

# Identifizierung und Charakterisierung sekretierter Proteine von *Trichuris suis* Larven

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katja Balster  
aus Perleberg

Berlin, 2018



Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2013 bis März 2018 unter Leitung von Prof. Dr. Susanne Hartmann am Institut für Immunologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Susanne Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Jens Rolff

Disputation am: 2018/09/18





## Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Susanne Hartmann für das spannende Thema meiner Doktorarbeit, die Unterstützung während der einzelnen Etappen und den vielen Möglichkeiten auf Konferenzen meine Ergebnisse zu präsentieren.

Ein besonderer Dank geht an Friederike, die mich als "mein Post-Doc" während der gesamten Zeit unterstützt, gefordert und gefördert hat. Ihr offenes Ohr für die Hindernisse und Fehlversuche im Laboralltag, die vielen Diskussionen über die Ergebnisse und gemeinsamen Erfolge haben mir viel Freude bereitet. Ich danke ihr auch für das Lesen und Kommentieren meiner Arbeit.

Ebenfalls möchte ich den anderen Post-Docs und allen Doktoranden für die gemeinsamen Freitags-Meetings danken. Dort haben wir gemeinsam über verschiedene Projekte diskutiert, philosophiert und neue Erkenntnisse gewonnen.

Außerdem hat es mich immer sehr gefreut, wenn wir Doktoranden zu den Mittagspausen in der Mensa auch über andere Themen des (Labor-)Alltags gesprochen haben. Dabei möchte ich Christin und Gopinath besonders erwähnen, die mit mir gemeinsam das aufregende Projekt Promotion gestartet haben.

Des Weiteren möchte ich allen technischen Assistentinnen Danken, die mich nicht nur während der Sektionstage unterstützt haben, sondern auch sonst mir mit Rat und Tat für jegliche Laborfragen zur Verfügung standen.

Dabei möchte ich Marion zusätzlich für die lustigen und ernsthaften Gespräche danken, die den ein oder anderen "Aha"-Effekt für uns beide hervorgebracht haben. Außerdem hat es viel Spaß gemacht gemeinsam verschiedene Praktikanten zu betreuen und ihnen LEXYs zu präsentieren. Ich weiß, dass du dich zukünftig gut um "unsere Babys" kümmern wirst.

Yvonne möchte ich außerdem dafür danken, dass sie mit mir x-fache ELISA-Platten bearbeitet hat und nicht weggelaufen ist, wenn ich neue gemeinsame ELISA-Tage vorgeschlagen habe.

Ein großer Dank geht auch an unsere Kooperationspartner, ohne die ich meine Arbeit sonst nicht hätte durchführen können. Ich danke daher Arndt Heuser und Stefanie Schelenz der Pathophysiologie-Plattform vom MDC Berlin Buch für die gemeinsamen Arbeiten am Doppelkammer-Plethysmographen. Außerdem danke ich Manfred Weiss und Piotr Malecki vom Helmholtz-Zentrum Berlin (Arbeitsgruppe Makromolekulare Kristallografie), die gemeinsam mit mir das wahre Aussehen (also die Struktur) von TsES1 entschlüsselt haben.

Des weiteren bedanke ich mich beim GRK1673, bei dem ich als assoziierte Promotionsstudien-

tin Kurse der Dahlem-Research-School besuchen konnte und das es mir ermöglicht hat, den indischen Forschungsalltag kennenzulernen.

Außerdem danke ich der FAZIT-Stiftung, die mich in meinem letzten Jahr der Promotion finanziell unterstützt hat.

Ich danke herzlich meiner Familie für ihre Unterstützung und dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat. Es mag ihnen nicht immer leicht gefallen sein meinen Forschungen zu folgen, aber ich habe mich über die regelmäßigen Nachfragen (“Wie geht es denn so deinen Würmern?”) sehr gefreut.

Ich danke besonders meinen Freunden für die vielseitigen Ablenkungen, die mir die Energie gegeben haben, meine Forschungen erfolgreich durchführen zu können. Ein großer Dank geht dabei an Thomas, der mich mit seinen kritischen Fragen herausgefordert hat, mich um Miternacht aus Düppel mit dem Auto abholt und mir den Rücken freigehalten hat, wenn es mal stressig wurde.

# Inhalt

<b>Abstract</b>	<b>i</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>iii</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Immunreaktion und Immunmodulation in Helmintheninfektionen . . . . .	1
1.1.1. Immunreaktion in Helmintheninfektionen . . . . .	1
1.1.2. Immunmodulation in Helmintheninfektionen . . . . .	5
1.2. Der Schweinepeitschenwurm - <i>Trichuris suis</i> . . . . .	12
1.2.1. Auftreten und Infektion . . . . .	12
1.2.2. <i>Trichuris suis</i> Therapie in klinischen Studien . . . . .	13
1.2.3. <i>Trichuris suis</i> in Krankheitsmodellen . . . . .	16
1.3. Ziele der Arbeit . . . . .	18
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1. Tiermodelle . . . . .	19
2.1.1. Verwendete Mausstämme . . . . .	19
2.1.2. Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung . . . . .	19
2.1.3. Generierung proteinspezifischer Antikörper in der Maus . . . . .	23
2.1.4. Statistische Analysen . . . . .	23
2.2. Immunologische Methoden . . . . .	23
2.2.1. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> - ELISA . . . . .	23
2.2.2. Durchflusszytometrie (FACS) . . . . .	25
2.3. Methoden der Zellkultur . . . . .	25
2.3.1. Isolation von Zellen aus dem Knochenmark . . . . .	25
2.3.2. Generierung von murinen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark	26
2.3.3. Stimulation dendritischer Zellen . . . . .	26
2.3.4. Generierung von murinen Makrophagen aus dem Knochenmark . . . . .	27
2.3.5. Differenzierung von murinen AAMs aus dem Knochenmark . . . . .	27
2.3.6. Isolation von Immunzellen aus peripheren lymphatischen Organen . . . . .	27
2.3.7. Analyse der antigenabhängigen und -unabhängigen T-Zell-Proliferation	28
2.3.8. Analyse regulatorischer B-Zellen . . . . .	29
2.3.9. Analyse der durch Serumangel induzierten Apoptose . . . . .	29

2.4.	Molekularbiologische Methoden . . . . .	30
2.4.1.	Extraktion von total RNA aus Lungengewebe . . . . .	30
2.4.2.	Genspezifische Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) . . . . .	30
2.4.3.	Gewinnung und Kultivierung von <i>Trichuris suis</i> Larven . . . . .	31
2.4.4.	Proteinfällung zur Analyse per Massenspektrometrie . . . . .	32
2.4.5.	Extraktion von total RNA aus <i>Trichuris suis</i> Würmern und Larven . . . . .	32
2.4.6.	cDNA-Synthese aus mRNA von <i>Trichuris suis</i> . . . . .	33
2.4.7.	Genspezifische Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	33
2.4.8.	DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel . . . . .	35
2.4.9.	Ligation von PCR-Produkt und Plasmid mit anschließender Transformation . . . . .	35
2.4.10.	Kolonie-PCR von <i>Escherichia coli</i> Zellen . . . . .	36
2.4.11.	Plasmidisolierung aus einer <i>Escherichia coli</i> Flüssigkultur . . . . .	36
2.4.12.	Sequenzierung von Plasmiden . . . . .	36
2.4.13.	Spezifischer Restriktionsenzymverdau von Plasmiden . . . . .	37
2.4.14.	Ligation der spezifischen Gensequenz mit dem Plasmid pLEXSY-sat2 und Transformation . . . . .	37
2.4.15.	Gewinnung einer Expressionskassette . . . . .	37
2.4.16.	Kultivierung von <i>Leishmania tarentolae</i> . . . . .	38
2.4.17.	Transfektion von <i>Leishmania tarentolae</i> . . . . .	38
2.4.18.	Polyklonale und monoklonale Selektion transfizierter <i>Leishmania tarentolae</i> Kulturen . . . . .	39
2.4.19.	Herstellung von Glycerol-Stocks von <i>Leishmania tarentolae</i> Kulturen . . . . .	39
2.4.20.	DNA-Isolierung aus <i>Leishmania tarentolae</i> Kulturen . . . . .	39
2.4.21.	PCR der <i>Leishmania tarentolae</i> DNA mit spezifischen Primern . . . . .	40
2.5.	Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine . . . . .	40
2.5.1.	Proteinreinigung über eine Handsäule . . . . .	40
2.5.2.	Proteinherstellung über Großkulturen . . . . .	41
2.5.3.	Proteinreinigung über Flüssigchromatografie . . . . .	41
2.5.4.	Dialyse der Proteinlösung . . . . .	42
2.6.	Biochemische Methoden . . . . .	42
2.6.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	42
2.6.2.	Semi-dry Western Blot . . . . .	43

2.6.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration über den Bicinchoninsäure (BCA)- Test . . . . .	45
2.6.4.	Bestimmung der LPS-Konzentration über ein <i>Limulus Amebocyte</i> Lysat	45
2.6.5.	Hitze-Inaktivierung von Proteinen . . . . .	45
2.6.6.	Chitinase-Aktivitätstest . . . . .	45
2.6.7.	Proteinkristallographie . . . . .	46
2.7.	Materialien . . . . .	48
2.7.1.	Geräte . . . . .	48
2.7.2.	Chemikalien . . . . .	48
2.7.3.	Medien, Puffer und Lösungen . . . . .	50
2.7.4.	Antibiotika . . . . .	50
2.7.5.	Reaktionskits . . . . .	51
2.7.6.	Verwendete Organismen zur Proteinexpression . . . . .	52
2.7.7.	Primer . . . . .	52
2.7.8.	Plasmide . . . . .	53
2.7.9.	Enzyme . . . . .	53
2.7.10.	Antikörper . . . . .	53
2.7.11.	Datenbanken und Software . . . . .	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1.	Identifizierung sekretierter Proteine von <i>Trichuris suis</i> L1 Larven . . . . .	57
3.2.	Rekombinante Herstellung larvaler <i>Trichuris suis</i> Proteine mit dem Leishma- nien Expressionssystem . . . . .	58
3.2.1.	Auswahl der Proteine . . . . .	58
3.2.2.	Klonierung . . . . .	60
3.2.3.	Proteinexpression . . . . .	61
3.3.	Analysen zur Immunmodulation durch rekombinante <i>Trichuris suis</i> L1 ES Pro- teine . . . . .	63
3.3.1.	<i>In vitro</i> Analysen rekombinanter larvaler <i>Trichuris suis</i> L1 ES Proteine	63
3.3.2.	Präventive Applikation rekombinanter <i>Trichuris suis</i> L1 Proteine im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung . . . . .	70
3.4.	Das <i>Trichuris suis</i> L1 ES Protein TsES1 . . . . .	72
3.4.1.	TsES1 besitzt Homologien zu Chitinasen . . . . .	72
3.4.2.	TsES1 ist als Chitinase aktiv . . . . .	74
3.4.3.	Proteinstruktur von TsES1 . . . . .	76

3.5. Analysen der modulierten Immunantwort durch TsES1 im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung . . . . .	80
3.5.1. TsES1 reduziert die Infiltration von Immunzellen in die Lunge . . . . .	80
3.5.2. TsES1 reduziert die spezifischen Atemwegsresistenz der Lunge . . . . .	84
3.5.3. TsES1 induziert Relm $\alpha^+$ Leukozyten im Lungengewebe . . . . .	86
3.6. Analysen zum immunmodulatorischen Mechanismus von TsES1 . . . . .	89
3.6.1. Hypothese: TsES1 steigert die Expression muriner Chitinasen . . . . .	90
3.6.2. Hypothese: TsES1 mindert Apoptose . . . . .	92
3.6.3. Hypothese: TsES1 führt zur Vermehrung Relm $\alpha^+$ AAM . . . . .	93
3.6.4. Hypothese: TsES1 induziert kreuzreaktive Antikörper . . . . .	96
3.6.5. Hypothese: TsES1 induziert regulatorische B-Zellen . . . . .	98
<b>4. Diskussion</b>	<b>103</b>
4.1. Identifizierung und rekombinante Herstellung sekretierter Moleküle von <i>Trichuris suis</i> Larven . . . . .	103
4.2. <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Funktionsstudien rekombinanter <i>Trichuris suis</i> Proteine .	107
4.3. TsES1 ist eine enzymatisch aktive Chitinase, die Dimere bildet . . . . .	110
4.4. Immunmodulation des Wirtes durch die <i>Trichuris suis</i> Chitinase TsES1 . . .	113
<b>5. Ausblick</b>	<b>121</b>
<b>A. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>B. Anhang</b>	<b>127</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>

---

## Abstract

### Identification and characterization of excretory/secretory proteins from *Trichuris suis* larvae

At the end of the 20th century the hygiene hypothesis evolved, this suggested that the decrease of parasitic and bacterial infections in industrial countries increases the risk of developing allergies and autoimmune diseases. Meanwhile, the Th2 dominated immune responses elicited by helminth parasites have been investigated and their modulation by effector molecules was described. Proteins and other molecules of helminths are responsible for an altered immune reaction, that can concurrently suppress unrelated inflammation. Based on their immunomodulatory traits and the hygiene hypothesis, helminths like the whipworm *Trichuris suis* (*T. suis*) were considered as a treatment option for allergies and autoimmune diseases. Initial clinical trials demonstrated that patients suffering from Ulcerative colitis and Crohn's disease experienced reduced disease symptoms after *T. suis ova* (TSO) therapy. However, in some studies TSO treatment had no adverse effects, but achieved also no clinically relevant improvements. Therefore, further investigation of TSO therapy in relevant disease models is of great importance.

Our group has previously shown that *excretory/secretory* (ES) products of *T. suis* larvae are potent immunomodulators in an allergic airway hyperreactivity model. Furthermore, *T. suis* ES demonstrated beneficial immunomodulation in both gut inflammation and multiple sclerosis disease models.

Hence, the aim of this work was to identify ES proteins of *T. suis* larvae, that might interfere with unrelated immune responses. After recombinant expression of single proteins, possible immunoregulatory mechanisms should be discovered.

For that purpose, ten potential immunoregulators in the *T. suis* larval L1 ES were selected. Out of those, six proteins were recombinantly expressed and tested *in vitro* as well as *in vivo*. *In vitro* assays exhibit that LPS induced cytokine secretion of dendritic cells (DCs) was reduced by the treatment with recombinant TsES proteins, although the expression of DC surface markers were not regulated.

---

One of the six recombinantly expressed proteins lowered the allergic airway lung inflammation *in vivo*. It not only decreased lung eosinophilia and airway resistance, but also led to increased levels of interstitial Relm $\alpha$ <sup>+</sup> lung macrophages. Furthermore it was possible to show that this protein (TsES1) is a functional active chitinase with a typical chitinase structure. As chitinases and chitinase-like proteins (CLPs) are also produced in mice, the observed immunoregulation after the treatment with a helminth chitinase was astonishing. Mechanistic investigations revealed that TsES1 treatment induces cross reactive antibodies and regulatory B cells, that might act as regulatory factors.

These results contribute to the research of TSO therapy, as new regulatory pathways were presented. Although TsES1 might not be a good candidate, single immunomodulatory proteins could act as a replacement to live helminth infection as a treatment for allergies and autoimmune diseases.



---

## Zusammenfassung

Zum Ende des 20. Jahrhunderts wurde die Hygiene-Hypothese formuliert, die besagt, dass in den Industrieländern der Rückgang parasitärer und bakterieller Erkrankungen das Risiko erhöht Allergien oder Autoimmunerkrankungen zu entwickeln. In der Zwischenzeit wurde die Th2-dominierte Immunantwort gegen parasitäre Helminthen erforscht und deren Modulation durch Effektormoleküle aufgeklärt. Proteine und andere Moleküle der Helminthen sind verantwortlich für eine veränderten Immunreaktion, die gleichzeitig unabhängige Entzündungen reduzieren können.

Basierend auf den immunmodulatorischen Eigenschaften und der Hygiene-Hypothese wurde überlegt, Helminthen, wie den Schweinepeitschenwurm *Trichuris suis* (*T. suis*), zur Behandlung von Allergien und Autoimmunerkrankungen einzusetzen.

In initialen klinischen Studien wurden verringerte Krankheitssymptome nach der *T. suis ova* (TSO) Therapie für Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn nachgewiesen. Jedoch zeigten einige Studien, dass die TSO Behandlung zwar keine schädlichen Nebenwirkungen für Patienten hat, aber auch keine klinisch relevanten Verbesserungen bringt. Daher wird die Erforschung der TSO-Therapie in relevanten Krankheitsmodellen immer wichtiger.

Unsere Arbeitsgruppe hat im Vorfeld gezeigt, dass sekretorische (*excretory/ secretory* ES) Produkte von *T. suis* Larven potente Immunmodulatoren in einem Modell der allergischen Atemwegserkrankung sind. Des Weiteren wurde auch in Krankheitsmodellen für entzündliche Darmerkrankungen und Multiple Sklerose eine positive Immunmodulation durch *T. suis* ES nachgewiesen.

Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, ES Proteine von *T. suis* Larven zu identifizieren, die möglicherweise unabhängige Immunantworten beeinflussen. Nach der rekombinanten Herstellung einzelner Proteine, sollten mögliche immunregulatorische Mechanismen aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck wurden zehn potentielle Immunregulatoren im ES von *T. suis* L1 Larven ausgewählt. Von diesen wurden sechs Proteine rekombinant exprimiert und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* getestet. *In vitro* Assays haben gezeigt, dass die LPS-induzierte Zytokinsekretion dendritischer Zellen (DCs) durch die Behandlung mit den rekombinanten Proteinen reduziert wird, wobei die Expression der DC-Oberflächenmarker nicht reguliert wurden.

---

Von den 6 rekombinant exprimierten Proteinen milderte eines *in vivo* die allergische Atemwegserkrankung. Es wurde nicht nur die Eosinophilie in der Lunge und die Atemwegsresistenz reduziert, sondern auch die Anzahl an interstitiellen  $\text{Relm}\alpha^+$  Lungenmakrophagen vermehrt. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass dieses Protein (TsES1) eine funktionell aktive Chitinase ist, die eine für Chitinasen typischen Struktur besitzt. Da auch Mäuse Chitinasen und Chitinase-like Proteine (CLPs) produzieren, überraschten die Beobachtungen der Immunregulation durch die Behandlung mit einer Helminthenchitinase. Untersuchungen zum Mechanismus haben ergeben, dass die TsES1-Behandlung kreuzreaktive Antikörper und regulatorische B-Zellen induziert und diese möglicherweise als regulatorische Faktoren wirken. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen neue Regulationswege auf, die einen Beitrag zur Erforschung der TSO-Therapie leisten. Obwohl TsES1 vermutlich kein guter Kandidat ist, können möglicherweise einzelne immunmodulatorische Proteine zukünftig eine Infektion mit lebenden Helminthen als Therapie von Allergien und Autoimmunerkrankungen ersetzen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Immunreaktion und Immunmodulation in Helmintheninfektionen

Helminthen sind endoparasitäre Würmer, die hauptsächlich den Darm ihrer Wirtsorganismen infizieren und zu chronischen Infektionen führen können [Mehlhorn, 2012]. Weltweit sind derzeit über 1 Million Menschen mit Helminthen infiziert, wobei in tropischen und subtropischen Regionen die Prävalenz größer ist als in anderen Teilen der Erde [Jourdan et al., 2017]. Dabei zählen die Helminthen *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*), *Trichuris trichiura* (*T. trichiura*) und *Necator americanus* (*N. americanus*) zu den durch kontaminierte Böden übertragene Nematoden, die die meisten Helmintheninfektionen beim Menschen verursachen [Jourdan et al., 2017]. Stark belastende Symptome treten bei Helmintheninfektionen mit einer hohen Wurmzahl auf, wobei es zu abdominalen Schmerzen, Nährstoffverlust wie z.B. Eisenmangel und Durchfall kommen kann [Hall et al., 2008]. Die Mehrzahl der Helmintheninfektionen des Menschen lassen sich durch Hygienemaßnahmen verhindern. Obwohl viele Infektionen mit Medikamenten behandelbar sind, können das Auftreten von Resistenzen sowie ineffiziente Behandlungen Reinfektionen begünstigen [Jia et al., 2012, Levecke et al., 2014] .

