren, die Rekombinase, aufgrund der *loxP*-Seiten, das Stoppcodon entfernt und so das Toxin exprimiert werden kann. Dies führt zum Tod der Zelle. Da *Mcpt5* nicht in mukosalen Mastzellen exprimiert wird, sondern nur in Bindegewebsmastzellen, also in Mastzellen in der Haut und im Peritoneum, fehlen dieser Maus konstitutiv Bindegewebsmastzellen [118]. Der Vergleich dieses Mausstamms mit dem komplett mastzelldefizienten Mausstamm (*Cpa3^{Cre}*) gibt Aufschluss über die unterschiedlichen Rollen von mukosalen Mastzellen und Bindegewebsmastzellen.

1.6. Ziel der Arbeit

Strongyloides ratti ist ein parasitärer Nematode der Ratten und Mäuse infizieren kann. *S. ratti* eignet sich als Modell für eine parasitäre, gastrointestinale Nematodeninfektion, die von einem intakten Immunsystem erfolgreich kontrolliert und beendet werden kann. Bei der Infektion penetriert er aktiv die Haut des Wirtes und wandert durch das Gewebe hin zum Kopf und letztendlich in den Mund. Dort wird er verschluckt und gelangt an seinen eigentlichen Zielort den Darm. Die Bekämpfung des Nematoden durch das Immunsystem findet während der Wanderung im Gewebe und im Darm statt. Die Rolle von Mastzellen in der Bekämpfung des Wurms wurde bisher ausschließlich mit Hilfe von KIT-abhängigen Mausmodellen analysiert. Aufgrund eines Defektes in der Rezeptor Tyrosinkinase KIT besitzen diese Mäuse keine Mastzellen. Da sich der Defekt jedoch, wie oben ausgeführt, nicht nur auf die Mastzelldefizienz der Mäuse beschränkt, sondern diese auch andere immunologisch relevante Einschränkungen aufweisen, kann ein in diesen Mäusen beobachtetes Phänomen nicht unbedingt nur auf die Mastzelldefizienz zurückgeführt werden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb die Rolle von Mastzellen während der Immunantwort auf eine Infektion mit *S. rattii* mit Hilfe neuer, KIT-unabhängiger Mausmodelle zu analysieren. Dabei sollte die Funktion von Mastzellen bei der Abwehr der Larven im Gewebe und von adulten Weibchen im Darm neu geprüft werden. Zusätzlich sollte die Rolle von ctMCs von der Funktion von mMCs während der *S. rattii* Infektion abgegrenzt werden. Schließlich sollten die Mechanismen und die Regulation der Mastzellaktivierung genauer analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Inkubatoren: CO ₂ -Inkubator für Zellkultur	New Brunswick Scientific, Nijmegen, Niederlande
für <i>S. ratti</i> Kultur / Darminkubation	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Digitalwaage	Kern & Söhne, Albersatdt, Deutschland OHAUS, Parsippany, USA
Durchflusszytometer „LSR II“	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
ELISA-Reader (MRX II)	Dynex Technologies, Berlin, Deutschland
γ -Bestrahlungsanlage Geldokumentationsanlagen	STS GmbH, Braunschweig, Deutschland Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Kühl- und Gefrieranlage	Liebherr-Hausgeräte, Rostock, Deutschland
Lichtmikroskop	Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
PCR-Cycler Px2 Thermal Cycler	Thermo Scientific, Wilmington, USA
pH-Meter (WTW pH 537)	Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer 2NanoDrop2000c“	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Pipetten: Einkanal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Gilson, Middleton, USA
Mehrkanal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

elektronisch programmierbare	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe „accu-jet pro“	Brand, Wertheim, Deutschland
Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH , München, Deutschland
RT-Cycler Corbett Rotor-Gene 6000	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Schüttler (für ELISA-Platten)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Sterilwerkbank „Lamin Air HB 2448“	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserdeionisierungsanlage	TKA GmbH, Niederelbert, Deutschland
Zentrifugen:	
Megafuge 2.0R	Heraeus-Sepatech, Hanau, Deutschland
Multifuge 1 L-R	Heraeus-Sepatech, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühl-Tischzentrifuge 1-15K	Sigma, Osterode am Harz, Deutschland

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Steril bezogenen Materialien sind mit * gekennzeichnet.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blutlanzetten*	Megro GmbH, Wesel, Deutschland
Chirurgische Einmalskalpelle*	Braun, Melsungen, Deutschland
Durchflusszytometrierröhrchen (5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
EDTA-Röhrchen	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland
ELISA 96-Lochplatten „Microlon“	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Glaspipetten (5 mL, 10 mL, 20 mL)*	Brand, Wertheim, Deutschland
Handschuhe	
Kanülen*	Braun, Melsungen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 100 µm)	Brandt, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1 mL);	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

gestopft	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schottflaschen	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Spritzen* (1 mL, 5 mL, 20 mL)	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilfiltergefäße „Stericup“*	Millipore, Bredford, USA
Zellkulturplatten* (96-Loch Rundboden)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellsiebe* „Cell Strainer“ (70 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Reagenz	Hersteller
Baytril	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Diphtherietoxin (DT)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Gentamycin	PAA, Linz, Österreich
HEPES	PAA, Linz, Österreich
Hot Star Taq Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Incidin Liquid	Ecolab, Düsseldorf, Deutschland
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA, Linz, Österreich
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
RPMI 1640-Kulturmedium ohne L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Streptavidin-HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Tetramethylbenzidin (TMB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

2.1.4. Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Die Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Für die Zellkultur wurden hitzeunempfindliche Lösungen autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min) und hitzeempfindliche Lösungen steril filtriert (Porengröße 0,22 µm). Die Inaktivierung von Komplementfaktoren im FCS erfolgte durch Erhitzen auf 56 °C für 30 min. Bis zur Verwendung wurde das FCS aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Lösungen für ELISA:

Blockpuffer	1 % (w/v) BSA in 1x PBS
Diluent	0,1 % BSA in 1x PBS
Stopplösung	2 M H ₂ SO ₄
Substratlösung	12 mL Substratpuffer 200 µL TMB-Lösung 1,2 µL H ₂ O ₂ (30%)
Substratpuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5,5
TMB-Lösung	6 mg Tetramethylbenzidin (TMB) In 1 mL DMSO
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in 1x PBS

Lösungen für die Zellkultur und Durchflusszytometrie:

Erythrozytenlysepuffer	10% Tris/HCl (0,1 M, pH 7,5) 90% NH ₄ Cl (0,16 M)
FACS-Puffer	1% FCS 0,1 % Natriumazid In 1x PBS
PBS (20x)	160 g NaCl 23,2 g Na ₂ HPO ₄ 4 g KH ₂ PO ₄ 4g KCl Ad 1 L Aqua dest. → autoklavieren
PBS/Pen/Strep	1 L 1x PBS Pen/Strep in 1x Endkonzentration hinzugeben

RPMI-Vollmedium	500 mL RPMI 1640 25 mL FCS 5 mL 1 M HEPES 5 mL L-Glutamin (200 mM) 2,5 mL Gentamycin (10 mg/mL)
Trypanblaulösung	2% Trypanblau In 1x PBS
Gewebelysepuffer	20 mL 1M Tris pH 8,5 (autoklaviert) 4 mL 10% SDS 40 mL M NaCl (autoklaviert) Ad 200 mL Aqua dest. → aliquotiert und bei -20°C lagern bei Verwendung Proteinase K hinzugeben (100 µg/mL Endkonz.)
TBE (10x)	216 g Tris Base 110 g Borsäure 12,6125 Na ₂ EDTA (bzw. 80 mL 0,5M EDTA pH 8,0) Ad 2 L Aqua dest. → autoklavieren
1M NaCl-Lsg.	58,44 g NaCl Ad 1 L Aqua dest.
1M KOH	56,1 g KOH Ad 1 L Aqua dest.
1M Tris-Lösung	121,14 g Tris-Base Ad 1 L Aqua dest. → autoklavieren

2.1.5. Antikörper

IgG1, IgG2b, IgM Antikörper für Immunoglobulin-ELISAs waren alle anti-Maus und HRP-konjugiert und wurden von Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

2.1.6. Oligonukleotide

S. ratt 28S RNA Primer:

StroS2 5'-TTAGAGTCGTGTTGCTTGGAA
StroAS1 5'-GTGCAACTGGCTCTGTATGC

Cpa3^{Cre} Primer:

Cpa3 common 5'-GGACTGTTTCATCCCCAGGAACC
CpaA3 Wt 5'-CTGGCGTGCTTTTCATTCTGG
Cpa3 KI 5'-GTCCGGACACGCTGAACTTG

Mcpt5^{Cre} Primer:

Mcpt5 Cre for 5'-ACAGTGGTATTCCCGGGGAGTGT
 Mcpt5 Cre rev 5'-GTCAGTGC GTTCAAAGGCCA
 Mcpt5-Ex1D03 5'-TGAGAAGGGCTATGAGTCCCA

Rosa-DTA Primer:

ROSA26-UP 5'-CCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC
 R26stopD01 5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
 ROSA26-D02 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG

2.1.7. Kits

Mouse MCPT-1 ELISA Ready-SET-Go! [®] Kit	Affymetrix eBioscience, Frankfurt
DuoSet [®] ELISA-Kits	R&D Systems
Foxp3 staining Kit	Affymetrix eBioscience, Frankfurt
Mouse IgE ELISA Set	BD OptEIA [™]

2.1.8. Tiere und Parasiten

Mausstamm und Ratten	Beschreibung	Herkunft
C57BL/6J (H-2^b)		Zucht im BNITM, Hamburg Charles River, Sulzfeld
BALB/c (H-2^d)		Zucht im BNITM, Hamburg Charles River, Sulzfeld
C57BL/6 Cpa3^{Cre}	transgene, heterozygote Expression der CRE-Rekombinase unter der Kontrolle des Carboxypeptidase 3 (Cpa3)-Promotors, führt zur kompletten Mastzelldefizienz, Reduktion der Basophilen um 60% (Feyerabend, T et al., Immunity, 2011)	heterozygot Für die Zucht zur Verfügung gestellt von Hans-Reimer Rodewald & Thorsten B. Feyerabend, DKFZ, Heidelberg; Zucht im BNITM
BALB/c Cpa3^{Cre}	Beschreibung siehe C57BL/6 Cpa3 ^{Cre}	heterozygot
C57BL/6 Mcpt5^{Cre}xRosa^{DTA}	heterozygote Expression der CRE Rekombinase unter der Kontrolle des Maus-Mastzellprotease 5 (Mcpt5) Promotors; zusätzlich transgen für Diphteriatoxin A (DTA), welches am 3' Ende ein loxP site flankiertes Stop Codon enthält[118]	heterozygot Für die Zucht zur Verfügung gestellt von Axel Roers, Technische Universität, Dresden; Zucht im BNITM

BALB/c DERE^G	enthält in das Genom integriertes artifizielles Chromosom, welches für ein Fusionsprotein aus GFP und dem Diphterietoxinrezeptor (DTR) codiert, Expression unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors (Lahl, K et al., 2007)		Zucht im BNITM
RAG1^{-/-}	defizient für B und T Zellen, durch das Fehlen von dem Enzym RAG1, welches wichtig ist für die Rekombination von T Zellrezeptor und Immunoglobuline [121]	homozygot	Zucht im BNITM
BALB/c IL-9R^{-/-}	IL-9 Rezeptor defizient durch den Ersatz eines 2,8 kb großen genomischen <i>KpnI-SpeI</i> Fragments, welches Exon 2–6 umfasst mit einem Neomycin-Resistenzgen	homozygot	von Jean-Christophe Renauld, Ludwig Cancer Research Institute, Brüssel, Belgien, Zucht im BNITM

2.1.9. Software

FlowJo X	Tree Star, Ashland, USA
Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
Prism6	GraphPad, La Jolla, USA
qPCR Software	Rotor Gene 6000 Series Software, San Francisco, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Grundsätze der Zellkultur

Zur Verhinderung einer bakteriellen oder fungalen Kontamination wurden alle Zellkulturarbeiten in der sterilen Atmosphäre einer Sterilwerkbank durchgeführt. Alle Verbrauchsmaterialien und Lösungen wurden vor Verwendung autoklaviert (135°C, 2 bar, 20 min) und nur unter der Werkbank geöffnet bzw. genutzt. Glasmaterial wurde für 3 h bei 180 °C sterilisiert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Wasch- und Pelletierschritte erfolgten bei 300 xg für 5 min bei 4 °C.

2.2.1.2. Präparation muriner Milz- und Lymphknotenzellen

Milz und mesenteriale Lymphknoten (mLN) wurden steril herauspräpariert, in einer Petrischale mit 10 mL kaltem PBS zwischen zwei Objektträgern zerrieben und anschließend pelletiert. Die mLN Zellen wurden für die Kultur in RPMI-Vollmedium, für FACS-Färbungen in PBS aufgenommen, gezählt und entsprechend eingesetzt. Die pelletierten Milzzellen wurden in 10 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert, für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und zum Stopp der Lyse mit 20 mL RPMI-Vollmedium versetzt. Die Zellen wurden dreimal mit RPMI-Vollmedium (Kultur) oder PBS (FACS) gewaschen und gezählt.

2.2.1.3. Präparation muriner peripherer Blutzellen

Zur Blutgewinnung wurde die Gesichtsvene (Vena facialis) mit einer Einweglanzette punktiert und Blut in einem EDTA beschichteten Röhrchen gesammelt. Zur Lyse wurde das Blut in 2 mL Erythrozytenlysepuffer aufgenommen, bei RT für 5 min inkubiert, anschließend pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen.

2.2.1.4. Gewinnung von Zellen aus dem Peritoneum

Zur Gewinnung von Zellen aus dem Peritoneum wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Dafür wurde 5 mL kaltes PBS mit einer 20 G Kanüle intraperitoneal gespritzt, der Bauchraum leicht massiert und anschließend die Zelllösung wieder quantitativ aufgenommen. Die Zellen wurden pelletiert, in FACS-Puffer resuspendiert und direkt für die durchflusszytometrische Analyse genutzt.

2.2.1.5. Gewinnung von Knochenmarkzellen

Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen zur Herstellung von gemischten Chimären (siehe 2.2.4.10.) wurden der rechte und linke Femur, als auch die Tibia entnommen und das Muskelfleisch entfernt. Der Knochen wurde anschließend an beiden Enden aufgeschnitten und das Knochenmark mit kaltem PBS ausgespült (27 G Kanüle) und in 20 mL kaltem PBS gesammelt. Die erhaltene Zelllösung wurde 5 min mit 300 xg und 4 °C zentrifugiert und das Zellpräzipitat in 20 mL Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und für 3 min bei RT inkubiert. Es wurde erneut zentrifugiert und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen über ein Zellsieb gegeben und zum Auszählen in PBS aufgenommen.

2.2.1.6. Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mittels Trypanblau

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität wurden die Zellen 1:10 bzw. 1:100 in Trypanblau verdünnt und zur Zählung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Tote bzw.

beschädigte Zellen nehmen selektiv den Farbstoff auf und können so von vitalen Zellen unterschieden werden. Die Zellkonzentration (Zellen/mL) ergab sich aus der Multiplikation von gezählten Zellen pro Großquadrat, dem Kammerfaktor und dem Verdünnungsfaktor.

2.2.1.7. *In vitro* Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen

Zur Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen wurden pro Stimulanz Dreifachwerte in einer 96-Rundboden-Lochplatte angesetzt. Zunächst wurden 100 µL Stimulanz verdünnt in RPMI-Vollmedium pro Loch vorgelegt und 2×10^5 Zellen in 100 µL RPMI-Vollmedium hinzugegeben. Die Stimulanzen wurden in folgender Endkonzentration eingesetzt: 1 µg/mL Hamster anti-Maus-CD3-Antikörper (Klon 1452C11, BNITM); 40 µg/mL *S. ratti*-Lysat. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur in RPMI-Vollmedium kultiviert wurden. Die Stimulation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für 72 h.

2.2.1.8. Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie (*fluorescent activated cell sorting*, FACS; Bonner *et al.*, 1972) wird genutzt um Einzelzellen auf ihre Eigenschaften wie z.B. Größe, Granularität, DNA-Gehalt und Oberflächenmoleküle hin zu analysieren. Die Charakterisierung der einzelnen Zelle erfolgt durch ihre Lichtstreuungseigenschaften, anhand von Antikörpern vermittelter Fluoreszenzstrahlung oder auch durch in die DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe. Für die Analyse werden die Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt, perlenschnurartig durch eine Messzelle (Durchflusszelle) geführt und in dieser von Lasern unterschiedlicher Wellenlänge bestrahlt. Passiert eine Zelle den Laserstrahl so kommt es im einfachsten Fall zu einer Streuung des Lichts, das von Photomultiplikatoren detektiert wird. Man unterscheidet dabei das Vorwärtsstreulicht (FCS; forward scatter), ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel, mit dem Größe und Volumen der Zelle korreliert und dem Seitwärtsstreulicht (SCC; sideward scatter), ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, welches mit der Granularität der Zelle korreliert. Zusätzlich können Zellen im Hinblick auf ihre Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine mittels Markierung durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper weiter charakterisiert werden. Die Messungen erfolgten an den Durchflusszytometern „LSR II“ und „FACS Calibur“. Die Messdaten wurden mit Hilfe des Programmes „FlowJo“ ausgewertet. Die Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfolgten, soweit nicht anders angegeben, bei 4 °C im Dunkeln.

In der folgenden Tabelle finden sich die fluoreszenzmarkierten Antikörper, welche in der Durchflusszytometrie verwendet wurden.

Antikörper (Klon)	Hersteller
Ratten anti-Maus CD4-FITC (RM4-5)	BioLegend, Aachen, Deutschland
Ratten anti-Maus CD4-APC (GK1.5)	eBioscience, San Diego, USA
Ratten anti-Maus CD8a-FITC (53-6.7)	BioLegend, Aachen, Deutschland
Ratten anti-Maus CD19-FITC (6D5)	BioLegend, Aachen, Deutschland
Ratten anti-Maus/Mensch CD11b-PerCP/Cy5.5 (M1/70)	BioLegend, Aachen, Deutschland
Ratten anti-Maus CD117-BV421 (2B8) (c-Kit)	BioLegend, Aachen, Deutschland
Ratten anti-Maus Ly-6G/Ly-6C-BV421 (RB6-8C5) (Gr-1)	BioLegend, Aachen, Deutschland
Ratten anti-Maus CD49b-APC (DX5)	BioLegend, Aachen, Deutschland
Ratten anti-Maus IgE -PE (RME-1)	BioLegend, Aachen, Deutschland
Ratten anti-Maus Siglec-F-AF647 (E50-2440)	BD Pharmingen, Heidelberg,

Ein beispielhaftes Gating für Mastzellen und Basophile (Abb.2.1.A) und für Neutrophile und Eosinophile (Abb.2.1.B) ist unten gezeigt. Unter „lineage“ sind CD4, CD8 und CD19 positive Zellen zusammengefasst.

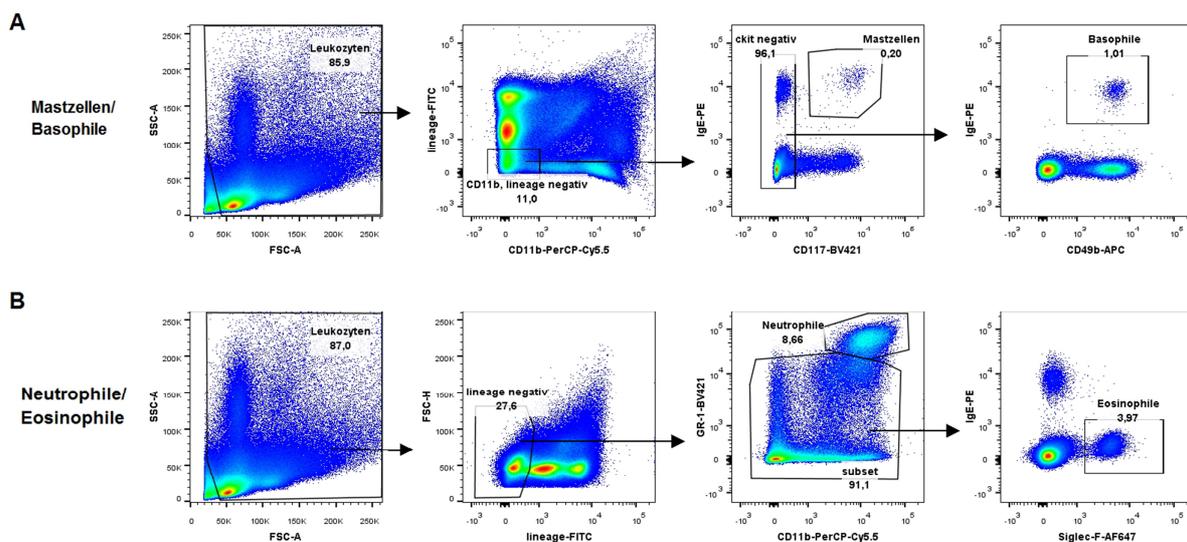


Abb.2.1. Beispielhaftes Gating von Mastzellen, Basophilen, Neutrophilen und Eosinophilen in der Milz.

2.2.2. Biochemische Methoden

2.2.2.1. ELISA zur Quantifizierung von Zytokinen im Zellkulturüberstand

Die Detektion von Zytokinen (IL-13, IL-4, IL-5, IL-10, IL-3 und IFN γ) im Zellkulturüberstand erfolgte durch einen Sandwich-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) mit den DuoSet[®] ELISA-Kits von R&D Systems. Dazu wurde eine 96-Flochboden-Lochplatte mit 50 μ L/Loch des

für das jeweilige Zytokin entsprechenden, in PBS verdünnten, Capture-Antikörpers über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 100 µL/Loch ELISA-Blockierungspuffer für 2 h bei RT blockiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen wurden 40 µL der Zellkulturüberstände (Dreifachwerte) und der Zytokinstandard (Doppelwerte), seriell verdünnt in ELISA-Diluent, aufgetragen und über Nacht bei 4°C bzw. für 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und das gebundene Antigen (Zytokin) wurde mit 50 µL/Loch des jeweils spezifischen und verdünnten, biotinyliertem Sekundärantikörpers für 2 h bei RT detektiert. Anschließend wurde die Platte wiederum fünfmal gewaschen, 50 µL/Loch Streptavidin-HRP-Konjugat (1:200 verdünnt in ELISA-Diluent) hinzugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die Entwicklung nach erneutem Waschen erfolgte mit 100 µL/Loch ELISA-Substratpuffer für 15 min bei RT. Nach Abstoppen der Reaktion mit 25 µL/Loch ELISA-Stopplösung wurde die Platte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und die Zytokinkonzentration mittels Standardreihe bestimmt.

2.2.2.2. ELISA zur Quantifizierung von Interleukin-9 im Zellkulturüberstand

Die Quantifizierung von IL-9 im Zellkulturüberstand erfolgte ebenfalls durch einen Sandwich-ELISA, wie in 2.1. beschrieben, jedoch nicht mit einem DuoKit und in half-well ELISA Platten. Es gab folgende Abweichungen. Der Capture-Antikörper wurde mit einer Konzentration von 2 µg/mL verdünnt in PBS eingesetzt. Das Blocken von unspezifischen Bindungen und die Verdünnung des biotinylierten IL-9 Detektionsantikörpers erfolgte mit IL-9 ELISA-Puffer (10 % FCS/PBS).

2.2.2.3. ELISA zur Quantifizierung von Maus-Mastzellprotease-1 (mMCPT-1) im Serum

Die Bestimmung der Maus-Mastzellprotease-1 im Serum von *S. rattii*-infizierten Mäusen erfolgte mit dem Mouse MCPT-1 (mMCP-1) ELISA Ready-SET-Go!® Kit von eBioscience und wurde mit folgenden Abweichungen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Beschichtung der Platten mit Capture Antikörper erfolgte mit einem Volumen von 50 µL/Loch. Zur Detektion wurden 50 µL/Loch, 1:250 in Assay-Diluent verdünntem, Avidin-HRP-Antikörper eingesetzt und zur Entwicklung wurden ebenfalls 50 µL TMB Substrat verwendet. Pro Probe (Serumverdünnung 1:100) wurden Doppelwerte bestimmt.

2.2.2.4. ELISA von *S. rattii*-spezifischen Immunglobulinen im Serum

Zur Detektion von *S. rattii*-spezifischen Immunglobulinen (Ig) wurde eine 96-Microlon-Flachboden-Lochplatte über Nacht bei 4 °C mit 50 µL/Loch *S. rattii* Lysat (2,5 µg/mL) in PBS inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 100 µL/Loch

ELISA-Blockierungspuffer für 2h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 50 µL der in ELISA-Diluent verdünnten Seren in Zweifachwerten auf die Platte aufgetragen und zur Bestimmung des Titters seriell mit ELISA-Diluent verdünnt. Die Platten wurden für 4 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen. Der Nachweis von gebundenem *S. ratti*-spezifischem Ig erfolgte durch die 1 stündige Inkubation bei RT mit HRP-gekoppeltem anti-Maus IgM, IgG1, IgG2b verdünnt in ELISA-Diluent, dem fünfmaligem Waschen und der anschließenden Entwicklung mit 100 µL/Loch ELISA-Substratlösung für 2,5 min. Die Reaktion wurde mit 25 µL/Loch ELISA-Stopplösung beendet und die photometrische Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Der Ig-Titer ergab sich aus der Serum-Verdünnung deren OD₄₅₀ über dem doppelten Plattenhintergrund lag.

2.2.2.5. ELISA zur Quantifizierung von polyklonalem IgE im Serum

Die Quantifizierung von polyklonalem IgE erfolgte mit dem Mouse IgE ELISA Set von BD OptEIA™ und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Isolierung von DNA aus Gewebeproben

Zur Genotypisierung der transgenen Mäuse wurden Ohrbiopsien in 50 µL Gewebelysepuffer, aufgenommen und für 15 min bei 75 °C inkubiert. Die anschließende Inkubation von 10 min bei 95 °C führt zur Inaktivierung der im Lysepuffer enthaltenen Proteinase K. 20 µL der DNA-Lösung wurden mit 180 µL Tris-Puffer gemischt und 1 µL dieser Lösung für die Genotypisierungs-PCR verwendet (siehe 3.4.).

2.2.3.2. Isolierung von DNA aus Stuhlproben

Die DNA Isolierung aus Stuhlproben von *S. ratti* infizierten Mäusen erfolgte durch eine modifizierte KOH-Methode nach Katzwinkel-Wladarsch *et al.*, 1994 [122]. Dazu wurden 200 mg Fäzes mit 1,4 mL Aqua dest., 100 µL 1M KOH und 30 µL 1M DTT versetzt und vollständig homogenisiert. Anschließend wurde die Probe bei 65 °C für 30 min inkubiert und 10 min bei 13000 xg zentrifugiert. 400 µL des Überstandes wurden mit 10 µL 10 mg/mL Proteinase K versetzt, gemischt und für 15 min bei 56 °C inkubiert. Zur Proteinfällung wurde die Lösung für 10 min bei 4 °C gelagert und nach Zugabe von 140 µL gesättigter NaCl-Lösung weitere 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Proteinpelletierung erfolgte bei 13000 xg für 10 min. 400 µL des Überstandes wurden zum Ausfällen der DNA mit 400 µL Isopropanol vermischt, bei -20 °C für 20 min gelagert und für 15 min bei 4 °C und 13000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die pelletierte DNA mit 100 µL 80%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet

und in 200 µL Aqua dest. resuspendiert. Für die anschließende Analyse von *S. ratt*i DNA mittels quantitativer *real-time* PCR (3.6.) wurden die Proben auf 100 ng /µl eingestellt.

2.2.3.3. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels Nanodrop bestimmt.

2.2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung von transgenen Mäusen

Für die Genotypisierung der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse wurde die DNA wie in 3.1. aus Ohrgewebe der Maus gewonnen. Zum Screenen der heterozygot gezüchteten Mäuse wurden jeweils 3 Primer verwendet, die zum einen das Transgen, zum anderen auch das Wildtypgen vervielfältigten. Die Primer für die jeweiligen PCRs finden sich unter 2.1.7.

Für alle Genotypisierungs-PCRs wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung der Polymerase	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Anlagerung der Primer	60 °C	15 sec
Elongation	72 °C	15 sec
finale Elongation	72 °C	5 min

x 35 Zyklen

PCR-Ansatz:	20µL
millipore Wasser	13,95 µL
10x PCR Buffer	2 µL
25 mM MgCl ₂	0,8 µL
10 mM dNTPs	0,4 µL
Primer 1/2/3	je 0,6 µL
Taq-Polymerase	0,05 µL
Template-DNA	1 µL

2.2.3.5. Agarosegelelektrophorese

Zum Auftrennen der durch die PCR zur Genotypisierung der transgenen Mäuse vervielfältigten DNA Fragmente wurden 15-20µL der Proben auf ein 1%iges Agarosegel (0,001% EtBr) in TBE-Puffer aufgetragen. Nach 50-60 min bei 90 Volt wurde das Gel unter UV-Licht mit einem digitalen Gel-Imaging Geräte analysiert.

2.2.3.6. Quantitative *real-time* PCR

Zur Quantifizierung der Kopienzahl von *S. rattis* 28S rRNA-DNA wurde die quantitative real-time PCR verwendet. Diese basiert auf der herkömmlichen PCR-Methode [123], bei der geringe Mengen an DNA durch Einsatz spezifischer Primer vervielfältigt werden kann. Zudem kann durch die Verwendung von dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I, welcher sich in doppelsträngige DNA einlagert, eine Quantifizierung der zu analysierenden Sequenz vorgenommen werden, da die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produkts steigt. Der Ct-Wert (cycle threshold) gibt dabei den PCR-Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal über den Fluoreszenzhintergrund ansteigt. Dabei ist der Ct-Wert umgekehrt proportional zur eingesetzten Konzentration der zu analysierenden DNA. Folglich, je kleiner der Ct-Wert, desto höher ist die Menge an Ziel-DNA.