Neben dem Menschen sind alle freilebenden und in Haltung lebenden Säugetiere wie zum Beispiel Schweine, Rinder oder Schafe von Wurminfektionen betroffen [Roepstorff et al., 2011, Charlier et al., 2014, Morgan and van Dijk, 2012]. Bei der Nutztierhaltung können schwere Wurminfektionen zu wirtschaftlichen Einbußen führen, weshalb die Gesundheit der Tiere durch Impfungen, Behandlung mit Anthelminthika oder bestimmten Haltungsbedingungen kontrolliert wird [Stear et al., 2007, Charlier et al., 2014].

### 1.1.1. Immunreaktion in Helmintheninfektionen

Die Infektionswege der Helminthen sind sehr vielfältig. So wandern *N. americanus* Larven über die Haut in die Lunge, werden abgehustet und gelangen nach dem Verschlucken in den Darm des Menschen [Mehlhorn, 2012]. Andere Helminthen, wie *T. trichiura*, haben evolutionär einen direkten Infektionsweg entwickelt, um über die orale Aufnahme von embryonierten Eiern den Darm des Wirtes zu besiedeln [Mehlhorn, 2012]. Neben dem Darm können weitere Organe wie Lunge, Leber oder das zentrale Nervensystem von Helminthen infiziert werden [Lucius and Loos-Frank, 2007].

Allen Helmintheninfektionen gemeinsam ist eine gegen sie gerichtete Th2-dominierte Immunantwort des Wirtes, die durch andere Mechanismen gekennzeichnet ist als die Th1-Immunreaktion gegen Bakterien und Viren [Grencis et al., 2014, Allen and Sutherland, 2014]. Wichtige Erkenntnisse zur Abwehr von Helminthen wurden über Tiermodelle gewonnen, die dann zu einem besseren Verständnis der Th2-Immunreaktion im Menschen geführt haben.

Im Zuge der Invasion und Migration der Würmer treten Verletzungen der Lungen- und Darmschleimhaut auf, die zur Freisetzung sogenannter Alarmine aus Epithelzellen führen [Oppenheim and Yang, 2005]. Zu diesen Alarminen zählen das Chemokin *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) und die Zytokine IL-25 und IL-33, die zur Rekrutierung und Aktivierung dendritischer Zellen (DCs), *type 2 innate lymphoid cells* (ILC2s), eosinophiler und basophiler Granulozyten und Mastzellen führen [Fallon et al., 2006, Humphreys and Xu, 2008, Hephworth et al., 2012]. Wie wichtig diese Alarmine für die Abwehr sind, konnte unter anderem in *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) infizierten IL-25/IL-33 defizienten Mäusen nachgewiesen werden, die die Würmer deutlich schlechter austreiben konnten als Wildtypmäuse [Fallon et al., 2006, Hung et al., 2013].

Aktivierte DCs präsentieren Helminthenantigene über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex* MHC)-II an die T-Zellrezeptoren der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Zusammen mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 der DCs wird die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen vervollständigt [Murphy et al., 2009]. Für die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th2-Zellen sind außerdem weitere kostimulatorische Moleküle, wie Ox40L auf der Zelloberfläche von DCs und das Zytokin IL-4 notwendig [Jenkins et al., 2007]. Dabei wird IL-4 hauptsächlich von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten bereitgestellt [Kaiko et al., 2008].

Differenzierte CD4<sup>+</sup> Th2-Zellen sekretieren die für eine Th2-Immunantwort typischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 und aktivieren dadurch eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen und alternativ aktivierte Makrophagen (*alternative activated macrophage* - AAMs) [Allen and Maizels, 2011, Allen and Sutherland, 2014]. Dies wurde in einem Infektionsmodell der Maus nachgewiesen, bei dem ohne CD4<sup>+</sup> T-Zellen kein Schutz gegenüber einer *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) Infektion besteht [Vignali et al., 1989]. Des Weiteren führte der Transfer von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *N. brasiliensis* infizierten Mäusen in Empfänger-mäuse, die keine eigenen T-Zellen haben, zu einer effektiven Immunantwort gegen *N. brasiliensis* [Mohrs et al., 2001].

Neben den CD4<sup>+</sup> Th2-Zellen wird den ILC2 eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen Helminthen zugeschrieben [Huang and Paul, 2016]. Durch die Sekretion von IL-5 und IL-13

führen sie zur Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten, CD4<sup>+</sup> Th2-Zellen und Mastzellen, sodass ohne ILC2 eine geringere Austreibung von *N. brasiliensis* Würmern festgestellt wurde [Fallon et al., 2006, Neill et al., 2010].

Ebenso sind eosinophile und basophile Granulozyten durch die Expression von IL-4 an einer effektiven Immunabwehr beteiligt [Min et al., 2004, Spencer and Weller, 2010]. Es konnte für eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden, dass *in vitro* durch die Sekretion der in den Granula gespeicherten Enzyme antikörperabhängig die Larven von *N. brasiliensis* und *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) getötet werden können [Kazura and Grove, 1978, Shin et al., 2001]. Außerdem führte *in vivo* die Abwesenheit von eosinophilen Granulozyten in der Maus zu einer geringeren Abwehr der *N. brasiliensis* und *Brugia malayi* (*B. malayi*)-Infektion [Knott et al., 2007, Cadman et al., 2014]. Zusätzlich konnte in *Heligmosomoides polygyrus* (*H. polygyrus*) infizierten Mäusen, die keine eosinophilen Granulozyten besitzen, aufgeklärt werden, dass diese Zellen lokal die IL-4-Expression von T-Zellen hemmen und so in B-Zellen den IgG1-Klassenwechsel regulieren können [Strandmark et al., 2016].

Weitere Aktivatorzellen der Th2-getriebenen Immunantwort gegen Helminthen sind Mastzellen [Hepworth et al., 2012]. Diese Zellen werden am Ort der Infektion durch IL-9 bzw. IL-18 zur Freisetzung von Proteasen und Zytokinen angeregt. Diese Proteasen verursachen die Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen, den sogenannten Tight-Junctions, erhöhen dadurch im Darm die Wasserdurchlässigkeit und unterstützen unter anderem die Austreibung von *T. spiralis* Würmern [McDermott et al., 2003]. Fehlen die Mastzellen, kommt es durch die abgeschwächte Sekretion der Zytokine IL-25, IL-33 und von TSLP zu einer geringen Th2-Immunität, die *H. polygyrus*- und *Trichuris muris* (*T. muris*)-Infektionen mit einer größeren Wurmlast hervorrufen [Hepworth, 2012].

Neben den genannten Immunzellen sind die Zytokine IL-4 und IL-13 unter anderem für die Proliferation und Differenzierung von Gobletzellen im Darm- und Lungenepithel entscheidend. Die Gobletzellen sind während einer Helmintheninfektion für die Mukusproduktion verantwortlich [Hasnain et al., 2011] und sekretieren Relm $\beta$ , ein hormonähnliches Molekül, welches direkt an Helminthen bindet [Artis et al., 2004]. Relm $\beta$  verringert unabhängig von T- und B-Zellen sowie AAMs die Fruchtbarkeit von *H. polygyrus* und ist für die IL-4 induzierte Austreibung von *N. brasiliensis* und *H. polygyrus* notwendig [Herbert et al., 2009]. Zusammen mit der erhöhten Mukusproduktion und Proliferation der Epithelschicht aktivieren IL-4 und IL-13 die Darmmuskulatur, sodass die Kontraktion zu einer gesteigerten Austreibung der Helminthen führt [Akiho et al., 2002, Cliffe et al., 2005].

Immunzellen, die ebenfalls während der Immunantwort gegen Helminthen vermehrt gebildet werden, sind die alternativ aktivierten Makrophagen (AAMs). Sie werden aus Monozyten/Makrophagen über die Bindung von IL-4 und IL-13 induziert und sind durch die Expression der Moleküle Relm- $\alpha$ , Arginase-1 und Ym1 gekennzeichnet [Raes et al., 2002, Nair et al., 2009, Gordon and Martinez, 2010]. AAMs wird hauptsächlich eine Reparaturfunktion des verletzten Gewebes zugeschrieben, obwohl auch direkte Effekte auf Helminthen beschrieben sind [Dyken and Locksley, 2013]. So konnte nachgewiesen werden, dass AAMs bei der Eliminierung von *H. polygyrus* und *N. brasiliensis* beteiligt sind und die Wundheilung bzw. Reparation nach einer *N. brasiliensis*-Infektion ohne AAM wesentlich schlechter erfolgt [Anthony et al., 2006, Chen et al., 2012].

Neben der indirekten Detektion nach Gewebeerstörung können Helminthen und deren sekretierte Produkte auch über sogenannte *pattern recognition receptors*-PRR direkt erkannt werden [Allen and Maizels, 2011]. Es sind nur wenige Helminthen-spezifische Rezeptoren beschrieben, wobei die für die Abwehr von Bakterien und Viren bekannten *toll-like receptors* (TLRs) eine untergeordnete Rolle bei Helmintheninfektionen spielen. Allerdings wurde für *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) nachgewiesen, dass die Bindung von dem Glycolipid Lyso-phosphatidylserin an TLR2 und die Aktivierung von TLR3 durch RNA erfolgen kann [van der Kleij et al., 2002, Aksoy et al., 2005]. Hingegen sind die sogenannten *c-type lectin receptors* (CLRs) vermutlich wichtiger für die Detektion von Helminthen, da diese die Zuckerstrukturen der Helminthenproteine binden können [van Kooyk, 2008, van Die and Cummings, 2017]. Es wurde zum Beispiel für *T. muris* beschrieben, dass deren sekretierte Proteine (*excretory/secretory* - ES Proteine) an den Mannoserezeptor auf Makrophagen binden, obwohl dieser keine Funktion bei der Abwehr übernimmt [DeSchoolmeester et al., 2009]. Für *S. mansoni* ES Proteine wurde ebenfalls gezeigt, dass sie an den Mannoserezeptor binden und von Makrophagen aufgenommen werden. Fehlte dieser Rezeptor, produzierten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mehr IFN $\gamma$  während einer *S. mansoni* Infektion [Paveley et al., 2011].

Ein weiterer Weg der Th2-Immunreaktion gegen Helminthen erfolgt über die Bildung spezifischer Antikörperklassen. IgE und IgG1 werden über den IL-4 induzierten Klassenwechsel in B-Zellen produziert [Harris and Gause, 2011], wobei beim Menschen zusätzlich noch die Bildung von IgG4 über IL-10 erfolgt [Satoguina et al., 2005]. Dabei konnte für IgE gezeigt werden, dass dieser Antikörper die Fitness von *H. polygyrus* und damit die Produktion von Eiern reduzierte [McCoy et al., 2008]. Zusätzlich sind IgE-Antikörper zusammen mit eosinophilen Granulozyten an der Ausbildung einer Immunität gegen *Onchocerca volvulus* (*O. volvulus*) beteiligt [Abraham et al., 2004].

Zusammengefasst ist das Ziel des Immunsystems, Eindringlinge wie Helminthen über verschiedene Wege der Th2-gesteuerten Immunantwort abzuwehren und aus dem Organismus zu schleusen. Im Gegensatz dazu versuchen die Würmer möglichst lange im Wirt zu überleben, um viele Nachkommen zu produzieren und dabei wenig Schaden anzurichten. Deshalb haben Helminthen eine Bandbreite an Abwehrmechanismen entwickelt, um dem Immunsystem zu entkommen. Unter anderem sekretieren Helminthen verschiedene Proteine und Moleküle, die zu einer Regulierung der Immunabwehr führen und so eine Toleranz des Wirtes gegenüber dem Wurm erzeugen sollen [Hewitson et al., 2009, Coakley et al., 2016, Maizels and McSorley, 2016]. Dieser Mechanismus der Helminthen wird als Immunmodulation oder Immunregulation beschrieben.

### **1.1.2. Immunmodulation in Helmintheninfektionen**

Immunmodulation oder Immunregulation bezeichnet die gerichtete Veränderung einer eingeleiteten Immunantwort. Moleküle wie z.B. Zytokine oder Transkriptionsfaktoren, die das Immunsystem nach einer Immunantwort wieder in den Ausgangszustand versetzen, können als immunregulatorische Moleküle bezeichnet werden [Annacker and Powrie, 2002, Iwasaki and Medzhitov, 2015, Chen and Ten Dijke, 2016]. Die dadurch erzeugte Homöostase des Immunsystems ist für das Überleben und die Abwehr von Krankheitserregern von Bedeutung [Marques et al., 2016].

Helminthen besitzen die Fähigkeit eigene immunregulatorische Moleküle zu produzieren, die gezielt das Immunsystem ihres Wirtes beeinflussen [Hewitson et al., 2009, Coakley et al., 2016, Maizels and McSorley, 2016]. Diese Moleküle werden größtenteils sekretiert, wodurch die Modulation nicht nur von dem direkten Kontakt der Helminthen zu Immunzellen abhängig ist, sondern einen größeren Wirkungsbereich einschließt. Somit können früh auch systemische Änderungen der Immunantwort eingeleitet werden, die das spätere Einnisten und Überleben im Darm unterstützen.

Es können vier Hauptgruppen von Immunmodulatoren unterschieden werden: Proteine, RNA-Moleküle, Zuckerstrukturen und Fettsäuren. Diese Moleküle und ihre immunmodulatorischen Eigenschaften werden nachfolgend an ausgewählten Beispielen verschiedener Helminthen genauer beschrieben.

## Immunregulatorische Proteine

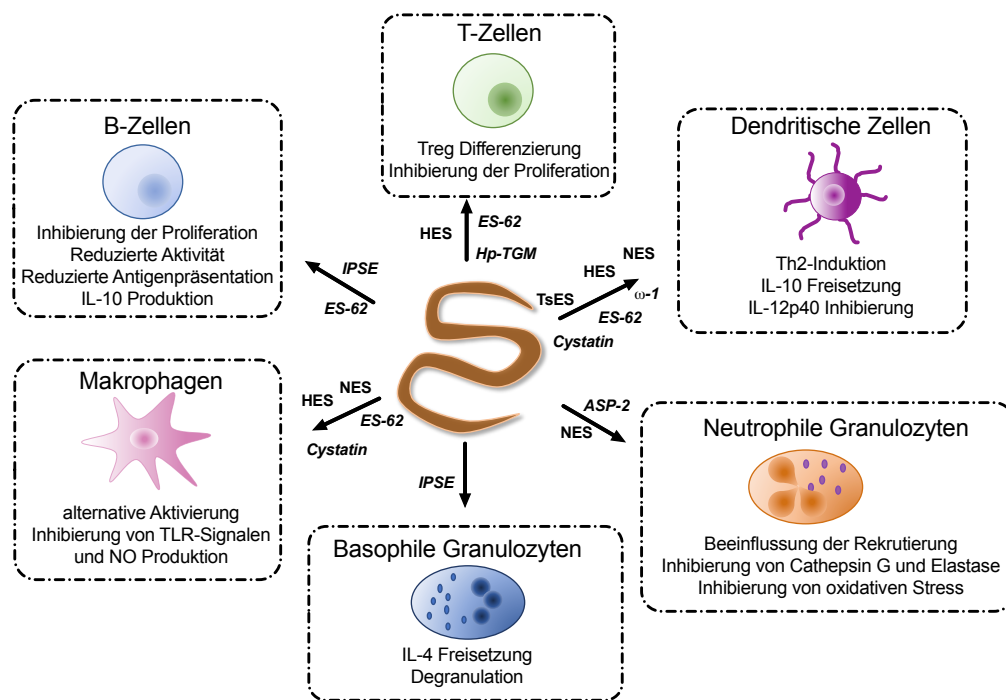
Die größte Gruppe immunmodulatorischer Moleküle sind Proteine, die durch ihre vielfältige Größe, Struktur und potentielle Enzymaktivität unterschiedlichste Regulationsmechanismen aufweisen (Abb. 1.1) [Hewitson et al., 2009]. Sie werden sekretiert und als *excretory/secretory* (ES) Proteine oder Produkte bezeichnet, wobei auch *soluble products* (SP) oder *soluble antigens* als Bezeichnungen verwendet werden. Dabei werden methodisch betrachtet erstere aus dem Medium *in vitro* kultivierter Würmer gewonnen und letztere durch den Aufschluss der gesamten Würmer [Hewitson et al., 2011a, Maizels and McSorley, 2016, Varyani et al., 2017]. *H. polygyrus* zum Beispiel sekretiert ein funktionell zu TGF- $\beta$  homologes Protein, das zu einer Expansion von regulatorischen FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen führt [Rausch et al., 2008, Grainger et al., 2010]. TGF- $\beta$  ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und induziert ebenfalls regulatorische FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen (Tregs), die durch Kontrolle der DC-Aktivierung zur Homöostase des Immunsystems beitragen [Chen et al., 2003, Konkel and Chen, 2011]. Vor kurzem wurde sogar das verantwortliche Protein Hp-TGM (TGF- $\beta$  mimic) von *H. polygyrus* rekombinant exprimiert, welches *in vitro* humane und murine CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Tregs differenziert und *in vivo* in einem Transplantations-Modell anti-inflammatorisch wirkte [Johnston et al., 2017].

Zu einer größeren Gruppe von regulatorischen Proteinen gehören die Protease-Inhibitoren, die sogenannten Cystatine und Serpine. Für die Cystatine (Cysteinprotease-Inhibitoren) von *Acanthocheilonema viteae* (*A. viteae*), *B. malayi*, *O. volvulus* und *N. brasiliensis* wurden Mechanismen der Immunregulation nachgewiesen [Hartmann and Lucius, 2003, Gregory and Maizels, 2008]. Zum Einen inhibieren sie die Cysteinproteasen ihres Wirtes, die für die Antigenpräsentation und somit T-Zellaktivierung notwendig sind [Dainichi et al., 2001, Manoury et al., 2001]. Zum Anderen induzieren sie die Expression des immunsupprimierenden Zytokins IL-10, das in antigenpräsentierenden Zellen die Expression der Oberflächenmarker CD86 und MHC-II reduziert und damit die T-Zellproliferation inhibiert [Hartmann et al., 1997, Schone-meyer et al., 2001]. *In vivo* konnte die immunsupprimierende Wirkung der Cystatine sowohl im Asthma-Modell, als auch im Colitis-Krankheitsmodell über die Induktion von Tregs und IL-10 produzierenden Makrophagen nachgewiesen werden [Schnoeller et al., 2008, Whelan et al., 2014].

Serpine sind Serinprotease-Inhibitoren, die bei vielen Helminthen auf Grund ihrer kurzen Aminosäuresequenz auch als Smapins (*small serine protease inhibitors*) bezeichnet werden [Molehin et al., 2012]. Ein bekannter Vertreter der Serpine ist das SPN-2 Protein von *B. malayi*, dass Cathepsin G und Elastase humaner neutrophiler Granulozyten inhibiert [Zang et al., 1999]. Stanley et al. konnten die inhibitorische Wirkung von SPN-2 hingegen nicht bestätigen,



sodass die Inhibitionsfähigkeit weiter diskutiert wird [Stanley and Stein, 2003]. Unbestritten ist aber, dass die Infektion mit Mikrofilarien von *B. malayi* in der Maus kurzzeitig eine Th1-Immunantwort hervorruft, die über eine SPN-2 spezifische Sekretion von  $\text{IFN}\gamma$  nachgewiesen wurde [Zang et al., 2000]. Somit können einige Helminthen neben einer Th2-Immunreaktion auch zur Induktion einer Th1-Immunreaktion beitragen. Für ein Serpin von *Trichinella pseudospiralis* wurde nachgewiesen, dass es die Polarisation von alternativ aktivierten Makrophagen (AAM) *in vitro* induziert [Xu et al., 2017]. Ein weiteres Beispiel ist das Serpin TsCEI von *T. suis*, das Chymotrypsin, die pankreatische und neutrophile Elastase sowie Chymase, eine von Mastzellen exprimierte Protease, inhibiert [Rhoads et al., 2000]. Daher wurde postuliert, dass TsCEI proteaseabhängig Mastzellen reguliert und dadurch die Immunreaktion im Darm moduliert.