Die zu analysierenden Proben wurden in Duplikaten pipettiert. Als Negativkontrolle dient eine Doppelbestimmung mit Ampuwa-Wasser, ohne DNA. Vervielfältigt wurde ein 180bp großes Fragment des *S. rattis* 28S rRNA Gens. Als Kalibrator dient ein Plasmid, welches dieses Fragment enthält. Die qPCR wurde mit dem RotorGene6000 durchgeführt. Ein PCR-Ansatz besteht aus folgenden Bestandteilen:

Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung der Polymerase	95 °C	15 min
Denaturierung	95 °C	10 sec
Anlagerung der Primer	50 °C	15 sec
Elongation	72 °C	20 sec
Schmelzkurve	62 °C-95°C (1°C Schritte)	

x 35 Zyklen

PCR-Ansatz:	10µL
millipore Wasser	4,65 µL
10x PCR Buffer	1 µL
25 mM MgCl ₂	0,4 µL
SYBR® Green (1:1000)	0,1 µL
BSA (1 µg/µL)	1 µL
10 mM dNTPs	0,2 µL
Primer S1 / AS1	je 0,3 µL
Taq-Polymerase	0,05 µL
Template-DNA/ Kalibrator	2 µL

2.2.4. Parasitologische Methoden und Tierversuche

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und durch die Hamburger Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt. Für die Versuche wurden Mäuse im Alter von 8-10 Wochen eingesetzt, die im Tierhaus des BNITM in einzelbelüfteten Käfigen (IVCs, individually ventilated cages) unter keimarmen bzw. SPF-Bedingungen (spezifisch pathogenfrei) gehalten wurden.

2.2.4.1. Laborzyklus von *S. ratt*i und Präparation der infektiösen dritten Larven (L3i)

Zur Erhaltung des *S. ratt*i-Lebenszyklus und zur Verhinderung einer Adaption an das Immunsystem der Maus wurde *S. ratt*i fortlaufend in Wistar Ratten passagiert. 24h-Stuhl von infizierten Ratten wurde gesammelt, in ca. 10 mL Leitungswasser eingeweicht und anschließend mit der dreifachen Menge gewässerter Aktivkohle vermischt, schräg in einem Glasgefäß geschichtet und mit einer weiteren dünnen Schicht gewässerter Aktivkohle überdeckt. Die Aktivkohlekultur wurde zur Inkubation mit Parafilm verschlossen und für 6 Tage bei 25 °C gelagert. Die sich dabei entwickelnden L3i wurden anschließend durch eine Baermann Apparatur isoliert. Vor der Aliquotierung für die Infektion wurden die Larven dreimal mit PBS (Pen/Strep) gewaschen, worauf auf jeden Waschschrift eine Sedimentationsphase von 1 h bei 4 °C folgte. Die Larven wurden in 2 µL Lösung ausgezählt und für die Infektion entsprechend aliquotiert.

2.2.4.2. Infektion von Mäusen und Ratten mit L3i *S. ratti*

Mäuse wurden mit 2000 L3i *S. ratti* in 30 μ L PBS (Pen/Strep) subkutan in die Hinterpfote; Wistar Ratten mit 2500 L3i *S. ratti* in 200 μ L PBS (Pen/Strep) subkutan in die Flanke infiziert.

2.2.4.3. Bestimmung der wandernden Larven in Kopf, Lunge und Darm

Zur Bestimmung der wandernden Larven wurden an Tag 1, 2, 3, und 4 nach Infektion die Köpfe, Lungen und Dünndärme der Mäuse präpariert. Der Kopf wurde vom Körper abgetrennt, gehäutet, in etwa 6 gleich große Stücke zerkleinert und in einer 6-Loch-Platte in Leitungswasser für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Lunge wurde zerkleinert und ebenfalls in H₂O für 3 h bei 37 °C in einer 24-Loch-Platte inkubiert. Während der Inkubation wandern die Larven aus dem Gewebe und können nach Entfernen der Gewebereste sofort unter dem Lichtmikroskop gezählt werden. Zur Bestimmung der Larven im Dünndarm wurde wie in 4.4. vorgegangen.

2.2.4.4. Bestimmung der adulten *S. ratti* im Darm

Die Anzahl der adulten *S. ratti* im Dünndarm wurde an Tag 6 nach Infektion bestimmt. Zur Isolierung der Würmer wurde der Dünndarm einer Maus herauspräpariert, longitudinal aufgeschnitten und der Fäzes gründlich herausgespült. Anschließend wurde der Darm in 30 mL H₂O in einer Petrischale für 3 h bei 37 °C inkubiert und stündlich leicht geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Darm zum Ablösen des Mucus geschüttelt und entfernt. Die Würmer in der Petrischale konnten direkt unter einem Lichtmikroskop ausgezählt werden.

2.2.4.5. Nachweis von *S. ratti*-DNA in Stuhlproben

Der Verlauf und die Termination einer *S. ratti* Infektion wurden durch die Analyse von *Strongyloides* 28S RNA kodierende DNA im Stuhl von Mäusen bestimmt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden dafür die Mäuse für 24 h auf Zellstoff gesetzt, der Stuhl gesammelt und bis zur DNA-Isolierung (siehe 2.2.3.2.) bei -20 °C gelagert.

2.2.4.6. Gewinnung von Serum

Die Gewinnung von Serum aus Blut erfolgte durch eine finale Herzpunktion oder durch die Punktion der Gesichtsvene (*Vena facialis*) einer Maus zu den entsprechenden Zeitpunkten. Das Blut wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die koagulierten Bestandteile des Bluts vom Serum durch einen Zentrifugationsschritt bei 10.000 xg für 10 min getrennt und das Serum abgenommen. Bis zur weiteren Analyse erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

2.2.4.7. Herstellung von hochtitrigem Antiserum

Zur Herstellung von hochtitrigem Antiserum wurde eine entsprechende Anzahl an Mäusen mit 2000 L3i *S. rattii* infiziert und für insgesamt 3 Monate alle 4 Wochen mit 2000 L3i infiziert. Im Anschluss wurde eine finale Herzpunktion durchgeführt, um möglichst viel Blut zu gewinnen und das Serum wurde wie in 2.2.4.6. beschrieben gewonnen.

2.2.4.8. Behandlung der Mäuse mit Immuserum

Den Mäusen wurde an 2 aufeinander folgenden Tagen jeweils 250 µL des hochtitrigem Antiserums oder 250 µL Kontrollserum von naïven Mäusen i.p. gespritzt. Zeitpunkte der Applikation finden sich im Ergebnissteil.

2.2.4.9. Depletion von Treg

Um Tregs zu depletieren wurden DEREK Mäuse verwendet. Diese Mäuse enthalten ein in das Genom integriertes artifizielles Chromosom, welches für ein Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem Diphtherietoxinrezeptor (DTR) codiert. Der DTR und GFP werden unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors exprimiert (Lahl, K et al., 2007). Foxp3-positive Tregs fluoreszieren demnach grün und können durch die Injektion von Diphtheriatoxin (DT) depletiert werden. Für die Depletion wurden Mäuse an drei aufeinander folgenden Tage mit 0,5 µg DT in 200 µL PBS i.p. behandelt. Am zweiten Tag der Depletion wurden die Mäuse mit 2000 L3i *S. rattii* infiziert und die Depletion an Tag 2 der Infektion durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.4.10. Herstellung von gemischten Knochenmarkchimären

Um zu analysieren, welche Rezeptoren/Signalkaskadenmoleküle von Mastzellen zur Abstoßung von *S. rattii* wichtig sind, wurden gemischte Knochenmarkchimären hergestellt, bei denen nur Mastzellen jeweils für einen spezifischen Rezeptor/ein spezifisches Molekül defizient sind, ansonsten aber ein völlig normales Immunsystem aufweisen. Dazu wurden als Empfängermäuse immer mastzelldefiziente Cpa3^{Cre}-Mäuse verwendet, in die die entsprechende Kombination an Knochenmarkzellen transferiert wurde. Die Empfängertiere wurden 24h vor dem Transfer mit 8 Gray γ -Strahlung aus einer Caesium (¹³⁷Cs)-Quelle bestrahlt. Da Mäuse auf BALB/c Hintergrund sensitiver gegenüber der Strahlung sind, wurden diese zweimal mit 4 Gray γ -Strahlung im Abstand von 3h bestrahlt. Am folgenden Tag wurde Knochenmark aus den Spendertieren isoliert (Wt, Cpa3^{Cre}, IL9R^{-/-}) (siehe 2.2.1.5.) und 6x10⁶ Zellen in 200µL PBS i.v. in die Empfängertiere transferiert.

Dabei wurden folgende Kombinationen an Knochenmarkszellen gespritzt:

	Hülle	KM-Kombination Spender 70% = $4,2 \times 10^6$ Zellen + 30% = $1,8 \times 10^6$ Zellen	Chimäre
1	Cpa3 ^{Cre}	70 % Cpa3 ^{Cre} KM + 30% Wt KM	Wt Chimäre
2	Cpa3 ^{Cre}	70% Cpa3 ^{Cre} KM + 30% Cpa3 ^{Cre} KM	Mastzell-defiziente Chimäre
3	Cpa3 ^{Cre}	70% Cpa3 ^{Cre} KM + 30% IL9R ^{-/-} KM	Chimäre mit Mastzell- spezifischem Defekt

Zur Vermeidung einer Infektion wurden die Tiere ab einer Woche vor Bestrahlung bis vier Wochen nach Transfer mit 0,5 % (v/v) Baytril im Trinkwasser behandelt. Die Infektion mit *S. rattii* erfolgte nach 8 Wochen Rekonstitution.

2.2.4.11. Histologie - Herstellung von Swiss Rolls

Für die histologische Analyse von Darmgewebe wurden sogenannte Swiss Rolls angefertigt. Dafür wurde der Dünndarm entnommen und mit 1x PBS gespült. Anschließend wurde der Dünndarm longitudinal ausgedrückt, um noch restlich vorhandenes PBS zu entfernen, zu einer Schnecke aufgerollt und in eine Einbettkammer gelegt. Diese wurde verschlossen in eine 4%ige Formaldehydlösung gegeben und zur weiteren Aufarbeitung und Färbung durch Frau Dr. Anja Kühl an die Immunpathologie der Charité Berlin geschickt.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Funktion und Regulation von Mastzellen während einer Infektion mit dem parasitären Nematoden *Strongyloides ratti* mit Hilfe von KIT-unabhängigen mastzelldefizienten Mausmodellen untersucht werden. Zur Unterscheidung zwischen dem Einfluss von mukosalen und Bindegewebsmastzellen wurden ein komplett mastzelldefizienter Mausstamm (auf C57BL/6 und BALB/c Hintergrund [93]), im Folgenden Cpa3^{Cre} Mäuse genannt und ein Mausstamm, dem nur Bindegewebsmastzellen (*connective tissue mast cells*; ctMCs) (C57BL/6 Hintergrund; [118]), im Folgenden Mcpt5^{Cre} genannt, verwendet. Die transgenen Mäuse wurden alle heterozygot gezüchtet und im Experiment immer mit nicht-transgenen Wurfgeschwistern verglichen. Auf diese Weise können alle anderen Parameter, wie z.B. das Mikrobiom und Umweltbedingungen der mastzellkompetenten und -defizienten Mäuse weitgehend konstant gehalten werden.

Der Ergebnisteil gliedert sich wie folgt. Im erste Teil wird Induktion von Zellen des angeborenen Immunsystems während der Infektion mit *S. ratti* in lokalen lymphatischen Geweben, wie den mesenterialen Lymphknoten (mLN) bzw. innerhalb des Peritoneums, sowie auf systemischer Ebene im Blut und in der Milz beschrieben. Im zweiten Teil wird die distinkte Funktion von mukosalen Mastzellen (mMCs) und ctMCs, während der Kontrolle einer *S. ratti* Infektion und der Initiierung einer schützenden Immunantwort untersucht. Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation und Aktivierung von Mastzellen während der *S. ratti* Infektion.

3.1. Induktion und Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems während einer *S. ratti* Infektion

Um einen Überblick zu erhalten, welche Zellen des adaptiven Immunsystems während einer *S. ratti* Infektion in spezifischen Organen induziert bzw. rekrutiert werden, wurde eine Kinetik der Expansion von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, als auch Mastzellen im Blut, Milz, mLN und im Peritoneum von C57BL/6 und BALB/c Mäusen mittels durchflusszytometrischer Analysen angefertigt. Die verschiedenen Zelltypen wurden wie folgt charakterisiert. Mastzellen sind CD4, CD8, CD19 und CD11b negativ, IgE (gebunden über Fcε-Rezeptor) und c-Kit positive Leukozyten. Basophile Granulozyten (Basophile) sind im Gegensatz zu Mastzellen c-Kit negativ jedoch CD49b positiv. Neutrophile Granulozyten (Neutrophile) sind CD4, CD8, CD19 negativ Leukozyten, welche CD11b und GR-1 sehr hoch exprimieren. Eosinophile Granulozyten (Eosinophile) sind CD11b positiv und exprimieren GR-1 intermediär. Sind dafür aber stark Siglec-F (CD170) positiv. Eine Gatingstrategie findet sich für jede Zellsorte unter 2.2.1.8.

Die systemische Immunantwort wurde durch Färbung der Leukozyten in Blut und Milz untersucht. Zur Analyse der lokalen Antwort wurden die Lymphknoten in den Mesenterien (mLN) verwendet, welche den Darm umspannen und eine Lavage, also eine Spülung des Bauchraums (Peritoneums) durchgeführt (peL). Die Infektion mit 2000 L3i *S. ratti* führte in C57BL/6 zu einem prozentualen Anstieg an Neutrophilen an Tag 3 im Blut (Abb.3.1.). Bei BALB/c

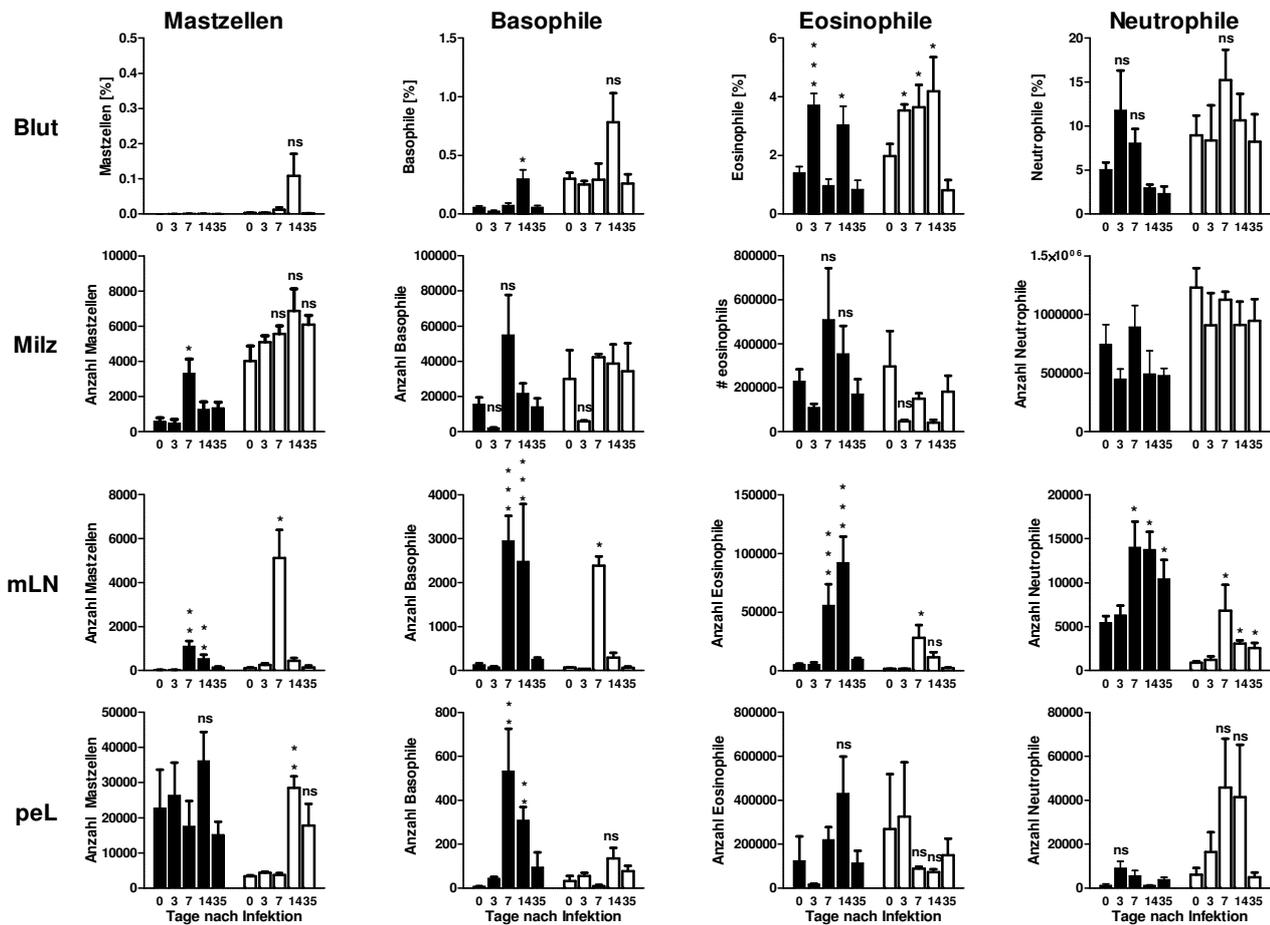


Abb.3.1. Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems während einer *S. ratti* Infektion. C57BL/6 (schwarze Balken) und BALB/c Mäuse (weiße Balken) wurden mit 2000 *S. ratti* L3i s.c. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden periphere Blut- und Milzzellen, als auch Zellen der mesenterialen Lymphknoten und des Peritoneums isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist Anzahl der verschiedenen Zelltypen bzw. der prozentuale Anteil innerhalb peripherer Blutzellen. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten ($n=4-6$). Dargestellt ist der Mittelwert +SEM. Die Sterne zeigen den signifikanten Unterschied der Ergebnisse des jeweiligen Analysetages im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe an Tag 0 an, ermittelt durch Mann Whitney U Test, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, ns= nicht signifikant.

Mäusen war dieser Anstieg erst an Tag 7 zu beobachten. Eine prozentuale Zunahme an Eosinophilen über die Tage 3, 7 und 14 ließ sich auch für infizierte BALB/c Mäuse im Blut beobachten. Hingegen zeigten Eosinophile im Blut von C57BL/6 Mäusen eine biphasische Expansion an Tag 3 und Tag 14 p.i. Mastzellen differenzieren sich erst im Gewebe aus und

waren somit im Blut von naiven und infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen nicht zu finden. Basophile waren an Tag 14 p.i sowohl im Blut von C57BL/6, als auch von BALB/c Mäusen erhöht. In der Milz waren bei C57BL/6 Mäusen Eosinophile, Mastzellen und Basophile in ihrer Anzahl an Tag 7 p.i erhöht. Die Zahl der Neutrophilen sank tendenziell an Tag 3 und stieg wieder an Tag 7 p.i. BALB/c Mäuse zeigten auch eine Erhöhung von Mastzellen an Tag 7 p.i. in der Milz, diese sank an Tag 14 wieder und stieg an Tag 35 p.i erneut (Abb.3.1.). Die Zahl der Basophilen in der Milz von C57BL/6 und BALB/c Mäusen sank kurzfristig an Tag 3 p.i. und gelangte an Tag 7 p.i. wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Im mesenterialen Lymphknoten war ein einheitlicher Anstieg an der Anzahl an Neutrophilen, Eosinophilen, Mastzellen und Basophilen an Tag 7 p.i. für BALB/c und C57BL/6 Mäuse feststellbar. Die Eosinophilenzahl erhöhte sich noch an Tag 14 bei C57BL/6 Mäusen, sank aber bei allen anderen Zelltypen ab diesem Tag wieder. Insgesamt zeigte sich, dass die hier untersuchten Zellen des angeborenen Immunsystems insbesondere an Tag 7 der Infektion in BALB/c und C57BL/6 Mäusen, also zum Zeitpunkt der höchsten gastrointestinalen Parasitenlast, besonders in den mesenterialen Lymphknoten und dem Peritoneum, erhöht waren.

3.2. Einfluss einer Mastzelldefizienz auf den *S. rattii* Infektionsverlauf in der Maus

3.2.1. Vergleich der Zellrekrutierung in den Darm während der *S. rattii* Infektion von mastzellkompetenten und mastzelldefizienten BALB/c Mäusen

Um zu überprüfen, welchen Einfluss eine Mastzelldefizienz auf die Immunzellrekrutierung während einer *S. rattii* Infektion innerhalb des Darms hat, wurden Cpa3^{Cre} Mäuse mit 2000 L3i *S. rattii* infiziert und an Tag 6, 14 und 29 p.i. der Dünndarm entnommen und sogenannte „Swiss Rolls“ für histologische Schnitte angefertigt.

Mastzellen sollten durch Färbung mit einem anti-c-Kit-Antikörper (Abb.3.2.A) identifiziert werden. Der Stammzellenwachstumsfaktor-Rezeptor KIT wird jedoch auch auf hämatopoetischen Stammzellen und anderen Zellen des hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Systems exprimiert. Des Weiteren wurden Mastzellen mit dem basischen, metachromen Farbstoff Toluidinblau gefärbt (Abb.3.2.B). Dieser färbt Mastzellen aufgrund ihrer enthaltenen Granula violett an. Toluidin färbt aber auch Nukleinsäuren, Mucine und kann auch Granula von endokrinen Zellen anfärben. Daher erfolgt die Identifikation neben der Färbung auch über die Morphologie der Zelle.

An Tag sechs der *S. ratti* Infektion konnten in mastzelldefizienten $Cpa3^{Cre}$ Mäusen erwartungsgemäß keine c-Kit positiven Zellen im Darm angefärbt werden. In $Cpa3^{wt}$ Mäusen konnten auch nur ein bis zwei Mastzellen anhand des anti-c-Kit Antikörpers bzw. der

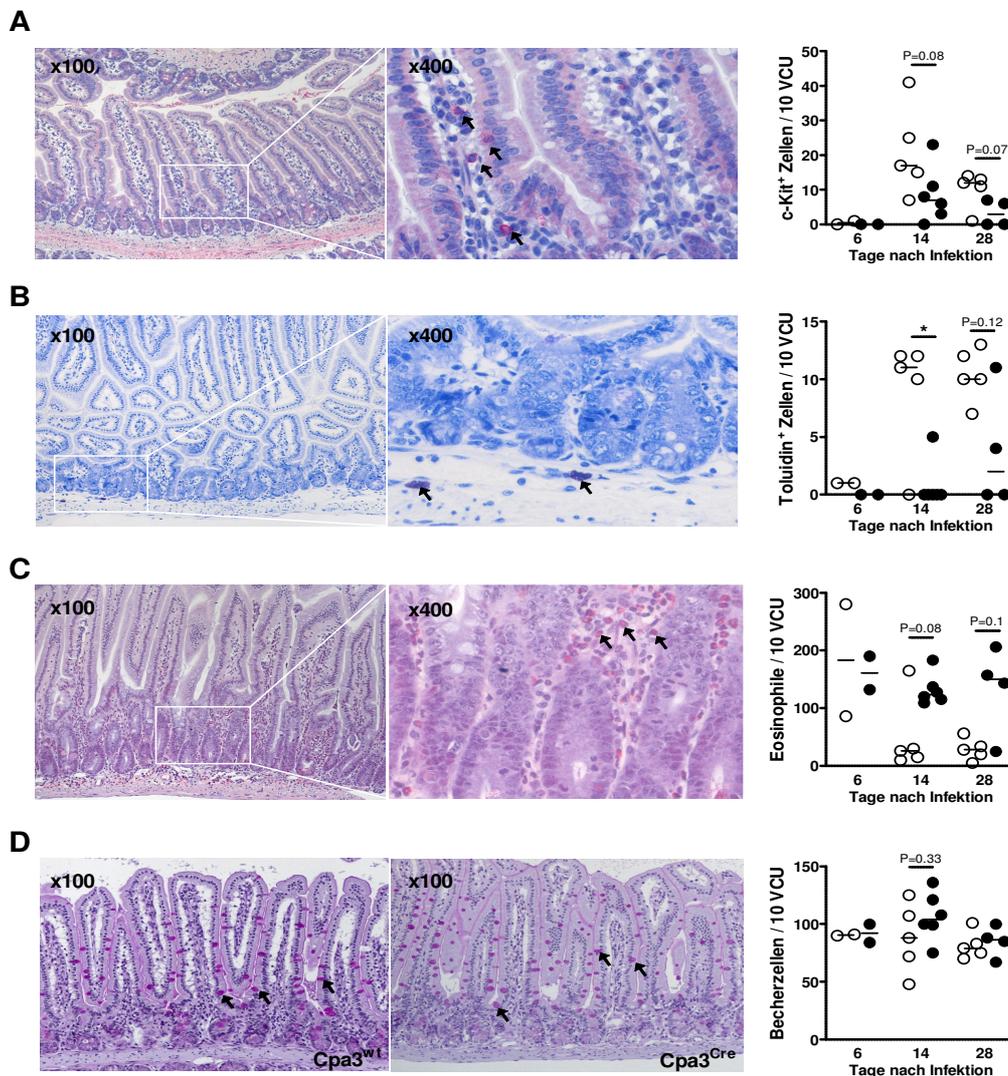


Abb.3.2. Histologische Untersuchung von Mastzellen, Becherzellen und Eosinophilen im Dünndarm von *S. ratti* infizierten BALB/c $Cpa3^{Cre}$ und $Cpa3^{wt}$ Mäusen.

BALB/c $Cpa3^{Cre}$ (schwarze Punkte) und $Cpa3^{wt}$ (weiße Kreise) Mäuse wurden mit 2000 L3i *S.ratti* infiziert. An Tag 6, 14 und 28 wurden die Dünndärme präpariert und „swiss rolls“ für die histologische Färbung mittels Formaldehydfixierung angefertigt. **A** und **B** zeigt die Anzahl an Mastzellen pro Villus-Krypten-Einheit (VCU), **C** die Anzahl der Eosinophilen und **D** die Anzahl der Becherzellen. **A**: Färbung mit Primärantikörper gegen c-Kit; **B**: Toluidinfärbung; **C**: modifizierte Siriusrot-Färbung; **D**: PAS-Färbung. Zwei Beispielbilder sind für jede Färbung dargestellt. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente, n=2-5. Punkte stellen jeweils eine Maus dar und die Balken repräsentieren den Median; Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied ermittelt mittels Mann-Whitney-Test; * p<0,05.

Toluidinfärbung pro Villus-Krypten-Einheit (VCU) gefunden werden (Abb.3.2.A/B). In mastzellkompetenten $Cpa3^{wt}$ Mäusen stieg die Zahl an Toluidin positiven Zellen an Tag 14 p.i. auf ca. 9 Zellen (Abb.3.2.B) bzw. knapp 22 c-Kit positive Zellen (Abb.3.2.A) pro VCU an. An Tag 28 p.i. sank die Anzahl an c-Kit positiven Zellen in mastzellkompetenten $Cpa3^{wt}$ Mäusen wieder, wohingegen die Anzahl an Toluidin positiven Zellen auf dem gleichen Niveau blieb, wie an Tag

14. Überraschenderweise war für Cpa3^{Cre} Mäuse ein Anstieg an c-Kit und Toluidin positiven Zellen an Tag 14 bzw. Tag 28 p.i. zu verzeichnen (Abb.3.2.A/B). Da diese Mäuse aber mastzelldefizient sind sollten sie keine c-Kit bzw. Toluidin positiven Mastzellen aufweisen. Es stellt sich daher die Frage (die in Abschnitt 4.6. diskutiert wird,) ob die Färbung nicht richtig funktioniert hat oder ob die angefärbten Zellen keine Mastzellen sind.

Die Zahl an Eosinophilen pro Villus-Krypten-Einheit war an Tag 6 p.i. in Cpa3^{Cre} und Cpa3^{wt} Mäusen gleich und betrug ca. 180 bis 190 (Abb.3.2.C). Jedoch sank die Zahl bei Cpa3^{wt} Mäusen an Tag 14 p.i. auf knapp 30 Eosinophile pro VCU wohingegen sie bei Cpa3^{Cre} Mäusen auf dem gleichen Niveau blieb, wie an Tag 6 p.i. Das gleiche Bild konnte für Tag 28 p.i. festgehalten werden. Die Unterschiede in der Eosinophilenanzahl zwischen mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} und mastzellkompetenten Cpa3^{wt} Mäusen an Tag 14 und 28 waren allerdings nicht signifikant (Abb.3.2.C). Die Analyse von Becherzellen im Darmepithel, welche über eine PAS-Färbung (*periodic acid*-Schiff Reaktion) angefärbt wurden, ergab eine leichte, nicht signifikante Erhöhung an Tag 14 p.i. in mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen im Vergleich zu mastzellkompetenten Cpa3^{wt} Mäusen (Abb.3.2.D).

3.2.2. Mastzellen sind wichtig für die Kontrolle der Parasitenlast im Darm und für die Terminierung der *S. rattii* Infektion

Während der Wanderung durch das Gewebe werden *S. rattii* L3 das erste Mal mit dem Wirtsimmunsystem konfrontiert. Neben Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen, welche die Larven im Gewebe bekämpfen [24, 25, 36, 38, 39], sind auch Mastzellen in der Haut lokalisiert. Der Einfluss von diesen Bindegewebsmastzellen auf die Wanderung der Larven durch die Haut des Wirtes sollte mit Hilfe der mastzelldefizienten Mausstämme untersucht werden. Zur Bestimmung der Anzahl an migrierenden Larven im Gewebe wurden Kopf, Lunge und der Dünndarm von *S. rattii* infizierten Cpa3^{Cre} und Cpa3^{wt} Mäusen an Tag 1, 2, 3 und 4 der Infektion präpariert und die ausgewanderten Larven mikroskopisch ausgezählt. An Tag 2 erreichte der Großteil der Larven den Kopf und die Lunge. Dabei zeigten mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse keinen Unterschied in der Anzahl der wandernden Larven in Kopf und Lunge im Vergleich zu mastzellkompetenten Cpa3^{wt} Mäusen (Abb. 3.3.B/C). Die Anzahl an L3 im Dünndarm war ebenfalls bis Tag 3 der Infektion in mastzellkompetenten und mastzelldefizienten Mäusen gleich. An Tag 4 der Infektion wiesen die mastzelldefizienten Mäuse auf C57BL/6 und BALB/c Hintergrund, tendenziell mehr Larven im Darm auf im Vergleich zu mastzellkompetenten Mäusen. Dieser Unterschied war zu diesem Zeitpunkt noch nicht signifikant. Interessanterweise zeigten mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse hingegen sowohl auf BALB/c und C57BL/6 Hintergrund im Vergleich zu mastzellkompetenten

Wildtypwurfgeschwister an Tag 6 der Infektion, also zum Zeitpunkt der maximalen Parasitenlast im Dünndarm, eine signifikant höhere Wurmlast (Abb.3.3.D/E)). Mastzelldefiziente Mäuse auf BALB/c Hintergrund (Abb.3.3.E) hatten im Mittel ca. 100 adulte Würmer im Darm, wohingegen Wildtypmäuse im Vergleich nur ca. 20

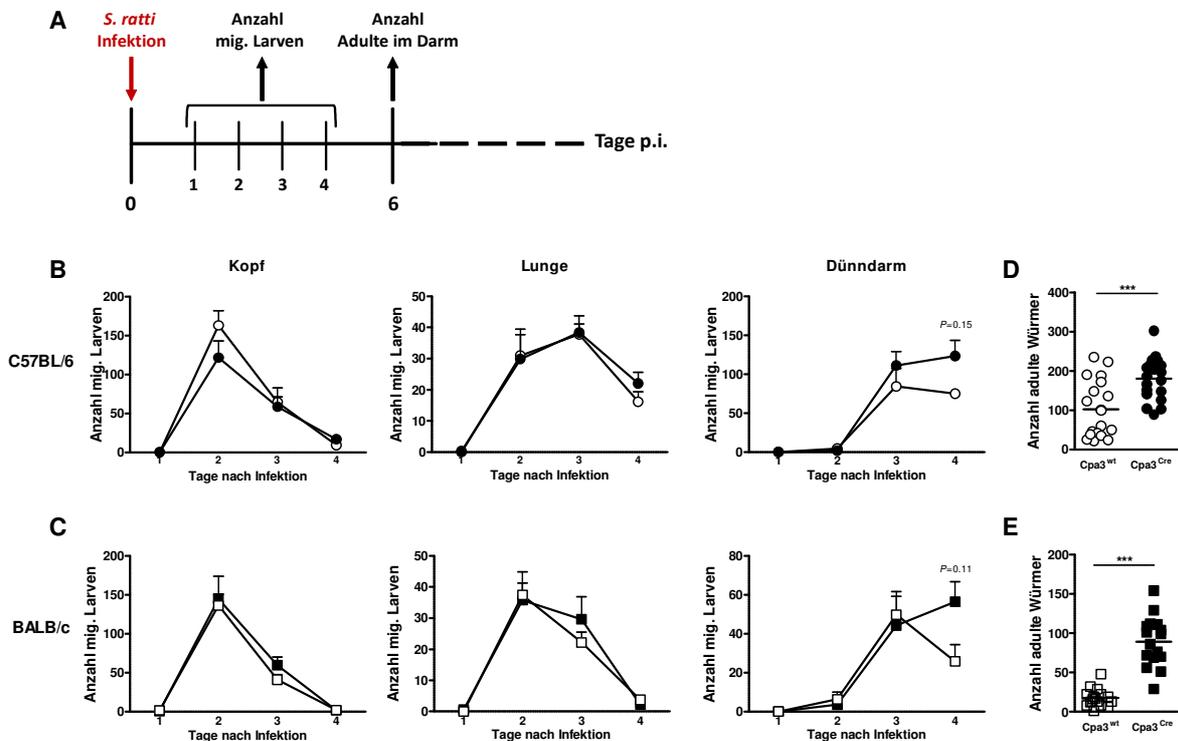


Abb.3.3. Mastzellen sind wichtig für die Kontrolle der Parasitenlast im Darm

(A) zeigt den Versuchsablauf. Cpa3^{Cre} (schwarze Kreise; Quadrate) und Cpa3^{wt} (weiße Kreise; Quadrate) Mäuse auf BALB/c und C57BL/6 genetischem Hintergrund, wurden mit 2000 L3i *S. rattii* in den Hinterfuß s.c. infiziert. An den angegebenen Tagen wurden Kopf, Lunge und Darm der Mäuse präpariert und die ausgewanderten Larven aus dem Gewebe gezählt (B/C). Die Anzahl adulter Würmer im Dünndarm wurde an Tag 6 p.i. bestimmt (D/E). C57BL/6 (B/D) und BALB/c (C/E). Die Graphen vereinigen Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n=3-9/Tag) (B/C) bzw. drei unabhängigen Experimenten (n=.16-19) (D/E). (B/C) Die Fehlerbalken zeigen +SEM. Statistik für Tag 4 für Dünndarm wurde mittels Mann-Whitney Test gewonnen. Der Balken zeigt für (D) den Median und für (E) den Mittelwert. Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten ermittelt durch (D) Mann-Whitney *** p<0.0001 und (E) Student's t-Test ***p<0.0005.

Adulte im Darm aufwiesen. Bei Cpa3^{Cre} Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund (Abb.3.3.D) hatten mastzellkompetenten Mäuse ungefähr 100 adulte *S. rattii*, wohingegen mastzelldefiziente Mäuse eine Steigerung auf knapp 180 Würmer im Dünndarm hatten. C57BL/6 Mäuse sind susceptibler für eine *S. rattii* Infektion als BALB/c Mäuse [124]. Der Vergleich von BALB/c und C57BL/6 Wildtypen (Cpa3^{wt} Mäuse) zeigte, dass sowohl im Kopf, als auch in der Lunge eine gleiche Anzahl an Larven während den ersten Tagen der Infektion im Gewebe zu finden war (Abb. 3.3.B/C). Erst im Dünndarm zeigte sich eine höhere Larvenzahl in C57BL/6 Mäusen, die später auch die unterschiedliche Höhe der Wurmlast in den susceptibleren C57BL/6 zu den resistenteren BALB/C Mäusen widerspiegelte (Abb. 3.3.D/E).

Ein wichtiger Marker für die Aktivität von mukosalen Mastzellen (mMCs) ist die Maus-Mastzellprotease 1 (mMCPT-1), welche spezifisch für mMCs ist [50]. Die Analyse der Mastzellaktivität in Cpa3^{Cre} und Cpa3^{wt} Mäusen, welche mit *S. ratt*i L3i subkutan in die Hinterpfote infiziert wurden ergab, dass mMCPT-1 schon früh (Tag 2, Tag4 p.i.) im Serum von mastzellkompetenten Cpa3^{wt} Mäusen, BALB/c (Abb.3.4.A) und C57BL/6 (Abb.3.4.B), mittels ELISA detektierbar war. Cpa3^{Cre} Mäuse zeigten erwartungsgemäß keine messbare Freisetzung an mMCPT-1 im Serum während der frühen Phase der Infektion von Tag 2 bis Tag 6. Jedoch war bei Cpa3^{Cre} Mäusen auf BALB/c Hintergrund ab Tag 6 und bei mastzelldefizienten Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund ab Tag 14 der Infektion mMCPT-1 im Serum detektierbar. Die Konzentration von mMCPT-1 stieg im Laufe der Infektion bis auf ca. 0,8 µg/mL bei Cpa3^{Cre} Mäusen auf BALB/c Hintergrund an Tag 14 und bis auf 0,3 µg/mL bei C57BL/6 Cpa3^{Cre} Mäusen an Tag 28 an. Damit unterschied sich die mMCPT-1 Konzentration im Serum von mastzellkompetenten Mäusen und mastzelldefizienten Mäusen zu diesem späten Zeitpunkt nicht mehr. Das überraschende Ergebnis, dass mastzelldefizienten Mäuse eine Freisetzung von mMCPT-1 zeigten, wird in Abschnitt 4.6. näher diskutiert.

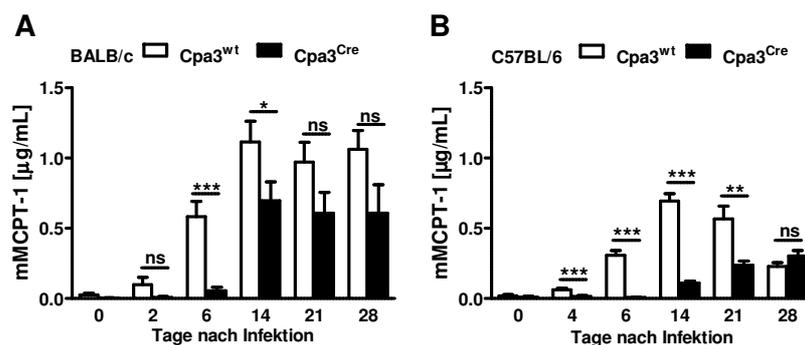


Abb.3.4. Aktivität von mukosalen Mastzellen während einer *S. ratt*i Infektion in Cpa3^{Cre} und Cpa3^{wt} Mäusen

Die Konzentration an mMCPT-1 im Serum von mit 2000 L3i *S. ratt*i infizierten Cpa3^{Cre} (schwarze Balken) und Cpa3^{wt} (weiße Balken) Mäusen wurde an den angegebenen Zeitpunkten mittels ELISA bestimmt. (A) zeigt den Verlauf auf BALB/c Hintergrund, (B) den Verlauf auf C57BL/6 Hintergrund. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen (n= 6-14/Tag). Die Fehlerbalken zeigen ±SEM. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied ermittelt durch Student's t-Test, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005, der einzelnen Tage, ns= nicht signifikant.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Mastzellen im Dünndarm wichtig sind, um die frühe Phase der Infektion (Tag 6 p.i.) zu kontrollieren. Eine *S. ratt*i Infektion kann von immunkompetenten Mäusen kontrolliert und innerhalb von ca. vier Wochen vollständig beendet werden [125]. Im Folgenden wurde untersucht, welche Rolle Mastzellen bei der endgültigen Expulsion von *S. ratt*i aus dem Darm spielen. Dafür wurde der Infektionsverlauf in mastzellkompetenten und -defizienten Mäusen anhand des Ausstoßes an *S. ratt*i DNA als Indikator für *S. ratt*i Eier und schon geschlüpften ersten Larven (L1) mittels quantitativer RT-PCR auf *S. ratt*i 28S RNA-DNA im Fäzes der Mäuse bis zur Beendigung der Infektion verfolgt.

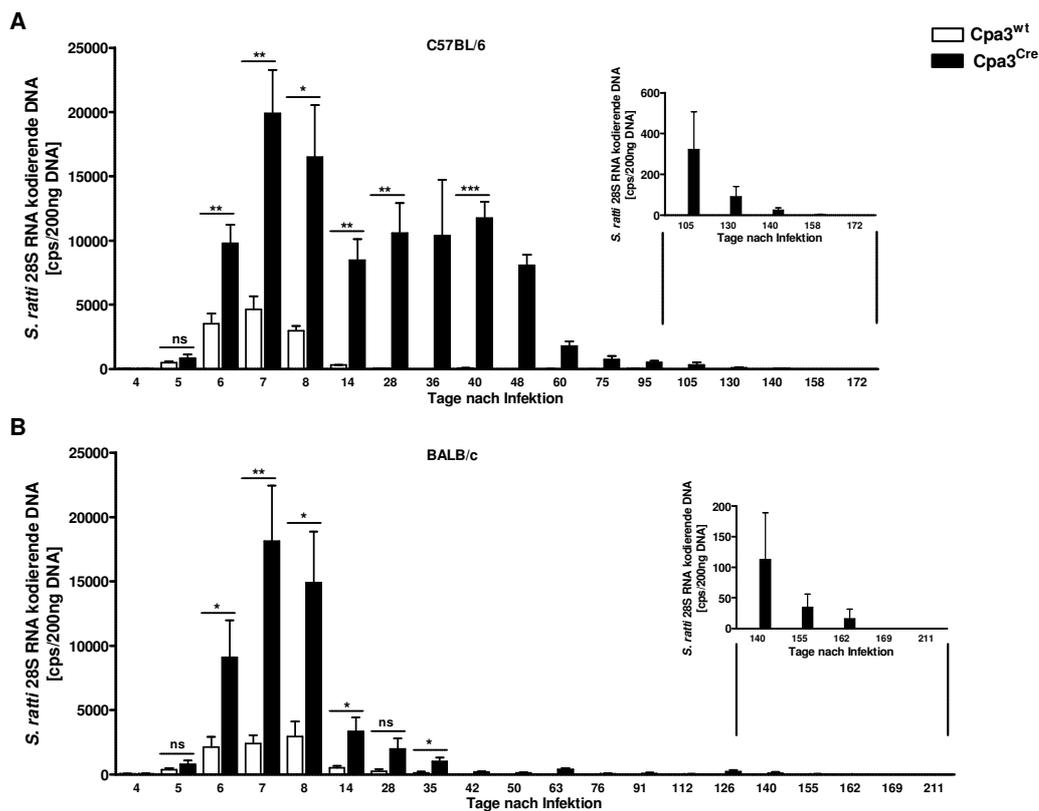


Abb. 3.5. Infektionskinetik von Cpa3^{Cre} Mäusen

Cpa3^{Cre} (schwarze Balken) und Cpa3^{wt} (weiße Balken) Mäuse wurden mit 2000 *S. rattii* L3is.c. in den Hinterfuß infiziert und der Ausstoß an *S. rattii* 28S RNA codierende DNA im Fäzes der Mäuse an den angegebenen Tagen mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Graphen vereinigen jeweils die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=3-14/Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen \pm SEM. Für die Statistik wurde jeder dargestellte Tag einzeln analysiert: Student's t-Test oder Mann-Whitney-Test; *<0,05; **<0,01; ***<0,001. Im Fall der Klärung der Infektion, wenn also alle Werte einer Gruppe 0 einnehmen, konnte keine Statistik mehr durchgeführt werden.

Die Analyse des Infektionsverlaufs in Cpa3^{Cre} Mäusen auf beiden Hintergründen zeigte, dass mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse ihren höchsten Ausstoß an *S. rattii* 28S RNA kodierender DNA an Tag 7 der Infektion hatten (Abb.3.5.). Dabei ist der Ausstoß an *S. rattii* DNA bei Cpa3^{Cre} Mäusen ca. viermal so hoch, wie bei ihren mastzellkompetenten Wurfgeschwistern. Der erhöhte Ausstoß korrelierte dabei mit der erhöhten Wurmlast der Mäuse an Tag 6 der Infektion (Abb.3.3.D/E). Ab Tag 42 konnte bei Cpa3^{wt} Mäusen keine *S. rattii* DNA im Fäzes mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen einen Ausstoß von *S. rattii* DNA auf geringem Niveau bis zu 160 Tage nach Infektion (Abb. 3.5.). Der Ausstoß von *S. rattii* DNA im Fäzes von mastzelldefizienten C57BL/6 Cpa3^{Cre} Mäusen reduzierte sich nach ca. 60 Tagen und bei BALB/c Cpa3^{Cre} Mäusen nach 14 Tagen. Dies zeigt noch einmal die unterschiedliche Suszeptibilität der beiden Mausstämme.

Die angewendete PCR weist *S. rattii* DNA im Fäzes nach. Sie kann nicht dafür verwendet werden, um zu unterscheiden, ob eine Maus noch mit einem lebenden, reproduzierenden Wurm infiziert

ist, oder ob sie nur noch totes Wurmmaterial ausscheidet. Um zu überprüfen, ob der verlängerte Ausstoß an *S. rattii* DNA bei den mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen die Gegenwart von lebenden Würmern im Dünndarm reflektiert, wurden Cpa3^{Cre} Mäuse mit *S. rattii* L3i infiziert. Nach 90 Tagen wurden die Mäuse getötet, der Darm präpariert und ausgewaschene Würmer mittels Mikroskop analysiert. Aus den Dünndärmen dieser Mäuse konnten ein adultes Weibchen (Abb.3.6.A) und vitale erste Larven L1 isoliert werden (Abb.3.6.B). Dies zeigt, dass Cpa3^{Cre} Mäuse zu diesem späten Zeitpunkt der Infektion noch mit lebenden und reproduzierenden Würmern infiziert waren.

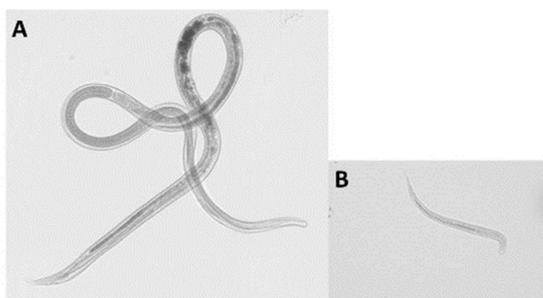


Abb.3.6. Adultes *S. rattii* Weibchen und L1 aus d90 infizierten BALB/c Cpa3^{Cre} Mäusen

BALB/c Cpa3^{Cre} Mäuse wurden mit 2000 *S. rattii* L3i s.c. in den Hinterfuß infiziert und an Tag 90 p.i. der Darm auf noch vorhandene Würmer analysiert. Aufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM 880 Mikroskop gemacht. (A) adultes Weibchen; 40x Vergrößerung, (B) L1, 100x Vergrößerung.

Im Darm finden sich sowohl mukosale Mastzellen, als auch Bindegewebsmastzellen. Dabei sind mMCS in der Lamina Propria, und bei Infektion in der Nähe zum Parasiten zwischen den intestinalen Epithelzellen zu finden. CtMCS sind in den unteren Schichten des Dünndarms lokalisiert, vor allem in der Serosa. Um zwischen dem Einfluss von mMCS und ctMCS bei der Abstoßung des Wurms zu differenzieren, wurde die Wurmlast an Tag 6 in Mcpt5^{Cre} Mäusen analysiert. Die Mäuse wurden dafür mit *S. rattii* iL3 infiziert und an Tag 6 der Infektion der Dünndarm präpariert und die ausgewanderten Larven lichtmikroskopisch ausgezählt. Interessanterweise führte bereits das Fehlen von ctMCS in Mcpt5^{Cre} Mäusen allein zu einer signifikant erhöhten Wurmlast an Tag 6 der Infektion (Abb. 3.7.B). Die erhöhte Wurmlast an Tag 6 der Infektion im Darm ist dabei nicht auf ein verändertes Wanderverhalten der dritten Larven im Gewebe zurückzuführen. Wie schon bei den komplett mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen war die Anzahl an wandernden Larven in Kopf, Lunge und Darm von mit *S. rattii* infizierten Mcpt5^{Cre} Mäusen im Vergleich zu Mcpt5^{wt} Mäusen an Tag 2 der Infektion nicht verändert (Abb. 3.7.A). Die Analyse des Infektionsverlaufs ergab, dass sowohl Mcpt5^{Cre}, als auch Mcpt5^{wt} Mäuse

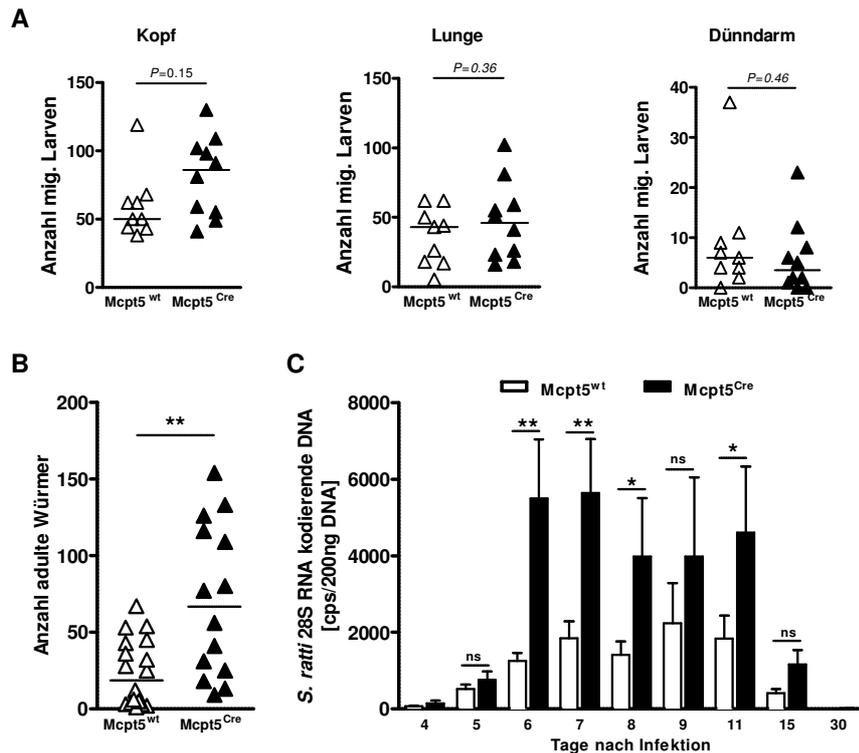


Abb.3.7. Phänotyp von ctMC-defizienten Mct5^{Cre} Mäusen

Mcpt5^{Cre} (schwarze Dreiecke/Balken) und Mcpt5^{wt} (weiße Dreiecke/Balken) Mäuse wurden mit 2000 L3i *S. ratti* s.c. in den Hinterfuß infiziert. Die Anzahl an migrierenden Larven wurde an Tag 2 in Kopf, Lunge und Darm analysiert (A). (B) zeigt die Wurmlast an Tag 6 der Infektion und (C) den Infektionsverlauf der anhand des Ausstoß an *S. ratti* 28S RNA kodierende DNA im Fäzes der Mäuse an den angegebenen Tagen mittels qRT-PCR analysiert wurde. Die Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied ermittelt durch Student's t-Test, $**<0,01$ (A). Statistik für (B) wurde mittels Mann-Whitney-Test für jeden einzelnen Tag ermittelt. Die Graphen vereinen Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=8-10) (A) bzw. aus drei unabhängigen Experimenten (B/C) (B) n=14-18; (C) n=4-10/Tag. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Median. Statistik wurde mittels Student's t-Test oder Mann-Whitney-Test, $*p<0,05$; $**p<0,01$, gewonnen. ns= nicht signifikant.

ihren höchsten Ausstoß an *S. ratti* 28S RNA kodierende DNA um Tag 6/7 der Infektion zeigten (Abb.3.7.C). Dabei hatten Mcpt5^{Cre} Mäuse einen signifikant höheren Ausstoß über die Tage 6-15 im Vergleich zu ihren mastzellkompetenten Mcpt5^{wt} Wurfgeschwistern. Der erhöhte Ausstoß an *S. ratti* DNA im Fäzes von Mcpt5^{Cre} Mäusen korrelierte dabei mit der erhöhten Wurmlast im Dünndarm der Mäuse an Tag 6 (Abb. 3.7.B). Mcpt5^{Cre} Mäuse beendeten die Infektion jedoch mit derselben Kinetik wie ihre ctMC-kompetenten Wurfgeschwister innerhalb von 30 Tagen (Abb.3.7.C). Demnach sind ctMCs wichtig für die Kontrolle der Parasitenlast im Darm, jedoch sind sie nicht für eine erfolgreiche Beendigung der *S. ratti* Infektion erforderlich.

Dies spricht dafür, dass mukosalen Mastzellen, die neben ctMCs in den mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen fehlen, wichtig sind für die Beendigung der Infektion. Die Frage, in wie weit mukosale Mastzellen alleine zur Kontrolle der Parasitenlast an Tag 6 nach Infektion beitragen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden, da ein entsprechendes Mausmodell in dem nur mMCs fehlen, bisher nicht vorhanden ist.

3.2.3. Mastzellen haben keinen Einfluss auf die Etablierung einer Th2 Immunantwort

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Mastzellen eine wichtig Rolle bei der Kontrolle der *S. rattii* Infektion im Darm spielen. Spezifisch mMCs sind essentiell für die Abstoßung des Parasiten und die endgültige Klärung der Infektion. Dabei stellt sich die Frage, ob Mastzellen nur als Effektorzellen zur Beendigung der Infektion nötig sind oder, ob Mastzellen im Allgemeinen an der Initiierung einer adaptiven Immunantwort gegen *S. rattii* beteiligt sind, wie es für die Infektion mit einem anderen gastrointestinalen Nematoden, *H. polygyrus*, gezeigt werden konnte [126]. Um zu überprüfen ob Mastzellen bei der Etablierung der adaptiven Immunantwort beteiligt sind, wurde die zelluläre und humorale Immunantwort in *S. rattii* infizierten Cpa3^{Cre} und Cpa3^{wt} Mäusen verglichen.

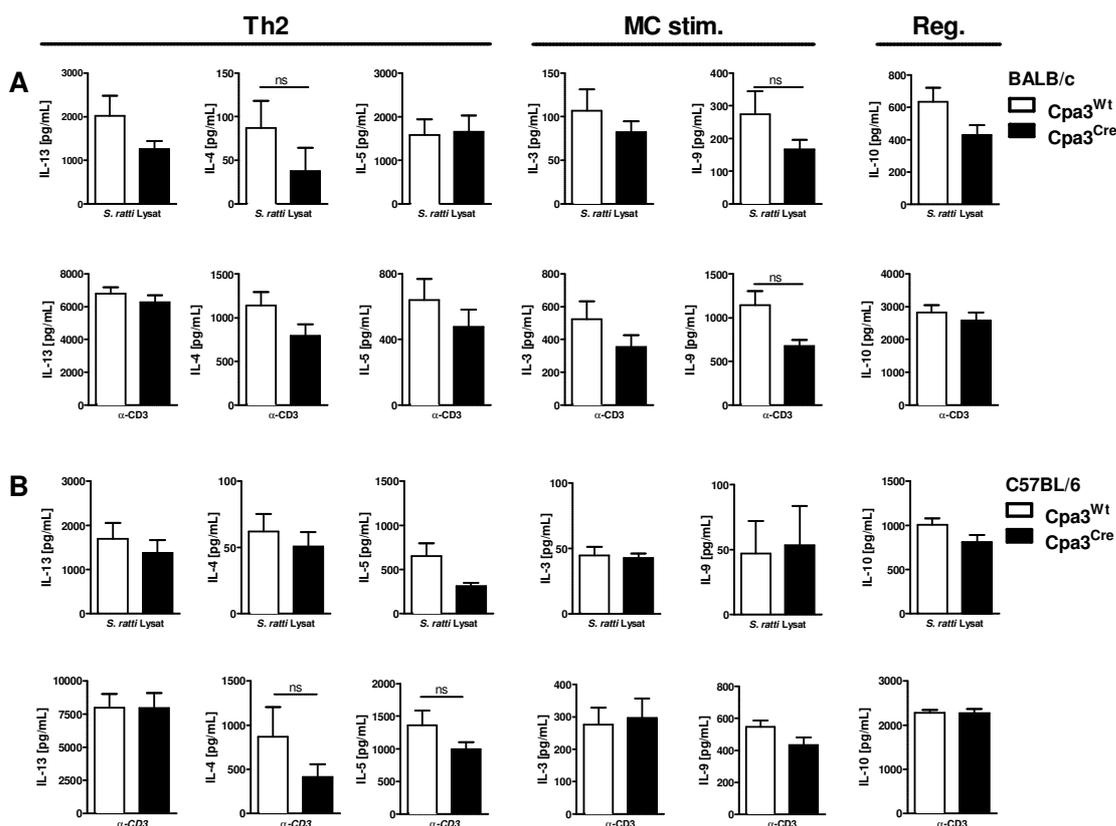


Abb.3.8. Zytokinantwort in Milzzellen von mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen

Milzzellen aus BALB/c Cpa3^{Cre} (A) und C57BL/6 Cpa3^{Cre} (B) Mäusen (schwarze Balken) und den jeweiligen Cpa3^{Wt} Mäusen (weiße Balken) wurden antigenspezifisch mit *S. rattii* Lysat (40µg/mL) bzw. polykonal mit α -CD3 (1µg/mL) für 3 Tage bei 37°C stimuliert. Zytokine im Überstand wurden mittels ELISA gemessen. Die Graphen zeigen den Mittelwert von vereinigten Daten aus zwei unabhängigen Experimente (n=7-8). Fehlerbalken zeigen SEM. Statistik wurde mittels Student's T-Test bzw. mit Mann-Whitney-Test ermittelt; ns= nicht signifikant.

Zur Analyse der zellulären Immunantwort in mastzelldefizienten Mäusen wurden $Cpa3^{Cre}$ und $Cpa3^{wt}$ Mäuse mit 2000 L3i *S. rattii* infiziert, an Tag 6 p.i. Milz und mLN isoliert und die T Zellen polyklonal mit anti-CD3 oder antigenspezifisch mit *S. rattii* Lysat stimuliert. Nach 72h Inkubation wurden die Zytokinkonzentrationen im Überstand mittels ELISA bestimmt. $Cpa3^{Cre}$ Mäuse auf BALB/c Hintergrund zeigten im Vergleich zu $Cpa3^{wt}$ Mäusen keine drastischen Veränderungen in der Zytokinantwort in der Milz (Abb.3.8.A). Die Konzentration der Th2 assoziierten Zytokine IL-13, IL-4, IL-5 sowie die Konzentration der mastzellstimulierenden Zytokine IL-3 und IL-9 waren sowohl nach anti-CD3 Stimulation, als auch nach antigenspezifischer Stimulation von Zellen aus der Milz (Abb.3.8.A/B) und den mesenterialen Lymphknoten (Abb.3.9.A/B) zwischen mastzelldefizienten $Cpa3^{Cre}$ und mastzellkompetenten $Cpa3^{wt}$ Mäusen auf beiden Hintergründen unverändert. Zudem war die Konzentration des regulatorisch wirkenden Zytokins IL-10 sowohl in $Cpa3^{wt}$ und $Cpa3^{Cre}$ Mäusen gleich (Abb.3.8. und Abb.3.9.). Insgesamt war also die zelluläre Immunantwort nicht auffällig verändert.