**Abb. 1.1.: Mechanismen der Immunmodulation durch Parasiten.**

Ausgewählte Beispiele der Immunmodulation durch Parasiten und deren sekretierte Moleküle (*excretory/secretory* ES-Produkte). Abgeleitet von Hewitson et al. 2009. Abkürzungen: **HES** - *Heligmosomoides polygyrus* ES; **NES** - *Nippostrongylus brasiliensis* ES; **TsES** - *Trichuris suis* ES; **IPSE** - *IL-4-inducing principle of schistosome eggs*; **ASP-2** - *Ancylostoma secreted protein-2*;  **$\omega$ -1** - *Schistosoma mansoni* Omega-1; **Hp-TGM** - *Heligmosomoides polygyrus* TGF- $\beta$  mimic.

Von *S. mansoni* wurden sekretierte immunregulatorische Proteine analysiert, die bei der Th2-Differenzierung einen Einfluss haben. Das dimere Protein *IL-4-inducing principle of schistosome eggs* (IPSE), auch Alpha-1 genannt, wird von *S. mansoni* Eiern entlassen und führt über Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren zur Degranulation der basophilen Granulozyten

[Schramm et al., 2003, Schramm et al., 2007]. Dabei wurde IL-4 freigesetzt, das für die Induktion der Th2-Immunreaktion entscheidend ist. Außerdem induziert IPSE in humanen und murinen B-Zellen die Expression von IL-10, sodass IPSE *in vivo* zur Bildung von regulatorischen B-Zellen beiträgt [Haeberlein et al., 2017].

Omega-1, in weiteres von *S. mansoni* sekretiertes Protein, ist eine Ribonuklease und regt DCs zur Induktion von Th2-Zellen an [Steinfeldt et al., 2009]. Dabei wurde nachgewiesen, dass das Protein über die Bindung an den Mannoserezeptor von DCs internalisiert wird und dort RNA-Moleküle abbaut [Everts et al., 2012]. Außerdem verstärkt Omega-1 bei TLR-2 stimulierten Makrophagen die Freisetzung von IL-1 $\beta$ , einem Zytokin für die Aktivierung des Inflammasoms [Latz et al., 2013, Ferguson et al., 2015].

Ein interessantes Beispiel sekretierter, immunmodulatorischer Proteine ist das von adulten *A. viteae* hergestellte Protein ES-62, eine Leucin-Aminopeptidase, die viele Phosphorylcholin-Reste auf der Oberfläche trägt [Harnett et al., 2004]. ES-62 inhibiert durch die Bindung an TLR-4 die Degranulation von humanen Mastzellen und ES-62 behandelte DCs induzieren *in vivo* CD4<sup>+</sup> Th2-Zellen [Whelan et al., 2000, Melendez et al., 2007]. Zusätzlich fördert ES-62 die Proliferation und IL-10 Produktion peritonealer B1-Zellen und andererseits werden B2-Zellen in ihrer Proliferation gehemmt [Wilson et al., 2003a, Wilson et al., 2003b]. *In vivo* konnte durch die Applikation von ES-62 sowohl die Entstehung von kollagen-induzierter Arthrose in Mäusen verhindert werden als auch die Th2-Immunreaktion bei OVA-induziertem Asthma gemildert werden [McInnes et al., 2003, Rzepecka et al., 2013]. Neueste Studien haben gezeigt, dass sogar kleinere, ES-62-analoge Proteine in murinen Krankheitsmodellen Allergien und den systemischen Lupus erythematoses (SLE) verringern können [Rodgers et al., 2015, Janicova et al., 2016]

Eine Proteinfamilie mit immunregulatorischen Eigenschaften ist die Venom-allergen/ ASP-like (VAL) Familie [Murray et al., 2001]. Dabei steht ASP für das erste identifizierte Protein dieser Familie, *Ancylostoma caninum secreted protein*, das von *in vitro* aktivierten Larven sekretiert wurde [Hawdon et al., 1996]. In den folgenden Jahren wurden weitere ASP-Proteine verschiedener Helminthen identifiziert, wodurch ASP auch die Bezeichnung *Activation-associated secreted protein* bekommen hat [Yatsuda et al., 2002]. Diese Proteine tragen CAP-Domänen (CAP-*Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5 and pathogenesis-related 1*) und gehören zu einer Proteinsuperfamilie, die auch als *sperm-coating glycoprotein* (SCP) Proteinfamilie (Pfam PF00188) bezeichnet wird [Gibbs et al., 2008]. Die SCP-Superfamilie ist unter Helminthen weit verbreitet, wobei unterschiedliche Eigenschaften identifiziert wurden [Cantacessi

and Gasser, 2012]. So wurde für das Protein *neutrophil inhibitory factor* (NIF) von *Ancylostoma caninum* nachgewiesen, dass es *in vitro* die Aktivierung neutrophiler Granulozyten inhibiert [Moyle et al., 1994]. Hingegen führte das Protein NA-ASP-2 von *N. americanus* *in vitro* und *in vivo* zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [Bower et al., 2008]. Dem *O. volvulus* Protein ASP-1 wird die Eigenschaft eines Adjuvans zugesprochen, da es neben IL-10 auch die Expression von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in antigenpräsentierenden Zellen induziert [He et al., 2009]. Obwohl diese Proteinfamilie unter Helminthen weit verbreitet ist und z.B. für *H. polygyrus* 25 verschiedene VAL-Proteine im ES nachgewiesen wurden, konnten bisher nur wenige spezifische Funktionen identifiziert werden [Hewitson et al., 2011b, Cantacessi and Gasser, 2012].

### Immunregulatorische Zuckerstrukturen

Sekretierte Proteine und Membranproteine von Helminthen sind glykosyliert, das heißt diese Proteine tragen Kohlenhydrate auf der Oberfläche und werden daher auch als Glykoproteine bezeichnet [Tundup et al., 2012]. Diese Zuckerstrukturen dienen sowohl als Schutzschicht vor der Umwelt als auch zur Interaktion mit der Umwelt bzw. Regulation des Wirtsorganismus [Rodrigues et al., 2015]. Ihnen wird eine Bindung an TLRs und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs) auf dendritischen Zellen und Makrophagen zugesprochen, wodurch sie direkte und indirekte regulatorische Eigenschaften haben. Ein Beispiel ist das *S. mansoni* Antigen gebundene Glykan *lacto-N-fucopentaose III* (LNFPIII), das über TLR4-Bindung auf DCs die Th2-Immunantwort auslöst [Thomas et al., 2003]. Hauptsächlich ist das sogenannte Lewis-X Motiv, ein terminales Trisaccharide von LNFPIII für die Bindung verantwortlich [Leverly et al., 1992], da die Inhibition dieser Motive die Bindung an CLRs von DCs verhindert [van Die et al., 2003].

Im Allgemeinen wurde für ES-Proteine von Helminthen nachgewiesen, dass ihre immunregulatorischen Eigenschaften von den gebundenen Kohlenhydraten abhängig sind. So verhindern *T. suis* SP Proteine mit fehlenden Glykanen die Inhibierung der LPS-induzierten Zytokinsekretion, woraufhin mehr Zytokine gebildet werden [Klaver et al., 2013]. Außerdem führte die Behandlung mit *T. suis* ES (TsES) zur glykanabhängigen Reduktion der Barrierefunktion von Epithelzellen [Hiemstra et al., 2014]. Ebenso konnte für *S. mansoni* Proteine gezeigt werden, dass deren Aktivierung von Makrophagen zur Sekretion von IL-12p40, IL-10 und IL-6 von den Glykosylierungen der Proteine abhängt [Jenkins et al., 2005]. Diese Ergebnisse der Gesamt-ES Experimente geben keine Information darüber, ob die Kohlenhydrate selbst diese Effekte induzieren oder ob sie für die Bindung und Internalisierung der Proteine verantwortlich sind,

die dann intrazellulär ihre Funktion ausüben [Tundup et al., 2012].

Es konnte jedoch für einige wenige Zuckerstrukturen gezeigt werden, dass sie direkte immunregulatorische Eigenschaften besitzen. Dazu wurden die Kohlenhydrate an Carrier-Moleküle gebunden, die selbst keine immunregulatorische Funktion haben. Zum Beispiel hat LNFPIII gebunden an Dextran nach intraperitonealer Applikation in Mäuse AAMs induziert, die mehr Arginase-1 und Ym1 exprimierten haben [Atochina et al., 2008]. Ebenso führte Chitin, einem ebenfalls mit Helminthen-Proteinen konjugiertes Kohlenhydrat, zur Rekrutierung und Induktion von AAMs in den peritonealen Bauchraum [Reese et al., 2007, Satoh et al., 2010].

*In vivo* reduzierte die Behandlung mit LNFPIII in einem Psoriasis-Modell die Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Sekretion von IFN $\gamma$  [Atochina and Harn, 2006]. In dem murinen Krankheitsmodell der Multiplen Sklerose (*experimental autoimmune encephalomyelitis*- EAE) konnte die Behandlung mit LNFPIII über die Bildung von AAMs zur Reduktion der Hirnentzündung beitragen [Zhu et al., 2012].

### Immunregulatorische RNA-Moleküle

Mit Hilfe sogenannter Exosomen können Proteine, Lipide und RNA-Moleküle innerhalb einer Spezies und zwischen verschiedenen Organismen übertragen werden [Raposo and Stoorvogel, 2013, Coakley et al., 2015]. Dabei sind Exosomen Membranvesikel, die von der Zelloberfläche abgeschnürt werden und den direkten Transport von Proteinen und Molekülen in eine andere Zelle ermöglichen. Für Helminthen wurde diese Fähigkeit, Moleküle direkt in die Zielzellen einzuschleusen, erst kürzlich nachgewiesen [Marcilla et al., 2014]. *H. polygyrus* produziert Exosomen, die mit microRNA (miRNA) und Proteinen gefüllt sind [Buck et al., 2014]. Während einer pilzinduzierten Allergie hinderten diese Exosomen ILC2s daran IL-5 freizusetzen und reduzierten damit die Eosinophilie in der Lunge. Neben *H. polygyrus* konnten RNA-beladene Exosomen für *B. malayi*, *Dicrocoelium dendriticum*, und *S. mansoni* nachgewiesen werden, obwohl deren immunregulatorische Funktion noch nicht genau bekannt ist [Bernal et al., 2014, Nowacki et al., 2015, Zamanian et al., 2015]. Neueste Ergebnisse von Untersuchungen des ES von *T. muris* haben gezeigt, dass diese ebenfalls Exosomen mit RNA enthält, die mit murinen Wirtszellen fusionieren können [Eichenberger et al., 2018].

### Immunregulatorische Lipide

Eine letzte Gruppe immunregulatorischer Moleküle sind die *Short chain fatty acids* (SCFA), die hauptsächlich von Darmbakterien hergestellt werden und eine Verbindung zwischen Mikrobiom und Immunsystem darstellen [Topping, 1996, Corrêa-Oliveira et al., 2016]. So wurde

für bakterielle SCFA nachgewiesen, dass sie unter anderem zur Proliferation von Foxp3<sup>+</sup> Treg führen [Arpaia et al., 2013]. Daneben besitzen auch Helminthen die Fähigkeit SCFA herzustellen, wobei bisher keine immunregulatorischen Effekte direkt für Helminthen SCFA bestätigt wurden [Tielens et al., 2010]. Zusätzlich können Helminthen das Mikrobiom ihres Wirtes beeinflussen, so zur Produktion der SCFAs beitragen und allergische Entzündungen reduzieren [Zaiss et al., 2015]. Unabhängig von den SCFAs wurde spezifisch für das Lipid Phosphatidylserin von *S. mansoni* gezeigt, dass es DCs zur Induktion von IL-4/IL-10 produzierenden T-Zellen anregt [van der Kleij et al., 2002].

Neben den vorgestellten Beispielen gibt es einige immunregulatorische Eigenschaften, die bisher nicht auf einzelne Proteine oder Moleküle der Helminthen zurückzuführen sind (Abb. 1.1). Zum Beispiel konnte für das *H. polygyrus* ES (HES) nachgewiesen werden, dass es in einem Allergiemodell der Lunge die IL-33-Freisetzung reduziert, die Zytokinproduktion von ILC2s hemmt und die Eosinophilie lokal verhindert [McSorley et al., 2014]. Außerdem reduziert HES direkt die NO-Produktion von Makrophagen sowie die IL-12p70-Sekretion von LPS-stimulierten DCs und die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation [Rzepecka et al., 2006, Segura et al., 2007].

Die Reduktion der T-Zellproliferation bzw. Induktion von Th2-Zellen wurde auch durch *N. brasiliensis* ES (NES) Proteine beobachtet [Allen and MacDonald, 1998, Balic et al., 2004]. Dabei wurde die LPS-induzierte IL-12p70-Sekretion von DCs reduziert und die IFN $\gamma$ -Produktion von antigenunabhängig stimulierten T-Zellen gehemmt [Uchikawa et al., 2000, Balic et al., 2004].

Für *T. suis* ES (TsES) Proteine wurde von unserer Arbeitsgruppe ebenfalls die Reduktion LPS-induzierter Zytokine von DCs nachgewiesen, die jedoch keinen Einfluss auf die T-Zellproliferation hatte [Ebner et al., 2014]. Außerdem wurde gezeigt, dass das TsES in einem Asthma-Mausmodell die Eosinophilie reduziert, die Lungenfunktion verbessert und Th2-Zytokine in der Lunge verringert. Des Weiteren konnte *in vitro* die Induktion von anti-entzündlichen humanen Monozyten durch die Behandlung mit *T. suis* SP nachgewiesen werden [Kooij et al., 2015].

Insgesamt sind parasitäre Helminthen und ihre Wirte ko-evolviert und haben jeweils Mechanismen entwickelt, sich gegen den anderen zu wehren und gleichzeitig möglichst lange zu überleben. Daher versucht das Immunsystem des Menschen den Parasiten einerseits über Th2-Immunreaktionen direkt zu bekämpfen und gleichzeitig die Schädigungen durch den Parasiten bzw. der eigenen Immunabwehr zu minimieren. Dabei aktivieren Helminthen selbst

den regulatorischen Arm des Immunsystems ihrer Wirte durch Sekretion von Proteinen und Molekülen, wodurch die gegen sie gerichtete Immunreaktion abgeschwächt wird.

### 1.2. Der Schweinepeitschenwurm - *Trichuris suis*

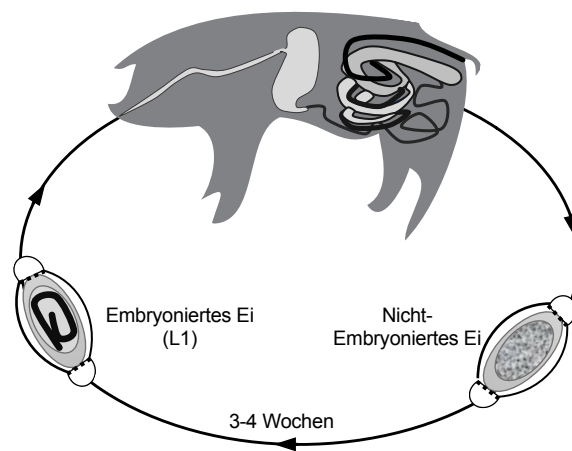
Der Schweinepeitschenwurm *Trichuris suis* (*T. suis*) gehört zur Familie der *Trichuridae*, die zum Stamm der Fadenwürmer (*Nematoda*) zählen [Mehlhorn, 2012]. Zu dieser Familie innerhalb der Helminthen gehören außerdem der humanpathogene Parasit *Trichuris trichiura* (*T. trichiura*) und weitere Vertreter, welche Maus, Schaf, Hund und Katze als Wirt nutzen. *T. suis* ist ein über die Umwelt übertragbarer Parasit, der über einen direkten Infektionsweg den Darm von Schweinen besiedelt. Eine hohe Parasitenlast kann zu einer Unterversorgung der infizierten Schweine führen, wodurch die Tierhaltung erschwert wird und wirtschaftliche Probleme auftreten können [Roepstorff et al., 2011].

#### 1.2.1. Auftreten und Infektion

Weltweit sind Schweine mit *T. suis* infiziert, wobei Tiere in industrieller Schweinehaltung weniger stark betroffen sind als Tiere in Freilandhaltung [Eijck and Borgsteede, 2005]. Besonders in Entwicklungsländern tropischer Regionen liegt eine erhöhte Infektionsrate vor, da die feucht-warmen Bedingungen vor Ort *T. suis*-Infektionen begünstigen [Roepstorff et al., 2011]. Der einfache, direkte Infektionszyklus von *T. suis* ist in der Abbildung 1.2 zusammengefasst und beginnt mit der oralen Aufnahme embryonierter Eier, die die infektiösen L1 Larven in sich tragen. Im Dünndarm schlüpfen dann die Larven und entwickeln sich über vier Häutungen zu adulten Würmern.

*T. suis* befällt den Blind- und Enddarm von Schweinen, wobei das schmale vordere Ende der Parasiten in der Schleimhaut verankert ist und das dicke Hinterende in das Darmlumen ragt. *T. suis* Weibchen produzieren täglich tausende Eier, die über den Kot ausgeschieden werden und in denen sich die L1 Larven innerhalb von 3-4 Wochen entwickeln. Diese infektiösen Eier überleben mehrere Jahre in einer feuchten Umgebung und können, oral aufgenommen, wieder einen neuen Infektionszyklus starten (Abb. 1.2) [Mehlhorn, 2012]. Dabei beträgt die Präpatenz von *T. suis*, das heißt die Dauer von oraler Aufnahme der infektiösen Eier bis zur Ausscheidung neuer Eier, 6-8 Wochen [Kringel and Roepstorff, 2006].

Eine *T. suis* Infektion führt bei Schweinen zu einer Th2-Immunreaktion, die durch die Vermehrung der eosinophilen und basophilen Granulozyten im Blut gekennzeichnet ist [Kringel and Roepstorff, 2006]. RT-PCR Analysen zeigten, dass die Expression der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 im Darm von infizierten Schweinen deutlich erhöht war [Kringel et al., 2006]. Außerdem wurde im Darmgewebe infizierter Tiere eine größere Anzahl von Gobletzellen nachgewiesen, die durch eine vermehrte Mukusproduktion zur Ausscheidung der Würmer führt. Nach 3-6 Monaten sind unbehandelte Tiere von *T. suis* Würmern befreit und haben eine Immunität ausgebildet, die sie vor Reinfektionen schützt [Nejsum et al., 2009].



**Abb. 1.2.: Infektionszyklus von *Trichuris suis*.**

Die *T. suis* Infektion beginnt mit der oralen Aufnahme von embryonierten Eiern. Die darin enthaltenen L1 Larven schlüpfen im Dünndarm und entwickeln sich über 4 Häutungen zu adulten Würmern, die im Blind- und Enddarm sitzen. *T. suis* Weibchen produzieren täglich tausende Eier, die über den Kot ausgeschieden werden. Innerhalb von 3-4 Wochen entwickeln sich embryonierte Eier, die über Jahre infektiös bleiben können.

### 1.2.2. *Trichuris suis* Therapie in klinischen Studien

Im Laufe der Industrialisierung wurde beobachtet, dass immer mehr Menschen an Allergien und Autoimmunerkrankungen leiden. Gleichzeitig wurde eine Reduktion von parasitären und bakteriellen Infektionen durch die verbesserten Hygienemaßnahmen der letzten Jahrzehnte erzielt. Diese Beobachtungen wurden in der Theorie der Hygiene-Hypothese zusammengefasst [Gerrard et al., 1976, Strachan, 1989]. Sie geht davon aus, dass ein gesundes Immunsystem im Laufe des Lebens durch Infektionen den Unterschied zwischen gefährlichen Eindringlingen und harmlosen Umweltmolekülen erlernt. Fehlen diese Infektionen, entwickelt das Immunsystem autoreaktive Erkrankungen oder Allergien [Yazdanbakhsh et al., 2002].

Zusätzlich wurde das Wissen über Immunreaktionen gegen Bakterien oder Würmer immer umfangreicher, sodass Effekte der Immunregulation durch pathogene Erreger in die Hypothese einbezogen wurden. Wie im Abschnitt 1.1.2 beschrieben wurde, besitzen Helminthen immunmodulatorische Moleküle und können damit potentiell auch Immunreaktionen gegenüber anderen pathogenen Erregern oder Impfungen beeinflussen [Hewitson et al., 2009, Coakley et al., 2016, Maizels and McSorley, 2016]. Nachgewiesen wurde dies für *A. lumbricoides* infizierte Studienteilnehmer, die nach einer Anthelminthikatherapie und folgender Impfung mit Cholera-Toxin B höhere IL-2 und IFN $\gamma$ -Konzentrationen aufwiesen als die weiterhin infizierten Probanden [Cooper et al., 2001]. Außerdem wurde der Einfluss von Anthelminthika auf die Bildung von Allergien untersucht, wobei Kinder nach einer Behandlung mit Anthelminthika in einem Allergietest stärker reagierten als vor der Behandlung [Lynch et al., 1993]. Ebenso konnte beobachtet werden, dass die Reduktion allergischer Reaktionen besonders von IL-10 und regulatorischen T-Zellen abhängig ist [Akdis et al., 1998, Maloy and Powrie, 2001], die wiederum durch Helminthen induziert werden [Yazdanbakhsh et al., 2002].

Aus diesen Forschungsergebnissen und der Theorie der Hygiene-Hypothese folgte die Überlegung, dass Menschen, die an Allergien bzw. Autoimmunerkrankungen leiden, mit Hilfe von Helminthen behandelt werden könnten. Als vielversprechender Kandidat für die Wurmtherapie galt der Nematode *T. suis*, weil er einen direkten Infektionsweg hat und damit keine Körperwanderung stattfindet (Abb. 1.2). Außerdem findet keine Vermehrung innerhalb des Wirtsorganismus durch Teilung statt und im Schwein kommt es selten zu starken Infektionen mit schwerwiegenden Symptomen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine lang andauernde Infektion und die Entwicklung zu fortpflanzungsfähigen Würmern im Menschen auf Grund der Wirtsspezifität zum Schwein nicht vorliegt [Beer, 1976, Ooi et al., 1993].

Eine erste experimentelle Studie zeigte, dass die orale Aufnahme von 2500 *T. suis* Eiern [*Trichuris suis* ova (TSO)] eine sichere Therapie-Dosis für entzündliche Darmerkrankungen ist und zu einer Verbesserung der klinischen Parameter führt [Summers, 2003]. Bis heute wurde der Einsatz von TSO als Therapie in über zehn Studien untersucht und veröffentlicht. Wie in der Tabelle 1.1 aufgeführt ist, wurden entzündliche Darmerkrankungen, Allergien und neuronale Erkrankungen mit Hilfe von TSO behandelt.

Die ersten therapeutischen Studien zur Behandlung von Colitis ulcerosa und Morbus Crohns zeigten deutliche Verbesserungen der klinischen Parameter der mit TSO behandelten Patienten [Summers et al., 2005a, Summers et al., 2005b]. Des Weiteren wurde die TSO-Therapie zur Behandlung von Allergien wie der Rhinitis eingesetzt. Dabei wurde die Therapie von den meisten Patienten gut vertragen, jedoch ohne eine Reduktion der Krankheitsparameter



hervorzurufen [Bager et al., 2010, Bager et al., 2011]. Neueste Studien auf dem Gebiet der entzündlichen Darmerkrankungen haben gezeigt, dass die TSO-Behandlung gut toleriert wird, es aber im Durchschnitt zu keiner Verbesserung für den Patienten kommt [Schölmerich et al., 2016].

Eine weitere Erkrankung, für die eine TSO-Therapie durchgeführt wurde, ist die neuronale Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS). In einer ersten Studie wurden fünf MS Patienten für drei Monate mit TSO behandelt, woraufhin eine deutliche Verringerung der messbaren Läsionen im Gehirn festgestellt wurde [Fleming et al., 2011]. Diese stiegen nach Absetzen der Therapie allerdings wieder an, sodass der beobachtete Effekt auf die Behandlung mit TSO zurückgeführt werden kann. Demnach muss eine TSO Behandlung kontinuierlich erfolgen, um wirksame Resultate zu erzielen. In nachfolgenden Studien wurde die TSO-Therapie von MS-Patienten zwar gut toleriert, die klinischen Parameter zeigten allerdings nur eine tendenzielle Verbesserung [Benzel et al., 2012, Fleming et al., 2017].

**Tab. 1.1.:** Publierte klinische Studien zur TSO-Therapie.

	<b>Erkrankung</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>Referenz</b>
Entzündliche Darmerkrankungen	Colitis ulcerosa	verträglich, positiv	[Summers, 2003]
	Colitis ulcerosa	verträglich, positiv	[Summers et al., 2005b]
	Morbus Crohn	verträglich, positiv	[Summers et al., 2005a]
	Morbus Crohn	verträglich	[Sandborn et al., 2013]
	Morbus Crohn	verträglich, ohne Effekt	[Schölmerich et al., 2016]
Allergien	Rhinitis	verträglich, ohne Effekt	[Bager et al., 2010]
	Rhinitis	verträglich, ohne Effekt	[Bager et al., 2011]
	Nuss Allergie	verträglich	[Jouvin and Kinet, 2012]
Neuronale Erkrankungen	Multiple Sklerose	verträglich, positiv	[Fleming et al., 2011]
	Multiple Sklerose	verträglich, positive Tendenz	[Benzel et al., 2012]
	Multiple Sklerose	verträglich, ohne Effekt	[Voldsgaard et al., 2015]
	Multiple Sklerose	verträglich, positive Tendenz	[Fleming et al., 2017]

Neben den veröffentlichten Studien gibt es eine Vielzahl an klinischen Studien mit TSO, die auf der Internetseite der US-amerikanischen Bibliothek der Medizin (*U.S. National Library of Medicine*) unter ClinicalTrials.gov gelistet sind. Darunter befinden sich Studien, die ohne Veröffentlichung der Ergebnisse abgebrochen oder beendet wurden. Möglicherweise waren die Nebenwirkungen der TSO Behandlung zu stark oder zu viele Teilnehmer sind aus anderen Gründen vorzeitig ausgeschieden, sodass die Studien nicht vollständig abgeschlossen

wurden. Es sind aber auch neue, noch laufende Studien aufgelistet, wie z.B. Studien zur TSO-Behandlung der chronischen Hauterkrankung Psoriasis.

Übergreifend betrachtet sind die Ergebnisse klinischer Studien mit der therapeutischen Gabe von TSO sehr unterschiedlich und zeigen dennoch das Potential dieser Therapieform. Neben *T. suis* werden auch andere Helminthen, wie *Necator americanus* als Therapie-Würmer eingesetzt, wobei klinische Studien auch hier eine heterogene Ergebnislage liefern [Wammes et al., 2014, Smallwood et al., 2017]. Es muss berücksichtigt werden, dass die zu behandelnden Autoimmunerkrankungen des Menschen selbst noch unzureichend verstanden sind. Genetische Unterschiede, das Alter zum Diagnosezeitpunkt oder die Vorbehandlung einzelner Patienten können die Durchführbarkeit und die Ergebnisse der Studien beeinflussen. Außerdem sind die grundlegenden Mechanismen der TSO-Therapie noch nicht aufgeklärt. Obwohl bekannt ist, dass *T. suis* immunmodulatorische Moleküle sezerniert, sind die genauen Komponenten und Mechanismen der zugrundeliegenden Immunregulation noch weitgehend unerforscht.

### 1.2.3. *Trichuris suis* in Krankheitsmodellen

Obwohl in den letzten 15 Jahren viele klinische Studien mit TSO zur Therapie von Autoimmunerkrankungen durchgeführt wurden, gibt es nur wenige Studien, die die Immunmodulation durch *T. suis* in Krankheitsmodellen genauer untersucht haben.

In einer ersten präklinischen Studie wurden lösliche Moleküle (*soluble products*-SP) von adulten *T. suis* Würmern in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose, dem *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE) Modell, eingesetzt [Kuijk et al., 2012]. Durch die Behandlung mit *T. suis* SP verringerte sich der Gewichtsverlust der Tiere ebenso wie der klinische Score. Im EAE-Modell an Ratten konnte gezeigt werden, dass diese Verbesserung der klinischen Parameter durch die Gabe von adulten *T. suis* ES Proteinen über eine Reduktion der Th1- und Th17-Antwort verursacht wurde [Hansen et al., 2017]. Außerdem wurde vergleichend die Gabe von TSO in dem EAE-Modell untersucht, wobei selbst mit einer hohen Dosierung von 3 x 7000 Eier im Gegensatz zur TsES Behandlung keine Verbesserungen im Score ermittelt wurden.

In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie wurde larvales *T. suis* L1 ES in einem Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung eingesetzt und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gelang der Nachweis immunregulatorischer Eigenschaften [Ebner et al., 2014]. *In vitro* wurde durch die Inkubation mit TsES die Expression der Oberflächenmarker CD86 und MHC-II von CpG-stimulierten DCs reduziert. Des Weiteren wurde in diesem Asthma-Mausmodell gezeigt, dass die Anzahl eosinophiler Granulozyten in der Lunge durch die Be-

handlung mit TsES reduziert und die allergische Hyperreaktivität der Lunge verringert wurde. Damit wurden DCs als mögliche Zielzellen der Immunregulation durch *T. suis* identifiziert und ein positiver Effekt auf allergische Atemwegserkrankungen beschrieben.

Erst kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, bei dem eine TSO Behandlung bei der induzierten Colitis in Kaninchen durchgeführt wurde [Leonardi et al., 2017]. Dabei wurde deutlich, dass immunkompetente Kaninchen nach oraler Gabe von TSO ein deutlich höheres Gewicht und weniger Immunzellen im Darmgewebe hatten und damit einen geringen Colitis-Score aufwiesen. Überraschend war die Beobachtung, dass in immunsupprimierten Kaninchen eine TSO-Behandlung genau gegenteilige Effekte zeigte. Die Tiere verloren deutlich an Gewicht, viele Lymphozyten wanderten ins Darmgewebe ein und verschlechterten die Symptomatik der Tiere. Damit wurde deutlich gemacht, welchen Einfluss eine immunsupprimierende Behandlung auf den Therapieerfolg mit TSO haben kann.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass die TSO-Therapie mit Hilfe von Krankheitsmodellen in der Zukunft besser untersucht werden sollte. Dabei spielt die Identifikation einzelner *T. suis* ES Komponenten, die für die Immunmodulation verantwortlich sind, eine wichtige Rolle, um den Wirkmechanismus der TSO-Therapie zu analysieren. Außerdem bietet die kontrollierte Applikation einzelner Moleküle den Vorteil einer gezielten Analyse der Immunregulation und Nebenwirkungen einer Lebendinfektion können verhindert werden.

Ein wichtiger Schritt hin zu einem besseren Verständnis dieser Immunregulation durch *T. suis* war die Entschlüsselung des Genoms und Transkriptom von *T. suis*. Die erste Transkriptomanalyse wurde 2011 veröffentlicht und es wurde eine Vielzahl an sekretierten Proteinen adulter *T. suis* Würmer identifiziert, die potentiell als immunregulatorisch angesehen wurden [Cantacessi et al., 2011]. Im Jahr 2014 wurde dann die Datengrundlage zur genetischen Ausstattung von *T. suis* und deren Expression erweitert [Jex et al., 2014]. Dabei wurde deutlich, dass es zwischen einzelnen *T. suis* Larvenstadien größere Unterschiede in der Genexpression gab, als zwischen weiblichen und männlichen Würmern. Damit scheint es für *T. suis* wichtig zu sein, zu jedem Larvenstadium spezifische Moleküle herzustellen, die für ein Überleben im Wirt notwendig sind.

Zusammengefasst wird der Schweinepeitschenwurm *T. suis* mit seinem einfachen Infektionsweg und der geringen Pathologie im Fehlwirt Mensch als ein immunregulierender Helminth eingesetzt, um in klinische Studien chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen zu behandeln. Obwohl diese Studien unterschiedliche Ergebnisse zum Einsatz von TSO liefern, steckt in diesem Therapieansatz ein großes Potential. Mit Hilfe der Transkriptomdaten

von *T. suis* wurde eine Grundlage geschaffen, immunmodulatorische Moleküle von *T. suis* zu identifizieren und genauer zu charakterisieren. Um die Immunmodulation von *T. suis* aufzuklären, sollte in klinisch relevante Erkrankungen die Medikation mit TSO bzw. den ES Molekülen von *T. suis* mit *in vivo* Krankheitsmodellen untersucht werden. Dies eröffnet zukünftig die Möglichkeit der Nutzung gezielter Therapieformen, die eine Lebendinfektion mit Helminthen unnötig machen.

### 1.3. Ziele der Arbeit

*T. suis* ist einer der am häufigsten eingesetzten Helminthen in klinischen Studien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn oder Multipler Sklerose. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gabe von *T. suis* Eiern (TSO) eine sichere und gut verträgliche Therapieform ist, die in einzelnen Studien deutliche Verbesserungen für die Patienten zeigte. Klinische Studien sind gekennzeichnet durch Variabilitäten und die Grundlagen der Helminthentherapie ist noch nicht ausreichend untersucht. Deshalb war der Einsatz von *T. suis* und dessen sekretierten Proteinen in *in vivo* Krankheitsmodellen für Asthma oder Multiple Sklerose ein wichtiger Schritt für die grundlegende Erforschung der TSO-Therapie. In diesen Modellen wurde deutlich, dass die krankheitsbezogenen Immunantworten reguliert werden können und ein großes Potential in diesem Therapieansatz liegt. Bisher jedoch sind die einzelnen Komponenten, die für die Immunmodulation durch *T. suis* verantwortlich sind, nicht bekannt oder unzureichend charakterisiert.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb sekretierte Proteine von *T. suis* L1 Larven zu identifizieren und deren immunmodulatorische Eigenschaften zu analysieren. Dazu sollte eine Auswahl identifizierter Moleküle mit Hilfe eines eukaryotischen Expressionssystem rekombinant hergestellt werden. Außerdem sollten die Proteine und deren mögliche Immunregulation mit Hilfe von *in vitro* Zellkulturexperimenten und dem *in vivo* Model der allergischen Atemwegserkrankung charakterisiert werden.

Mit der Charakterisierung einzelner immunmodulatorischer Proteine von *T. suis* L1 Larven sollte die Immunregulation durch Helminthen besser verstanden werden und das langfristige Ziel, zukünftige Therapien auf Basis einzelner immunmodulatorischer Moleküle durchzuführen, unterstützt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tiermodelle

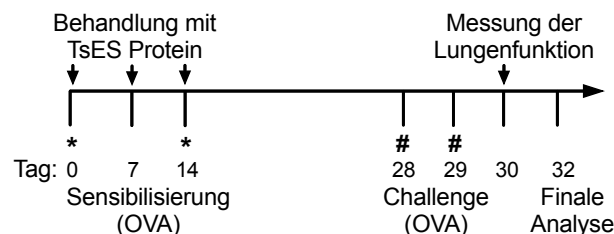
#### 2.1.1. Verwendete Mausstämme

Die Isolation von Knochenmarkzellen, die Generierung von proteinspezifischen Antisera und die Durchführung der *in vivo* Versuche zur allergischen Atemwegshyperreaktivität wurden mit weiblichen BALB/cJRj Mäusen von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) durchgeführt. Für die OVA-spezifischen Proliferationsversuche wurden weibliche DO11.10 Mäuse mit einem BALB/c Hintergrund verwendet, die über das Deutsche-Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) erworben wurden.

Alle Tiere wurden unter *specific pathogen free* (SPF)-Konditionen gehalten und die Versuche nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes und der Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) mit folgenden Versuchsnummern durchgeführt: T0097/16, G0144/10, G0068/16, H0096/13.

#### 2.1.2. Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung

Ein Krankheitsmodell für Asthma in Mäusen ist die OVA-induzierte, allergische Atemwegserkrankung (*allergic airway hyperreactivity - AHR*) [Tierversuchsnummer: G0144/10, G0068/16]. Für dieses Mausmodell wurde 8 Wochen alten BALB/c Mäusen zwei Mal (Tag 0 und 14) eine Emulsion aus 20 µg Ovalbumin (OVA) und 2 mg Alum intraperitoneal appliziert (siehe Abb.2.1). Tieren der negativen Kontrollgruppe wurde stattdessen 0,9 % NaCl in gleicher Menge intraperitoneal appliziert.



**Abb. 2.1.: Induktionschema des Mausmodells der allergischen Atemwegserkrankung.**

Dargestellt ist das Versuchsprotokoll zur Induktion der allergischen Atemwegserkrankung in der Maus mit präventiver Behandlung durch die TsES Proteine. Während der Sensibilisierungsphase wurden OVA (20 µg, 2 mg Alum) und die TsES Proteine (20 µg) intraperitoneal (i.p.) appliziert und 2 Wochen später erfolgte die intranasale Challenge mit OVA (50 µg). Einen Tag nach der Messung der Lungenfunktion fanden die abschließenden Analysen statt.

Die Behandlung mit TsES Proteinen (20 µg, i.p.) erfolgte an den Tagen 0, 7 und 14 während der OVA-Sensibilisierung. Die Tiere wurden unter Narkose intranasal mit insgesamt 50 µg OVA (25 µl pro Tier) an Tag 28 und 29 provoziert. Einen Tag nach der letzten Challenge wurde die Lungenfunktion im Zweikammer-Plethysmographen ermittelt. Die Sektion geschah an Tag 31 und folgende Analysen wurden durchgeführt:

- Blutentnahme zur Gewinnung von Serum (Bestimmung Antikörperlevel)
- Lungenspülung zur Analyse infiltrierter Zellen (Zytospin/FACS) und Zytokine (Multiplex)
- Entnahme der peribronchialen Lymphknoten und Milz zur Zellanalyse (FACS)
- Kryokonservierung eines Lungenstücks für mRNA-Analysen (RT-PCR)
- Konservierung von Lungenstücken für histologische Analysen (Formalin/ Kryokonservierung)

### **Messung der Lungenfunktion im Zweikammer-Plethysmograph**

Die Messungen wurden in der Einrichtung Pathophysiologie-Plattform von Arnd Heuser am Max-Delbrück-Centrum Berlin in Zusammenarbeit mit Stefanie Schelenz durchgeführt. Mit Hilfe eines Zweikammer-Plethysmographen wurden Parameter (Tab. 2.2) der basalen Lungenfunktion und der Lungenfunktion bei steigender Konzentration von Methacholin, einer zur Bronchokonstriktion führenden Chemikalie, bestimmt. Die Tiere wurden ohne Narkose in einem Restraîner (Fixiereinheit für Mäuse) fixiert und das in Tabelle 2.2 aufgeführte Protokoll wurde durchgeführt.

Jede Sekunde wurden Messwerte generiert, von denen im Abstand von 5 s ein Mittelwert gespeichert wurde. Mit Hilfe der iox2 Software (iox v2.8.0.13, EMKA Technologies) wurden die Daten analysiert. Daten mit einer "success rate" < 50 % und einer "beat number" < 10 wurden von der Analyse ausgeschlossen, bevor die gespeicherten Daten pro Tier und Methacholindosis nochmals gemittelt wurden.

Tab. 2.1.: Gemessene Parameter im Zweikammer-Plethysmographen.