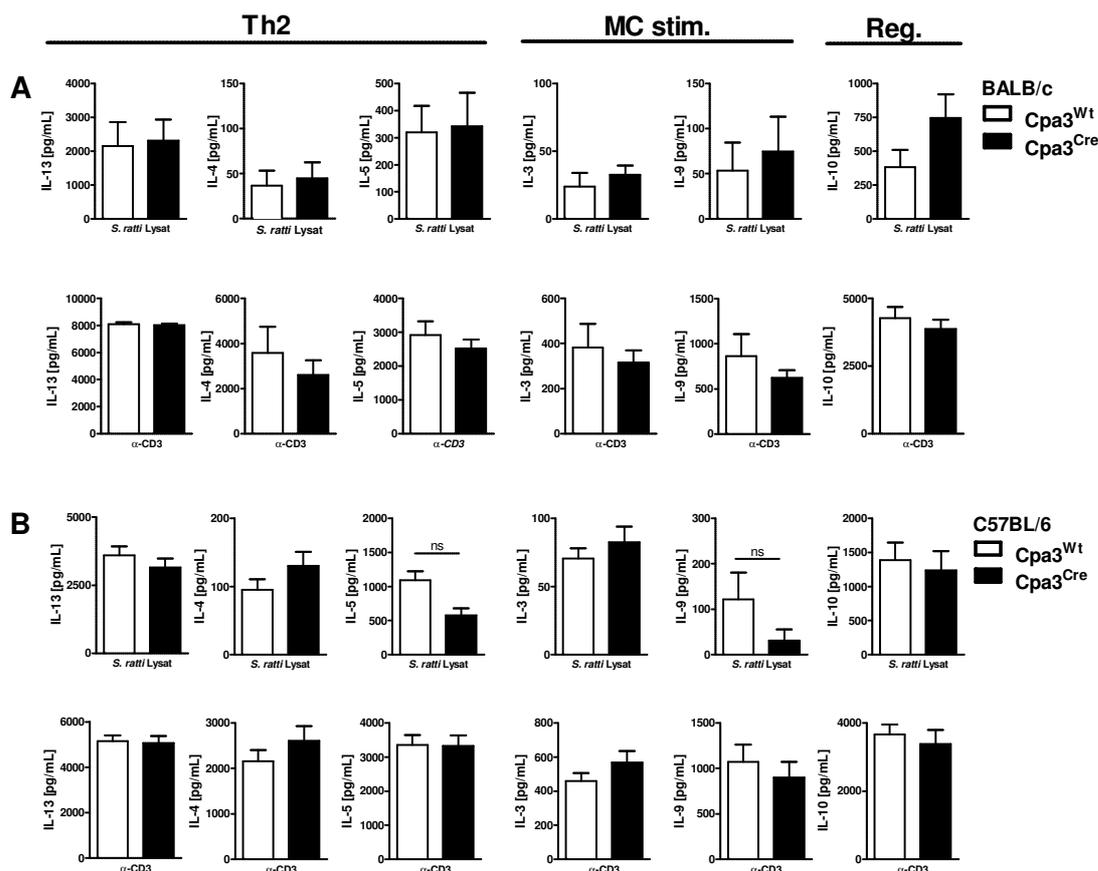


Abb.3.9. Zytokinantwort im mesenterialen Lymphknoten in $Cpa3^{Cre}$ Mäusen

Die Zytokinantwort im Überstand von stimulierten (3 Tage; 37°C) mesenterialen Lymphknotenzellen aus BALB/c $Cpa3^{Cre}$ (A) und C57BL/6 $Cpa3^{Cre}$ (B) Mäusen wurde mittels ELISA bestimmt. Stimuliert wurde antigenspezifisch mit *S. rattii* Lysat (40 μ g/mL) und polyklonal mit α -CD3 (1 μ g/mL). Die Graphen zeigen den Mittelwert der vereinigten Daten aus zwei unabhängige Experimentes (n=7-8). Fehlerbalken zeigen SEM. Sterne zeigen signifikante Unterschiede ermittelt durch Student's t-Test bzw. Mann-Whitney-Test; ns= nicht signifikant.

Als nächstes wurde die *S. rattii* spezifische humorale Antwort nach Infektion mit 2000 vitalen und bestrahlten L3i mittels ELISA bestimmt. Cpa3^{Cre} Mäuse auf C57BL/6 und BALB/c Hintergrund zeigten einen erhöhten Th2 assoziierten IgG1 Titer nach Infektion mit vitalen infektiösen dritten Larven (Abb.3.10.). Dieser war bei BALB/c Cpa3^{Cre} Mäusen signifikant erhöht (Abb.3.10.A). Antigenpezifisches IgE wurde nicht detektiert, aber die Konzentration an polyklonalem IgE im Serum war an Tag 36 nach Infektion signifikant in mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen im Vergleich Cpa3^{wt} Wurfgeschwistern auf BALB/c und C57BL/6 Hintergrund erhöht (Abb.3.10.). Sowohl der IgM, als auch der Th1 assoziierte IgG2b Titer war in Cpa3^{Cre} Mäusen im Vergleich zu Cpa3^{wt} Mäusen unverändert (Abb.3.10.).

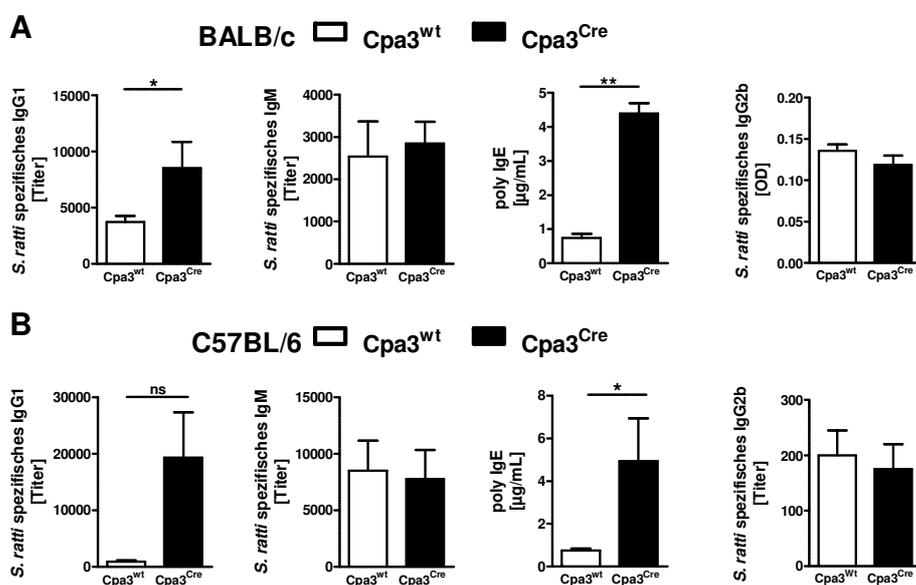


Abb.3.10. Antikörperantwort von Cpa3^{Cre} Mäusen

Die Titer bzw. die Konzentration der Antikörper wurde an Tag 28 (A) bzw. Tag 21(B) p.i. in Seren von infizierten Cpa3^{Cre} und Cpa3^{wt} Mäusen mittels ELISA bestimmt. (A) zeigt die Antikörperantwort in BALB/c Cpa3^{Cre} und (B) in C57BL/6 Cpa3^{Cre} Mäusen. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus den vereinigten Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n=5-9). Fehlerbalken zeigen SEM und die Sterne zeigen signifikante Unterschiede ermittelt durch Mann-Whitney-Test, *p<0,05, **p<0,01.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Wurmlast in Cpa3^{Cre} Mäusen ursächlich für die erhöhte Antikörperantwort ist, wurden Mäuse mit bestrahlten Larven infiziert. Diese Larven sind noch vital und können sich im Gewebe bewegen. Jedoch sind bestrahlte L3i nicht mehr in der Lage sich zu häuten und der Großteil stirbt während der Wanderung im Gewebe. Dabei rufen die wandernden Larven aber eine potente Immunantwort in den Mäusen hervor. Diese Methode

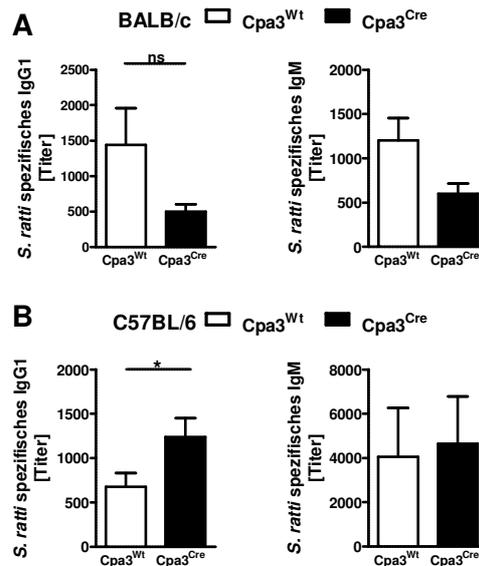


Abb.3.11. Antikörperantwort in Cpa3Cre Mäusen nach Infektion mit bestrahlten Larven

Cpa3^{Cre} und Cpa3^{Wt} Mäuse auf BALB/c (A) und C57BL/6 (B) Hintergrund wurden mit 2000 bestrahlten L3i *S. rattii* vakziniert und Seren an Tag 36 (A) bzw. Tag 28 (B) auf Antikörpertiter/-konzentration mittels ELISA untersucht. Die Graphen zeigen die Mittelwerte der vereinigten Daten von zwei unabhängigen Experimente (n=4-13). Fehlerbalken zeigen SEM. Sterne zeigen signifikante Unterschiede ermittelt durch Mann-Whitney-Test *p<0,05.

kann auch als Vakzinierung benutzt werden um einen Immunschutz gegenüber einer zweiten Infektion aufzubauen. Nach Infektion mit 2000 bestrahlten L3i zeigten die Cpa3^{Cre} Mäuse annähernd gleiche Antikörpertiter wie ihre Cpa3^{Wt} Wurfgeschwister (Abb.3.11.). C57BL/6 Cpa3^{Cre} Mäuse zeigten noch einen leicht erhöhten IgG1 Titer im Vergleich zu mastzellkompetenten Cpa3^{Wt} Mäusen (Abb.3.11.B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Etablierung einer *S. rattii*-spezifischen Antikörperantwort in den mastzelldefizienten Mäusen nicht gestört ist. Die erhöhte Wurmlast in mastzelldefizienten Mäusen führt sogar zu der Produktion von höheren Antikörpertitern, als bei mastzellkompetenten Wurfgeschwistern.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Abwesenheit von ctMCs und mMCs keinen Einfluss auf die Immunantwort hat, zeigte sich, wie erwartet, dass die Abwesenheit von ctMCs allein bei der Etablierung einer Immunantwort auf eine *S. rattii* Infektion ebenfalls keine Rolle spielte (Abb.3.12.). Die Analyse der Antikörperantwort für Mcpt5^{Cre} Mäuse ergab, dass Mcpt5^{Cre} Mäuse im Vergleich zu Mcpt5^{Wt} Mäusen keine Veränderungen in den Titern für *S. rattii* spezifisches IgG1 und IgM zeigten (Abb.3.12.A). Auch die Serumkonzentration an polyklonalem IgE war bei Wildtypen und ctMC-defizienten Mäusen gleich. Die Produktion von IL-13 und IL-5 nach *ex vivo* Stimulation von Milzzellen durch *S. rattii* Antigen oder durch anti-CD3 war zwischen Mcpt5^{Cre} und Mcpt5^{Wt} Mäusen auch gleich (Abb.3.12.B). Die Analyse der Immunantwort in diesem

unabhängigen System der Mcpt5^{Cre} Mäuse verdeutlicht noch einmal, dass Mastzellen nicht wichtig sind für die Etablierung einer Immunantwort.

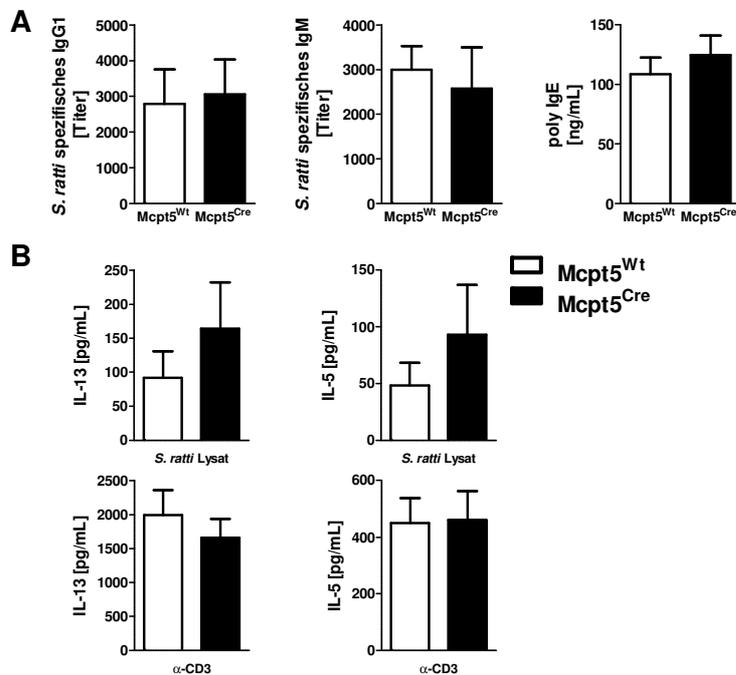


Abb.3.12. ctMC-Defizienz führt auch in Mcpt5^{Cre} Mäusen nicht zu einer veränderten Immunantwort

(A) zeigt die humorale Immunantwort in Seren von Mcpt5^{Cre} und Mcpt5^{Wt} Mäusen an Tag 28 p.i. welche mittels ELISA quantifiziert wurde. (B) zeigt die Zytokinantwort von *ex vivo* stimulierten (antigenspezifisch: *S. ratti* Lysat, 40 µg/mL; polyklonal: anti-CD3, 1 µg/mL) Milzzellen von Tag 6 infizierten Mcpt5^{Cre} und Mcpt5^{Wt} Mäusen. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus den vereinigten Daten von zwei unabhängige Experimente (n=7-14). Die Fehlerbalken zeigen+SEM.

Nach den bisherigen Ergebnissen zeigen mastzelldefizienten Mäuse keine Einschränkungen, was den Aufbau einer *S. ratti*-spezifischen Th2 Immunantwort angeht. Diese Th2 Immunantwort vermittelt bei Mäusen welche eine erste *S. ratti* Infektion überstanden haben einen Teilschutz gegen eine zweite Infektion. Dabei werden vor allem die wandernden Larven im Gewebe während der zweiten Infektion effektiv getötet und nur vereinzelte Larven erreichen den Darm [124].

Um zu analysieren, ob auch in mastzelldefizienten Mäusen die wandernden Larven im Gewebe bei einer zweiten Infektion effektiv abgetötet werden, wurden Cpa3^{Cre} Mäuse mit bestrahlten L3i immunisiert und nach vier Wochen mit 2000 vitalen Larven s.c. in den Hinterfuß infiziert und die Anzahl an Larven im Gewebe bestimmt. Zur Kontrolle der Parasitenlast in Abwesenheit von einer schützenden Immunantwort, wurden jeweils mastzelldefiziente und mastzellkompetente Mäuse, welche zum ersten Mal mit *S. ratti* L3i infiziert wurden, mitgeführt. Sowohl Cpa3^{wt}, als auch Cpa3^{Cre} Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der Anzahl an wandernden Larven im Kopf während der Reinfektion im Vergleich zu erst infizierten Mäusen (Abb.3.13.A/B).

Mastzelldefiziente Mäuse konnten also die wandernden Larven im Gewebe genauso effektiv abtöten, wie ihre mastzellkompetenten Wurfgeschwister. In der ersten Infektion wurden die Larven im Gewebe ebenfalls in Abwesenheit von Mastzellen kontrolliert, erst im Darm zeigte sich, dass Mastzellen als Effektorzellen vor Ort wichtig sind, um die Parasitenlast zu kontrollieren und die Infektion zu beenden (Abb.3.3.D/E und Abb.3.7.B). Daher sollte auch in der Reinfektion untersucht werden, ob die generierte adaptive Immunantwort auch mastzelldefiziente Mäuse die Etablierung einer zweiten Infektion im Darm verhindern kann. Dazu wurden $Cpa3^{Cre}$ und $Mcpt5^{Cre}$ Mäuse reinfiziert und die Wurmlast an Tag 6 nach Reinfektion bestimmt. Kontroll- $Cpa3^{wt}$ Mäuse zeigten in der ersten Infektion im Mittel eine Wurmlast von 60 (BALB/c) und 150 (C57BL/6), während in der Reinfektion keine adulten

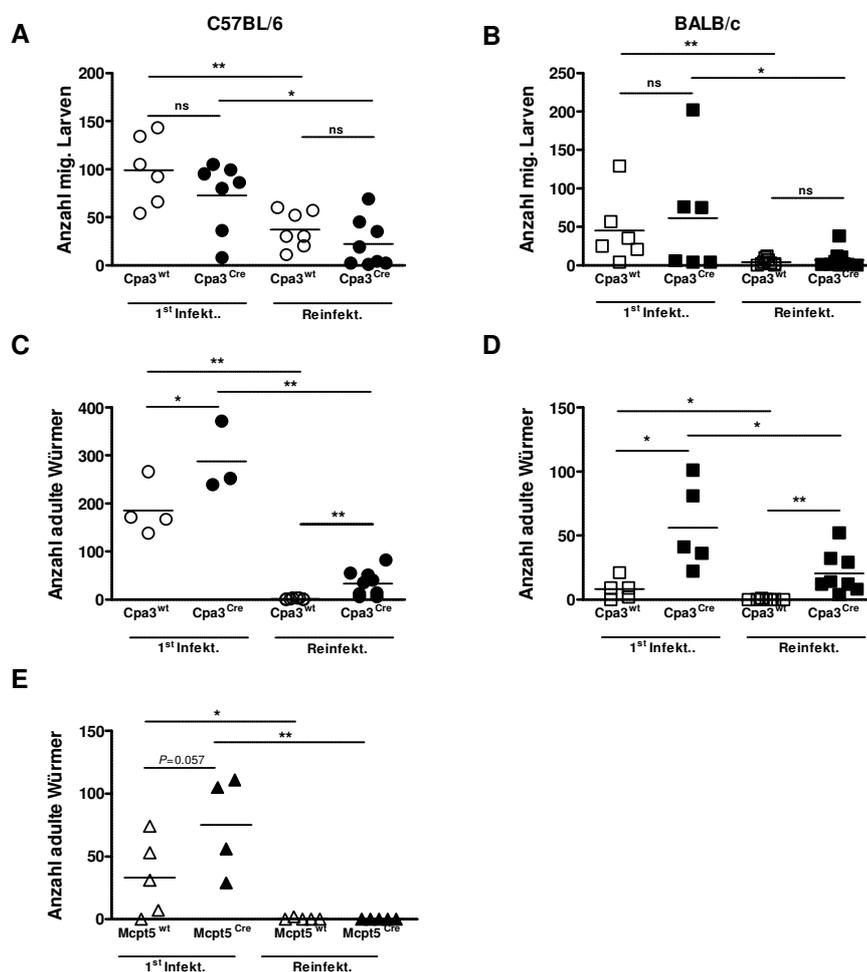


Abb.3.13. Larvenlast und Parasitenlast nach Reinfektion von mastzelldefizienten Mäusen

(A-D) $Cpa3^{Cre}$ (schwarze Symbole) und $Cpa3^{wt}$ (weiße Symbole) Mäuse wurden naiv belassen oder mit 2000 bestrahlten *S. ratt* L3i vakziniert. Nach 4 Wochen wurden die Mäuse mit 2000 vitalen L3i reinfiziert. (A/C) Anzahl der wandernden Larven im Kopf an Tag 2 p.i. (C/ D) Anzahl adulter Würmer im Darm an Tag 6 p.i. (A/C) C57BL/6; (B/D) BALB/c. (E) $Mcpt5^{Cre}$ (schwarze Symbole) und $Mcpt5^{wt}$ (weiße Symbole) Mäuse wurde wie oben beschrieben vakziniert und reinfiziert. Dargestellt ist die Anzahl adulter Würmer an Tag 6 p.i. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert. Die Graphen zeigen Daten vereinigt aus zwei unabhängigen Experimenten (A-D); n=3-8 bzw. aus einem Experiment (E). Sterne zeigen signifikante Unterschiede ermittelt durch Student's t-test oder Mann-Whitney-Test, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Parasiten gefunden wurden (Abb.3.13.C/D). Cpa3^{wt} Mäuse zeigten also eine Reduktion der Wurmlast im Dünndarm in der Reinfektion von fast 100%. Im Gegensatz dazu waren im Dünndarm von Cpa3^{Cre} Mäusen auf BALB/c und C57BL/6 Hintergrund an Tag 6 der Reinfektion reproduzierende, adulte Weibchen im Dünndarm zu finden (Abb.3.13.C/D). BALB/c Cpa3^{Cre} Mäuse hatten im Mittel der Reinfektion ca. 20 adulte Weibchen und C57BL/6 Cpa3^{Cre} Mäuse im Mittel ca. 40 adulte Weibchen im Darm. Dieses Ergebnis zeigt, dass mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse nicht so effizient vor einer zweiten Infektion geschützt sind, wie mastzellkompetente Wildtypmäuse. Im Gegensatz dazu hatten sowohl vakzinierte ctMC-kompetente Mcpt5^{wt}, als auch vakzinierte ctMC-defiziente Mcpt5^{Cre} Mäuse entweder keine oder nur einen adulten Wurm an Tag 6 der Reinfektion Darm (Abb.3.13.E). Die ctMC-defizienten Mcpt5^{Cre} Mäuse waren demnach genauso geschützt, wie die ctMC-kompetenten Wurfgeschwister, obwohl das Fehlen der ctMCs in der ersten Infektion auch zu einer erhöhten Parasitenlast an Tag 6 nach Infektion führte.

Insgesamt zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass ctMCs und mMCs nicht wichtig sind für die Bekämpfung der wandernden Larven im Gewebe; ctMCs sind generell jedoch wichtig, um die Wurmlast im Darm auf dem Höhepunkt der Infektion zu kontrollieren. In wie weit mMCs alleine wichtig sind für die Kontrolle der Parasitenlast kann hier nicht geklärt werden, da, wie schon erwähnt, bisher noch kein Mausmodell generiert wurde, in dem selektiv mMCs fehlen. Jedoch sind ctMCs entbehrlich für die Beendigung der *S. ratti* Infektion, wohingegen aber mMCs benötigt werden, um die Infektion zu terminieren. Die Tatsache, dass die zelluläre und humorale Immunantwort und die Eradikation von wandernden Larven im Gewebe immuner Mäuse bei einer zweiten Infektion auch in Abwesenheit von Mastzellen unverändert war, spricht dagegen, dass MC wesentlich am Aufbau einer potenten und schützenden Immunantwort beteiligt sind. Mastzellen scheinen also vor allem zentrale Effektorzellen für die Kontrolle und die Expulsion des parasitären Nematoden zu sein.

3.2.4. Zusätzliches Fehlen der adaptiven Immunantwort in Cpa3^{Cre} Mäusen führt zu keiner verschlechterten Kontrolle der *S. ratti* Infektion

Cpa3^{Cre} Mäusen waren für knapp 5 Monate mit lebenden, reproduzierenden *S. ratti* Weibchen infiziert. Auch das Fehlen von adaptiver Immunität in T-Zell defizienten Nacktmäusen oder in T- und B-Zell defizienten RAG1^{-/-} Mäusen führte zu einem verlängerten *S. ratti* Infektionsverlauf ([125], Breloer, unpublizierte Daten). Da von T-Zellen produzierte Zytokine und von B-Zellen produzierte Antikörper für die Expansion und die Effektorfunktion von mMCs wichtig sind,

wäre es möglich, dass der Phänotyp der RAG1^{-/-} Mäuse durch eine fehlende Aktivierung der Mastzellen durch das adaptive Immunsystem verursacht wird [127, 128].

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden C57BL/6 Cpa3^{Cre} Mäuse auf RAG1^{-/-} Mäuse zurückgekreuzt. Die Nachkommen aus der F2 Generation, RAG1^{-/-}xCpa3^{Cre} und RAG1^{-/-}xCpa3^{wt} Mäuse, wurden im Experiment verglichen, um den Effekt einer zusätzlichen Mastzelldefizienz in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems zu analysieren. Die Mäuse wurden mit 2000 L3i infiziert, die Wurmlast an Tag 6 nach Infektion im Dünndarm, das Körpergewicht und der Ausstoß an *S. ratti* DNA im Fäzes bestimmt (Abb.3.14.). Interessanterweise zeigten mastzelldefiziente RAG1^{-/-}xCpa3^{Cre} Mäuse nur eine tendenziell verschlechterte Kontrolle der Wurmlast an Tag 6 der Infektion im Vergleich zu mastzellkompetenten RAG1^{-/-}xCpa3^{wt} Mäusen (Abb.3.14.A). Das fehlende B- und T-Zell Kompartiment könnte zu kompensatorischen Effekten auf Seiten von Zellen des angeborenen Immunsystems führen, die stärker expandieren und so die fehlenden Zellen ersetzen. Dabei könnten auch Immunzellen, expandieren, die für die Kontrolle der Parasitenlast an Tag 6 der Infektion wichtig sind und so den Effekt der fehlenden

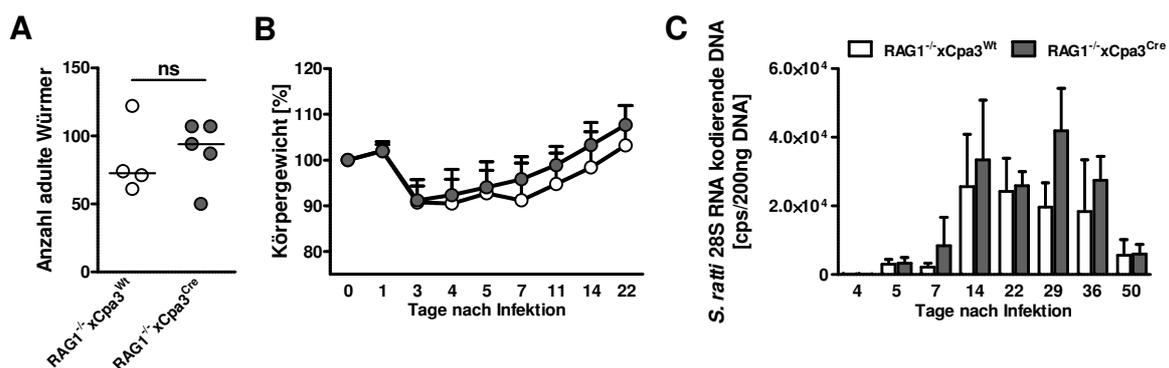


Abb.3.14. Zusätzliches Fehlen des adaptiven Immunsystems in mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen führt nicht zu einer verschlechterten Kontrolle der *S. ratti* Infektion

RAG1^{-/-}xCpa3^{Cre} (graue Punkte/Balken) und RAG1^{-/-}xCpa3^{wt} (weiße Punkte/Balken) Mäuse wurden mit 2000 L3i s.c. in den Hinterfuß infiziert und die Wurmlast an Tag 6 p.i. im Dünndarm bestimmt (A). Zudem wurde der Gewichtsverlust (B) und der Ausstoß an *S. ratti* DNA im Fäzes (C) mittels qRT-PCR auf *S. ratti* 28 S RNA kodierende DNA hin, über die Infektion hinweg verfolgt. Dargestellt ist jeweils ein Experiment (n=4-7). Jeder Punkt zeigt eine Maus und Balken repräsentieren den Median (A). Fehlerbalken zeigen SEM. Statistik wurde mittels Mann-Whitney-Test gemacht; ns= nicht signifikant.

Mastzellen in diesem System aufheben. Auch unterschieden sich mastzelldefiziente RAG1^{-/-}xCpa3^{Cre} Mäuse nicht von RAG1^{-/-}xCpa3^{wt} Mäusen, was den Verlauf des Verlustes an Körpergewicht betraf (Abb.3.14.B). Sowohl bei RAG1^{-/-}xCpa3^{Cre} und RAG1^{-/-}xCpa3^{wt} Mäusen war ein Abfall des Körpergewichts von ca. 10% des Ausgangsgewichtes an Tag 3 der Infektion festzustellen. Die Mäuse erholten sich aber ab Tag 7 wieder und an Tag 14 hatten alle Mäuse ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht. Die Analyse des Ausstoßes an *S. ratti* DNA im Fäzes der Mäuse zeigte auch keine signifikanten Unterschiede zwischen mastzelldefizienten und mastzellkompetenten RAG1^{-/-} Mäusen (Abb.3.14.C). Zudem hatten beide Mausgruppen an Tag 50

der Infektion noch einen nachweisbaren Ausstoß an *S. ratti* DNA im Fäzes. Dieses Experiment zeigt, dass entweder die Abwesenheit von Mastzellen oder die Abwesenheit des adaptiven Immunsystems eine Verlängerung der *S. ratti* Infektion verursachen, die durch die Abwesenheit der jeweils anderen Komponente nicht weiter verschlimmert wird. Dies weist darauf hin, dass das adaptive Immunsystem und Mastzellen in immunkompetenten Mäusen zusammen arbeiten müssen um die Infektion zu beenden.

3.3. Aktivierung und Regulation von Mastzellen

3.3.1. Antikörper-vermittelte Aktivierung von Mastzellen

Mastzellen können über eine Vielzahl an Rezeptoren aktiviert werden. Neben Komplementrezeptoren, Zytokinrezeptoren und TLRs (Toll-like-Rezeptoren) besitzen Mastzellen vor allem Fc-Rezeptoren, über die sie aktiviert werden. Neben Fc γ -Rezeptoren, die IgG binden, haben Mastzellen hauptsächlich Fc ϵ -Rezeptoren auf der Oberfläche, welche durch die Bindung von IgE quervernetzt werden und so zur Aktivierung der Mastzelle führen.

Um zu untersuchen, ob die Antikörper-vermittelte Mastzellaktivierung nötig ist für die Terminierung der Infektion, wurden RAG1^{-/-} (Mäuse denen aufgrund des Fehlens von B- und T-Zellen auch die Antikörper fehlen), als auch Cpa3^{Cre} Mäuse mit *S. ratti* spezifischem, hochtitrigem Antiserum behandelt und der Infektionsstatus über den Ausstoß an *S. ratti* DNA im Fäzes beobachtet. Das hochtitrige Antiserum wurde durch mehrfache Infektion von Wildtypmäusen generiert und mittels Herzpunktion gewonnen. Die Applikation eines so generierten gegen *S. ratti* Antigene gerichteten Antiserums vor der Infektion mit *S. ratti*, führt in Mäusen zu einer Reduzierung der Larvenlast im Gewebe [129] und zeigt so die biologische Aktivität des Antiserums. Das hier verwendete *S. ratti* spezifische Antiserum wies einen *S. ratti* spezifischen IgG1 Titer von ca. 1:8000 auf und die Konzentration von polyklonalem IgE im Antiserum betrug knapp 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Abb3.15.A/B) und konnte die Larvenlast in Kopf und Lunge in infizierten C57BL/6 Mäusen reduzieren (Abb3.15.C). In C57BL/6 Mäusen, welchen *S. ratti*-spezifisches Antiserum gespritzt wurde, konnten nur noch 1-2 Larven im jeweiligen Gewebe gefunden werden, wohingegen C57BL/6, welche mit naiven Serum behandelt wurden, im Kopf im Mittel 200 Larven und in der Lunge im Mittel 50 Larven aufwiesen.

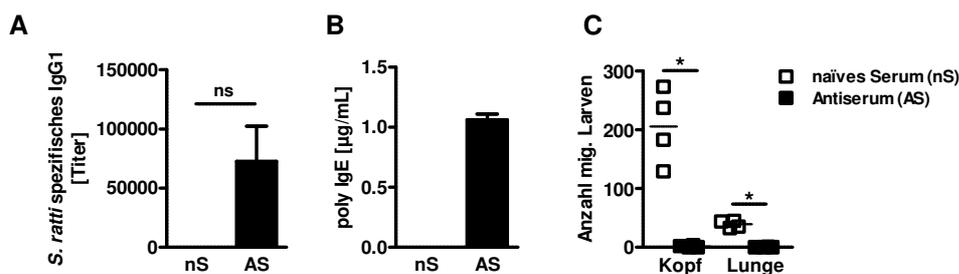


Abb.3.15. Effektivitätstest des Antiserums

Titer von *S. rattii* spezifischem IgG1 (A) und Konzentration von polyklonalem IgE (B) im Antiserum und naïvem Serum wurde quantifiziert mittels ELISA. (C) Anzahl migrierender Larven in Kopf und Lunge an d2 p.i. C57Bl/6 Mäusen wurde dafür 4h vor Infektion mit 2000 L3i *S. rattii* 500 µL Antiserum bzw. naïves Serum i.p. gespritzt. Jedes Symbol zeigt eine Maus, die Balken repräsentieren den Mittelwert. Fehlerbalken zeigen +SEM. (A) Bestimmung in Triplikaten (B) Bestimmung in Duplikaten (C) ein Experiment (n=4). Sterne zeigen signifikante Unterschiede ermittelt mit Mann-Whitney-Test, *p<0,05, ns= nicht signifikant.

Die Gabe des Antiserums bzw. des naiven Kontrollserums an Tag 28 und Tag 29 in infizierte C57BL/6 Cpa3^{Cre} Mäuse und RAG1^{-/-}-Mäuse führte nur zu einer kurzzeitigen Reduktion des Ausstoßes an *S. rattii* DNA im Fäzes (Abb.3.16.). Dies war aber unabhängig davon, ob die Mäuse mit *S. rattii*-spezifischem Antiserum behandelt wurden, oder aber mit dem Serum aus naïven

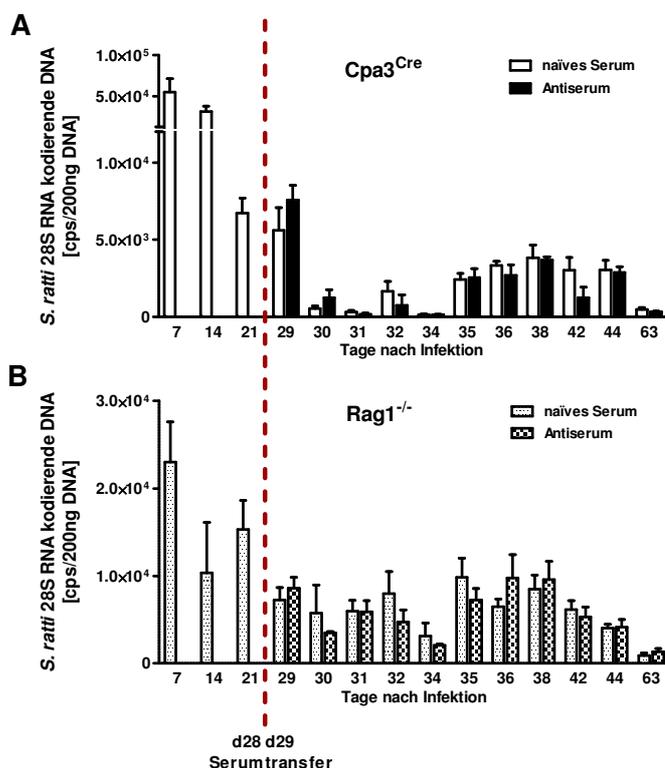


Abb.3.16. Serumtransfer in Cpa3^{Cre} und RAG1^{-/-} Mäuse

Cpa3^{Cre} (A) und RAG1^{-/-} (B) Mäuse wurde an Tag 28 und 29 p.i. 250µL Antiserum (schwarze Balken/stark gepunktete Balken) oder naïves Serum (weiße Balken/leicht gepunktete Balken) i.p. gespritzt. Der Ausstoß an *S. rattii* DNA im Fäzes wurde mittels qRT-PCR vor und nach Behandlung quantifiziert. Tag 7, 14 und 21 vor Behandlung dienen zur Kontrolle der Infektion und zur Bestimmung des Ausgangsniveaus. Dargestellt ist ein Experiment (n=3-5). Fehlerbalken zeigen SEM.

Mäusen. In beiden Mausstämmen konnte in diesem Versuch durch die Gabe des Antiserums keine Beendigung der Infektion erreicht werden. Es stellte sich die Frage, ob die Menge an verabreichten Antikörpern für die Reduktion der Wurmlast in Cpa3^{Cre} und RAG1^{-/-} Mäusen ausreichte, um die Infektion zu beenden (Abb.3.16.).

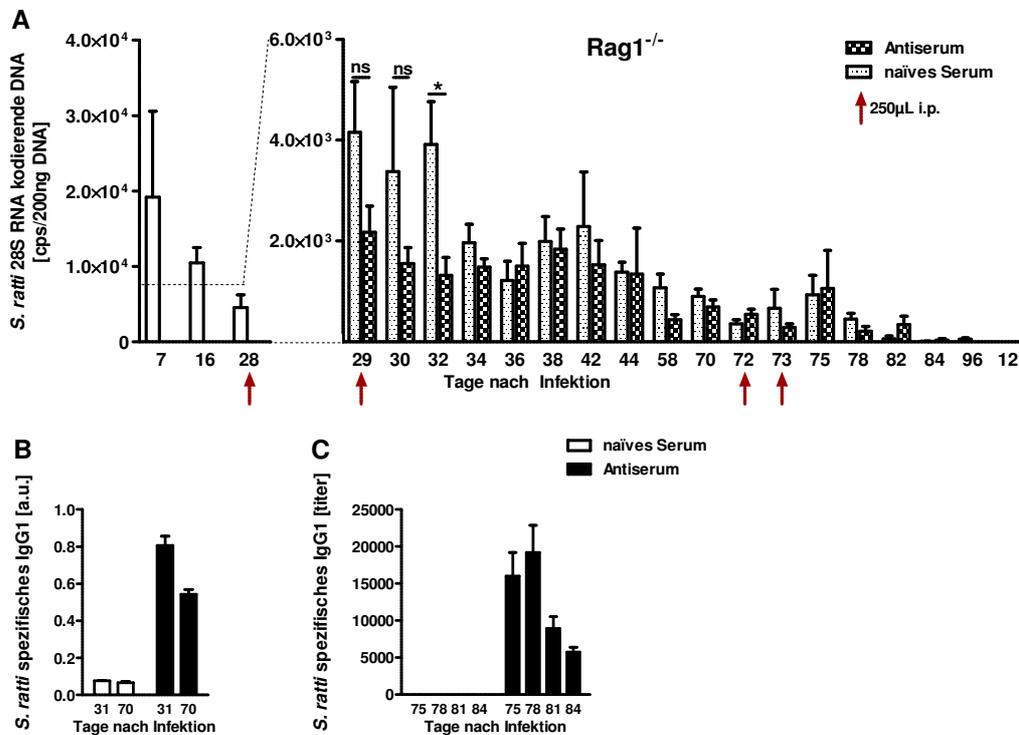


Abb.3.17. Zweifacher Serumtransfer in RAG1^{-/-} Mäusen

RAG1^{-/-} Mäuse wurden mit 2000 L3i *S. ratti* s.c. infiziert und an Tag 28, 29 und an Tag 72, 73 mit 250 µL *S. ratti*-spezifischem Antiserum (schwarze und stark gepunktete Balken) bzw. naïvem Kontrollserum (weiße und leicht gepunktete Balken) behandelt. Der *S. ratti* DNA-Ausstoß im Fäzes wurde vor und nach dem Serumtransfer mittels qRT-PCR bestimmt (A). *S. ratti* spezifisches IgG1 im Serum der behandelten RAG1^{-/-} Mäuse wurde mittels ELISA nach dem ersten (B) und nach dem zweiten (C) Serumtransfer verfolgt. Dargestellt ist ein Experiment (n=5). Fehlerbalken zeigen SEM. Sterne zeigen signifikante Unterschiede ermittelt mittels Mann-Whitney-Test für jeden einzelnen Tag, *p<0,05.

RAG1^{-/-} Mäuse wurden daher erneut infiziert und zweimal mit Antiserum bzw. naïvem Serum behandelt (Abb.3.17.). Wie schon im Versuch zuvor führte die erste Gabe der Seren an Tag 28 und 29 zu einer Reduktion des Ausstoßes an *S. ratti* DNA im Fäzes an Tag 34 und 36 der Infektion, unabhängig ob Antiserum oder naïves Kontrollserum gespritzt wurde (Abb.3.17.A). Nach der zweiten Applikation an Tag 72 und 73 nach Infektion konnten RAG1^{-/-} Mäuse die Infektion nach 121 Tagen beenden (Abb.3.17.A). Um zu zeigen, dass nach Applikation *S. ratti* spezifische Antikörper in Rag1^{-/-} Mäusen zu finden waren, wurden Serumproben der behandelten Mäuse mittels ELISA auf IgG1 analysiert (Abb.3.17.C). Es konnten noch *S. ratti* spezifische Antikörper in mit Antiserum behandelten Mäusen 39 Tage nach Applikation des Serums nachgewiesen werden (Abb.3.17.B). Hingegen fand sich in mit naïvem Kontrollserum

behandelten RAG1^{-/-} Mäusen kein *S. ratti* spezifisches IgG1 (Abb3.17.B/C). Die Beendigung der Infektion in behandelten RAG1^{-/-} war jedoch unabhängig davon, ob sie mit Antiserum oder naïvem Kontrollserum behandelt wurden. Im Serum sind neben Antikörpern auch andere Mediatoren enthalten, wie z.B. Zytokine und Komplementfaktoren, welche anti-infektiös wirken können. Dies bedeutet, dass nicht *S. ratti*-spezifische Antikörper sondern ein anderer enthaltener Mediator der auch im naïvem Kontrollserum vorkommt, zur Klärung der Infektion beigetragen haben muss.

3.3.2. IL-9 vermittelte Mastzellaktivierung und Klärung der *S. ratti* Infektion

Neben der Antikörper-vermittelten Aktivierung können Mastzellen auch von Zytokinen aktiviert werden, welche auch zu ihrer Expansion beitragen können. Zu diesen Zytokinen zählt Interleukin-3. Die Injektion von IL-3 in Nacktmäuse und C57BL/6 Mäuse führte zu einer erhöhten Anzahl an Mastzellen im Darm, einer verstärkten Freisetzung von mMCPT-1 und zu einer geringeren Wurmlast [42]. Die IL-3-Injektion in die bisher verwendeten mastzelldefizienten W/W^v Mäuse konnte keine Reduktion der Wurmlast bewirken [41], was dahingehend interpretiert wurde, dass IL-3 über die Expansion/Aktivierung von Mastzellen die Reduktion der Wurmlast bewirkt. Zusätzlich zeigen IL-3 defiziente Mäuse eine verzögerte Abstoßung von *S. venezuelensis* von 8 Tagen [43]. Neben IL-3 scheint auch Interleukin-9 wichtig zu sein, eine *S. ratti* Infektion zu kontrollieren. IL-9 vermittelt die Expansion von Mastzellen [130]. Die synergistische Gabe von IL-3 und IL-9 erhöhte die nur durch IL-3 allein freigesetzte Menge an mMCPT-1 im Serum von Mäusen [32]. Zudem führt die Gabe von IL-9 zu einer reduzierten Anzahl an *S. ratti* Weibchen im Darm und die reziproke Neutralisierung von IL-9 mittels Antikörper zu einer Erhöhung der Parasitenlast [20].

Zur Analyse der Rolle von IL-9 bei der Mastzellaktivierung während der *S. ratti* Infektion wurden BALB/c IL-9 Rezeptor defiziente Mäuse (IL-9R^{-/-}) mit 2000 L3i *S. ratti* infiziert und die Wurmlast, die mMCPT-1 Freisetzung und der Ausstoß an *S. ratti* DNA über die Infektion hinweg bestimmt. Die IL-9R^{-/-} Mäuse wurden homozygot gezüchtet und mit BALB/c Mäusen verglichen. Zur Anpassung der Darmflora wurden die Mäuse vor Versuchsbeginn für 2 Wochen zusammen gehalten.

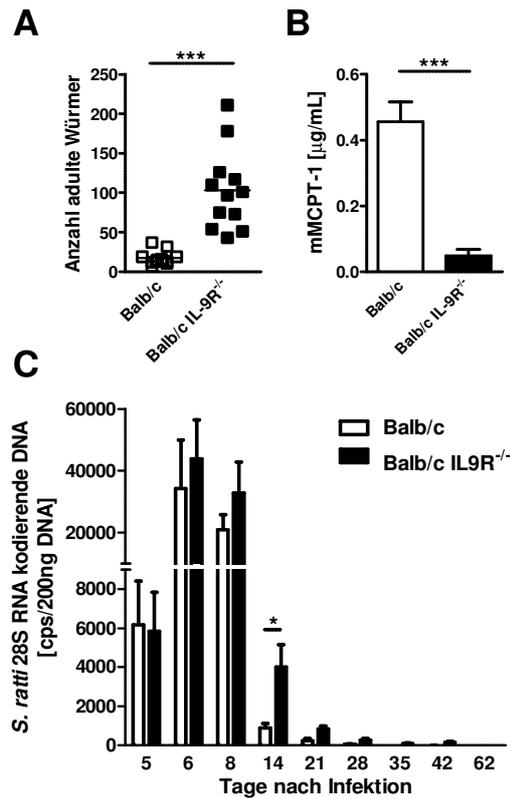


Abb.3.18. Phänotyp von IL-9R^{-/-} Mäusen während *S. rattii* Infektion

BALB/c IL-9R^{-/-} (schwarze Punkte und Balken) und BALB/c (weiße Punkte und Balken) wurden zur Angleichung der Darmflora für 2 Wochen zusammen gehalten und anschließend mit 2000 L3i *S. rattii* s.c. in den Hinterfuß infiziert. Die Anzahl an adulten Würmern (A) und die Konzentration an mMCPT-1 im Serum (B) wurde an Tag 6 p.i. bestimmt. Der Ausstoß von *S. rattii* 28 S RNA kodierender DNA im Fäzes wurde über den Infektionsverlauf hinweg mittels qRT-PCR bis zur Terminierung der Infektion verfolgt (C). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus und die Balken den Mittelwert (A). Fehlerbalken zeigen SEM. Sterne zeigen signifikante Unterschiede ermittelt durch Student's t-Test oder Mann-Whitney-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Im Fall der Klärung der Infektion, wenn also alle Werte einer Gruppe 0 einnehmen, konnte keine Statistik mehr durchgeführt werden.

BALB/c IL-9R^{-/-} Mäuse zeigten eine sechsmal so hohe Wurmlast, wie BALB/c Mäuse an Tag 6 der Infektion (Abb.3.18.A). Während BALB/c Mäuse im Mittel 17 adulte Würmer im Darm besaßen, so hatten BALB/c IL-9R^{-/-} Mäuse 103 adulte Würmer im Darm. Diese erhöhte Parasitenlast ging zu diesem Zeitpunkt mit einer signifikanten Reduktion von mMCPT-1 im Serum der infizierten BALB/c IL-9R^{-/-} Mäuse im Vergleich zu BALB/c Mäusen einher, welches ein Indiz für eine verschlechterte Mastzellaktivierung ist (Abb.3.18.B). BALB/c IL-9R^{-/-} Mäuse zeigten zudem eine verzögerte Klärung der Infektion von knapp 30 Tagen (Abb.3.18.C). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die IL-9 Rezeptor vermittelte Signaltransduktion wichtig ist für die Aktivierung der Mastzelle und in der Folge für die Kontrolle der Wurmlast an Tag 6 p.i. In dieser Arbeit konnte, aufgrund der Zeit, der Verlauf der Freisetzung von mMCPT-1 innerhalb der IL-9R-defizienten Mäuse nicht analysiert werden und könnte Bestandteil weiterer Arbeiten sein.

Um zu überprüfen, ob die verzögerte Klärung der Infektion auf den Verlust des IL-9 Rezeptors auf der Oberfläche der Mastzelle zurückzuführen ist wurden gemischte Knochenmarkschimären hergestellt, um die IL-9 Rezeptordefizienz auf Mastzellen zu beschränken (BALB/c MC^{IL9R}/-

Mäuse). Verglichen wurden diese Mäuse mit mastzelldefizienten und mastzellkompetenten Mäusen, die auf die gleiche Weise behandelt wurden. Die Mäuse wurden mit 2000 L3i *S. ratti* infiziert und der Infektionsverlauf mittels qRT-PCR auf *S. ratti* DNA im Fäzes der Mäuse hin analysiert. In der frühen Phase der Infektion zeigte sich, dass der Ausstoß an *S. ratti* DNA im Fäzes in allen drei Gruppen gleich war. Der höchste Ausstoß wurde an Tag 8 gemessen. Sowohl BALB/c MC^{IL9R-/-}, als auch BALB/c Cpa3^{Cre} Knochenmarkschimären zeigen eine tendenziell verzögerte Expulsion von *S. ratti* im Vergleich zu BALB/c Cpa3^{Wt} Chimären mit IL-9 responsiven Mastzellen. Auch BALB/c Cpa3^{Wt} beendeten die Infektion nicht innerhalb von 4 Wochen sondern erst an Tag 78 p.i. Die Repopulation des Mastzellkompartiments durch Wildtyp Knochenmarkstransplantation bestahlter Cpa3^{Cre} Empfängermäuse stellte also offensichtlich nicht 100% der Mastzellfunktion wieder her. Hingegen zeigten Knochenmarkschimären ohne Mastzellen (BALB/c Cpa3^{Cre}) und BALB/c MC^{IL9R-/-} Chimären an Tag 78 noch einen Ausstoß an *S. ratti* DNA und beendeten die Infektion erst an Tag 86 (Abb.3.19.A). Dieses Experiment zeigt, dass sich die *S. ratti* Infektion verlängert, wenn Mastzellen nicht durch IL-9 stimuliert werden können. Jedoch rekapituliert die alleinige IL-9 Rezeptordefizienz der Mastzellen nicht die um 5 Monate verlängerte Infektion der mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäuse.

An Tag 7 p.i. zeigten BALB/c MC^{IL9R-/-} Chimären eine tendenziell geringere mMCP-1 Konzentration im Serum, was auf eine verminderte Aktivierung von IL-9R^{-/-} Mastzellen zu frühen Zeitpunkten der Infektion hinweist. Zu späteren Zeitpunkten, wie an Tag 14 war jedoch kein Unterschied mehr in der Serumkonzentration von mMCP-1 zwischen IL-9R-kompetenten und -defizienten Mastzellen zu sehen (Abb.3.19.B).

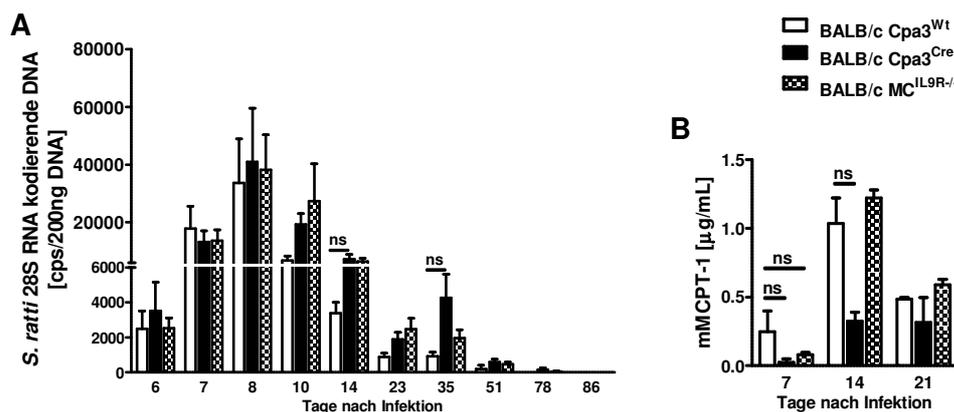


Abb.3.19. Fehlender IL-9R auf Mastzellen führt zu einer verzögerten Expulsion von *S. ratti*

BALB/c Cpa3^{Cre}, Cpa3^{Wt} und MC^{IL9R-/-} Chimären wurden mit 2000 L3i *S. ratti* s.c. in den Hinterfuß infiziert und der Ausstoß an *S. ratti* 28 S RNA kodierende DNA mittels qRT-PCR im Fäzes der Mäuse bestimmt (A). An Tag 7, 14 und 21 wurde den Mäusen Blutabgenommen und mMCP-1 im Serum der Mäuse mittels ELISA bestimmt. (A) Graph vereinigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten, n=3-13. (B) Gezeigt sind Daten von einem Experiment, n=4. Fehlerbalken zeigen ±SEM. Statistik wurde mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns-Post-Test ermittelt. ns= nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IL-9 vermittelte Mastzellaktivierung zur Kontrolle der Infektion in der frühen Phase der Infektion beiträgt, jedoch nicht essentiell ist um die *S. rattii* Infektion zeitig zu beenden. Andere Wege der Mastzellaktivierung können die IL-9 vermittelte Aktivierung ersetzen, wie die Freisetzung von mMCPT-1 ab Tag 14 p.i. zeigt und somit letztlich zur Beendigung der Infektion beitragen.

3.3.3. Regulation von Mastzellen durch Interleukin-9 während der frühen Phase der *S. rattii* Infektion

Die bisherigen Experimente zeigen, dass IL-9 Mastzellen früh in der Infektion direkt aktiviert und die Abstoßung von *S. rattii* beschleunigt aber nicht exklusiv vermittelt. Während der *S. rattii* Infektion kommt es zu einer Expansion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) [131]. Werden diese Tregs depletiert so führt dies zu einer Verringerung der Wurmlast an Tag 6 p.i. und einer erhöhten Produktion von IL-9 [20]. Diese geht einher mit einer erhöhten Freisetzung von mMCPT-1. Die induzierten Tregs dämpfen demnach sowohl die Mastzellaktivität, als auch die IL-9 Produktion. Um zu analysieren, ob das durch Tregs unterdrückte IL-9 während der Infektion von Wildtypmäusen verantwortlich ist für die Mastzellaktivierung wurden mastzelldefiziente BALB/c Mäuse mit BALB/c-DEREG Mäusen verpaart. Diese Mäuse exprimieren den Diphtheriatoxinrezeptor (DTR) auf der Oberfläche von Foxp3 positiven Treg. Durch Injektion von Diphtheriatoxin können somit Treg in diesen Mäusen für eine gewisse Zeitspanne depletiert werden. Durch Verpaarung der Mäuse entstehen vier unterschiedliche genotypische Gruppen. BALB/c Cpa3^{wt} Mäuse, welche eine normale Anzahl an Mastzellen und Treg besitzen. Balb/c DEREG Cpa3^{wt} Mäuse, welche auch eine normale Anzahl an Mastzellen besitzen aber deren Tregs den DTR exprimieren. Zudem entstehen mastzelldefiziente Mäuse, die zum einen normale Tregs besitzen (BALB/c Cpa3^{Cre}) und zum anderen mastzelldefiziente Mäuse deren Tregs auch den DTR exprimieren (BALB/c DEREG Cpa3^{Cre}). Wie beschrieben zeigt die Infektion dieser Mäuse, dass die Depletion von Tregs durch DT Injektion zu einer signifikanten Reduktion der Wurmlast führte [20]. Wie in dieser Arbeit gezeigt (Abb.3.3.D/E) führte die Mastzelldefizienz zu einer signifikanten Erhöhung der Wurmlast (Abb.3.20.B). Interessanterweise reduzierte die Treg Depletion bei mastzelldefizienten Mäusen die Wurmlast nicht weiter, sie war in Cpa3^{Cre} Mäusen in Gegenwart und Abwesenheit von Tregs gleich (Abb.3.20.B). Die Messung der Konzentration von IL-9 im Überstand polyklonal stimulierter Milzzellen zeigte, dass die Treg-Depletion sowohl in mastzellkompetenten, als auch in mastzelldefizienten Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der IL-9 Produktion führte (Abb.3.20.C), aber nicht zu einer Reduktion der Wurmlast. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Treg Depletion die Wurmlast verringert, weil die IL-9 Produktion durch Tregs gedämpft wird. Es

zeigte sich ferner, dass Mastzellen nötig sind, um die gesteigerte IL-9 Produktion in Treg depletierten Mäusen in eine reduzierte Wurmlast zu übersetzen. Das deutet darauf hin, dass IL-9 die Mastzelle zur Reduktion der Wurmlast aktiviert.

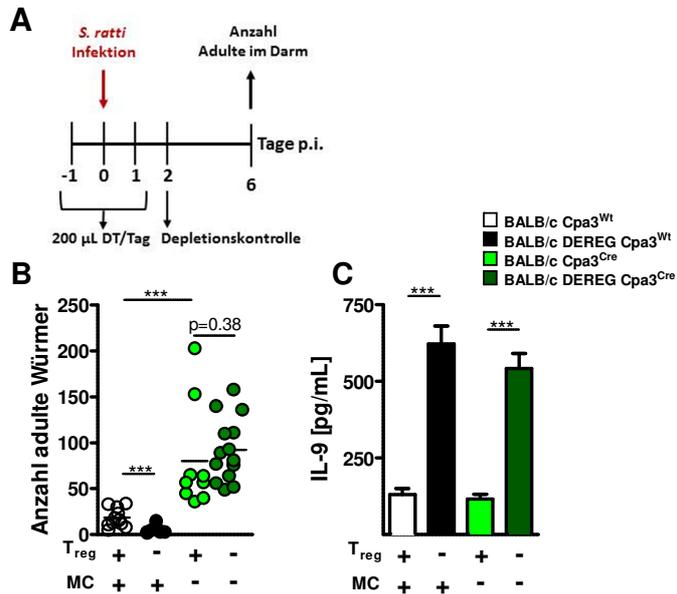


Abb.3.20. Rolle von Mastzellen während einer *S. ratti* Infektion in Treg depletierten BALB/c Mäusen

(A) zeigt den Versuchsaufbau. BALB/c Cpa3^{Wt} und BALB/c Cpa3^{Cre}, als auch BALB/c DEREK Cpa3^{Wt} und BALB/c DEREK Cpa3^{Cre} Mäuse wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit DT behandelt. An Tag zwei der DT Gabe wurden die Mäuse mit 2000 L3i *S. ratti* infiziert, die Wurmlast an Tag 6 p.i. bestimmt (B), Milzzellen isoliert und für drei Tage *ex vivo* stimuliert (polyklonal mit α -CD3; 1 μ g/mL). Die IL-9 Konzentration im Überstand der stimulierten Mäuse wurde mittel ELISA quantifiziert (C). Jedes Symbol zeigt eine Maus und die Balken den Mittelwert (B) Graphen zeigen die vereinigten die Daten aus drei unabhängigen Experimenten (n \geq 12). Fehlerbalken zeigen den SEM, Sterne signifikante Unterschiede ermittelt durch Student's t-Test; *** p \leq 0,001.

4. Diskussion

4.1. Die Rolle von Mastzellen bei der Kontrolle einer *S. ratti* Infektion

Mit Hilfe von KIT-unabhängigen Mausmodellen wurde in dieser Doktorarbeit die Rolle von Mastzellen während der Infektion mit dem gastrointestinalen Nematoden *S. ratti* untersucht. Die Abwehr der wandernden L3 im Gewebe wurde nicht von Mastzellen vermittelt: die Anzahl an L3 war sowohl in ctMC-defizienten *Mcpt5^{Cre}* Mäusen, als auch in komplett mastzelldefizienten *Cpa3^{Cre}* Mäusen genauso hoch, wie in den mastzellkompetenten Wurfgeschwistern. Die Abwehr von adulten *S. ratti* im Dünndarm hingegen wurde von Mastzellen vermittelt. Beide mastzelldefizienten Mausstämme wiesen im Vergleich zu Wildtyp Wurfgeschwistern eine gesteigerte Parasitenlast an Tag 7 der Infektion im Dünndarm. Dabei zeigten aber nur komplett mastzelldefiziente *Cpa3^{Cre}* Mäuse, aber nicht rein ctMC-defiziente *Mcpt5^{Cre}* Mäuse, einen stark verlängerten Infektionsverlauf. Dies zeigt, dass ctMCs und möglicherweise auch mMCs zur Kontrolle von *S. ratti* im Darm beitragen, aber spezifisch nur mMCs für die zeitige Beendigung der Infektion essentiell sind.

4.1.1. Funktion von Mastzellen während der frühen Phase der *S. ratti* Infektion

Indirekte Hinweise, dass Mastzellen wichtig sind für die Kontrolle einer *S. ratti* Infektion stammen von Studien mit Mäusen, welche mit rekombinantem IL-3 behandelt (rIL-3) wurden, oder IL-3-defizient sind [41, 132]. IL-3 ist ein wichtiges Zytokin für die Aktivierung und Expansion von Mastzellen [98, 133]. Die Injektion von rIL-3 in immunkompetente Mäuse und T-Zell defiziente Nacktmäuse reduzierte die Parasitenlast, führte zu einer Erhöhung der Anzahl an mukosalen Mastzellen und zu einer verstärkten Aktivierung von Mastzellen, welche über die erhöhte Konzentration an mMCPT-1 im Serum festgestellt wurde [41, 42]. Die Reduzierung der Parasitenlast konnte nicht bei Gabe von rIL-3 in mastzelldefiziente *WBB6F1-Kit^{W/W-v}* Mäuse beobachtet werden, was darauf hinweist, dass IL-3 über Mastzellen, oder aber über andere Effektoren die in KIT-mutanten Mäusen fehlen, zur verbesserten Expulsion des Parasiten beiträgt. Die Anzahl an Larven im Gewebe nach rIL-3 Behandlung war identisch zwischen unbehandelten und behandelten Mäusen und die Parasitenlast war auch bei rIL-3 Behandlung nach oraler Infektion mit adulten Würmern reduziert [41]. Die Resultate dieser Studie können somit dahingehend interpretiert werden, dass über IL-3 aktivierte Mastzellen für die Parasitenabwehr im Darm aber nicht für die Abwehr der wandernden Larven im Gewebe wichtig sind.