<b>Parameter</b>		<b>Beschreibung</b>
dT	Time delay	Zeitverzögerung zwischen Signalen der thorakalen und nasalen Strömungen.
EEP	End-expiratory pause	Pause nach dem Ausatmen.
EF50	Mid-expiratory flow	Strömungsrate, wenn das Volumen zur Hälfte ausgeatmet wurde.
EIP	End-inspiratory pause	Pause nach dem Einatmen.
EV	Expired volume	Integral der expiratorischen (positiven) Zeit.
f	Breathing frequency	Atemfrequenz, berechnet über PEF zu PEF oder über $T_i+T_e$ .
MV	Minute volume	Gesamtvolumen der Atmung in einer Minute, berechnet über: $TV \times f$ .
n	Number of beats	Anzahl an Ausschlägen je gemitteltem Zeitabschnitt.
Pau	Pause	Indikator der Bronchokonstriktion, berechnet über: $(T_e/RT - 1)$ .
PEF	Peak expiratory flow	Das positive Maximum der Strömung während einer Atmung.
Penh	Enhanced pause	Einheitsloses Maß, berechnet über: $(T_e/RT - 1) \times (PEF/PIF)$ .
PIF	Peak inspiratory flow	Das negative Maximum der Strömung während einer Atmung.
RT	Relaxation time	Zeit zum Ausatmen eines definierten Anteils des Tidenvolumen.
Sgaw	Specific airway conductance	Reziprok zu Sraw.
Sr	Success rate	Verhältnis von validen Ausschlägen zu gemessenen Ausschlägen je gemitteltem Zeitabschnitt.
Sraw	Specific airway resistance	Atemwiderstand multipliziert mit dem thorakalen Volumen.
$T_e$	Expiratory time	Zeitabschnitt zwischen Beginn der Ausatmung und Beginn der nächsten Einatmung.
$T_i$	Inspiratory time	Zeitabschnitt zwischen Beginn und Ende der Einatmung.
TV	Tidal volume	Integral der inspiratorischen (negativen) Zeit.

**Tab. 2.2.:** Protokoll der Messung im Zweikammer-Plethysmographen.

<b>Zeit</b>	<b>Protokollphase</b>
5 min	Adaptation der Tiere an den Restrainer
4 min	Messung der Basiswerte
1 min	Vernebelung von PBS
4 min	Messung
1 min	Vernebelung von 6,25 $\mu\text{l/ml}$ Methacholin
4 min	Messung
1 min	Vernebelung von 12,5 $\mu\text{l/ml}$ Methacholin
4 min	Messung
1 min	Vernebelung von 25 $\mu\text{l/ml}$ Methacholin
4 min	Messung
1 min	Vernebelung von 50 $\mu\text{l/ml}$ Methacholin
4 min	Messung

### **Lungenspülung (*Bronchoalveolar lavage-BAL*)**

Zur Durchführung einer Lungenspülung wurden Mäuse betäubt (Ketamin [2 mg/30 g Körpergewicht] /Rompun[0,4 mg/30 g]) und durch zervikale Dislokation getötet. Durch die Luftröhre wurde ein Katheter in die Lunge eingeführt, die anschließend insgesamt fünfmal gespült wurde. Die erste Spülung erfolgte mit 0,8 ml kalter PBS-Protease-Inhibitor-Lösung und diente der Analyse von Zytokinen. Die nachfolgenden vier Spülungen wurden mit kaltem PBS durchgeführt, vereinigt und für Zellzählungen verwendet. Die Proben wurden gewogen, zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C) und die Zellpellets pro Tier in 500  $\mu\text{l}$  PBS vereinigt. Der Zellüberstand der ersten Spülung wurde für die Zytokinanalyse bei -20 °C gelagert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zellzählkammer bestimmt. 2x 100  $\mu\text{l}$  der BAL-Zelllösung wurden auf Objektträgern zentrifugiert (112 x g, 10 min, 22 °C) und mit einem DiffQuick-Färbekit gefärbt. Abschließend wurde eine Differential-Zellzählung mit 300 Zellen/Objektträger durchgeführt.

### **Histologie der Lunge**

Lungenstücke wurden in 10 %iger Formalin-Histofix Lösung konserviert und histopathologisch von Dr. Anja Kühl (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Forschungszentrum Immunwissenschaft RCIS) untersucht. Es wurden Gewebeschnitte hergestellt, die mit HE (Hämatoxylin/Eosin), PAS/H oder anti-Relm $\alpha$  Antikörpern gefärbt wurden.



### 2.1.3. Generierung proteinspezifischer Antikörper in der Maus

Für die Generierung von proteinspezifischen Antikörpern [Tierversuchsnummer: H0096/13] wurden 8 Wochen alten BALB/c Mäusen in einem Abstand von sieben Tagen dreimal eine Emulsion aus 20 µg TsES1 und 2 mg Alum intraperitoneal appliziert. Nach insgesamt 4 Wochen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Blut gewonnen. Nach Koagulation des Blutes (ca. 20 min) wurde das Blut zentrifugiert (5 min, 3000 x g, 22 °C), das Serum abgenommen und in Aliquots von 500 µl bei -20 °C eingefroren.

Mit Hilfe des "MapTrap<sup>TM</sup> Kit", das mit einer "HiTrap Protein G HP"-Säule ausgestattet war, wurden nach Angaben des Herstellers IgG Antikörper aus 2 ml Serum gewonnen. Die antikörperhaltigen Elutionsfraktionen wurden gepoolt und gegen PBS dialysiert. Das TsES1-Antiserum und die TsES1-IgG Antikörper wurden für Western Blot Analysen verwendet.

### 2.1.4. Statistische Analysen

Die Experimente wurden mit den jeweils angegebenen Gruppengrößen und Wiederholungen durchgeführt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software (v7) durchgeführt, wobei der Kruskal-Wallis Test (Dunn's multiple comparisons test), Mann-Whitney Test oder t-Test zur Datenanalyse verwendet wurde. Statistische Signifikanz wurde durch \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  gekennzeichnet.

## 2.2. Immunologische Methoden

### 2.2.1. *Enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA

#### Gesamt- und antigenspezifische Antikörperlevel im Serum

Die Konzentration von Maus-IgG, IgG1, und IgE im Serum wurde wie nachfolgend beschrieben ermittelt. Dazu wurden Antikörper gegen die verschiedenen Maus-Antikörperklassen im jeweiligen Coating-Puffer verdünnt (Tab. 2.3). Eine 96-Well Platte wurde pro Well mit 50 µl der jeweiligen Antikörperlösung beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 200 µl/ Well Blockpuffer (PBS, 3 % BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach Antikörperklasse wurde das Serum in Blockpuffer verdünnt und nach der Blockierungsphase für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf der Platte inkubiert. Gleichzeitig wurde eine Standardreihe mit definierten Immunglobulinkonzentrationen zu den untersuchten Antikörperklassen angelegt. Es folgten drei Waschschritte und anschließend wurden die jeweiligen Detektionsantikörper in Blockpuffer verdünnt. HRP- oder AP-konjugierte Detektionsantikörper wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf

der Platte inkubiert. Die Substratlösung für das jeweilige Enzym wurde auf die Platte gegeben (Tab. 2.4). Nach 20-30 min wurde die Reaktion mit der jeweiligen Stopplösung beendet und die Absorption bei 450/570 nm gemessen.

Für die Bestimmung von Ovalbumin (OVA)-spezifischen Antikörpern wurde die Platte mit OVA (25 µg/ml in PBS) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde dem obigen Protokoll gefolgt, jedoch wurde als Standardreihe ein Serumpool von OVA-behandelten Tieren verwendet, der in 1:2-Verdünnungsschritten auf die Platte gegeben wurde.

**Tab. 2.3.:** Zusammensetzung ELISA Coating Puffer.

Name	Chemikalie	Endkonzentration
Phosphat-Puffer (pH 6,5)	Aqua dest.	-
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4 % [w/v]
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 % [w/v]
Carbonat-Puffer (pH 9,5)	Aqua dest.	-
	NaHCO <sub>3</sub>	0,84 % [w/v]
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,01 % [w/v]

**Tab. 2.4.:** Zusammensetzung der Substrat- und Stopplösungen.

Enzym	Substratlösung	Stopplösung
HRP (IgE)	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)-Tablette in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer (0,05 M)	1 M Schwefelsäure
AP (IgG, IgG1)	p-Nitrophenyl Phosphat in 10 ml Carbonat-Puffer, 1 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM EDTA in Aqua dest.

### Bestimmung von Zytokinen

Die Konzentration von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe der "OptEIA ELISA Kits" bzw. "Ready-Set-GO! ELISA Kits" nach Herstellerangaben bestimmt. Abweichend vom Protokoll wurden 50 µl je Probe und Standard pro Well eingesetzt. Es wurden folgende Zytokine bestimmt: Maus IL-4, IL-6, IL-10 IL-12p40, IFN $\gamma$ .

Für die Bestimmung der Zytokine und Chemokine in der Lungenspülung wurde das "26-Plex Mouse ProcartaPlex<sup>TM</sup> Panel 1" verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben für Zellkulturüberstände gearbeitet, am MAGPIX<sup>TM</sup> Luminex System gemessen und zur Auswertung die Software "Procarta Plex<sup>TM</sup> Analyst 1.0" verwendet. Als Probenvolumen wurden 50 µl je Probe und Standard pro Well eingesetzt.

### 2.2.2. Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können verschiedene Zellpopulationen nach ihrer Größe, Granularität und Molekülexpression identifiziert werden. Dazu werden Oberflächenmarker und intrazelluläre Moleküle der Zellen spezifisch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt.

Für die Färbung von Oberflächenmarkern wurden  $3\text{-}20 \times 10^5$  Zellen in  $50 \mu\text{l}$  FACS-Puffer (Tab. 2.5) resuspendiert und bei  $4^\circ\text{C}$  für 20 min mit den jeweiligen Antikörpern (Tab. 2.36) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in  $100 \mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen. Intrazelluläre Färbungen erfolgten mit dem ‘‘FoxP3-Staining Kit‘‘ nach Herstellerangaben. Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem BD FACSCanto<sup>TM</sup> II und der FlowJo Software 9.8.3. Als Kontrollen und Kompensationshilfen wurden Einzelfärbungen, *Fluorescence Minus One* (FMO) Färbungen und eine ungefärbte Probe mitgeführt.

**Tab. 2.5.:** Zusammensetzung FACS-Puffer.

Chemikalie	Endkonzentration
DPBS	-
EDTA	2 mM
BSA	0,5 % [w/v]

## 2.3. Methoden der Zellkultur

### 2.3.1. Isolation von Zellen aus dem Knochenmark

Knochenmark für die Differenzierung von dendritischen Zellen wurde aus dem Wadenbein und Schienbein der beiden Hinterläufe von weiblichen Balb/c Mäusen gewonnen [Tierversuchsnummer: T0097/16]. Dazu wurden den Tieren nach zervikaler Dislokation die Hinterbeine entfernt und diese von Haut und Muskeln befreit. Die gereinigten Knochen wurden in 70 % Ethanol desinfiziert, in PBS gewaschen und die beiden Enden der Knochen abgetrennt. Eine mit cRPMI Medium (siehe Tab. 2.6) gefüllte Spritze wurde unter Verwendung einer 27G Kanüle eingesetzt, um das Knochenmark aus dem Knochen in eine Petrischale zu spülen. Durch mehrmaliges Pipettieren mit einer Pasteurpipette wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, die über einen  $70 \mu\text{m}$  Filter von möglichen Knochenteilen getrennt und in ein 50 ml Röhrchen überführt wurde. Nach Zentrifugation ( $300 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) und Lyse der Erythrozyten (Tab. 2.7) wurden die Zellen mit cRPMI Medium gewaschen und die Zellzahl am Casy<sup>TM</sup> System bestimmt.

**Tab. 2.6.:** Zusammensetzung von Zellkulturmedien.

<b>Name</b>	<b>Chemikalie</b>	<b>Endkonzentration</b>
cRPMI	RPMI1640	
	Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
	L-Glutamin	2 mM
	FBS	10 % [v/v]
wRPMI	RPMI1640	
	Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
cDMEM	DMEM	
	Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
	FBS	10 % [v/v]
cDMEM/F12	DMEM/F12	
	Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
	FBS	10 % [v/v]
mangel-DMEM/F12	DMEM/F12	
	Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml

**Tab. 2.7.:** Zusammensetzung Lyse-Puffer(pH 7,5).

<b>Chemikalie</b>	<b>Endkonzentration</b>
KHCO <sub>3</sub>	0,01 M
NH <sub>4</sub> Cl	0,155 M
EDTA	0,1 M

### 2.3.2. Generierung von murinen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Eine Einzelzellsuspension aus Knochenmarkszellen wurde wie unter Abschnitt 2.3.1 hergestellt und auf  $5-6 \times 10^5$  Zellen/ml in cRPMI Medium (siehe Tab. 2.6) eingestellt. Mehrere Petrischalen mit je 10 ml der Zellsuspension wurden mit dem murinen Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF, 20 ng/ml Endkonzentration) für insgesamt sechs Tage inkubiert. Nach drei Tagen wurde die Zelldifferenzierung und -proliferation am Mikroskop überprüft und weitere 10 ml cRPMI Medium mit 20 ng/ml GM-CSF je Petrischale hinzugefügt. Am sechsten Tag wurden die nicht-adhärenenten Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein 50 ml Röhrchen überführt, gewaschen und die Zellzahl am Casy<sup>TM</sup> System bestimmt.

### 2.3.3. Stimulation dendritischer Zellen

Für den Stimulationsversuch wurden  $2 \times 10^5$  dendritische Zellen/Well in eine 96-Well Platte verteilt und in Doppelbestimmung mit 10 µg/ml rekombinantem *T. suis* ES Protein für 2,5 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS oder 1 µM CpG für 20 h stimuliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte, *toll like receptor* (TLR)-stimulierte oder nur mit rekombinanten *T. suis* ES Proteinen behandelte dendritische Zellen. Als weitere Kontrolle

wurde gereinigter Kulturüberstand von untransfizierten Leishmanien-Zellen verwendet. Dieser wurde in dem höchsten Volumen eingesetzt, das für das TsES Protein mit der geringsten Proteinkonzentration verwendet wurde. Die Zellkulturüberstände wurden zur Bestimmung von Zytokinen gesammelt (siehe Abschnitt 2.2.1) und die Expression von Oberflächenmarkern wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitt 2.2.2).

#### **2.3.4. Generierung von murinen Makrophagen aus dem Knochenmark**

Eine Einzelzellsuspension aus Knochenmarkzellen wurde wie unter Abschnitt 2.3.1 hergestellt und auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in cRPMI Medium (siehe Tab. 2.6) eingestellt. Mehrere Petrischalen mit je 10 ml der Zellsuspension wurden mit dem murinen Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF, 10 ng/ml Endkonzentration) für insgesamt sieben Tage differenziert. Nach drei Tagen wurde die Zelldifferenzierung und -proliferation am Mikroskop überprüft und weitere 10 ml cRPMI Medium mit 10 ng/ml M-CSF je Petrischale hinzugefügt. Am siebten Tag wurden die adhärennten Makrophagen mit 5 ml PBS gewaschen und mit 5 ml PBS-EDTA (2 mM) für 10 min bei 4 °C inkubiert. Mit Hilfe von Zellschabern wurden die adhärennten Zellen von den Petrischalen gelöst und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden gewaschen und die Zellzahl am Casy<sup>TM</sup> System bestimmt.

#### **2.3.5. Differenzierung von murinen AAMs aus dem Knochenmark**

Um zu untersuchen ob das rekombinante Protein TsES1 einen Einfluss auf die Differenzierung von murinen AAMs hat, wurde die klassische Differenzierung von Makrophagen zu AAMs über IL-4 in An- oder Abwesenheit von TsES1 durchgeführt. Dazu wurden  $6 \times 10^5$  Makrophagen in eine 12-Well Platte mit 1 ml cRPMI verteilt und konnten sich 1 h absetzen. Anschließend wurden 2,5/ 5/ 10 µg/ml rekombinantes TsES1 für 2 h zu den Zellen gegeben und dann mit oder ohne 10 ng/ml IL-4 für 18 h zu AAMs differenziert. Am Ende wurden die Zellen gewaschen und die mRNA mit Hilfe des "MicroSpin Total RNA Kit, peqGOLD" nach Herstellerangaben für RT-PCR Analysen isoliert.

#### **2.3.6. Isolation von Immunzellen aus peripheren lymphatischen Organen**

Für die Analyse der T-Zell-Proliferation wurden die Milz, die axillären und inguinalen Lymphknoten von Balb/c bzw. Do.11.10 Mäusen präpariert und wie nachfolgend beschrieben, weiter behandelt. Für die Analyse der T-Zellpopulationen in asthmatischen Mäusen wurden die Milz und die peribronchialen Lymphknoten (*peribronchial lymph node*-PBLN) für die Isolation von B- und T-Zellen verwendet.

Dazu wurden die Lymphknoten und die Milz unter aseptischen Bedingungen aus Mäusen nach zervikaler Dislokation isoliert. Die Organe wurden über einen 70  $\mu\text{m}$  Filter mit Hilfe des Stempels einer 3 ml-Spritze in ein 50 ml Röhrchen gedrückt. Durch regelmäßiges Spülen mit cRPMI Medium entstand eine Einzelzellsuspension, die anschließend zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C) wurde. Die Zellen wurden mit cRPMI Medium gewaschen und die Zellzahl am Casy<sup>TM</sup> System bestimmt. Bei der Milzzellsuspension wurde zusätzlich die Lyse der Erythrozyten durchgeführt.

### 2.3.7. Analyse der antigenabhängigen und -unabhängigen T-Zell-Proliferation

Um die T-Zell-Proliferation messen zu können, wurden isolierte T-Zellen mit CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester) angefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich an intrazelluläre Proteine an, beeinflusst dabei keine Zellfunktionen und wird bei der Zellteilung zur Hälfte an die Tochtergeneration weitergegeben. Dadurch lassen sich die Zellteilungen am Durchflusszytometer analysieren.

Für die antigenunabhängigen Proliferationsversuche wurden 96-Well Platten mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3 und anti-CD28 in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Milz sowie die axillären und inguinalen Lymphknoten einer naiven Balb/c Maus entfernt und wie im Abschnitt 2.3.6 beschrieben, zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Anschließend wurden  $3\text{-}5 \times 10^7$  dieser Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  CFSE für 8 min im Dunkeln angefärbt, zweimal mit cRPMI gewaschen und auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Die über Nacht beschichteten Platten wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit  $4 \times 10^5$  CFSE gefärbten Zellen/Well befüllt. Gleichzeitig wurden 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  je TsES Protein und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD28 zu den Wells gegeben. Jedes Well wurde auf ein Endvolumen von 250  $\mu\text{l}$  mit cRPMI Medium aufgefüllt und für 4 Tage bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden zur Bestimmung von Zytokinen gesammelt (siehe Abschnitt 2.2.1) und die T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitt 2.2.2).

Für die antigenabhängigen Proliferationsversuche wurden, wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben, murine DCs generiert. Anschließend wurden  $1 \times 10^5$  DCs/Well in einer 96-Well Platte für 24 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  je TsES Protein stimuliert und am nächsten Tag mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ovalbumin (OVA) für 6 h inkubiert. Die Milz und Lymphknoten einer OVA-transgenen Do.11.10 Maus wurden, wie im Abschnitt 2.3.6 beschrieben, aufbereitet. Anschließend wurden  $\text{CD4}^+$  T-Zellen mit Hilfe des "CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit" nach Herstellerangaben isoliert und mit 5  $\mu\text{M}$  CFSE angefärbt.

Abschließend wurde die Ko-Kultur von OVA-beladenden DCs und  $4 \times 10^5$  CFSE gefärbten CD4<sup>+</sup> T-Zellen/Well in 250  $\mu$ l cRPMI für 5 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden zur Bestimmung von Zytokinen gesammelt (siehe Abschnitt 2.2.1) und die T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitt 2.2.2).

### 2.3.8. Analyse regulatorischer B-Zellen

Regulatorische B-Zellen sind durch die Expression des Zytokins IL-10 gekennzeichnet, das von den B-Zellen nach Stimulation hergestellt und sekretiert wird. Daher ist vor der Analyse von regulatorischen B-Zellen am Durchflusszytometer die Stimulation der Zellen notwendig.