Direkte Hinweise, dass Mastzellen bei der Kontrolle von *S. rattii* Larven im Gewebe als auch von adulten Würmern im Darm wichtig sind zeigen Studien mit KIT-abhängigen mastzelldefizienten Mäusen. So zeigen *S. rattii* infizierte WBB6F₁-Kit^{W/W-v} Mäuse eine erhöhte Anzahl an L3 im Kopf [45]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen jedoch diesem Ergebnis von Nawa *et al.* Sowohl bei ctMC-defizienten Mcpt5^{Cre} R-DTA Mäusen, als auch bei komplett mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen, war die Anzahl der wandernden Larven im Gewebe zu jedem Zeitpunkt der frühen Phase der Infektion zwischen mastzelldefizienten und mastzellkompetenten Mäusen gleich. Dieses Ergebnis der vorliegenden Arbeit legt nahe, dass die beobachtete Steigerung der wandernden Larven im Kopf in der Abwesenheit von Mastzellen in Studien mit KIT-abhängigen Mäusen [45] auf die zusätzlichen Defekte dieser Mäuse zurückzuführen ist. Die in dieser Studie verwendeten WBB6F₁-Kit^{W/W-v} Mäuse haben neben der Mastzelldefizienz auch eine reduzierte Anzahl an Neutrophilen [113]. Neutrophile sind dabei wichtig, um *Strongyloides* Larven im Gewebe zu töten. Studien mit in Diffusionskammern implantierten *S. stercoralis* Larven zeigen, dass Neutrophile durch einen Prozess, der die Protease Myeloperoxidase (MPO) beinhaltet, töten können [24, 36]. Zusätzlich führt die Blockade der Neutrophilenrekrutierung zu einer verschlechterten Tötung der Larven [24, 25].

Im Gegensatz zur Kontrolle der wandernden Larven im Gewebe zeigen die Studie mit mastzelldefizienten KIT-abhängigen Mäusen [45], als auch Studien bei der rIL-3 injiziert wurde [132], dass Mastzellen bei der Kontrolle der *S. rattii* Infektion im Darm beteiligt sind. Das kombinierte Fehlen von mMCs und ctMCs in den, in dieser Arbeit untersuchten Cpa3^{Cre} Mäusen führte, wie auch bei WBB6F₁-Kit^{W/W-v} Mäusen [134] zu einer gesteigerten Parasitenlast an Tag 6 der Infektion. Somit konnte der, in dieser Studie mit KIT-abhängigen mastzelldefizienten Mäusen produzierte Phänotyp, durch die Analyse der auf einem reinen genetischen Hintergrund generierten KIT-unabhängigen mastzelldefizienten Mausmodelle bestätigt werden.

Die Bedeutung der Expansion von Mastzellen für die Kontrolle einer parasitären, gastrointestinalen Nematodeninfektion scheint bei unterschiedlichen Nematodenarten verschieden zu sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Mastzellen wichtig sind für die Kontrolle der Parasitenlast und insbesondere mukosale Mastzellen essentiell sind für die Expulsion von *S. rattii* aus dem Darm. Interessanterweise bewirkte aber eine *S. rattii* Infektion keine besonders starke Expansion von Mastzellen im Darm von Wildtypmäusen, wie die histologischen Färbungen zeigten (Abb.3.2.). Infektionen mit anderen gastrointestinalen Nematoden, wie z.B. mit *Heligmosomoides polygyrus* oder *Nippostrongylus brasiliensis* führen in Wildtypmäusen zu einer starken Mastrozytose, welche auch teilweise gekennzeichnet ist durch eine erhöhten mMCPT-1 Freisetzung [135-137]. Studien mit KIT-abhängigen mastzelldefizienten Mausmodellen zeigen aber über die Funktion von Mastzellen während

dieser beiden Infektionen ein unterschiedliches Bild. So zeigen Studien mit WBB6F₁-Kit^{W/W-v} und C57BL/6 Kit^{W-sh} Mäusen, dass das Fehlen von Mastzellen während einer *H. polygyrus* Infektion zu einer erhöhten Parasitenlast und zu einer erhöhten Ausscheidung an Eiern führt, was darauf hindeutet, dass Mastzellen bei der Kontrolle der Parasitenlast, wie es auch bei *S. ratti* der Fall war, mitwirken. Die Beendigung der *H. polygyrus* Infektion war jedoch nicht gestört [126, 138]. Hingegen zeigt eine Studie mit KIT-abhängigen mastzelldefizienten Mäusen, dass Mastzellen für die Expulsion des Nematoden *N. brasiliensis* nicht nötig sind [139]. Vielmehr hängt die Expulsion von *N. brasiliensis* aus dem Darm von der Expansion von Becherzellen ab, IL-22 defiziente Mäuse zeigen nach Infektion mit diesem Nematoden eine verschlechterte Becherzellhyperplasie welche einhergeht mit einer verschlechterten Infektionsterminierung [140]. Die Becherzellhyperplasie spielt anscheinend wiederum bei der Expulsion von *S. ratti* eine eher untergeordnete Rolle. Sowohl mastzelldefiziente, als auch mastzellkompetente BALB/c Cpa3^{Cre} Mäuse zeigten eine gleiche Expansion der Becherzellen innerhalb der histologischen Färbung dieser Arbeit, was darauf schließen lässt, dass der verlängerte Infektionsverlauf innerhalb der mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäuse nicht auf einer verschlechterten Becherzellexpansion beruhte.

Zwei weitere gastrointestinale Nematodeninfektionen zeigen ebenfalls eine unterschiedliche Beteiligung von Mastzellen an der Kontrolle und Expulsion des Parasiten. So ist das Vorhandensein von Mastzellen bzw. der durch sie freigesetzten Protease mMCPT-1 bei einer Infektion mit *Trichinella spiralis* unabdingbar. Die Infektion mit *T. spiralis* führt zu einer Expansion von Mastzellen und Mcpt-1 defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte Expulsion des Nematoden in Kombination mit einer erhöhten Anzahl an Muskellarven [141-143]. Hingegen spielt die Aktivierung von Mastzellen über KIT bei der Kontrolle der Parasitenlast von *Trichuris muris* infizierten Wildtypmäusen keine Rolle, wie eine Studie zeigt, in der über den Infektionsverlauf hinweg eine Signalweiterleitung von Mastzellen mit der Gabe eines antagonistischen c-Kit-Antikörpers blockiert wurde [144]. Es sollte dabei berücksichtigt werden, dass die Studien für *T. spiralis* und *T. muris* nur indirekte Hinweise liefern was die Beteiligung von Mastzellen während dieser Infektionen angeht.

Insgesamt korreliert demnach aber die Expansion von Mastzellen während einer gastrointestinalen Nematodeninfektion nicht immer mit der Beteiligung der Mastzelle an der Kontrolle der Infektion bzw. der Expulsion des Nematoden. Dass die Expansion einer Immunzelle nicht immer einhergeht mit einer verbesserten Funktion zeigt die Expansion von Eosinophilen während einer *Strongyloides* Infektion. Obwohl es zu einer starken Eosinophilie im Darm von *S. ratti* und *S. venezuelensis* infizierten Mäusen kommt, führt die Aufhebung der Eosinophilie in IL-5 defizienten Mäusen oder durch die Gabe von anti-IL-5 Antikörper nicht zu einer verschlechterten Kontrolle der Infektion [29, 30, 145]. Jedoch sollte hierbei berücksichtigt

werden, dass die Funktion von Eosinophilen während einer *Strongyloides* Infektion mittels eosinophildefizienter Mäuse, bisher nicht direkt analysiert wurde.

4.1.2. Unterschiedliche Funktion von ctMCs und mMCs während der *S. ratti* Infektion

Der Vorteil der mastzelldefizienten Mausmodelle, die in dieser Doktorarbeit verwendet wurden, ist die Möglichkeit der Unterscheidung des Einflusses von ctMCs und mMCs während einer *S. ratti* Infektion. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigten, dass komplett mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse eine erhöhte Wurmlast an Tag 6 der *S. ratti* Infektion aufwiesen. Interessanterweise zeigten auch rein ctMC-defiziente Mäuse eine gesteigerte Wurmlast an Tag 6 der Infektion. Daher könnte die erhöhte Parasitenlast in den komplett mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen auch allein vom Fehlen von ctMCs herrühren. Da bisher kein reiner mMC-defizienter Mausstamm existiert, kann die spezifische Rolle von mMCs diesbezüglich nicht weiter analysiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ferner, dass insbesondere mMCs eine wichtige Rolle bei der Terminierung der *S. ratti* Infektion spielen. Mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse waren im Gegensatz zu ihren mastzellkompetenten Wurfgeschwistern, welche die Infektion innerhalb von vier Wochen beenden konnten, bis zu 160 Tage infiziert. Dies konnte anhand des Ausstoßes an *S. ratti* DNA im Fäzes der Mäuse nachgewiesen werden. Dabei konnte an Tag 90 nach Infektion noch ein lebendes Weibchen und erste Larven aus einer infizierten Cpa3^{Cre} Maus isoliert werden, was dafür spricht, dass der Ausstoß nicht nur auf totes Material, welches verlangsamt abgestoßen wird, zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu den komplett mastzelldefizienten Mäusen konnten aber Mcpt5^{Cre} Mäuse, denen nur die ctMCs fehlen die *S. ratti* Infektion innerhalb von vier Wochen beenden, d.h. mit derselben Kinetik wie ihre Wildtyp Wurfgeschwister. Die zusätzliche Abwesenheit von mMCs bei Cpa3^{Cre} Mäusen führte demnach zu dem verlängerten Infektionsstatus.

In Bezug auf eine *Strongyloides* Infektion unterstützen Studien mit PI3Kp85 α -defizienten Mäusen das Ergebnis dieser Doktorarbeit, dass spezifisch mMCs für die Abstoßung des Parasiten wichtig sind. Die Deletion der Untereinheit p85 α der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) in PI3Kp85 α -defizienten Mäusen (PI3Kp85 α ^{-/-}) führte zur Abwesenheit gastrointestinaler und peritonealer Mastzellen. PI3Kp85 α ^{-/-} Mäuse besitzen aber eine normale Anzahl an Mastzellen in der Haut. Bei Infektion dieser Mäuse mit *S. venezuelensis* kommt es zu einem erhöhten Ausstoß an Eiern und L1 mit dem Fäzes, zu einer erhöhten Parasitenlast im Darm und zu einem verlängerten Infektionsstatus [146]. Dabei umfasst die beobachtete verzögerte Terminierung der Infektion in PI3Kp85 α ^{-/-} Mäusen nur zwei bis vier Tage, im Gegensatz zu knapp 4 Monaten

verzögerter Beendigung der Infektion bei Cpa3^{Cre} Mäusen. Dies könnte daran liegen, dass PI3Kp85 $\alpha^{-/-}$ Mäuse zwar im naiven Zustand keine Mastzellen im Jejunum und Ileum des Dünndarms besitzen, jedoch an Tag 12 der *S. venezuelensis* Infektion durchaus eine, wenn auch im Gegensatz zu PI3Kp85 $\alpha^{+/+}$ Mäusen moderate Mastozytose aufweisen, die eine frühere Expulsion verursacht.

Das Ergebnisse der Arbeit wird ferner auch von Studien mit IL-3 defizienten Mäusen unterstützt. Diese zeigen eine verzögerte Terminierung der Infektion mit *S. venezuelensis* von acht Tagen, welche mit einer reduzierten Mastzell- und Basophilenzahl korrelierte [43, 147]. Zusätzlich weisen auch mastzelldefiziente WBB6F1-Kit^{W/W-v} Mäuse einen verlängerten Ausstoß an *S. venezuelensis* und *S. ratti* Eiern und L1 im Fäzes auf [45, 148]. Jedoch zeigen beide Modelle ebenfalls nicht den deutlich verlängerten Infektionsstatus der hier analysierten Cpa3^{Cre} Mäuse. Mastzelldefiziente WBB6F1-Kit^{W/W-v} Mäuse denen zusätzlich auch IL-3 fehlt zeigten zwar eine zusätzlich verlängerte Infektion von 50 Tagen, was darauf hindeutet, dass IL-3 nicht nur über Mastzellen zur Expulsion des Nematoden beiträgt. Dass IL-3 defiziente Mäuse nur eine Verlängerung der Infektion um 50 Tage zeigen und nicht die in Cpa3^{Cre} Mäusen verlängerte Infektion von 150 Tagen kann zum einen daran liegen, dass IL-3 zwar ein wichtiger Faktor für das Mastzellewachstum und der Mastzellaktivierung ist [43, 149], jedoch Mastzellen auch über andere Wege aktiviert werden können. Dazu zählen Komplementrezeptoren, TLRs und insbesondere über Fc-Rezeptoren, dabei im speziellen über den hoch affinen Fc ϵ RI [98, 150, 151].

Sowohl komplett-mastzelldefiziente Cpa3^{Cre}, als auch ctMC-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Parasitenlast an Tag 6 der Infektion, jedoch waren nur Cpa3^{Cre} Mäuse, denen neben den ctMCs auch mMCs fehlen, nicht in der Lage die *S. ratti* Infektion wie die Wildtypmäuse zu beenden. Es stellt sich daher die Frage, warum mukosale Mastzellen für die Terminierung der Infektion wichtig sind und ctMCs nicht. Eine Erklärung dafür könnte die unterschiedliche Lokalisierung der Zelltypen im Darm sein. Im Gegensatz zu mMCs, welche in der Lamina propria des Darms und während einer Infektion vermehrt auch zwischen den Epithelzellen lokalisiert sind [128] finden sich ctMCs in der Serosa und in der Nähe der glatten Muskulatur des Darms. mMCs sind demnach in direkter Nähe zum Nematoden lokalisiert, der eingebettet in der Mukosa bzw. in tunnelartigen Gebilden zwischen den Epithelzellen lebt [14]. Dass die Lokalisierung der Mastzellen wichtig ist für die Kontrolle der Nematodeninfektion zeigen auch Studien mit Mäusen denen das Transmembranprotein Notch 2 fehlt. Bei Infektion dieser Mäuse mit dem *S. ratti* verwandten *S. venezuelensis* kommt es zu einer Akkumulation der Mastzellen in der Lamina propria und nicht zum Einwandern in das Epithel des Darms. Damit einhergehend kommt es zu einer erhöhten Ausscheidung an L1 und Eiern während der Infektion mit *S. venezuelensis* [152].

Dabei war die Entwicklung und Gewebsverteilung von ctMCs in Notch2 defizienten Mäusen nicht verändert.

Die unterschiedliche Suszeptibilität der Mausstämmen (C57BL/6= hohe Wurmlast; BALB/c= niedrige Wurmlast) gegenüber einer *Strongyloides* Infektion ist bekannt [19, 124]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber, dass dieser Unterschied erst im Darm auftritt, da die wandernden Larven im Gewebe zwischen C57BL/6 und BALB/c Wildtyp Mäusen gleich waren. Da die Kontrolle der Parasitenlast abhängig ist vom Vorhandensein von Mastzellen könnte die unterschiedliche Suszeptibilität der Mausstämmen durch die Mausstamm-spezifischen Unterschiede in der Mastzellhämatopoese [128] oder von der unterschiedlichen Regulation der Mastzellaktivierung während der frühen Phase der *S. ratti* Infektion herrühren [20, 153].

4.2. Sind Mastzellen Effektoren oder Initiatoren der Immunantwort während der *S. ratti* Infektion?

Die stark verlängerte *S. ratti* Infektion in mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen könnte dadurch erklärt werden, dass Mastzellen zentrale Effektorzellen sind, die für die endgültige Abstoßung des Parasiten und damit für die Beendigung der Infektion nötig sind. Es ist aber auch denkbar, dass Mastzellen zur Etablierung einer protektiven Immunantwort beitragen, die für die Terminierung der Infektion wichtig ist. Studien mit KIT-mutanten Mäusen, und KIT-mutanten Mäusen, die mit Mastzellen konstituiert wurden (KIT-knock-in Mäuse), zeigen, dass Mastzellen besonders durch die Rekrutierung von dendritischen Zellen, Neutrophilen und Lymphozyten zum Infektions- bzw. Entzündungsort durch die Produktion von TNF, Leukotriene und Histamine zur Induktion einer Immunantwort und zur Produktion von Th2 assoziierten Zytokinen beitragen [154-159]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Mastzellen eine Th2 Antwort verstärken, indem sie die Produktion von IL-13 durch T-Zellen unterstützen. Dabei interagiert eine membrangebundene Tryptase auf der Oberfläche von humanen Mastzellen direkt mit T-Zellen [160].

Das Mastzellen zu einer Etablierung einer Th2 Immunantwort im Kontext einer Nematodeninfektion beitragen, wurde innerhalb des Infektionsmodells mit *H. polygyrus* gezeigt. Das Fehlen von Mastzellen in KIT-abhängigen mastzelldefizienten Mäusen führt bei der *H. polygyrus* Infektion zu einer reduzierten Produktion von Gewebszytokinen, den Alarminen (IL-25, IL33 und thymusstimulierendes Lymphopoetin: TSLP), was einen Defekt in der Th2 Polarisierung zur Folge hat [126]. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine durch das Darmepithel freigesetzten Alarmine gemessen, welche diese Studie unterstützen könnten. Dass jedoch durch das Epithel freigesetzte Alarmine die Th2 Immunantwort gegenüber einer *S.*

venezuelensis Infektion unterstützen, zeigt eine Studie von Yasuda *et al.* Die Stimulation von alveolaren Epithelzellen durch parasitäres Chitin führt zur Freisetzung von IL-33, welches wiederum zur Expansion von ILCs und zur pulmonalen Eosinophilie führt [161]. Dabei wurde die Rolle von Mastzellen jedoch nicht untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Th2 Immunantwort, welche gekennzeichnet ist durch die Produktion von Zytokinen wie IL-13, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-10, die Induktion einer Antikörperantwort hin zu IgG1 und IgE [21, 162], in *S. ratti* infizierten mastzelldefizienten Mäusen genauso gut initiiert wurde wie in mastzellkompetenten Wurfgeschwistern. So zeigten polyklonal als auch Antigen-spezifisch stimulierte mLN- und Milzzellen aus BALB/c Cpa3^{Cre} und C57BL/6 Mäusen eine normale Th2 Polarisierung. Die Analyse der Produktion von *S. ratti* spezifischen Antikörpern in mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen zeigte keine dramatischen Veränderungen. Der Serumtiter von *S. ratti* spezifischem IgM war zwischen mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} und mastzellkompetenten Cpa3^{wt} Mäusen gleich. Der Titer von *S. ratti* spezifischem IgG1 und von polyklonalem IgE war in Cpa3^{Cre} Mäusen sogar höher im Vergleich zu den Wildtyp Wurfgeschwistern. Dies könnte durch die erhöhte Parasitenlast, die diese Mäuse zeigen erklärt werden. Unterstützt wird diese Hypothese durch das Ergebnis dieser Arbeit, dass mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse nach Vakzinierung mit bestrahlten Larven, also nach Exposition einer gleich hohen Antigendosis, einen gleich hohen Antikörpertiter wie mastzellkompetente Cpa3^{wt} Mäuse entwickelten. Die Daten der Arbeit zeigen, dass der Klassenwechsel zu IgG und IgE und die allgemeine *S. ratti* spezifische Antikörperproduktion (IgG1; IgM) während der *S. ratti* Infektion in mastzelldefizienten Mäusen nicht beeinträchtigt waren. Zudem zeigte sich, dass die Immunantwort im Darm was die Anzahl an Eosinophilen im Darm in mastzelldefizienten Mäusen betrifft auch nicht beeinträchtigt war. Die histologischen Analysen der Arbeit zeigten, dass die Anzahl an Eosinophilen an Tag 6 der Infektion zwischen Cpa3^{Cre} und Cpa3^{wt} Mäusen im Darm gleich waren, jedoch verblieb sie innerhalb der mastzelldefizienten Mäuse auf diesem Niveau über Tag 14 bis zu Tag 28, wohingegen sie in mastzellkompetenten Mäusen schon an Tag 14 auf fast 0 Eosinophile /10 VCU fiel. Die auf hohem Niveau verbleibende Eosinophilenzahl könnte auch durch die zu diesem Zeitpunkt noch hohe Parasitenlast im Darm verursacht worden sein. Die konstant hohe Anzahl an Eosinophilen in mastzelldefizienten Mäusen war dabei aber nicht ursächlich für eine verbesserte Terminierung der Infektion, da die mastzelldefizienten Mäuse über knapp 160 Tage mit *S. ratti* infiziert waren. Während einer *S. venezuelensis* Infektion konnte ebenfalls gezeigt werden, dass IL-5 transgene Mäuse eine verstärkte Einwanderung von Eosinophilen in das intestinale Epithel zeigen und den Nematoden auch direkt umgeben. Diese verstärkte Akkumulation führt aber auch nicht zu einer verbesserten Expulsion des Wurms [31].

Die Qualität der in mastzelldefizienten Mäusen etablierten Immunantwort wurde in dieser Arbeit durch Vakzinierungsexperimente verglichen. Sowohl mastzellkompetente, als auch mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse, welche mit bestrahlten L3i vakziniert und mit vitalen L3i reinfiziert wurden zeigten eine Reduktion der wandernden Larven im Gewebe während der Reinfektion. Auch die Anzahl an adulten Weibchen im Darm war in vakzinierten mastzelldefizienten Mäusen reduziert, sowohl in Cpa3^{Cre}, als auch in Mcpt5^{Cre} Mäusen. Jedoch zeigten mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse im Gegensatz zu Mcpt5^{Cre} Mäusen nicht denselben Schutz wie Wildtyp Mäuse, sondern hatten immer noch eine signifikant höhere Parasitenlast im Darm an Tag 6 nach Reinfektion im Vergleich zu reinfizierten mastzellkompetenten Geschwistermäusen. Dabei war die Parasitenlast in der Reinfektion von Cpa3^{Cre} Mäusen auf ca. ein Drittel der Parasitenlast nach einer Erstinfektion reduziert. Da die Anzahl der wandernden Larven in mastzellkompetenten und mastzelldefizienten Mäusen gleichermaßen reduziert war, scheint die etablierte Immunantwort im Gewebe in Abwesenheit von Mastzellen nicht beeinträchtigt zu sein.

Diese Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass Mastzellen keine Initiatoren der protektiven Immunantwort während der *S. ratti* Infektion sind, sondern wesentliche Effektorzellen darstellen, die zur Expulsion des Nematoden beitragen. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch eine Studie mit mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen, welche mit dem Parasiten *Leishmania major* infiziert wurden. Das Fehlen von Mastzellen während der *L. major* Infektion hat keinen Einfluss auf die Etablierung einer Th2 Immunantwort in BALB/c Cpa3^{Cre} Mäusen oder die Mausstamm-spezifische TH1/Th2 Polarisierung von *L. major* infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen. Sowohl die Parasitenlast, die Größe der durch den Parasiten verursachten Läsionen, als auch die expandierenden Zellen während der Infektion sind auch in Abwesenheit von Mastzellen in Cpa3^{Cre} Mäusen unverändert [163].

4.3. Die Effektorfunktion von Mastzellen während der *S. ratti* Infektion

Nachdem die Ergebnisse darauf hindeuten, dass Mastzellen wesentliche Effektorzellen sind, die für Abstoßung des Nematoden beitragen, stellte sich die Frage, wie genau Mastzellen zur Expulsion des Nematoden führen. Mastzellen setzen nach ihrer Aktivierung ihre gespeicherten Mediatoren frei, darunter auch die Mastzell-spezifische Protease mMCPT-1 [50]. Innerhalb dieser Doktorarbeit konnte in mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen die Freisetzung von mMCPT-1 ab ca. Tag 14 der *S. ratti* Infektion gemessen werden. Jedoch, trotz der gemessenen mMCPT-1 Freisetzung, konnten die mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäuse die *S. ratti* Infektion für ca. 160 Tage nicht beenden. Dies spricht dafür, dass mMCPT-1, welches möglicherweise durch aufkommenden Mastzellvorläufer oder aber durch andere Zelltypen produziert wurde nicht für

die Bekämpfung und die Expulsion von *S. rattii* aus dem Darm nötig war bzw. nicht als alleiniger Mediator ab Tag 14 nach Infektion die Abstoßung vermitteln konnte. Über die genaue Funktion von mMCPT-1 bei der Abwehr von gastrointestinalen Parasiten ist wenig bekannt. Da aber z.B. mMCPT-1-defiziente Mäuse eine verzögerte Expulsion von *T. spiralis* zeigen wird angenommen, dass die Protease einen Beitrag zur Expulsion dieses parasitären Nematoden leistet [164]. Auch die Freisetzung von mMCPT-1 während einer Infektion mit *S. rattii* scheint mit einer reduzierten Parasitenlast zu korrelieren. So führt die Applikation von rekombinantem IL-3 in Wildtypmäuse zu einer verstärkten Freisetzung von mMCPT-1 und zu einer reduzierten Parasitenlast im Darm [41]. In Mäusen in denen regulatorische T-Zellen depletiert wurden und Mäuse denen der regulatorische Rezeptor BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) bzw. sein Ligand HVEM (*herpes virus entry mediator*) fehlt, zeigen ebenfalls eine reduzierte Parasitenlast, welche mit einer erhöhten Konzentration von mMCPT-1 im Serum von *S. rattii* infizierten Mäusen einhergeht [20, 153]. Zusätzlich führt die Neutralisierung des mastzellstimulierenden Zytokins IL-9 zu einer Steigerung der Parasitenlast und reduziert die Freisetzung von mMCPT-1 im Serum [20]. Im Gegensatz dazu zeigen *S. venezuelensis* infizierte Fc-Rezeptor γ -Kette-defiziente Mäuse (FcR γ ^{-/-}) eine normale Mastozytose und mMCP-1 Freisetzung, aber eine verzögerte Abstoßung des Parasiten [165, 166]. Dieser Befund zeigt, dass unter bestimmten Umständen, z.B. in Abwesenheit von Fc-Rezeptor-vermittelter Aktivierung in FcR γ ^{-/-} Mäusen Mastzellen zwar mMCPT-1 frei setzen aber trotzdem nicht zur Freisetzung der für die Wurmexpulsion nötigen Effektormoleküle stimuliert werden.

Ein Effektormolekül, das neben mMCPT-1 durch Mastzellen freigesetzt werden kann und zur Expulsion von *S. rattii* beiträgt könnte ist das Proteoglykan Chondroitinsulfat. Mukosale Mastzellen von Ratten exprimieren z.B. nach Infektion mit *N. brasiliensis* verstärkt sulfonierte Proteoglykane, darunter Glykosaminoglykane und Chondroitinsulfate [167, 168]. Studien mit Hamstern und Ratten konnten zeigen, dass besonders hoch sulfonierte Mucine von Becherzellen zur Abstoßung von *S. venezuelensis* aus dem Darm beitragen [169, 170]. Auch Mastzellen exprimieren solche hoch sulfonierten Glykosaminoglykane [171, 172]. Maruyama *et al.* konnten zeigen, dass parasitäre *S. rattii* Weibchen sich nicht mehr in der Mukosa des Darms festsetzen konnten wenn sie zuvor *in vitro* mit den Glykosaminoglykanen Chondroitin A, E und Heparin inkubiert wurden [173]. Die erhöhte Parasitenlast in den zuvor schon erwähnten *S. venezuelensis* infizierten FcR γ ^{-/-} Mäusen korreliert auch mit der Reduktion von freiem Chondroitinsulfat in Darmspülungen [166] und mit einer Erhöhung an Chondroitinsulfat in Darmhomogenat, also im Gewebe [165], was darauf schließen lässt, dass Mastzellen in Abwesenheit der Fc-Rezeptor γ -Kette nicht voll aktiviert werden, um Chondroitinsulfat freizusetzen welches möglicherweise das verlängerte Festsetzen des Nematoden verhindern könnte. Die unterschiedliche Suszeptibilität von 129/SvJ und C57BL/6 Mäusen gegenüber einer

S. venezuelensis Infektion korreliert ebenfalls mit der unterschiedliche Freisetzung von Chondroitinsulfat [174]. Daher könnte also die Produktion und Freisetzung solcher Mediatoren durch mMCs, unabhängig von der Freisetzung von mMCPT-1, das Festsetzen des parasitären Nematoden im Darm verhindern.