Diese Methode wurde für die PBLN der Lunge des *in vivo* Modells der allergischen Atemwegserkrankung eingesetzt. Dabei wurden  $2,5 \times 10^6$  Milzzellen bzw.  $2 \times 10^6$  PBLN Zellen in jeweils 500  $\mu$ l cRPMI Medium in eine 24-Well Platte gegeben. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 10  $\mu$ g/ml LPS für 5 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Es wurde eine unstimulierte Kontrolle je Gruppe mitgeführt. Nach den ersten 30 min wurden 2  $\mu$ M Monensin zu jedem Ansatz gegeben, um die Sekretion der hergestellten Proteine zu verhindern. Am Ende der Stimulation wurden die Zellen gewaschen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitt 2.2.2).

### 2.3.9. Analyse der durch Serummangel induzierten Apoptose

Es sollte untersucht werden, ob durch die Inkubation mit dem rekombinanten *T. suis* Protein TsES1 die mangelinduzierte Apoptose in humanen Epithelzellen reduziert werden kann. Dazu wurde die humane Epithelzelllinie A549 verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Karsten Tedin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin).

Die adhärennten A549-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit cDMEM/F12 Medium (siehe Tab. 2.6) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit angewärmtem PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02% in PBS) für 3 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcontube überführt, zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C) und gewaschen sowie die Zellzahl am Casy<sup>TM</sup> System bestimmt. Für den Apoptoseversuch wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Medium ohne FBS (mangel-DMEM/F12, Tab. 2.6) in eine 12-Well-Platte verteilt, wohingegen als Kontrolle cDMEM/F12 verwendet wurde. Nachdem die Zellen sich für 1 h abgesetzt hatten, wurden sie mit 5, 10 oder 20  $\mu$ g/ml TsES1 für 3 Tage bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden gewaschen und wie zuvor beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Analyse der Apoptose erfolgte mit Hilfe des “Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC“ unter Verwendung des Protokolls “Annexin V Staining“ mit anschließender Detektion der Zellen am Durchflusszytometer.

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1. Extraktion von total RNA aus Lungengewebe

Um die Genexpression bestimmter Zytokine, Chemokine und Proteine der Lunge analysieren zu können, wurde RNA aus dem Lungengewebe der Maus isoliert. Dazu wurden Lungenstücke mit Hilfe von Flüssigstickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Isolation gelagert.

Die total RNA wurde mit dem “innuPREP RNA Mini Kit“ nach Protokoll 1-Angaben extrahiert. Dazu wurden die aufgetauten Lungenstücke der Maus gewogen und maximal 20 mg für eine RNA-Extraktion verwendet. Das Lungengewebe wurde mit 500  $\mu\text{l}$  RL-Lysepuffer in “innuSPEED Lysis Tubes“ mit Hilfe eines Homogenisators aufgeschlossen (40 s bei 6 M/s) und dem Isolationsprotokoll folgend weiter behandelt. Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt und die RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.2. Genspezifische Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Um die genspezifische RT-PCR durchführen zu können, wurde aus mRNA der total Lungen-RNA mit dem “High-Capacity RNA-to-cDNA<sup>TM</sup> Kit“ cDNA hergestellt. Bis zu 2  $\mu\text{g}$  RNA wurden pro Reaktionsmix eingesetzt und mit dem Enzym-/Puffer-Mix des Kits gemischt. Der Reaktionsmix mit einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 60 min inkubiert und anschließend bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 min inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Die RT-PCR wurde mit Hilfe des “LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master-Kits“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden pro Reaktion 5  $\mu\text{M}$  je Primer und 10 ng cDNA mit PCR-Wasser und dem Master-Mix gemischt. In einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  erfolgte die RT-PCR am LightCycler<sup>®</sup> 480 mit den in Tabelle 2.33 aufgelisteten Primern. Es wurden Doppelbestimmungen je Primerpaar durchgeführt und das in Tabelle 2.8 aufgeführte Programm verwendet.

Für die Analyse wurde die “LightCycler<sup>®</sup> 480 Relative Quantification Software“ verwendet. Als Referenzgen wurde das Gen der *Peptidylprolyl-Isomerase A*- PPIA verwendet und auf jeder 96-Well Platte für jede Probe mitgeführt. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit dem Effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodell [Pfaffl, 2001].



**Tab. 2.8.:** RT-PCR-Programm.

Programmpunkt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
40-50 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	60 °C	30 s
Elongation	72 °C	20 °C
Finale Schmelzkurvenanalyse	von 60 °C auf 95 °C	-
Abkühlung	40 °C	∞

### 2.4.3. Gewinnung und Kultivierung von *Trichuris suis* Larven

Für die Identifizierung von sekretierten *Trichuris suis* (*T. suis*) L1 Proteinen wurden die Larven von *T. suis* Eiern wie nachfolgend beschrieben *in vitro* zum Schlüpfen gebracht. Die *T. suis* Eier wurden bereitgestellt von OVAMED (Ovamed GmbH, Barsbüttel, Deutschland) und pro Ansatz wurden 250 000 *T. suis* Eier verwendet. Die Lösung mit den *T. suis* Eiern wurde in einem 50 ml Röhrchen zentrifugiert (300 x g, 10 min, 22 °C) und der Überstand wurde bis auf 8 ml abgenommen. Diese Eiersuspension wurde mit einer Natriumhypochlorid-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 3% aufgefüllt und für 45 min bei 37 °C / 5% CO<sub>2</sub> unter regelmäßigem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Eiersuspension mit Wurmmedium (Tab. 2.9) bis auf 45 ml aufgefüllt und zentrifugiert (300 x g, 10 min, 22 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet weitere dreimal in 45 ml Wurmmedium gewaschen.

Die Eier wurden mit Hilfe einer McMaster Zählkammer gezählt und 40 000-50 000 Eier pro Well in einer 24-Well Platte mit 1 ml Wurmmedium kultiviert. Alle zwei Tage wurde die Anzahl geschlüpfter Larven kontrolliert und das Medium abgenommen, gepoolt und durch einen 0,2 µm Sterilfilter gereinigt. Dieser *T. suis* L1 Kulturüberstand wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen gesammelt und bei -20 °C eingefroren.

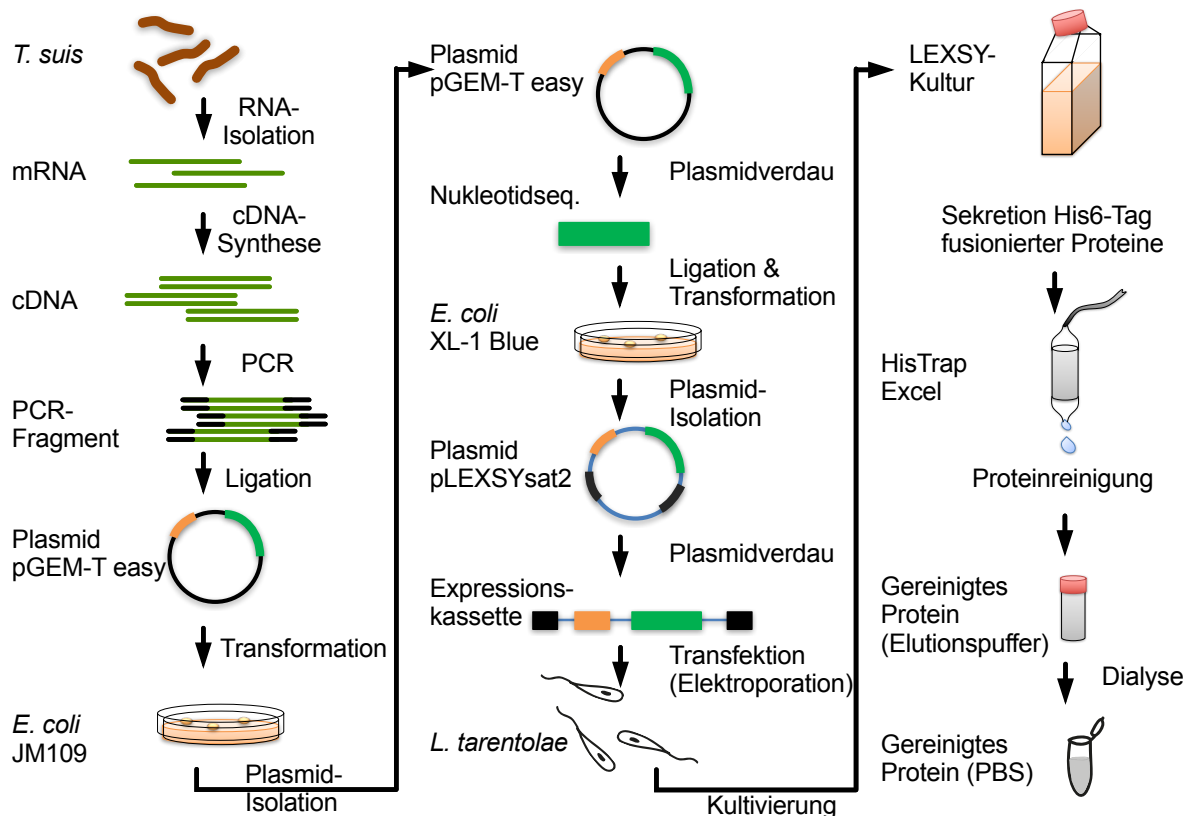
**Tab. 2.9.:** *Trichuris suis* Wurmmedium.

Chemikalie	Endkonzentration
RPMI 1640	-
L-Glutamin	2 mM
Pen/Strep	100 U/ml / 100 µg/ml
Glucose	1% [v/v]

#### 2.4.4. Proteinfällung zur Analyse per Massenspektrometrie

Der gesammelte Kulturüberstand der *T. suis* L1 Larven sollte auf die darin enthaltenen sekretierten Proteine untersucht werden. Dazu wurden die Proteine des gesammelten Kulturüberstandes mit Trichloressigsäure (16,6 % Endkonzentration) über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Die ausgefallenen Proteine wurden pelletiert (20200 xg, 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und das Proteinpellet zweimal mit 1 ml 100 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Proteinpellet wurde von der Arbeitsgruppe Bioanalytik, Massenspektrometrie (Dr. Katharina Janek, Biochemie, Charité, Berlin) mit Hilfe der Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie (LC-MS/MS) untersucht.

#### 2.4.5. Extraktion von total RNA aus *Trichuris suis* Würmern und Larven



**Abb. 2.2.: Schema der Klonierung und Proteinexpression mit dem Leishmanien Expressionssystem**

Schematischer Ablauf der Klonierung und Proteinexpression mit dem Leishmanien Expressionssystem (LEXSY) beginnend mit der RNA-Isolation aus *T. suis* Würmern (Abschnitt 2.4.5), cDNA-Synthese (Abschnitt 2.4.6), genspezifischer PCR (Abschnitt 2.4.7), Ligation und Transformation in *E. coli* JM109 (Abschnitt 2.4.9), Restriktionsenzymverdau (Abschnitt 2.4.13), Ligation und Transformation in *E. coli* XL-1Blue (Abschnitt 2.4.14), Gewinnung der Expressionskassette (Abschnitt 2.4.15), Transfektion von *L. tarentolae* (Abschnitt 2.4.17) bis zur Reinigung rekombinanter Proteine (Abschnitt 2.5).

Um ausgewählte, sekretierte Proteine der *T. suis* L1 Larven rekombinant herstellen zu können, wurde als Ausgangsmaterial für die Klonierung RNA aus *T. suis* Würmer bzw. L4 Larven gewonnen (Abb. 2.2). Die total RNA wurde mit dem “innuPREP RNA Mini Kit“ nach Protokoll 1-Angaben extrahiert. Dazu wurden adulte *T. suis* Würmer bzw. L4 Larven in Flüssigstickstoff gefroren und mit Hilfe eines Pistill grob zerkleinert. Die Probe wurde mit 500 µl RL-Lysepuffer in innuSPEED Lysis Tubes mit Hilfe eines Homogenisators aufgeschlossen (40 s bei 6 M/s) und dem Isolationsprotokoll folgend weiter behandelt. Die RNA Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt und die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

#### 2.4.6. cDNA-Synthese aus mRNA von *Trichuris suis*

Im nächsten Schritt wurde cDNA aus mRNA der isolierten total RNA von *T. suis* Würmern synthetisiert. Dazu wurde die cDNA-Synthese mit dem “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit“ und dem PCR-Cycler “Mastercycler<sup>®</sup> Nexus“ durchgeführt. Der Primermix (Tab. 2.10) wurde bei 65 °C für 10 min inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Der anschließend hergestellte Reaktionsmix (Tab. 2.10) wurde bei 55 °C für 30 min inkubiert und danach bei 85 °C für 5 min inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

**Tab. 2.10.:** Reaktionslösungen zur cDNA Herstellung.

Name	Substanz	Menge
Primermix	RNA	1 µg
	Oligo(dT)-Primer	1 µl
	PCR Wasser	ad. 13 µl
Reaktionsmix	Primermix	13 µl
	Reverse Transkriptase (RTase)	1 µl
	RTase-Puffer	13 µl
	Ribonuklease (RNase) Inhibitor	4 µl
	dNTP-Lösung	0,5 µl

#### 2.4.7. Genspezifische Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um ausgewählte *T. suis* ES Proteine klonieren zu können, wurde deren spezifische Nukleotidsequenz amplifiziert (Sek. B). Dazu wurden genspezifische Primer (Tab. 2.33) verwendet, die die jeweilige Nukleotidsequenz der Signalpeptide ausschlossen.

Im PCR-Cycler “Mastercycler<sup>®</sup> Nexus“ wurde der Reaktionsmix (Tab. 2.11) dem PCR-Programm (Tab. 2.12) folgend behandelt.

**Tab. 2.11.:** Reaktionslösung der genspezifischen PCR.

Name	Substanz	Menge
Reaktionsmix	MgCl <sub>2</sub>	2 µl
	dNTP-Mix	2 µl
	10xPuffer	5 µl
	Forward-Primer	1 µl
	Reverse-Primer	1 µl
	Taq-Polymerase	0,5 µl
	cDNA	3,5 µl
	PCR-Wasser	35 µl

**Tab. 2.12.:** PCR-Programm.

Genspezifische Temperaturen und Zeiten sind in Tabelle 2.13 aufgeführt.

Programmpunkt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	30-60 s
Annealing	genspezifisch	30 s
Elongation	72 °C	genspezifisch
Finale Elongation	72 °C	10 min
Abkühlung	4 °C	∞

**Tab. 2.13.:** Genspezifische PCR-Bedingungen.

Sequenzgröße (ohne Primer), Annealing-Temperatur ( $T_A$ ) und Elongationsdauer ( $t_E$ ) der jeweiligen TsES Proteine sind aufgeführt.

Name	Sequenz (bp)	$T_A$ (°C)	$t_E$ (min)
TsES1	1464	58	1,5
TsES4	345	55	0,3
TsES5	1032	52	1,0
TsES6	996	52	1,0
TsES8	372	55	0,5
TsES9	804	50	1,0

### 2.4.8. DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel

Um mit den hergestellten PCR-Produkten die Klonierung fortzuführen, wurden sie über ein Agarosegel gereinigt und anschließend extrahiert. Dazu wurden die jeweiligen PCR-Produkte parallel zu einem 2-Log DNA Marker in einem 1 %igen TAE Agarosegel (Tab. 2.14) der Größe nach bei 120 V aufgetrennt. Das 1 %ige TAE Agarosegel enthielt den DNA-bindenden Farbstoff Midori Green Advance, welches das PCR-Produkt im Geldokumentationssystem unter UV-Licht sichtbar macht. Das PCR-Produkt der jeweiligen Größe wurde ausgeschnitten und unter Verwendung des “innuPREP Gel Extraction Kit“ isoliert. Die DNA-Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt.

**Tab. 2.14.:** Zusammensetzung eines 1 %igen TAE Agarosegels.

Chemikalie	Endkonzentration
Aqua dest.	-
Tris	0,4 M
EDTA (0,5 M, pH 8)	2 % [v/v]
Eisessig	1,14 % [v/v]
Agarose	1 % [w/v]

### 2.4.9. Ligation von PCR-Produkt und Plasmid mit anschließender Transformation

Das “pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I“ wurde verwendet, um nach Herstellerprotokoll das spezifische PCR-Produkt mit dem pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector zu ligieren. Anschließend wurde das Plasmid in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 Zellen über einen Hitzeschock (42 °C für 50 s) im Thermomixer transformiert. 100 µl der Transformationskultur wurden auf einer LB/AMP/IPTG/X-Gal Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Da das verwendete Plasmid einen Resistenzmarker gegen Ampicillin enthielt, der nur bei erfolgreicher Ligation exprimiert wurde, konnten nur plasmidhaltige *E. coli* JM109 Zellen auf den Platten wachsen.

**Tab. 2.15.:** Nährmedien zur Kultivierung von *Escherichia coli* JM109 und XL-1 Blue.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Agar	1 L 1,2 % [w/v]
LB-Medium <sup>1</sup>	1 % [w/v] 0,5 % [w/v] 42,78 mM ad. 1 L
	LB-Medium Agar Kobe I Trypton Hefeextrakt NaCl Aqua dest.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
SOC-Medium <sup>2</sup>	475 ml	Aqua dest.
	10 g	Trypton
	2,5 g	Hefeextrakt
	0,25 g	NaCl
	5 ml	KCl (250 mM)
	10 ml	Glukose (1 M)
	2,5 ml	MgCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O (2 mM)

<sup>1</sup> Agar Kobe I und LB-Medium bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Anschließend sterile Antibiotika hinzugefügt.

<sup>2</sup> Trypton, Hefeextrakt, NaCl und KCl in Aqua dest. gelöst, pH 7.0 eingestellt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Anschließend sterile Glukose und steriles MgCl<sub>2</sub> hinzugefügt.

#### 2.4.10. Kolonie-PCR von *Escherichia coli* Zellen

Die Transformation der *E. coli* JM109 Zellen mit dem jeweiligen Vektor wurde mit Hilfe einer sogenannten Kolonie-PCR überprüft. Zellmaterial einer Einzelkolonie wurde mit einem PCR-Reaktionsmix vermischt. Wie im Abschnitt 2.4.7 beschrieben, wurde das spezifische PCR-Produkt amplifiziert, im 1%igen TAE Agarosegel aufgetrennt und im Geldokumentationssystem unter UV-Licht sichtbar gemacht.

#### 2.4.11. Plasmidisolierung aus einer *Escherichia coli* Flüssigkultur

In einem nächsten Schritt wurden verifizierte *E. coli* Einzelkolonien in einer 5-10 ml LB-Medium Flüssigkultur mit den jeweiligen Antibiotika über Nacht vermehrt. Die Plasmide wurden mit Hilfe des "innuPREP Plasmid Mini Kit" gemäß Herstellerangaben isoliert und die Plasmid-Konzentration am NanoDrop bestimmt. Es wurden 2 µg für die Sequenzierung und 2-4 µg für einen Restriktionsenzymverdau benötigt.

#### 2.4.12. Sequenzierung von Plasmiden

Um zu überprüfen, ob die Nukleotidsequenz der Gene in den Plasmiden mit den gewünschten Nukleotidsequenzen übereinstimmen, wurden die Plasmide sequenziert. Die Sequenzierung der spezifischen Nukleotidsequenz der gereinigten pGEM<sup>®</sup>-T Easy Plasmide erfolgte durch die Firma LGC Genomics (Berlin, Deutschland) mit Hilfe der Primer T7prom und SP6-20. Bei Verifizierung der Nukleotidsequenz des sequenzierten Plasmids wurden von dem entsprechenden *E. coli* JM109 Klon Glycerolstocks (Endkonzentration 8% Glycerin) eingefroren. Außerdem wurden die Plasmide des *E. coli* JM109 Klons aus einer Flüssigkultur für den Restriktionsenzymverdau isoliert.

### 2.4.13. Spezifischer Restriktionsenzymverdau von Plasmiden

Der Verdau der pGEM<sup>®</sup>-T Easy und der pLEXSYsat2 Plasmide wurde mit spezifischen Restriktionsenzymen durchgeführt. 2 µg des jeweiligen Plasmids wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit je 2 µl der Restriktionsenzyme KpnI-HF<sup>™</sup> und SalI-HF<sup>™</sup> bei 37 °C für 30 min inkubiert. Abweichend davon wurde für das Protein TsES1 anstelle von KpnI-HF<sup>™</sup> das Restriktionsenzym XhoI verwendet. Der Ansatz wurde in einem 1 %igen TAE Agarosegel getrennt. Wie im Abschnitt 2.4.8 beschrieben, wurde das spezifische Insert mit der Gensequenz bzw. das geschnittene Plasmid pLEXSYsat2 aus dem Gel isoliert.

### 2.4.14. Ligation der spezifischen Gensequenz mit dem Plasmid pLEXSY-sat2 und Transformation

50 ng des geschnittenen pLEXSY-sat2 Plasmids wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit dem Insert in einem Insert-Plasmid-Verhältnis von 3:1 für 1 h bei Raumtemperatur in Anwesenheit der T4 DNA Ligase inkubiert. Dieser Ligationsansatz wurde mit 100 µl *E. coli* XL-1 Blue Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mit einem Hitzeschock bei 42 °C für 50 s und einer anschließenden Inkubation von 2 min auf Eis. Die transformierten Zellen wurden mit 900 µl sterilem SOC Medium (siehe Tab. 2.15) vermischt und anschließend bei 37 °C und 400 rpm für 90 min inkubiert. 200 µl der Transformationskultur wurden auf LB/Ampicillin/Tetracyclin Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Da das verwendete Plasmid einen Resistenzmarker gegen Ampicillin enthielt und die *E. coli* XL-1 Blue Zellen eine Tetracyclinresistenz tragen, konnten nur plasmidhaltige *E. coli* Zellen auf den Platten wachsen.

### 2.4.15. Gewinnung einer Expressionskassette

Die entstandenen pLEXSY-sat2 Plasmide enthielten eine sogenannte Expressionskassette, die für die Transfektion benötigt wird und die jeweilige Gensequenz der Proteine sowie ein *Nourseothricin*- (NTC-) Resistenzgen trägt. Deshalb wurden die Plasmide der transfizierten *E. coli* XL-1 Blue Zellen isoliert (siehe 2.4.11). 4 µg der Plasmide wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 2 µl des Restriktionsenzym SwaI bei 25 °C für 1 h verdaut. Der Ansatz wurde in einem 1 %igen TAE Agarosegel getrennt, sodass die Expressionskassette wie im Abschnitt 2.4.8 beschrieben aus dem Gel isoliert werden konnte.

### 2.4.16. Kultivierung von *Leishmania tarentolae*

Die *Leishmania tarentolae* (*L. tarentolae*) Zellen wurden dem LEXSYcon2 Expressions Kit entnommen und nach Angaben des Herstellers kultiviert. Als Nährmedium wurde ein *Brain Heart Infusion* (BHI) Medium verwendet, welches nach Angaben des Herstellers angesetzt wurde (siehe Tab. 2.16). Die *L. tarentolae* Kultur wurde bei 26 °C gehalten und zweimal pro Woche verdünnt.

Das Medium von transfizierten *L. tarentolae* Kulturen wurde zusätzlich mit 0,01 % [w/v] NTC versetzt. Damit wurde erreicht, dass nur die *L. tarentolae* Zellen, die eine Expressionskassette mit Proteingen und NTC-Resistenzgen integriert haben, wachsen können.

**Tab. 2.16.:** Nährmedien zur Kultivierung von *Leishmania tarentolae*.

Bezeichnung	Zusammensetzung
BHI-Medium <sup>1</sup>	1 L 3,7 % [w/v] 0,5 % [v/v] 0,2 % [v/v]
BHI-Agar <sup>2</sup>	100 ml 3,7 % [w/v] 1 % [v/v] 0,2 % [v/v] 4 % [v/v] 10 % [v/v] 1 % [w/v]
	Aqua dest. LEXSY BHI <i>powder</i> Pen-Strep Hemin Aqua dest. LEXSY BHI <i>powder</i> Pen-Strep Hemin 1 M HEPES (pH 7,4) iFCS Agar Kobe I

<sup>1</sup> BHI *powder* in Aqua dest. gelöst und bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Anschließend steriles Pen-Strep und Hemin hinzugefügt.

<sup>2</sup> Doppelte Menge BHI *powder* in Aqua dest. gelöst und bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Anschließend steriles Pen-Strep, Hemin, HEPES und iFCS hinzugefügt. Sterile Agarlösung von 2 % [w/v] auf 55 °C temperiert und mit dem BHI-Medium 1:2 gemischt. 25 ml des BHI-Agar pro Platte verwendet, 10 min getrocknet und mit einer Nitrocellulosemembran bedeckt. Angesetzte Agarplatten am selben Tag verwendet.

### 2.4.17. Transfektion von *Leishmania tarentolae*

Für die Transfektion von *L. tarentolae* Zellen wurde eine 10 ml Leishmanienkultur ( $OD_{600}:1,2-1,4$ ) pelletiert (2000 x g, 5 min, 22 °C) und 5 ml des Überstandes abgenommen. Das Zellpellet wurde im restlichen Medium suspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde zentrifugiert (2000 x g, 5 min, 22 °C) und der Überstand abgenommen. Die Transfektion erfolgte mit dem “Amaxa<sup>TM</sup> Human T cell Nucleofector<sup>TM</sup> Kit“. Dazu wurde das Zellpellet in 82 µl Nucleofector Solution mit 18 µl Supplement-1 suspendiert und mit 3 µg der Expressionskassette vermischt. Die gesamte Lösung wurde in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und unter Verwendung des Programms U33 des Nucleofector<sup>®</sup> II-Gerätes erfolgte die Transfektion.



Die Elektroporationsküvette wurde für 5 min auf Eis inkubiert und die transfizierten Zellen wurden in 10 ml BHI Medium überführt. Die Zellsuspension wurde in belüfteten Kulturflaschen über Nacht bei 26 °C inkubiert.

#### **2.4.18. Polyklonale und monoklonale Selektion transfizierter *Leishmania tarentolae* Kulturen**

Die transfizierte *L. tarentolae* Kultur wurde nach 24 h mit NTC (0,01 % [w/v]) versetzt und deren Wachstum über die nächsten Tage beobachtet. Die Kultur wurde anschließend regelmäßig zweimal pro Woche in NTC-haltigem BHI Medium verdünnt.

Eine monoklonale Selektion wurde auf BHI Agar Platten (siehe Tab. 2.16) durchgeführt. Dazu wurden 2 ml der transfizierten Leishmanienkultur pelletiert (2000 x g, 5 min, 22 °C), das Zellpellet in 100 µl BHI-Medium resuspendiert und auf den BHI Agar Platten ausgestrichen (Inkubation: 7 Tage bei 26 °C). Einzelne Kolonien wurden in eine 48-Well Platte mit 500 µl NTC-haltigem BHI-Medium überführt und über Nacht bei 26 °C inkubiert. 3-5 Kulturen der Platte wurden in 10 ml Medium aufgenommen und anschließend regelmäßig zweimal pro Woche in NTC-haltigem BHI Medium verdünnt.

#### **2.4.19. Herstellung von Glycerol-Stocks von *Leishmania tarentolae* Kulturen**

Eine Leishmanienkultur wurde in NTC-haltigem BHI Medium kultiviert, bis eine Zelldichte von 1,2-1,8 (OD<sub>600</sub>) erreicht wurde. 3,6 ml der Leishmanienkultur wurden mit 1,2 ml sterilem Glycerol (80 %) suspendiert und in drei Kryoröhrchen überführt. Die Glycerol-Stocks wurden für 10 min bei Raumtemperatur, dann eine Stunde auf Eis und anschließend über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die Glycerol-Kulturen wurden bei -80 °C gelagert.

#### **2.4.20. DNA-Isolierung aus *Leishmania tarentolae* Kulturen**

Um mit Hilfe einer PCR zu überprüfen, ob die Leishmanienkultur die Expressionskassette mit dem proteincodierenden Gen enthielt, wurde DNA aus den Leishmanienkulturen isoliert. Dazu wurde eine Leishmanienkultur in NTC-haltigem BHI Medium kultiviert, bis eine Zelldichte von 1-2 (OD<sub>600</sub>) erreicht wurde. Von dieser Leishmanienkultur wurde 1 ml abgenommen und pelletiert (2000 x g, 10 min, 22 °C). Das Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer (Tab. 2.17) aufgenommen und die DNA mit Hilfe des “innuPREP Bacteria DNA Kit“ isoliert. Abweichend vom Protokoll wurde kein Lysozym und keine Proteinase K verwendet. Die DNA-Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt.

**Tab. 2.17.:** Zusammensetzung TE-Puffer (pH 8).

<b>Chemikalie</b>	<b>Endkonzentration</b>
Aqua dest.	-
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

#### **2.4.21. PCR der *Leishmania tarentolae* DNA mit spezifischen Primern**

Um die erfolgreiche Integration der Expressionskassette in die DNA der *L. tarentolae* Zellen zu überprüfen, wurde eine PCR mit den spezifischen Primern (Tab. 2.33) für die codierende Sequenz der jeweiligen Proteine durchgeführt. Die jeweiligen PCR-Bedingungen sind im Abschnitt 2.4.7 aufgeführt.

## **2.5. Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine**

### **2.5.1. Proteinreinigung über eine Handsäule**

Die jeweiligen Proteine sollten in transfizierten *L. tarentolae* Zellen exprimiert und über Sekretion in das Kulturmedium abgegeben werden. Dabei wird den Proteinen während der Expression am C-Terminus ein His6-Tag angefügt, über den eine spezifische Reinigung möglich ist. Zur Überprüfung, ob rekombinante Proteine im Kulturüberstand vorhanden waren, wurde in einem kleinen Ansatz die Proteinreinigung über eine Handsäule durchgeführt. Dazu wurde eine transfizierte Leishmanienkultur in 50 ml NTC-haltigem BHI Medium kultiviert, bis eine Zelldichte von 2 ( $OD_{600}$ ) erreicht wurde. Die Kultur wurde zentrifugiert (2000 x g, 5 min, 22 °C) und der Überstand mit Natriumchlorid (NaCl) versetzt, sodass eine Endkonzentration von 300 mM NaCl erreicht wurde.

Die verwendete Handsäule wurde mit Aqua dest. gespült und 1 ml einer Ni-NTA-Agarose-Matrix auf den Filter der Säule gegeben. Über diese Matrix können Proteine, die einen His6-Tag besitzen, gebunden und gereinigt werden. Überschüssige Flüssigkeit der Säule konnte abfließen und die Agarose wurde nacheinander mit 5 ml Aqua dest. und 5 ml Waschpuffer (siehe Tab. 2.18) gewaschen. Der Kulturüberstand wurde auf die Ni-NTA-Agarose gegeben und der Durchlauf wurde aufgefangen. Anschließend wurde die Agarose dreimal mit 1,5 ml Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die einzelnen Waschfraktionen wurden gesammelt und die Elution der His6-Tag-Proteine erfolgte mit dem Elutionspuffer (siehe Tab. 2.18) in 10x 0,5 ml Schritten. Die gesammelte Durchlaufraktion sowie die Waschfraktionen und Elutionsfraktionen wurden zur Analyse mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.6.1) verwendet.

**Tab. 2.18.:** Puffer für die Proteinreinigung.

Name	Chemikalie	Endkonzentration
Waschpuffer (pH 8)	Aqua dest.	-
	NaCl	300 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
Elutionspuffer (pH 8)	Aqua dest.	-
	NaCl	300 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	Imidazol	250 mM

### 2.5.2. Proteinherstellung über Großkulturen

Um größere Proteinmengen reinigen zu können, wurden Leishmanien-Großkulturen von bis zu 1 L Gesamtvolumen angesetzt. Dazu wurde eine Vorkultur von 50 ml NTC-haltigem BHI Medium bis zu einer Zelldichte von 2 (OD<sub>600</sub>) kultiviert. Die Vorkultur wurde verwendet, um Erlenmeyerkolben mit je 250 ml NTC-haltigem BHI Medium auf eine von 0,1 (OD<sub>600</sub>) anzuimpfen. Die Kolben wurden drei Tage geschüttelt (26 °C, 120 rpm) und anschließend wurde die Leishmanienkultur zentrifugiert (2500 x g, 20 min, 4 °C). Der Zellüberstand wurde gesammelt, über einen 0,45 µm Vakuumfilter gereinigt und bis zur Proteinreinigung bei -20 °C gelagert.

### 2.5.3. Proteinreinigung über Flüssigchromatografie

Die Reinigung der Proteine aus dem Kulturüberstand von Großkulturen erfolgte mit Hilfe der Flüssigchromatografie über HisTrapExcel Säulen (1 ml). Dazu wurde die filtrierte Proteinlösung auf 300 mM Natriumchlorid eingestellt und zusammen mit den verwendeten Pufferlösungen (siehe Tab. 2.18, Wasser, 70 % Ethanol) mit dem ÄKTA pure System über ein Pumpensystem verbunden. Ein Reinigungsprogramm wurde mit Hilfe der UNICORN Software geschrieben, sodass die Proteinreinigung vollautomatisch durchgeführt wurde.

Im ersten Schritt wurde die HisTrapExcel Säule mit 5 ml Wasser und anschließend mit 10 ml Waschpuffer gespült. Bis zu 1 L Proteinlösung wurde nachfolgend dann über die Säule gegeben, sodass Proteine, die einen His6-Tag haben, gebunden wurden. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml des Waschpuffers gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 10 ml Imidazol-haltigem Elutionspuffer, wobei Elutionsfraktionen von je 1 ml gesammelt wurden. Im Anschluss wurde die Säule nacheinander mit 10 ml Waschpuffer, 5 ml Wasser und 10 ml Ethanol gewaschen. Für jedes Protein wurde eine eigene HisTrap excel Säule verwendet, die bis zu fünfmal wiederverwendet wurde. Die Säulen wurden bei 4 °C gelagert.

Von jeder Elutionsfraktion wurden 16  $\mu\text{l}$  abgenommen, mit 8  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer gemischt und zur Analyse mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.6.1) verwendet.

#### 2.5.4. Dialyse der Proteinlösung

Nach der Reinigung liegen die Proteine in einem Imidazol-haltigen Elutionspuffer vor, der für *in vitro* und *in vivo* Experimente ungeeignet ist. Deshalb wurden die proteinhaltigen Elutionsfraktionen zu maximal 5 ml gepoolt und gegen PBS dialysiert. Dafür wurden Dialyseschläuche mit einem Größenausschluss von 14 kDa verwendet. Die Dialyse wurde in 5 L PBS-Puffer (siehe Tab. 2.19) bei 4 °C für vier Stunden und in weiteren 5 L PBS-Puffer über Nacht durchgeführt.

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung über einen 0,45  $\mu\text{m}$  Sterilfilter gereinigt, in je 500  $\mu\text{l}$  aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration ist im Abschnitt 2.6.3 beschrieben.

**Tab. 2.19.:** Zusammensetzung PBS-Puffer (pH 7,4).

<b>Chemikalie</b>	<b>Endkonzentration</b>
Aqua dest.	-
NaCl	140 mM
KCl	3,4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	10 mM

## 2.6. Biochemische Methoden

### 2.6.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) können rekombinante Proteine oder Proteingemische getrennt und analysiert werden. Dazu wurde ein Gel bestehend aus Trenn- und Sammelgel (siehe Tab. 2.20) hergestellt. Anschließend wurden die Proteine im Verhältnis 2:1 mit 2x SDS-Ladepuffer (siehe Tab. 2.21) gemischt und mit Hilfe einer Hamilton-Mikroliterspritze in die Geltaschen des Sammelgels übertragen. Eine Geltasche wurde mit einem Proteinmarker zum Größenabgleich befüllt. Bei einer elektrischen Spannung von 120 V wurden die Proteine aufgetrennt. Das Sammelgel wurde verworfen und das Trenngel nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. in eine Comassie-Färbelösung (Tab. 2.21) überführt. Nach einer Inkubation von mindestens vier Stunden wurde das Gel durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. entfärbt, Proteinbanden sichtbar gemacht und digitalisiert.

**Tab. 2.20.:** Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Name	Chemikalie	Endkonzentration
Trenngel (12 %)	Aqua dest.	23,0 % [v/v]
	L-Puffer	29,9 % [v/v]
	Acrylamid	45,9 % [v/v]
	TEMED	0,1 % [v/v]
	APS (10 %)	1,1 % [v/v]
Sammelgel (6 %)	Aqua dest.	59,1 % [v/v]
	M-Puffer	24,6 % [v/v]
	Acrylamid	14,8 % [v/v]
	TEMED	0,1 % [v/v]
	APS(10 %)	1,4 % [v/v]

**Tab. 2.21.:** Pufferzusammensetzung für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Name	Chemikalie	Endkonzentration
2x SDS-Ladepuffer	Aqua dest.	-
	Tris-HCl (pH 6,8)	100 mM
	Glycerol	10 % [v/v]
	SDS	3 % [w/v]
	$\beta$ -Mercapthoethanol	5 % [v/v]
	Bromphenolblau	0,02 % [w/v]
M-Puffer (pH 6,8)	Aqua dest.	-
	Tris/HCl	0,5 M
	SDS	0,4 % [w/v]
L-Puffer (pH 8,8)	Aqua dest.	-
	Tris/HCl	1,6 M
	SDS	0,4 % [w/v]
Laufpuffer	Aqua dest.	-
	Tris	25 mM
	Glycin	190 mM
	SDS	0,1 % [w/v]
Coomassie-Lösung	Aqua dest.	-
	Ethanol	20 % [v/v]
	Ammoniumsulfat	10 % [w/v]
	Phosphorsäure	3 % [v/v]
	Coomassie G-250	0,1 % [w/v]

### 2.6.2. Semi-dry Western Blot

Im semi-dry Western Blot Verfahren werden Proteine, die mittels PAGE getrennt wurden, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Das Gel wurde auf die mit Transferpuffer (Tab. 2.22) aktivierte Membran gelegt und zwischen zwei mit Transferpuffer angefeuchteten Filterpapieren platziert. Dieser Aufbau wurde zwischen die Kontaktflächen der semi-dry Apparatur gespannt und bei einer Stromstärke von 80 mA pro Gel wurden die Proteine innerhalb einer Stunde auf die Membran übertragen.

Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Block-Puffer (Tab. 2.22) inkubiert. Der Primärantikörper wurde, wie jeweils angegeben, in Block-Puffer verdünnt und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit der Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal in Block-Puffer gewaschen, bevor der Sekundärantikörper in der entsprechenden Verdünnung für 1 h zu der Membran gegeben wurde. Abschließend wurde die Membran dreimal in Block-Puffer gewaschen.

Mit Hilfe des “WesternBright ECL-Kit“ wurden *Horseradish peroxidase*(HRP)-konjugierte Sekundärantikörper detektiert. Am Chemilumineszenz-Imaging-System wurden Proteinbanden sichtbar gemacht und Abbildungen der Membranen erstellt.

Die Detektion mit Hilfe einer AP-Substratlösung (Tab. 2.23) wurde für Alkalische Phosphatase (AP)-konjugierte Sekundärantikörper durchgeführt. Die Umsetzung des Substrates führt hier zu einem Niederschlag auf der Membran, wodurch die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

**Tab. 2.22.:** Zusammensetzung Transfer- und Blockpuffer Western Blot.

	<b>Chemikalie</b>	<b>Endkonzentration</b>
Transferpuffer	Aqua dest.	-
	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	SDS	0,037 % [w/v]
	Methanol	20 % [v/v]
Blockpuffer	PBS-Puffer (Tab.2.19)	-
	BSA	5 % [w/v]
	Tween20	0,01 % [v/v]
AP-Puffer (pH 9,5)	Aqua dest.	-
	Tris	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	5 mM

**Tab. 2.23.:** Zusammensetzung AP-Substratlösung.

<b>Chemikalie</b>	<b>Stock-Konzentration</b>	<b>Endvolumen</b>
AP-Puffer	-	10 ml
NBT	50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid	66 µl
BCIP	50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid	33 µl

### 2.6.3. Bestimmung der Proteinkonzentration über den Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des “Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit“ bestimmt. Dazu wurde das Protokoll *Microplate Procedure* verwendet und mindestens zwei Verdünnungen des zu untersuchenden Proteins in Doppel- oder Dreifachbestimmung eingesetzt. Die Absorption wurde bei 562 nm gemessen. Anhand einer Standardkurve (1000 - 50 µg/ml) wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Gen5 Software berechnet.