4.4. Antikörpervermittelte Aktivierung von Mastzellen

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass Mastzellen eine wichtig Rolle bei der Kontrolle der *S. ratti* Infektion im Darm spielen und spezifisch mMCs essentiell sind für die endgültige Klärung der *S. ratti* Infektion. Das Vorhandensein eines adaptiven Immunsystems ist ebenfalls wichtig für die Terminierung der Infektion. T-Zell defizienten Nacktmäusen sind mindestens 6 Wochen [125] und T- und B-Zell defiziente RAG1^{-/-} Mäuse sind über 300 Tage mit *S. ratti* infiziert können aber die Infektion an Tag 6 genauso kontrollieren wie Wildtypmäuse (Breloer, unpubliziert; [153]). Auch T-zell defiziente Nacktratten bleiben über ein Jahr mit *S. ratti* infiziert [175]. Auch B-Zell defiziente JHD ko Mäuse zeigen einen verlängert hohen Ausstoß an *S. venezuelensis* Eiern nach Implantation von adulten Würmer in den Darm [176], was auf eine verzögerte Expulsion des Nematoden hinweist. Jedoch wurde in dieser Studie der Ausstoß an Eiern nur bis Tag 11 verfolgt. Das Fehlen von Mastzellen in Kombination mit dem Fehlen einer adaptiven Immunantwort führte jedoch nicht zu einer Verschlechterung der Bekämpfung der *S. ratti* Infektion, wie die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen. Mastzell- und T- und B-Zell defiziente RAG1^{-/-}xCpa3^{Cre} Mäuse hatten eine fast gleiche Parasitenlast an Tag 6 der Infektion, keinen erhöhten Verlust des Körpergewichts und keine erhöhte Ausscheidung an *S. ratti* DNA mit dem Fäzes im Vergleich zu nur B- und T-Zell defizienten RAG1^{-/-}xCpa3^{wt} Mäusen. Daher könnte es sein, dass Mastzellen durch das adaptive Immunsystem während einer *S. ratti* Infektion aktiviert werden. Die Kreuzvernetzung von IgE, welches an den FcεRI auf der Mastzelle gebunden ist, durch Antigen, ist ein Weg Mastzellen zu Aktivierung und führt zur Degranulation z.B. im Asthma- und Allergiemodell [60, 61]. Um zu überprüfen, ob die Antikörper-vermittelte Aktivierung von Mastzellen zur Expulsion des Nematoden beiträgt wurde in dieser Arbeit *S. ratti*-spezifisches Antiserum in RAG1^{-/-} und Cpa3^{Cre} Mäuse transferiert. Dass die in diesem Antiserum enthaltenen Antikörper wirksam gegen *S. ratti* sind zeigte sich bei der Bekämpfung der wandernden Larven im Gewebe. Wie schon bei Nouir *et al.* führte auch in dieser Arbeit der Antiserumtransfer vor Infektion mit *S. ratti* zu einer Reduktion der wandernden Larven im Gewebe an Tag 2 der Infektion [129]. Dies beruht vermutlich auf der Opsonierung der Larven mit *S. ratti*-spezifischen Antikörpern und der darauffolgenden Erkennung und Tötung durch

Granulozyten, denn die Bestandteile des transferierten Kontrollserums führten nicht zu einer Reduzierung der wandernden Larven.

Die Injektion von hochtitrigem *S. ratti*-spezifischen Antiserum als auch die Injektion des Kontrollserums in mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse an Tag 28 und 29 der Infektion führte in dieser Arbeit zu einer kurzen Reduktion des Ausstoßes an *S. ratti* DNA im Fäzes dieser Mäuse. Demnach profitierten auch mastzelldefiziente Mäuse von einem Serumtransfer, mit und ohne *S. ratti*-spezifische Antikörper, was darauf hindeutet, dass die Mastzellen während der *S. ratti* Infektion nicht unbedingt durch Antikörper-vermittelte Aktivierung zur Expulsion des Nematoden beitragen. Die zweimalige Gabe des naiven Kontroll- bzw. Antiserums in RAG1^{-/-} Mäuse führte dazu, dass sowohl die mit Antiserum behandelten Mäuse und die Kontrollgruppe, die keine *S. ratti*-spezifischen Antikörper verabreicht bekommen hat, die Infektion beenden konnten. Die Terminierung der Infektion in RAG1^{-/-} Mäusen nach Serumtransfer war also unabhängig vom Vorhandensein von *S. ratti*-spezifischen Antikörpern. Daher führten wohl unspezifische Bestandteile im generierten Antiserum als auch im Kontrollserum, wie z.B. Komplementfaktoren, Zytokine oder natürliche Antikörper [42, 177-179] zur schnelleren Terminierung der *S. ratti* Infektion in RAG1^{-/-} Mäusen. Um zu untersuchen, welche Bestandteile bei der Beendigung der Infektion eine Rolle spielen könnte das Serum vor Transfer in die Mäuse hitzeinaktiviert werden. So könnten z.B. lösliche Bestandteile des Komplementsystems innerhalb des Serums entfernt werden und deren Rolle in Bezug auf die Terminierung der Infektion beobachtet werden.

Dass RAG1^{-/-} Mäuse nicht von einem späten *S. ratti*-spezifischen Antiserumtransfer profitieren spricht dafür, dass Mastzellen in der späten Phase der Infektion nicht von Antikörpern aktiviert werden bzw. dieser Aktivierungsweg zu diesem Zeitpunkt der Infektion nicht wichtig ist für die Terminierung der Infektion. Dass die antikörpervermittelte Mastzellaktivierung zur Klärung einer *S. venezuelensis* beiträgt, konnte eine Studie von Matsumoto et al. zeigen. Diese nutzen AID-defiziente Mäuse, welche aufgrund einer defekten B-Zellaffinitätsreifung keinen Antikörperklassenwechsel von IgM zu anderen Isotypen machen können. Daher besitzen diese Mäuse kein IgE und IgG. Der Transfer von gereinigtem *S. ratti*-spezifischen IgG oder IgE konnte jeweils zu einer verbesserten die Expulsion des Nematoden beitragen. Dieser Effekt konnte nicht bei Transfer von IgG oder IgE in mastzelldefiziente WBB6F₁-Kit^{W/W-v} Mäuse beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die verbesserte Expulsion durch IgG bzw. IgE vermittelte Mastzellaktivierung zu Stande kam. Der Serum bzw. Antikörpertransfer fand in der zitierten Studie an Tag 6/7 statt. Also zu einem Zeitpunkt, zu dem die Migrationsphase der Larven abgeschlossen ist und sich die parasitären Weibchen im Darm festsetzen und führte zu einer verbesserten Expulsion. Der Serumtransfer in dieser Arbeit fand vier Wochen nach Infektion statt, zu einem Zeitpunkt, wo sich die adulten Weibchen schon in der Darmmukosa festgesetzt

haben. Demnach könnte es sein, dass die Antikörpervermittelte Mastzellaktivierung vor allem wichtig sind um das Festsetzen des Nematoden zu verhindern. Zu einem späteren Zeitpunkt aber vielleicht andere Mediatoren freigesetzt werden, die keine Auswirkungen auf die Expulsion haben. Neben dem FcεRI besitzen Mastzellen auch Fcγ Rezeptoren über die IgG zur Mastzellaktivierung beitragen kann [63, 64]. Das Fehlen der Signalweiterleitung über die Fc-Rezeptor γ-Kette führte während einer *S. venezuelensis* Infektion zu einer erhöhten Parasitenlast und zu einem verlängert erhöhten Ausstoß an *S. venezuelensis* [165, 166]. Die erhöhte Parasitenlast korreliert mit einer Reduktion von freiem Chondroitinsulfat in Darmwaschungen und mit einer Erhöhung an Chondroitinsulfat in Darmhomogenat [165]. Die Anzahl an Mastzellen und die mMCP-1 Freisetzung in FcRγ^{-/-} Mäusen war jedoch nicht verändert [166], was darauf schließen lässt, dass Mastzellen in Abwesenheit der Fc-Rezeptor γ-Kette nicht voll aktiviert werden, um Chondroitinsulfat freizusetzen welches möglicherweise das verlängerte Festsetzen des Nematoden verhindern würde. Die FcRγ-Kette ist sowohl bei der Aktivierung von mehreren Fc-Rezeptoren, als auch z.B. bei C-Typ Lektinrezeptoren beteiligt [180], weshalb der Phänotyp dieser Mäuse auch durch Defekte in der Signalweiterleitung durch nicht Fc-Rezeptoren zu Stande kommen kann.

Zusammenfassend deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die späte Antigen-spezifische antikörpervermittelte Aktivierung von Mastzellen nicht zur Terminierung der Infektion beiträgt.

4.5. IL-9 vermittelte Mastzellaktivierung

Mastzellen können nicht nur über Antikörperbindung an die jeweiligen Fc-Rezeptoren aktiviert werden, sondern können auch durch Zytokinstimulation expandieren und verschiedene Mediatoren sekretieren. Neben dem IL-3 Rezeptor, der für die Mastzellexpansion und Reifung wichtig ist, besitzen Mastzellen auch den IL-9 Rezeptor [181-183]. IL-9 wirkt bei der Expansion und Aktivierung von Mastzellen synergistisch mit IL-3 und IL-4 zusammen [32, 184]. Neben seiner Wirkung als Wachstumsfaktor führt IL-9 in Mastzellen auch zur Aktivierung der Expression von verschiedener mastzellosoziierten Proteasen, wie mMCP-1, mMCP-2 und mMCP-4 [185, 186]. Infektionen mit parasitären Nematoden, wie *T. muris*, *H. polygyrus*, *N. brasiliensis* und auch *S. ratti* führen neben der Expression der typischen Th2 Zytokine auch zur Expression von IL-9 [20, 135, 184, 187], welches Mastzellen in Kombination mit IL-3 aktivieren könnte [32]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Gabe von IL-9 während einer *S. ratti* Infektion zu einer Reduktion der Parasitenlast an Tag 6 der Infektion führt und reziprok die Neutralisierung von endogenem IL-9 mittels Applikation eines anti-IL9-Antikörpers zu einer

Steigerung der Parasitenlast und gleichzeitig zu einer Reduktion der Freisetzung von mMCPT-1 [20]. Dies lässt darauf schließen, dass IL-9 während der *S. rattii* Infektion über Mastzellen zur Kontrolle der Parasitenlast beiträgt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass BALB/c IL-9R^{-/-} Mäuse eine erhöhte Parasitenlast im Vergleich zu Kontroll-BALB/c Mäusen an Tag 6 der Infektion besaßen. Diese erhöhte Parasitenlast ging mit einer fast fehlenden mMCPT-1 Freisetzung und einer verzögerten Terminierung der Infektion einher. Trotzdem waren BALB/c IL-9R^{-/-} Mäuse nicht so lange mit *S. rattii* infiziert, wie komplett mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse. Auch die Restriktion der IL-9R-Defizienz auf Mastzellen in gemischten Knochenmarkschimären spiegelte die um ca. 4 Wochen verzögerte Terminierung der reinen BALB/c IL-9R^{-/-} Mäuse wieder und nicht die um 5 Monate verzögerte Terminierung der mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäuse. Dies spricht dafür, dass Mastzellen offensichtlich durch weitere Wege aktiviert werden können, die die IL-9-abhängige Aktivierung kompensieren können und zur Expulsion des Parasiten beitragen.

Im Gegensatz zur Terminierung zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Kontrolle der Parasitenlast an Tag 6 der Infektion abhängig war von der IL-9 vermittelten Mastzellaktivierung. IL-9R^{-/-} Mäuse zeigten eine erhöhte Parasitenlast und eine reduzierte mMCPT-1 Freisetzung im Gegensatz zu Wildtypmäusen, was auf eine verminderte Mastzellaktivierung ohne IL-9 vermittelte Signale hinweist. Die IL-9 vermittelte Mastzellaktivierung kann durch die Induktion von regulatorischen T Zellen unterdrückt werden [20]. Die Depletion von Treg während der *S. rattii* Infektion führte in dieser Arbeit zu einem Anstieg an IL-9 in ex vivo stimulierten Milzzellen. Dabei geht die Steigerung von IL-9 mit einer erhöhten Mastzellaktivierung und einer verbesserten Expulsion des Nematoden einher [20]. Bei zusätzlichem Fehlen von Mastzellen war der Effekt der verbesserten Expulsion aufgehoben, wobei die Steigerung der IL-9-Konzentration gleich blieb. Die Bedeutung von IL-9 vermittelter Mastzellaktivierung ist nicht bei allen intestinalen Parasiten. So führte die *T. muris* Infektion von IL-9 transgenen Mäusen zu einer verstärkten Mastozytose die mit einer verbesserten Expulsion der Infektion einher ging [188]. Auch eine Infektion mit *T. spiralis* konnte innerhalb von IL-9 transgenen Mäusen schneller geklärt werden. Dabei konnte auch eine verstärkte Mastozytose beobachtet werden, die anhand einer gesteigerten mMCPT-1 Produktion im Darm festgestellt werden konnte [189]. IL-9 defiziente 129xC57BL/6 (F₂) Mäuse, welche mit *N. brasiliensis* infiziert wurden zeigten eine reduzierte mMCPT-1 Freisetzung, aber keine Beeinträchtigung der Expulsion [190]. Hingegen zeigt eine Studie mit IL-9 defizienten Mäusen auf BALB/c Hintergrund eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer *N. brasiliensis* Infektion mit gleichzeitig reduzierter Mastzellzahl [191]. Dies verdeutlicht, dass auch der genetische Hintergrund der verwendeten Mäuse Einfluss hat, in wie weit die IL-9 vermittelte Mastzellaktivierung wichtig ist für die Expulsion eines Nematoden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Aktivierung von Mastzellen während einer *S. rattii* Infektion zeigen, dass der Verlust einer späten, durch Antigen-spezifische Antikörper-vermittelten Mastzellaktivierung, als auch der Verlust des IL-9 Rezeptors auf der Mastzelloberfläche, jeweils nicht allein ursächlich sind für die verlängerte Infektion, die in mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen beobachtet werden kann.

4.6. Probleme des verwendeten Systems

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ab ca. Tag 14 der Infektion mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäusen sowohl auf BALB/c, als auch auf C57BL/6 Hintergrund mMCP-1 freisetzen. Die mMCP-1 ist eine Chymase die spezifisch von mukosalen Mastzellen in der Maus produziert und freigesetzt wird [50]. Es stellt sich die Frage, ob die mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäuse tatsächlich defizient für Mastzellen sind. Die histologischen Färbungen zeigen mittels anti-c-Kit Antikörper und Toluidinfärbung Zellen im Dünndarm von *S. rattii* infizierten Cpa3^{Cre} Mäusen, welche Mastzellen bzw. Mastzellvorläufer darstellen könnten. Jedoch sind diese Färbungen nicht 100% spezifisch, so kann Toluidin beispielsweise Nukleinsäuren, Mucine und auch Granula von endokrinen Zellen anfärben, weshalb eine morphologische Interpretation des jeweiligen Zelltypen vorgenommen werden muss. Feyerabend *et al.* zeigten, dass bei der Generierung der mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäuse noch mastzellähnliche Vorläuferzellen vorhanden waren [93], die die in dieser Arbeit gezeigte Freisetzung von mMCP-1 und die positiven Zellen in der histologischen Färbung erklären könnten. Jedoch konnte während der Infektion von *N. brasiliensis*, einem Nematoden der eine stärkere Mastozytose im Darm hervorruft als *S. rattii*, keine Expansion von mukosalen Mastzellen an Tag 10 der Infektion im Darm von mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen mittels histologischer Färbung festgestellt werden. Auch die Analyse der mMCP-1 mRNA Expression im Darm und die Konzentration im Serum, konnte keine mMCP-1 Induktion an Tag 14 der Infektion zeigen. Dies deutet darauf hin, dass womöglich andere Zellen für die Produktion bzw. Freisetzung von mMCP-1 innerhalb der *S. rattii* Infektion verantwortlich sind. Festzuhalten ist, dass trotz der aufkommenden mMCP-1 Freisetzung Cpa3^{Cre} Mäuse die *S. rattii* Infektion für ca. 160 Tage nicht beenden konnten, was dafür spricht, dass die möglicherweise aufkommenden Mastzellvorläufer entweder nicht funktionell sind, oder aber dass die mMCP-1 Freisetzung nicht ursächlich ist für die Expulsion des Nematoden, wie dies z.B. für eine Infektion mit *T. spiralis* gezeigt werden konnte [164].

5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass insbesondere mukosale Mastzellen für die Expulsion von *S. ratti* aus dem Darm wichtig sind. Der genaue Wirkmechanismus der Mastzelle, der zur Expulsion des Parasiten beiträgt wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es kommen dabei unterschiedliche, in Mastzellen gespeicherte, Effektormoleküle, als auch durch Mastzellen induzierte Wirkmechanismen in Frage, die in weiteren Untersuchungen näher analysiert werden könnten.

Mastzellen haben eine Vielzahl an Mediatoren in ihren Granula gespeichert, die potentiell einen Einfluss auf die Expulsion des Parasiten haben können. Zu diesen Substanzen zählen z.B. unterschiedliche Proteasen wie die Maus-Mastzellprotease mMCPT-1. Dass diese nicht unbedingt wichtig ist für die Expulsion von *S. ratti* zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit. Innerhalb der mastzelldefizienten *Cpa3^{Cre}* Mäuse konnte eine aufkommende Freisetzung an mMCPT-1 festgestellt werden, nichts destotrotz zeigten diese Mäuse eine verlängerte Infektion. Um aber die Beteiligung dieser Protease, als auch anderer Mastzellproteasen wie z.B. mMCPT-4 an der Expulsion von *S. ratti* auszuschließen, könnten Proteasespezifisch-defiziente Mäuse (darunter mMCPT-1 defiziente Mäuse) während der *S. ratti* Infektion untersucht werden und so Aufschluss darüber geben, ob die Proteasen für die Terminierung der Infektion wichtig sind, wie es z.B. für mMCPT-1 in der *T. spiralis* Infektion gezeigt werden konnte [164].

Neben Proteasen haben Mastzellen auch sulfonierte Chondroitinsulfate und Glycosaminoglykane gespeichert, wobei erstere für die Einbettung von *S. venezuelensis* in die Darmmukosa hinderlich sein können [173]. Um die genauere Rolle dieser Moleküle bei der Einbettung von *S. ratti* in den Darm zu analysieren könnten auch hier für die einzelnen Moleküle defiziente Mäuse verwendet werden [192, 193]. Dies kann einen ersten Eindruck vermitteln, in wie weit diese Moleküle bei der Bekämpfung und Expulsion von *S. ratti* eine Rolle spielen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese Moleküle nicht allein von Mastzellen produziert werden, sondern z.B. auch von Becherzellen im Darm nach Infektion [169]. Um zu überprüfen, ob die spezifisch durch Mastzellen freigesetzten Proteoglykane bzw. im speziellen Chondroitinsulfat für die Kontrolle der Infektion wichtig sind, könnten, wie auch schon in dieser Arbeit, gemischte Knochenmarkschimären generiert werden, in denen der Verlust eines Mediators auf die Mastzelle beschränkt wird.

Die Freisetzung der in Mastzellen gespeicherten Lipidmediatoren, wie z.B. Prostaglandine, als auch die Produktion von Zytokinen wie IL-4 und IL-13 können zur Erhöhung der Peristaltik des Darms, als auch zur Erhöhung der Mukusproduktion und der vaskulären Permeabilität beitragen, die für das „Herausschwemmen“ des Nematoden aus dem Darm wichtig sein können [81, 194, 195]. Um zu untersuchen, ob Mastzellen einen Einfluss auf die Muskelkontraktilität des

Darms haben, die wiederum zu der verschlechterten Expulsion von *S. ratti* aus mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen führen kann, könnte diese anhand von *ex vivo* präparierten Darmmuskeln aus infizierten mastzelldefizienten Mäusen untersucht werden [196, 197], als auch durch die Analyse der *in vivo* Weiterleitung von zugeführten Fluoreszenzfarbstoffen innerhalb des Darms [198]. Dies würde Aufschluss darüber geben, ob die verzögerte Terminierung der Infektion in mastzelldefizienten Mäusen durch eine verschlechterte Peristaltik generiert wird.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen darauf schließen, dass die Antikörper-vermittelte Mastzellaktivierung zum späten Zeitpunkt der Infektion nicht zur Expulsion des gastrointestinalen Nematoden beiträgt. Jedoch wurde in dieser Arbeit ein eher komplexes *S. ratti*-spezifisches Antiserum verwandt welches zum einen unterschiedliche Antikörperisotypen und zum anderen zusätzliche lösliche Komponenten wie z.B. Komplementfaktoren enthielt. Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, ob Mastzellen doch von einem spezifischen Antikörperisotyp, wie z.B. IgE oder IgG1 aktiviert werden, könnte man diese aus dem komplexen Antiserum aufreinigen, wie es z.B. in der Studie von Matsumoto *et al.* gemacht wurde. Zusätzlich könnte man dann durch den Transfer der gereinigten Antikörper in RAG1^{-/-} Mäuse an verschiedenen Zeitpunkten analysieren, ob nicht doch vielleicht eine frühere Antikörper-vermittelte Mastzellaktivierung zur Expulsion des Parasiten beiträgt.

Obwohl die IL-9 vermittelte Mastzellaktivierung zum frühen Zeitpunkt wichtig ist, um die Parasitenlast zu kontrollieren [20], zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass dieser Aktivierungsweg allein nicht nötig ist, für die Beendigung der Infektion. Mastzellen besitzen eine Vielzahl an anderen Rezeptoren. Darunter z.B. auch den IL-33 Rezeptor. Eine Infektion mit dem gastrointestinalen Nematoden *H. polygyrus* induziert im Darmepithel die Mastzell-abhängige Freisetzung von Alarminen, wie IL-25, IL-33 und TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*). Während einer *S. venezuelensis* Infektion produzieren alveolare Epithelzellen IL-33, welches zur Expansion von sogenannten „innate lymphoid cells“ vom Typ 2 (ILC2s) führt. Daher wäre es interessant zu sehen, ob die IL-33 abhängige Aktivierung von Mastzellen im Darm wichtig ist für die Kontrolle der Parasitenlast, als auch für die Expulsion des Nematoden aus dem Darm. Dazu könnten zum einen IL-33 Rezeptor-defiziente Mäuse während der *S. ratti* Infektion untersucht werden und/oder aber rekombinantes IL-33 könnte in mastzelldefizienten Cpa3^{Cre} Mäusen zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion zur Kontrolle der Parasitenlast, bzw. zu einem späten Zeitpunkt der Infektion für die Expulsion des Nematoden injiziert werden.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass IL-9, welches durch regulatorische T-Zellen während der *S. ratti* Infektion unterdrückt wird, zur Aktivierung von Mastzellen führt und dadurch zur Kontrolle der Parasitenlast beiträgt. Es stellt sich die Frage, wer dieses mastzellaktivierende IL-9

während der *S. rattii* Infektion produziert. Die weiteren Studien sollten sich demnach mit der Analyse der „Quelle des IL-9“ befassen. Neben Th9 Zellen, welche nach Ausdifferenzierung zur Produktion und Freisetzung von IL-9 und z.B. zur Expulsion von *N. brasiliensis* beitragen können [191], sind wohl besonders ILC2s Kandidaten für die IL-9 Produktion während der frühen Phase der *S. rattii* Infektion. Diese können durch die Freisetzung von IL-33 durch die über parasitäres Chitin aktivierten alveolaren Typ II Epithelzellen in der Lunge expandieren und führen dort durch die Produktion von IL-5 zur Rekrutierung von Eosinophilen [161]. Daher wäre es interessant die mögliche Induktion und Expansion der umstrittenen Th9 Zellen [199] und der ILCs sowohl in der Lunge, als auch im Darm von *S. rattii* infizierten Mäusen z.B. durchflusszytometrisch zu analysieren.

6. Zusammenfassung

Ca. 1/3 der Weltbevölkerung ist mit parasitären Würmern infiziert. Dabei umfassen Infektionen mit *Strongyloides spp.* ca. 30-100 Millionen Menschen. Die Infektion von Mäusen mit dem rattenpathogenen *Strongyloides ratti* kann als Modell für eine gastrointestinale Nematodeninfektion genutzt werden. Die freilebenden infektiösen dritten Larven penetrieren die unverletzte Haut der Mäuse und wandern zum Kopf, wo sie verschluckt werden. Angekommen im Darm häuten sich die Larven über ein viertes Larvenstadium hin zu adulten Weibchen, welche eingebettet in der Darmmukosa leben. Die parasitären Weibchen vermehren sich über mitotische Parthenogenese. Eier und geschlüpfte erste Larven gelangen mit dem Fäzes des Wirtes in die freie Welt. Immunkompetente Mäuse können eine Infektion innerhalb von ca. vier Wochen im Kontext einer typischen Th2 Immunantwort beenden. Sie erwerben dabei eine Teilresistenz gegenüber einer zweiten Infektion. Die Funktion von Mastzellen während einer *S. ratti* Infektion wurde bisher mit Hilfe von mastzelldefizienten KIT-mutanten Mäusen untersucht. Diese Mäuse besitzen aufgrund der Mutation des Stammzellenwachstumsfaktor-Rezeptors (KIT), welcher nicht nur für die Entwicklung von Mastzellen wichtig ist, neben der eigentlichen Mastzelldefizienz noch weitere immunologisch relevante Defekte. Diese zusätzlichen Defekte machen es schwer, ein in diesen Mäusen beobachtetes Phänomen, nur auf die alleinige Mastzelldefizienz zurückzuführen. Durch die Nutzung der neuen KIT-unabhängigen Mausmodelle wurde in dieser Arbeit die Funktion von Mastzellen während der *S. ratti* Infektion neu analysiert. Des Weiteren wurden die unterschiedlichen Funktionen von zwei Arten von Mastzellen, den Bindegewebsmastzellen und den mukosalen Mastzellen, während der Infektion differenziert.

Die Analyse von komplett mastzelldefizienten $Cpa3^{Cre}$ Mäuse und der nur bindegewebsmastzelldefizienten $Mcpt5^{Cre}$ Mäuse ergab, dass Mastzellen bei der Bekämpfung der wandernden Larven im Gewebe keine Rolle spielen. Die Anzahl an Larven war während der Gewebewanderung zwischen mastzellkompetenten und -defizienten Geschwistermäusen gleich. Hingegen war die Parasitenlast im Dünndarm in beiden mastzelldefizienten Mausstämmen an Tag 6 der Infektion, also zum Zeitpunkt der höchsten Parasitenlast, im Vergleich zu Wildtypwurfgeschwistern signifikant erhöht. Bei der Analyse des Verlaufs der Infektion zeigten jedoch nur $Cpa3^{Cre}$ Mäuse, nicht aber $Mcpt5^{Cre}$ Mäuse, eine stark verlängerte Infektion von ca. 160 Tagen anstatt 30 Tagen in Wildtyp Geschwistermäusen. Dies zeigt, dass insbesondere mukosale Mastzellen für die Beendigung der *S. ratti* Infektion wichtig sind.

Die Helminthen typischen Th2 Immunantwort, die sich durch die Produktion von Interleukinen, wie IL-9, IL-13, IL-4 und IL-5 Antikörpern der Isotypen IgG1 und IgE sowie Akkumulation von Eosinophilen im Darm auszeichnet, war in $Cpa3^{Cre}$ und $Cpa3^{wt}$ Mäusen vergleichbar. Diese Immunantwort vermittelte einen effektiven Schutz gegen eine zweite Infektion. Während der

Reinfektion von vakzinierten Mäusen zeigten mastzelldefiziente Cpa3^{Cre} Mäuse und mastzelldefiziente Cpa3^{wt} Mäuse eine gleich effektive Bekämpfung der migrierenden Larven im Gewebe. Zudem war die Parasitenlast an Tag 6 nach Reinfektion im Darm auch in Cpa3^{Cre} Mäusen im Vergleich zu einer Erstinfektion reduziert.

Die Analyse der Aktivierung von Mastzellen während der *S. rattii* Infektion ergab, dass Mastzellen über IL-9, welches von regulatorischen T Zellen supprimiert wird, in der frühen Phase der Infektion aktiviert werden. Jedoch zeigte die Analyse von IL-9 Rezeptor defizienten Mäusen und die Analyse von gemischten Knochenmarkchimären, in denen die IL-9 Rezeptordefizienz nur auf Mastzellen begrenzt ist, dass die IL-9 Rezeptor-vermittelte Aktivierung nicht die einzige Möglichkeit ist Mastzellen so zu aktivieren, dass die *S. rattii* Infektion beendet werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Mastzellen während der *S. rattii* Infektion keinen Beitrag bei der Bekämpfung der wandernden Larven im Gewebe und bei der Etablierung einer schützenden zellulären und humoralen Immunantwort leisten. Jedoch sind Mastzellen wichtig für die Kontrolle der Parasitenlast im Darm und spezifisch mukosale Mastzellen sind essentielle Effektorzellen, ohne die eine Infektion nur stark verzögert beendet werden kann.

Abstract

Approximately one third of the human population is infected with parasitic worms, *Strongyloides spp.* accounting for 30-100 million cases. Mice infected with *Strongyloides ratti* can be used as a model for a gastrointestinal helminth infection. The infective third-stage larvae of the nematode actively penetrate the skin of mice and migrate to the mouth, predominantly *via* the head but also the lung. The larvae are swallowed and reach the small intestine where they moult *via* a fourth-stage larvae to become parasitic, female adults. The female worms live embedded in the mucosa of the intestine and reproduce by parthenogenesis. Eggs and already hatched first-stage larvae are excreted with the feces. Immunocompetent mice efficiently terminate the infection in the context of a Th2 response that renders the mice semi-resistant to a subsequent infection. Studies using KIT-deficient mice that lack mast cells suggest that mast cells are important for expulsion of the nematode. However, as KIT is expressed in other hematopoietic and non-hematopoietic cell lineages these mice exhibit additional immunological-relevant abnormalities, making it difficult to separate the contributions of mast cells from the functions of KIT in other cell lineages. In this study the role of mast cells during an *S. ratti* infection was re-evaluated with recently generated KIT-independent mast cell-deficient mouse strains (Cpa3^{Cre} and Mcpt5^{Cre} mice). Thereby, the function of two different types of mast cells, mucosal mast cells and connective tissue mast cells, during *S. ratti* infection was investigated.

Numbers of tissue migrating larvae were alike in mast cell-competent and mast cell-deficient littermates. All mast cell-deficient mouse strains displayed a significant increase in parasite burden in the small intestine. Thus, mast cells are dispensable for the combat of migrating larvae but are required for the control of female adults in the small intestine. Interestingly, mice that selectively lack connective tissue mast cells efficiently terminated the *S. ratti* infection by day 40 after infection with the same kinetics as wildtype littermates. In contrast, mice that lack both, connective tissue mast cells and mucosal mast cells, remained infected for more than 160 days.

The establishment of the canonical helminth-specific Th2 immune response was comparable with regard to cytokine and antibody induction between mast cell-deficient and mast cell-competent littermates, indicating that neither mucosal nor connective tissue mast cells were required for the establishment of an adaptive immune response to *S. ratti*. In addition, the immune response in mast cell-deficient mice was functional since improved eradication of tissue migrating larvae was observed in immune mice also in the absence of mast cells.

Analyses of the function of IL-9 in mast cell activation showed that the IL-9 production that is suppressed by regulatory T cells leads to mast cell activation and promoted the control of parasite burden during the early phase of infection. However, IL-9 receptor deficient mice and mixed bone marrow chimeras in which the IL-9 receptor deficiency was restricted to mast cells did not exhibit the drastically prolonged infection observed in mast cell deficient Cpa3^{Cre} mice.

Taken together these results indicate that mast cells do not contribute to control of tissue migrating larvae and are not required as initiators or orchestrators of adaptive immune responses during *S. ratti* infection. While connective tissue mast cells alone or in combination with mucosal mast cells contribute to parasite control in the early stage of intestinal infection, specifically mucosal mast cells represent central and indispensable effectors in the final eradication of *S. ratti* from the small intestine. Thereby, IL-9 activation of mast cells is required for control of parasite burden during the early phase of infection, but neither IL-9 receptor mediated signalling nor antibody mediated mast cell activation is essential for termination of *S. ratti* infection.

4. Literaturverzeichnis

1. Katiyar, D. and L.K. Singh, *Filariasis: Current status, treatment and recent advances in drug development*. Curr Med Chem, 2011. **18**(14): p. 2174-85.
2. Hoerauf, A., B. Fleischer, and R.D. Walter, *Of filariasis, mice and men*. Trends Parasitol, 2001. **17**(1): p. 4-5.
3. Allen, J.E., et al., *Of mice, cattle, and humans: the immunology and treatment of river blindness*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(4): p. e217.
4. Bethony, J., et al., *Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm*. Lancet, 2006. **367**(9521): p. 1521-32.
5. Viney, M.E. and J.B. Lok, *The biology of Strongyloides spp.* WormBook, 2015: p. 1-17.
6. Schad, G.A., L.M. Aikens, and G. Smith, *Strongyloides stercoralis: is there a canonical migratory route through the host?* J Parasitol, 1989. **75**(5): p. 740-9.
7. Hira, P.R. and B.G. Patel, *Human strongyloidiasis due to the primate species Strongyloides fulleborni*. Trop Geogr Med, 1980. **32**(1): p. 23-9.
8. Dawkins, H.J., et al., *Light and electron microscopical studies of the location of Strongyloides ratti in the mouse intestine*. Z Parasitenkd, 1983. **69**(3): p. 357-70.
9. Dawkins, H.J. and D.I. Grove, *Kinetics of primary and secondary infections with Strongyloides ratti in mice*. Int J Parasitol, 1981. **11**(1): p. 89-96.
10. Streit, A., *Reproduction in Strongyloides (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis*. Parasitology, 2008. **135**(3): p. 285-94.
11. Viney, M.E., *Developmental switching in the parasitic nematode Strongyloides ratti*. Proc Biol Sci, 1996. **263**(1367): p. 201-8.
12. Harvey, S.C., et al., *The control of morph development in the parasitic nematode Strongyloides ratti*. Proc Biol Sci, 2000. **267**(1457): p. 2057-63.
13. Gemmill, A.W. and S.A. West, *Influence of rat strain on larval production by the parasitic nematode Strongyloides ratti*. J Parasitol, 1998. **84**(6): p. 1289-91.
14. Dawkins, H.J., et al., *Light and electron microscopical studies of the location of Strongyloides ratti in the mouse intestine*. Zeitschrift fur Parasitenkunde, 1983. **69**(3): p. 357-70.
15. Viney, M.E. and J.B. Lok, *The biology of Strongyloides spp.* WormBook : the online review of C. elegans biology, 2015: p. 1-17.
16. Dawkins, H.J. and D.I. Grove, *Kinetics of primary and secondary infections with Strongyloides ratti in mice*. International journal for parasitology, 1981. **11**(1): p. 89-96.
17. Dawkins, H.J. and D.I. Grove, *Immunisation of mice against Strongyloides ratti*. Z Parasitenkd, 1982. **66**(3): p. 327-33.
18. Dawkins, H.J., et al., *Strongyloides ratti: susceptibility to infection and resistance to reinfection in inbred strains of mice as assessed by excretion of larvae*. International journal for parasitology, 1980. **10**(2): p. 125-9.
19. Sato, Y. and H. Toma, *Strongyloides venezuelensis infections in mice*. Int J Parasitol, 1990. **20**(1): p. 57-62.
20. Blankenhaus, B., et al., *Foxp3(+) regulatory T cells delay expulsion of intestinal nematodes by suppression of IL-9-driven mast cell activation in BALB/c but not in C57BL/6 mice*. PLoS Pathog, 2014. **10**(2): p. e1003913.
21. Eschbach, M.L., et al., *Strongyloides ratti infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN-gamma production in mice*. Parasite Immunol, 2010. **32**(5): p. 370-83.
22. Murrell, K.D., *Protective role of immunoglobulin G in immunity to Strongyloides ratti*. J Parasitol, 1981. **67**(2): p. 167-73.
23. Abraham, D., et al., *Strongyloides stercoralis: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice*. Exp Parasitol, 1995. **80**(2): p. 297-307.
24. Galioto, A.M., et al., *Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval strongyloides stercoralis in mice*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5730-8.

25. Padigel, U.M., et al., *Signaling through Galphai2 protein is required for recruitment of neutrophils for antibody-mediated elimination of larval Strongyloides stercoralis in mice*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(4): p. 1120-6.
26. Brigandi, R.A., et al., *Strongyloides stercoralis: role of antibody and complement in immunity to the third stage of larvae in BALB/cByJ mice*. Exp Parasitol, 1996. **82**(3): p. 279-89.
27. Grove, D.I., C. Northern, and H.J. Dawkins, *Interactions of Strongyloides ratti free-living and skin-penetrated infective larvae and parasitic adults with serum and cells in vitro*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1985. **63 (Pt 5)**: p. 521-9.
28. Herbert, D.R., et al., *Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval Strongyloides stercoralis in mice*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4544-51.
29. Ovington, K.S., et al., *Regulation of primary Strongyloides ratti infections in mice: a role for interleukin-5*. Immunology, 1998. **95**(3): p. 488-93.
30. Korenaga, M., et al., *The role of interleukin-5 in protective immunity to Strongyloides venezuelensis infection in mice*. Immunology, 1991. **72**(4): p. 502-7.
31. El-Malky, M., et al., *Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, Strongyloides venezuelensis in mice*. Parasitol Int, 2003. **52**(1): p. 71-9.
32. Sasaki, Y., et al., *IL-18 with IL-2 protects against Strongyloides venezuelensis infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity*. J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 607-16.
33. Stein, L.H., et al., *Eosinophils utilize multiple chemokine receptors for chemotaxis to the parasitic nematode Strongyloides stercoralis*. J Innate Immun, 2009. **1**(6): p. 618-30.
34. Padigel, U.M., et al., *Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to Strongyloides stercoralis in mice*. J Infect Dis, 2007. **196**(12): p. 1844-51.
35. Padigel, U.M., et al., *Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to Strongyloides stercoralis*. Infect Immun, 2006. **74**(6): p. 3232-8.
36. O'Connell, A.E., et al., *Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to Strongyloides stercoralis in mice*. Infect Immun, 2011. **79**(7): p. 2770-8.
37. Rotman, H.L., et al., *Strongyloides stercoralis: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice*. Exp Parasitol, 1996. **82**(3): p. 267-78.
38. Bonne-Annee, S., et al., *Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval Strongyloides stercoralis*. Microbes Infect, 2014. **16**(6): p. 502-11.
39. Kerepesi, L.A., et al., *Toll-like receptor 4 (TLR4) is required for protective immunity to larval Strongyloides stercoralis in mice*. Microbes Infect, 2007. **9**(1): p. 28-34.
40. Austen, K.F. and J.A. Boyce, *Mast cell lineage development and phenotypic regulation*. Leuk Res, 2001. **25**(7): p. 511-8.
41. Abe, T., et al., *Intestinal protection against Strongyloides ratti and mastocytosis induced by administration of interleukin-3 in mice*. Immunology, 1993. **80**(1): p. 116-21.
42. Abe, T. and Y. Nawa, *Worm expulsion and mucosal mast cell response induced by repetitive IL-3 administration in Strongyloides ratti-infected nude mice*. Immunology, 1988. **63**(2): p. 181-5.
43. Lantz, C.S., et al., *Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 90-3.
44. Khan, A.I., et al., *Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against Strongyloides venezuelensis*. Int J Parasitol, 1993. **23**(5): p. 551-5.
45. Nawa, Y., et al., *Defective protective capacity of W/W^v mice against Strongyloides ratti infection and its reconstitution with bone marrow cells*. Parasite immunology, 1985. **7**(4): p. 429-38.

46. Nakano, T., et al., *Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells.* J Exp Med, 1985. **162**(3): p. 1025-43.
47. Tertian, G., et al., *Long-term in vitro culture of murine mast cells. I. Description of a growth factor-dependent culture technique.* J Immunol, 1981. **127**(2): p. 788-94.
48. Ihle, J.N., et al., *Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity.* J Immunol, 1983. **131**(1): p. 282-7.
49. Kitamura, Y., S. Go, and K. Hatanaka, *Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation.* Blood, 1978. **52**(2): p. 447-52.
50. Reynolds, D.S., et al., *Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(8): p. 3230-4.
51. Galli, S.J., N. Borregaard, and T.A. Wynn, *Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils.* Nat Immunol, 2011. **12**(11): p. 1035-44.
52. Irani, A.A., et al., *Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4464-8.
53. Supajatura, V., et al., *Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity.* J Clin Invest, 2002. **109**(10): p. 1351-9.
54. Nilsson, G., et al., *C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway.* J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1693-8.
55. Prodeus, A.P., et al., *Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice.* Nature, 1997. **390**(6656): p. 172-5.
56. Maurer, M., et al., *Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity.* Nature, 2004. **432**(7016): p. 512-6.
57. Johnson, D. and W. Krenger, *Interactions of mast cells with the nervous system--recent advances.* Neurochem Res, 1992. **17**(9): p. 939-51.
58. Hirai, Y., et al., *A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (Vespa xanthoptera).* Chem Pharm Bull (Tokyo), 1979. **27**(8): p. 1945-6.
59. Demeure, C.E., et al., *Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia.* J Immunol, 2005. **174**(7): p. 3932-40.
60. Galli, S.J. and M. Tsai, *Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity.* Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1843-51.
61. Williams, C.M. and S.J. Galli, *Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice.* J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 455-62.
62. Gurish, M.F., et al., *IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with Trichinella spiralis.* J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1139-45.
63. Daeron, M., et al., *Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors.* J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 577-85.
64. Woolhiser, M.R., et al., *IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of FcγRI by IFN-γ.* Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3298-307.
65. Genovese, A., et al., *Bacterial immunoglobulin superantigen proteins A and L activate human heart mast cells by interacting with immunoglobulin E.* Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5517-24.
66. Broide, D.H., et al., *Transforming growth factor-beta 1 selectively inhibits IL-3-dependent mast cell proliferation without affecting mast cell function or differentiation.* J Immunol, 1989. **143**(5): p. 1591-7.

67. Lin, T.J. and A.D. Befus, *Differential regulation of mast cell function by IL-10 and stem cell factor*. J Immunol, 1997. **159**(8): p. 4015-23.
68. Lin, T.J., T.B. Issekutz, and J.S. Marshall, *Human mast cells transmigrate through human umbilical vein endothelial monolayers and selectively produce IL-8 in response to stromal cell-derived factor-1 alpha*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 211-20.
69. Abraham, S.N. and A.L. St John, *Mast cell-orchestrated immunity to pathogens*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 440-52.
70. Xiang, Z., et al., *IgE-mediated mast cell degranulation and recovery monitored by time-lapse photography*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(1): p. 116-21.
71. Galli, S.J., M. Grimaldeston, and M. Tsai, *Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 478-86.
72. Galli, S.J. and M. Tsai, *Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis*. J Dermatol Sci, 2008. **49**(1): p. 7-19.
73. Wernersson, S. and G. Pejler, *Mast cell secretory granules: armed for battle*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(7): p. 478-94.
74. Sjoerdsma, A., T.P. Waalkes, and H. Weissbach, *Serotonin and histamine in mast cells*. Science, 1957. **125**(3259): p. 1202-3.
75. Caron, G., et al., *Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6000-6.
76. Shelburne, C.P., et al., *Mast cells augment adaptive immunity by orchestrating dendritic cell trafficking through infected tissues*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(4): p. 331-42.
77. Metcalfe, D.D., *Mast cells and mastocytosis*. Blood, 2008. **112**(4): p. 946-56.
78. Castells, M., *Mast cell mediators in allergic inflammation and mastocytosis*. Immunol Allergy Clin North Am, 2006. **26**(3): p. 465-85.
79. Weller, C.L., et al., *Mast cells in health and disease*. Clin Sci (Lond), 2011. **120**(11): p. 473-84.
80. Castellani, M.L., et al., *VEGF, substance P and stress, new aspects: a revisited study*. J Biol Regul Homeost Agents, 2010. **24**(3): p. 229-37.
81. Van Nassauw, L., D. Adriaensen, and J.P. Timmermans, *The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract*. Auton Neurosci, 2007. **133**(1): p. 91-103.
82. Akahoshi, M., et al., *Mast cell chymase reduces the toxicity of Gila monster venom, scorpion venom, and vasoactive intestinal polypeptide in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 4180-91.
83. Metz, M., et al., *Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms*. Science, 2006. **313**(5786): p. 526-30.
84. Maurer, M. and M. Metz, *The status quo and quo vadis of mast cells*. Exp Dermatol, 2005. **14**(12): p. 923-9.
85. Di Nardo, A., A. Vitiello, and R.L. Gallo, *Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2274-8.
86. Furuta, T., et al., *Protective roles of mast cells and mast cell-derived TNF in murine malaria*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3294-302.
87. Marshall, J.S., *Mast-cell responses to pathogens*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 787-99.
88. Marshall, J.S., C.A. King, and J.D. McCurdy, *Mast cell cytokine and chemokine responses to bacterial and viral infection*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(1): p. 11-24.
89. Williams, C.M. and S.J. Galli, *The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 847-59.
90. Garbuzenko, E., et al., *Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(2): p. 237-46.
91. Maurer, M., et al., *What is the physiological function of mast cells?* Exp Dermatol, 2003. **12**(6): p. 886-910.

92. Antsiferova, M., et al., *Mast cells are dispensable for normal and activin-promoted wound healing and skin carcinogenesis*. J Immunol, 2013. **191**(12): p. 6147-55.
93. Feyerabend, T.B., et al., *Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity*. Immunity, 2011. **35**(5): p. 832-44.
94. Hochegger, K., et al., *Role of mast cells in experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis*. Eur J Immunol, 2005. **35**(10): p. 3074-82.
95. Yu, X., A. Kasprick, and F. Petersen, *Revisiting the role of mast cells in autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(9): p. 751-9.
96. Sun, J., et al., *Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3359-68.
97. Conti, P., et al., *Role of mast cells in tumor growth*. Ann Clin Lab Sci, 2007. **37**(4): p. 315-22.
98. Galli, S.J., et al., *Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 749-86.
99. Reber, L.L., et al., *Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity*. Mucosal Immunol, 2015. **8**(3): p. 444-63.
100. Ribeiro-Filho, J., M.R. Piuvezam, and P.T. Bozza, *Anti-allergic properties of curine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid*. Molecules, 2015. **20**(3): p. 4695-707.
101. Bai, Y., et al., *Targeting the KIT activating switch control pocket: a novel mechanism to inhibit neoplastic mast cell proliferation and mast cell activation*. Leukemia, 2013. **27**(2): p. 278-85.
102. Businco, L. and A. Cantani, *Food allergy in children: diagnosis and treatment with sodium cromoglycate*. Allergol Immunopathol (Madr), 1990. **18**(6): p. 339-48.
103. Heib, V., et al., *Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice*. Blood, 2007. **110**(3): p. 946-53.
104. Nocka, K., et al., *Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W*. EMBO J, 1990. **9**(6): p. 1805-13.
105. Lim, K.H., A. Pardanani, and A. Tefferi, *KIT and mastocytosis*. Acta Haematol, 2008. **119**(4): p. 194-8.
106. Nagle, D.L., et al., *Physical mapping of the Tec and Gabrb1 loci reveals that the Wsh mutation on mouse chromosome 5 is associated with an inversion*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(11): p. 2073-9.
107. Hayashi, S., et al., *Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(6): p. 1267-71.
108. Edling, C.E. and B. Hallberg, *c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(11): p. 1995-8.
109. Kitamura, Y., K. Oboki, and A. Ito, *Development of mast cells*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2007. **83**(6): p. 164-74.
110. Galli, S.J., et al., *Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **107**(1-3): p. 51-3.
111. Piliponsky, A.M., et al., *Mast cell-derived TNF can exacerbate mortality during severe bacterial infections in C57BL/6-KitW-sh/W-sh mice*. Am J Pathol, 2010. **176**(2): p. 926-38.
112. Zhou, J.S., et al., *Mast cell deficiency in Kit(W-sh) mice does not impair antibody-mediated arthritis*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2797-802.
113. Chervenick, P.A. and D.R. Boggs, *Decreased neutrophils and megakaryocytes in anemic mice of genotype W/W*. J Cell Physiol, 1969. **73**(1): p. 25-30.
114. Grimbaldeston, M.A., et al., *Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo*. Am J Pathol, 2005. **167**(3): p. 835-48.
115. Waskow, C., et al., *Rescue of lethal c-KitW/W mice by erythropoietin*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1688-95.
116. Waskow, C. and H.R. Rodewald, *Lymphocyte development in neonatal and adult c-Kit-deficient (c-KitW/W) mice*. Adv Exp Med Biol, 2002. **512**: p. 1-10.

117. Puddington, L., S. Olson, and L. Lefrancois, *Interactions between stem cell factor and c-Kit are required for intestinal immune system homeostasis*. *Immunity*, 1994. **1**(9): p. 733-9.
118. Dudeck, A., et al., *Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens*. *Immunity*, 2011. **34**(6): p. 973-84.
119. Gutierrez, D.A., et al., *Hematopoietic Kit Deficiency, rather than Lack of Mast Cells, Protects Mice from Obesity and Insulin Resistance*. *Cell Metab*, 2015. **21**(5): p. 678-91.
120. Gomez-Pinilla, P.J., et al., *Mast cells play no role in the pathogenesis of postoperative ileus induced by intestinal manipulation*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e85304.
121. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. *Cell*, 1992. **68**(5): p. 869-77.
122. Katzwinkel-Wladarsch, S., T. Loscher, and H. Rinder, *Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica DNA from stool specimens*. *Am J Trop Med Hyg*, 1994. **51**(1): p. 115-8.
123. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
124. Dawkins, H.J., et al., *Strongyloides ratti: susceptibility to infection and resistance to reinfection in inbred strains of mice as assessed by excretion of larvae*. *Int J Parasitol*, 1980. **10**(2): p. 125-9.
125. Dawkins, H.J., G.F. Mitchell, and D.I. Grove, *Strongyloides ratti infections in congenitally hypothyroid (nude) mice*. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1982. **60**(Pt 2): p. 181-6.
126. Hepworth, M.R., et al., *Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(17): p. 6644-9.
127. Ruitenbergh, E.J. and A. Elgersma, *Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during Trichinella spiralis infection*. *Nature*, 1976. **264**(5583): p. 258-60.
128. Gurish, M.F. and K.F. Austen, *Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets*. *Immunity*, 2012. **37**(1): p. 25-33.
129. Ben Nouir, N., et al., *Passive immunization with a monoclonal IgM antibody specific for Strongyloides ratti HSP60 protects mice against challenge infection*. *Vaccine*, 2012. **30**(33): p. 4971-6.
130. Hultner, L., et al., *Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9)*. *Eur J Immunol*, 1990. **20**(6): p. 1413-6.
131. Blankenhaus, B., et al., *Strongyloides ratti infection induces expansion of Foxp3+ regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice*. *J Immunol*, 2011. **186**(7): p. 4295-305.
132. Abe, T., H. Sugaya, and K. Yoshimura, *Different susceptibility to the IL-3 induced-protective effects between Strongyloides ratti and Nippostrongylus brasiliensis in C57BL/6 mice*. *Parasite Immunol*, 1993. **15**(11): p. 643-5.
133. Ryan, J.J., et al., *Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease*. *Crit Rev Immunol*, 2007. **27**(1): p. 15-32.
134. Nawa, Y., et al., *Defective protective capacity of W/Wv mice against Strongyloides ratti infection and its reconstitution with bone marrow cells*. *Parasite Immunol*, 1985. **7**(4): p. 429-38.
135. Wahid, F.N., et al., *Immunological relationships during primary infection with Heligmosomoides polygyrus: Th2 cytokines and primary response phenotype*. *Parasitology*, 1994. **108** (Pt 4): p. 461-71.
136. Behnke, J.M., et al., *Immunological relationships during primary infection with Heligmosomoides polygyrus (Nematospiroides dubius): downregulation of specific cytokine secretion (IL-9 and IL-10) correlates with poor mastocytosis and chronic survival of adult worms*. *Parasite Immunol*, 1993. **15**(7): p. 415-21.

137. Issekutz, T.B., et al., *Blockade of either alpha-4 or beta-7 integrins selectively inhibits intestinal mast cell hyperplasia and worm expulsion in response to Nippostrongylus brasiliensis infection*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 860-8.
138. Hashimoto, K., et al., *Immunity-mediated regulation of fecundity in the nematode Heligmosomoides polygyrus--the potential role of mast cells*. Parasitology, 2010. **137**(5): p. 881-7.
139. Crowle, P.K. and N.D. Reed, *Rejection of the intestinal parasite Nippostrongylus brasiliensis by mast cell-deficient W/W^v anemic mice*. Infect Immun, 1981. **33**(1): p. 54-8.
140. Turner, J.E., B. Stockinger, and H. Helmbj, *IL-22 mediates goblet cell hyperplasia and worm expulsion in intestinal helminth infection*. PLoS Pathog, 2013. **9**(10): p. e1003698.
141. Alizadeh, H. and K.D. Murrell, *The intestinal mast cell response to Trichinella spiralis infection in mast cell-deficient w/w^v mice*. J Parasitol, 1984. **70**(5): p. 767-73.
142. Knight, P.A., et al., *Delayed expulsion of the nematode Trichinella spiralis in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1849-56.
143. Oku, Y., H. Itayama, and M. Kamiya, *Expulsion of Trichinella spiralis from the intestine of W/W^v mice reconstituted with haematopoietic and lymphopoietic cells and origin of mucosal mast cells*. Immunology, 1984. **53**(2): p. 337-44.
144. Betts, C.J. and K.J. Else, *Mast cells, eosinophils and antibody-mediated cellular cytotoxicity are not critical in resistance to Trichuris muris*. Parasite Immunol, 1999. **21**(1): p. 45-52.
145. Watanabe, K., et al., *Strongyloides ratti: the role of interleukin-5 in protection against tissue migrating larvae and intestinal adult worms*. J Helminthol, 2003. **77**(4): p. 355-61.
146. Fukao, T., et al., *Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 295-304.
147. Lantz, C.S., et al., *IL-3 is required for increases in blood basophils in nematode infection in mice and can enhance IgE-dependent IL-4 production by basophils in vitro*. Lab Invest, 2008. **88**(11): p. 1134-42.
148. Khan, A.I., et al., *Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against Strongyloides venezuelensis*. International journal for parasitology, 1993. **23**(5): p. 551-5.
149. Boyce, J.A., *Mast cells: beyond IgE*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(1): p. 24-32; quiz 33.
150. Sandig, H. and S. Bulfone-Paus, *TLR signaling in mast cells: common and unique features*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 185.
151. Kawakami, T. and S.J. Galli, *Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 773-86.
152. Sakata-Yanagimoto, M., et al., *Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine*. Blood, 2011. **117**(1): p. 128-34.
153. Breloer, M., et al., *Cutting Edge: the BTLA-HVEM regulatory pathway interferes with protective immunity to intestinal Helminth infection*. J Immunol, 2015. **194**(4): p. 1413-6.
154. Nakae, S., et al., *Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 48-55.
155. Nakae, S., et al., *Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3640-8.
156. McLachlan, J.B., et al., *Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1199-205.
157. Jawdat, D.M., et al., *IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 5275-82.
158. Biedermann, T., et al., *Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1441-52.
159. Malaviya, R. and S.N. Abraham, *Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(6): p. 841-6.

160. Wong, G.W., et al., *Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (TMT)/tryptase gamma. TMT is an exocytosed mast cell protease that induces airway hyperresponsiveness in vivo via an interleukin-13/interleukin-4 receptor alpha/signal transducer and activator of transcription (STAT) 6-dependent pathway.* J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41906-15.
161. Yasuda, K., et al., *Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3451-6.
162. Allen, J.E. and R.M. Maizels, *Diversity and dialogue in immunity to helminths.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(6): p. 375-88.
163. Paul, C., et al., *Mast cells have no impact on cutaneous leishmaniasis severity and related Th2 differentiation in resistant and susceptible mice.* Eur J Immunol, 2015.
164. Lawrence, C.E., et al., *Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse.* Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 155-65.
165. Onah, D.N. and Y. Nawa, *Mucosal mast cell-derived chondroitin sulphate levels in and worm expulsion from FcRgamma-knockout mice following oral challenge with Strongyloides venezuelensis.* J Vet Sci, 2004. **5**(3): p. 221-6.
166. Onah, D.N., et al., *Mucosal defense against gastrointestinal nematodes: responses of mucosal mast cells and mouse mast cell protease 1 during primary strongyloides venezuelensis infection in FcRgamma-knockout mice.* Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 4968-71.
167. Enerback, L., et al., *Glycosaminoglycans in rat mucosal mast cells.* Biochem J, 1985. **227**(2): p. 661-8.
168. Stevens, R.L., et al., *Intestinal mucosal mast cells from rats infected with Nippostrongylus brasiliensis contain protease-resistant chondroitin sulfate di-B proteoglycans.* J Immunol, 1986. **137**(1): p. 291-5.
169. Ishikawa, N., et al., *Reserpine-induced sulphomucin production by goblet cells in the jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminths.* Parasite Immunol, 1995. **17**(11): p. 581-6.
170. Shi, B.B., et al., *Goblet cell mucins of four genera of the subfamily Cricetinae with reference to the protective activity against Strongyloides venezuelensis.* Parasite Immunol, 1994. **16**(10): p. 553-9.
171. Razin, E., et al., *Culture from mouse bone marrow of a subclass of mast cells possessing a distinct chondroitin sulfate proteoglycan with glycosaminoglycans rich in N-acetylgalactosamine-4,6-disulfate.* J Biol Chem, 1982. **257**(12): p. 7229-36.
172. Stevens, R.L., K. Otsu, and K.F. Austen, *Purification and analysis of the core protein of the protease-resistant intracellular chondroitin sulfate E proteoglycan from the interleukin 3-dependent mouse mast cell.* J Biol Chem, 1985. **260**(26): p. 14194-200.
173. Maruyama, H., et al., *A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, Strongyloides venezuelensis.* J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3749-54.
174. Nakamura-Uchiyama, F., et al., *Natural resistance of 129/SvJ mice to Strongyloides venezuelensis infection.* Parasite Immunol, 2001. **23**(12): p. 659-63.
175. Gardner, M.P., D. Gems, and M.E. Viney, *Extraordinary plasticity in aging in Strongyloides ratti implies a gene-regulatory mechanism of lifespan evolution.* Aging Cell, 2006. **5**(4): p. 315-23.
176. El-Malky, M.A., et al., *The role of B-cells in immunity against adult Strongyloides venezuelensis.* Parasit Vectors, 2013. **6**: p. 148.
177. Schulman, E.S., et al., *Differential effects of the complement peptides, C5a and C5a des Arg on human basophil and lung mast cell histamine release.* J Clin Invest, 1988. **81**(3): p. 918-23.
178. Sabatino, G., et al., *Impact of IL -9 and IL-33 in mast cells.* J Biol Regul Homeost Agents, 2012. **26**(4): p. 577-86.
179. Schwartz-Albiez, R., et al., *Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation.* Clin Exp Immunol, 2009. **158 Suppl 1**: p. 43-50.

180. Takai, T., et al., *FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects*. Cell, 1994. **76**(3): p. 519-29.
181. Hultner, L., et al., *Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth-enhancing activity different from both IL-3 and IL-4*. J Immunol, 1989. **142**(10): p. 3440-6.
182. Druetz, C., et al., *Functional and biochemical characterization of mouse P40/IL-9 receptors*. J Immunol, 1990. **145**(8): p. 2494-9.
183. Renauld, J.C., et al., *Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(3): p. 353-60.
184. Madden, K.B., et al., *Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis*. J Immunol, 1991. **147**(4): p. 1387-91.
185. Hultner, L. and J. Moeller, *Mast cell growth-enhancing activity (MEA) stimulates interleukin 6 production in a mouse bone marrow-derived mast cell line and a malignant subline*. Exp Hematol, 1990. **18**(8): p. 873-7.
186. Eklund, K.K., et al., *Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases*. J Immunol, 1993. **151**(8): p. 4266-73.
187. Else, K.J., L. Hultner, and R.K. Grencis, *Cellular immune responses to the murine nematode parasite Trichuris muris. II. Differential induction of TH-cell subsets in resistant versus susceptible mice*. Immunology, 1992. **75**(2): p. 232-7.
188. Faulkner, H., et al., *Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode Trichuris muris*. Infect Immun, 1998. **66**(8): p. 3832-40.
189. Faulkner, H., et al., *Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection*. Eur J Immunol, 1997. **27**(10): p. 2536-40.
190. Townsend, J.M., et al., *IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 573-83.
191. Licona-Limon, P., et al., *Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection*. Immunity, 2013. **39**(4): p. 744-57.
192. Mizumoto, S., S. Yamada, and K. Sugahara, *Human genetic disorders and knockout mice deficient in glycosaminoglycan*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 495764.
193. Ameye, L. and M.F. Young, *Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases*. Glycobiology, 2002. **12**(9): p. 107R-16R.
194. Shea-Donohue, T., et al., *The role of IL-4 in Heligmosomoides polygyrus-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2234-9.
195. Mohajer, B. and T.Y. Ma, *Eicosanoids and the small intestine*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **61**(3-4): p. 125-43.
196. Vallance, B.A., P.A. Blennerhassett, and S.M. Collins, *Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice*. Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 1): p. G321-7.
197. Khan, W.I., et al., *Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections*. Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2430-8.
198. Engel, D.R., et al., *T helper type 1 memory cells disseminate postoperative ileus over the entire intestinal tract*. Nat Med, 2010. **16**(12): p. 1407-13.
199. Schmitt, E., M. Klein, and T. Bopp, *Th9 cells, new players in adaptive immunity*. Trends Immunol, 2014. **35**(2): p. 61-8.