### 2.6.4. Bestimmung der LPS-Konzentration über ein *Limulus Amebocyte Lysat*

Die LPS-Konzentration der rekombinant hergestellten Proteinlösung wurde mit Hilfe des “Limulus Amebocyte Lysate QCL-100<sup>TM</sup> Kit“ nach Protokollangaben bestimmt. Die Proteinlösungen wurden mindestens in zwei verschiedenen Verdünnungen eingesetzt und das Protokoll *Microplate Method* verwendet. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen und anhand einer Standardkurve (1- 0,1 EU/ml) wurde die LPS-Konzentration mit Hilfe der Gen5 Software berechnet.

### 2.6.5. Hitze-Inaktivierung von Proteinen

Die Denaturierung bzw. Inaktivierung von Proteinen wurde über eine Behandlung mit hohen Temperaturen erreicht. Dazu wurden Proteinlösungen von bis zu 500 µg/ml in maximal 600 µl zweimal für 15 min bei 95 °C und 200 rpm im Thermoblock erhitzt. Nach jeder Temperaturbehandlung wurde die Proteinlösung für 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proteine bei -20 °C gelagert.

### 2.6.6. Chitinase-Aktivitätstest

Die enzymatische Aktivität von Chitinasen wurde im Standardprotokoll mit den Substraten 4-methylumbelliferyl-N',N',N'-triacetylchitotriosid (M5, Endo-Chitinaseaktivität) und 4-methylumbelliferyl-,N',N'-diacetyl-D-chitobiosid-Hydrat (M9, Exo-Chitinaseaktivität) bei pH 5,6 durchgeführt. Die Substrate wurden auf 1100 µM in Dimethylsulfoxid (DMSO) eingestellt. Die Konzentration des zu testenden Proteins wurde auf 5 µg/ml in PBS eingestellt und die DMSO-Substrate 1:20 in Assaypuffer (Tab. 2.24) verdünnt. In Doppelbestimmungen wurden 10 µl des Proteins mit 40 µl Substratlösung in dunklen 1,5 ml Röhren gemischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 µl Stopp-Lösung (Tab. 2.24) beendet. Für die Standardkurve wurden Verdünnungen aus 4-Methylumbelliferon Natriumsalz in Wasser hergestellt (568 - 17,75 µM) und je 50 µl einer Verdünnung mit 500 µl Stopp-Lösung

vermischt. Je Reaktionsmix bzw. Standardlösung wurden 2x 250 µl in eine schwarze 96-Well Platte übertragen. Die Extinktion/Emission wurde bei 360/450 nm gemessen. Anhand der Standardkurve wurde die enzymatische Aktivität berechnet.

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurden Assaypuffer mit pH 2 bis 10 hergestellt. Der Aktivitätstest wurde wie beschrieben mit dem jeweiligen Assaypuffer durchgeführt.

Zur Bestimmung der Proteinstabilität wurde die Proteinlösung vor dem Chitinase-Aktivitätstest für 1 Stunde bei unterschiedlichen Temperaturen (4 - 90 °C) inkubiert.

**Tab. 2.24.:** Pufferzusammensetzung für den Chitinase-Aktivitätstest.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Assaypuffer <sup>1</sup>	Aqua dest.	-
	Zitronensäure	100 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mM
Stopp-Lösung	Aqua dest.	-
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 M
	NaHCO <sub>3</sub>	0,5 M

<sup>1</sup> Je nach Bedarf wurde der pH Wert eingestellt.  
Standardprotokoll pH 5,6.

### 2.6.7. Proteinkristallographie

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Makromolekulare Kristallografie von Dr. Manfred Weiß des Helmholtz-Zentrum Berlin wurde die Proteinstruktur des Proteins TsES1 untersucht. Alle Arbeitsschritte wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Piotr Malecki durchgeführt.

#### Thermofluor-Assay

Mit Hilfe eines “fluorescence-based thermal-shift assay“ (Thermofluor) können die Pufferbedingungen identifiziert werden, in denen ein Protein besonders stabil vorliegt.

Dazu wurden die bei Reinhard et al. gelisteten Puffer, unter Verwendung von SYPRO Orange, für TsES1 getestet [Reinhard et al., 2013]. SYPRO Orange ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der besonders gut an lineare Proteinsequenzen binden kann. Pro Pufferbedingung wurden 2,5 µl Protein (1 mg/ml) mit 2,5 µl SYPRO Orange (50x) gemischt und zu 20 µl des Puffers in eine 96-Well Platte gegeben. Als Kontrollen wurde das Protein ohne Farbstoff in Wasser, nur der Farbstoff in Wasser und Protein mit Farbstoff in Wasser mitgeführt. Die Temperatur der Ansätze wurde in einem Thermocycler graduell von 4 °C auf 90 °C erhöht und bei einer Anregung von 492 nm wurde die Emission des Farbstoffes bei 516 nm gemessen. Mit steigender Temperatur wird das Protein denaturiert und bindet auf Grund seines Strukturverlustes immer mehr



Farbstoff. Je nach Pufferbedingungen wurde der Scheitelpunkt der Denaturierung (also eine spezifische Temperatur) für das Protein ermittelt. Mit Hilfe eines bereits vorgefertigten Analyseprotokolls wurde eine Excel-Tabelle generiert, in der die Pufferbindungen sortiert nach der Temperatur für TsES1 gelistet wurden.

### Herstellung von Proteinkristallen

Für die Herstellung von Proteinkristallen wurde das rekombinante Protein TsES1 nach der Proteinreinigung (siehe Abschnitt 2.5.3) in einem HEPES-Puffer dialysiert. Es folgte eine weitere Reinigung über eine "HiLoad 16/600 Superdex 200 pg" - Gelfiltrationssäule mit einem HEPES-Laufpuffer (Tab. 2.25). Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe von Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 Konzentratoren (30 000 MWKO) bis zu einer Proteinkonzentration von 33 mg/ml konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde am NanoDrop mit dem Extinktionskoeffizienten von TsES1 ( $E=1,9$ ) bestimmt.

Mit Hilfe des Gryphon Pipettier-Roboters wurden 96-Well Kristallisationsplatten mit der Proteinlösung und dem Kristallisationspuffer (Morpheus, The PGA Screen, JSCG-plus Screen) befüllt. Dafür wurden 0,25  $\mu$ l Proteinlösung mit 0,25  $\mu$ l Pufferlösung gemischt. Die Platte wurde luftdicht mit einer Folie verschlossen und bei 20 °C inkubiert. Wöchentlich wurden die Platten am Mikroskop auf die Bildung von Kristallen hin untersucht.

**Tab. 2.25.:** HEPES-Laufpuffer.

Chemikalie	Endkonzentration
Aqua dest.	-
HEPES (pH 7.7)	20 mM
NaCl	200 mM
TCEP	1 mM

### Analyse der Proteinstruktur mit Hilfe von Röntgenstrahlung

Die Messungen wurden an der Photonenquelle Bessy II in Adlershof unter Nutzung von hochintensivem Röntgenlicht von Synchrotronstrahlungsquellen unter Leitung von Dr. Piotr Malecki durchgeführt. Vor der Messung wurden die Proteinkristalle mit Nylon-Schlaufen aus der Pufferlösung aufgenommen und kurz in eine Kryoprotektionslösung (25 % Ethylenglycol) getaucht. Anschließend wurde der Kristall samt Goniometerkopf in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Messung aufbewahrt. Die Aufnahme von Röntgen-Diffraktionsdaten, die Prozessierung der gemessenen Rohdaten und die Strukturbestimmung wurde von Dr. Piotr Malecki durchgeführt.

## 2.7. Materialien

### 2.7.1. Geräte

Tab. 2.26.: Eingesetzte Geräte und Apparaturen.

Geräte/Apparaturen	Hersteller
Äkta pure	GE Healthcare, Buckinghamshire, GBR
BD FACSCanto <sup>TM</sup> II	BD Biosciences, CA, USA
BioPhotometer <sup>TM</sup> V1.32	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
BioShake IQ Thermomixer	Analytik Jena AG, Jena, DEU
Casy <sup>®</sup> Cell counter Model TT	Omni Life Science GmbH & Co., Bremen, DEU
Cellspin <sup>®</sup> I Zytozentrifuge	Tharmac GmbH, Wiesbaden, DEU
Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Centrifuge 5810R / 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Certomat <sup>®</sup> BS-1	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DEU
Double Champer Plethysmograph	emka TECHNOLOGIES, Paris, FRA
E-BOX VX2 Geldokumentationssystem	VWR International GmbH, Erlangen, DEU
FastPrep <sup>®</sup> -24	MP Biomedicals, Solon, USA
Fusion SL 3500 WL	peqlab - VWR, Erlangen, DEU
Heracell <sup>TM</sup> 240i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
HydroSpeed <sup>TM</sup>	Tecan Trading AG, Männedorf, CHE
Leica DM700 Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DEU
LightCycler <sup>®</sup> 480	Roche, Basel, CHE
Mastercycler <sup>®</sup> nexus	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
MAGPIX <sup>TM</sup> Luminex System	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
NanoDrop Spectrophotometer ND 1000	peqLap Biotechnologie GmbH, Erlangen, DEU
Nucleofector <sup>®</sup> II	Lonza Group Ltd, Basel, CHE
Primovert Invers-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DEU
Synergy <sup>TM</sup> H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments, VT, USA

### 2.7.2. Chemikalien

Tab. 2.27.: Eingesetzte Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid (30 % / 0,8 % Bisacrylamid)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Agar Kobe I	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
Ammoniumpersulfat	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
Coomassie G-250	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
dNTP-Mix	Rapidozym GmbH, Berlin, DEU
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
eBioscience <sup>TM</sup> CFSE	eBioscience, CA, USA

Chemikalien	Hersteller
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
Ethanol	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Glukose	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Glycin	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
JSCG-plus Screen	Molecular Dimensions, Suffolk, GBR
Hefeextrakt	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Kalimchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Methanol	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DEU
Morpheus	Molecular Dimensions, Suffolk, GBR
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Natriumchlorid (NaCl)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
PCR Wasser	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
Phosphat Citrat Buffer (tablet)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Phosphorsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
p-Nitrophenyl Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
p53-His(6)	dianova GmbH, Hamburg, DEU
Schwefelsäure	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
SYPRO™ Orange Protein Gel Stain	ThermoFisher Scientific, Rockford, USA
The PGA Screen	Molecular Dimensions, Suffolk, GBR
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
Wasserstoffperoxid (38 %)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
6x DNA Loading Dye	New England Biolabs®, Hitchin, GBR

### Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.28.: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Amersham Protran 0,45 µm NC	GE Healthcare, Buckinghamshire, GBR
Amicon® Ultra-4 (30 000 MWKO)	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Cellstar® Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUT
Cytoträger	Tharmac GmbH, Wiesbaden, DEU
CryoPure tube 2 ml	Nümbrecht, DEU
HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare, Buckinghamshire, GBR
HisTrap excel	GE Healthcare, Buckinghamshire, GBR

Bezeichnung	Hersteller
PCR 96-Well TW-MT-Platte, weiß	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DEU
Zellkultur Platten	Corning Incorporated, NY, USA
1L Polycarbonat Erlenmeyer Kolben	Corning Incorporated, NY, USA
1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt AG, Numbrecht, DEU
1,5 ml Reagiergefäß, braun	Sarstedt AG, Numbrecht, DEU
3 mm Chromatography Paper	GE Healthcare, Buckinghamshire, GBR
10 cm Petrischalen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremismünster, AUT
15 ml, 50 ml Falcon	Greiner Bio-One International GmbH, Kremismünster, AUT
96-Well Assay Platten, schwarz	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DEU

### 2.7.3. Medien, Puffer und Lösungen

Tab. 2.29.: Medien, Puffer und Additives.

Name	Hersteller
Albumin Fraktion V	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, DEU
FBS (Origin South America)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU
DMEM	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU
DMEM/F12	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU
LEXSY BHI <i>powder</i>	Jena Bioscience GmbH, Jena, DEU
L-Glutamin (200 mM)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU
Hemin	Jena Bioscience GmbH, Jena, DEU
PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU
Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 % in PBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU
RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU

### 2.7.4. Antibiotika

Tab. 2.30.: Eingesetzte Antibiotika.

Antibiotikum	Selektions-Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU
Nourseothricin	100 µg/ml	Jena Bioscience GmbH, Jena, DEU
Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DEU
Tetracyclin	20 µg/ml	AppliChem GmbH, Darmstadt, DEU

## 2.7.5. Reaktionskits

Tab. 2.31.: Eingesetzte Präparations- und Reaktionskits.

Name	Verwendung	Hersteller
Amaxa <sup>TM</sup> Human T Cell Nucleofector <sup>TM</sup> Kit	Transfektion von <i>Leishmania tarentolae</i> Zellen	Lonza Group Ltd, Basel, CHE
Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC	eBioscience, CA, USA	
High-Capacity RNA-to-cDNA <sup>TM</sup> Kit	cDNA Synthese	Applied Biosystems, CA, USA
innuPREP RNA Mini Kit	Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen	Analytik Jena AG, Jena, DEU
innuPREP Plasmid Mini Kit	Isolation von Plasmiden aus Bakterien	Analytik Jena AG, Jena, DEU
innuPREP Gel Extraction Kit	DNA-Isolation aus Agarosegelen	Analytik Jena AG, Jena, DEU
Limulus Amebocyte Lysate QCL-100 <sup>TM</sup>	Bestimmung der LPS-Konzentration	Lonza Group Ltd, Basel, CHE
MapTrap <sup>TM</sup> Kit	Reinigung von Antikörpern aus dem Serum	GE Healthcare, Buckinghamshire, GBR
MicroSpin Total RNA Kit, peqGOLD	VWR International GmbH, Erlangen, DEU	
Pierce <sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	ThermoFisher Scientific, Rockford, USA
Pierce <sup>TM</sup> SilverStain Kit	Färbung von Proteinen im SDS-Gel	ThermoFisher Scientific, Rockford, USA
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DEU
WesternBright ECL	Susstrat für HRP-konjugierte Antikörper	Advansta, CA, USA
CD4+ T Cell Isolation Kit, mouse	Isolierung von CD4+ T-Zellen	Miltenyi Biotec, CA, USA
26-Plex Mouse	Multiplex Assay	eBioscience, CA, USA
ProcartaPlex <sup>TM</sup> Panel-1		
LightCycler <sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master	RT-PCR	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DEU

### 2.7.6. Verwendete Organismen zur Proteinexpression

**Tab. 2.32.:** Eingesetzte Organismen zur Klonierung und Proteinexpression.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
XL1blue MRF	$\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagen, La Jolla, CA, USA
K12 JM109	F' traD36 proA+B+ lacIq $\Delta$ (lacZ)M15/ $\Delta$ (lac-proAB) glnV44 e14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17	[Yanisch-Perron et al., 1985]
<i>Leishmania tarentolae</i>		
LEXSY host P10		Jena Bioscience GmbH, Jena, DEU

### 2.7.7. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, DEU) in lyophilisierter Form hergestellt, mit Reinstwasser (PCR-Water, Carl Roth) auf eine Konzentration von 50  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M eingestellt und bei -20 °C gelagert.

**Tab. 2.33.:** Eingesetzte Primer.

Name/Gen	Forward und Reverse Primer (5'-3')
<b>Klonierung</b>	
TsES1_for	CTCGAGGCAGCAGCTGAAAGCGGA
TsES1_rev	GCCCACGGTACCCGTTATGGTTTTCTCTTG
TsES4_for	GTCGACGCTGGACGAACGAGGATTCCAAC
TsES4_rev	GCTGGTACCGCGGTCAACTTCGAGAAAC
TsES5_for	GTCGACGCTCAAAATCTTGAGACGTTTAC
TsES5_rev	GGTACCGGCCCATAGTGCGAAAC
TsES6_for	GTCGACGCTTATGGGTTTCACTTTGG
TsES6_rev	GCTGGTACCTGAGCATATTCACAAG
TsES8_for	GTCGACGCTGAATGTGTGACGCATAAAGAC
TsES8_rev	GTCGGTACCACGAGAATTGTCGGTTTC
TsES9_for	GTCGACGCTTGGGATGGTTACCATATAC
TsES9_rev	GTCGGTACCCAAAACAGGTTCCCTGTAAT
<b>RT-PCR mausspezifisch</b>	
<i>AMCase</i>	for CCCTTGGCATATCCACTGA rev ACAGAATCCACTGCCTCCAG
<i>Chit1</i>	for CAAAACTGGTCTGCTACCTCAC rev GCAAAGATGACGTGGGTACAC
<i>BRP-39</i>	for AGCAGTATTTCTCCACCCTGAT rev ACCTTTCCTGCTGACAAAAGC
<i>Ym1</i>	for CAGGTCTGGCAATTCTTCTGAA rev GTCTTGCTCATGTGTGTAAGTGA
<i>Ym2</i>	for CAGAACCGTCAGACATTCATTA

Name/Gen	Forward und Reverse Primer (5'-3')
<i>CCL-2</i> ( <i>MCP-1</i> )	rev ATGGTCCTTCCAGTAGGTAATA
	for TTA AAAACCTGGATCGGAACCAA
<i>CCL-11</i> ( <i>Eotaxin-1</i> )	rev GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
	for CTGCTTGATTCCCTTCTCTTTTCCTAA
<i>RELM-<math>\alpha</math></i>	rev GGA ACTACATGAAGCCAAGTCCTT
	for TCCCAGTGAATACTGATGAGA
<i>Arginase-1</i>	rev CCACTCTGGATCTCCCAAGA
	for CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG
<i>PPIA</i>	rev AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
	for GAGCTGTTTGCAGACAAAGTTC
	rev CCCTGGCACATGAATCCTGG

### 2.7.8. Plasmide

Tab. 2.34.: Eingesetzte Plasmide.

Bezeichnung	Resistenz	Hersteller
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector System I	Ampicillin	Promega Corporation, Madison, USA
pLEXSYsat2	Nourseothricin (NTC)	Jena Bioscience GmbH, Jena, DEU

### 2.7.9. Enzyme

Tab. 2.35.: Eingesetzte Enzyme.

Enzym	Hersteller
KpnI-HF	New England Biolabs <sup>®</sup> , Hitchin, GBR
Sall-HF	New England Biolabs <sup>®</sup> , Hitchin, GBR
SwaI	New England Biolabs <sup>®</sup> , Hitchin, GBR
XhoI	New England Biolabs <sup>®</sup> , Hitchin, GBR
T4 DNA Ligase	New England Biolabs <sup>®</sup> , Hitchin, GBR
BioTherm <sup>™</sup> DNA Polymerase	Rapidozym GmbH, Berlin, DEU

### 2.7.10. Antikörper

Tab. 2.36.: Eingesetzte Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
anti-Maus CD1d	Alexa488	1B1	eBioscience, CA, USA
anti-Maus CD4	Horizon V500	RM4-5	BD Biosciences, CA, USA
anti-Maus CD5	PerCP-Cy5.5	53-7.3	eBioscience, CA, USA
anti-Maus CD8a	APC	53-6.7	eBioscience, CA, USA
anti-Maus CD11b	APC-Cy7	M1/70	Biologend, CA, USA
anti-Maus CD11c	FITC	HL3	BD Biosciences, CA, USA
	eFluor450	N418	eBioscience, CA, USA

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
	PacOrange	N418	DRFZ, Berlin, DEU
anti-Maus CD19	PacBlue	1D3	DRFZ, Berlin, DEU
anti-Maus CD25	PerCp-Cy5.5	PC61	BD Biosciences, CA, USA
anti-Maus CD45	eFluor450	30-F11	eBioscience, CA, USA
anti-Maus CD64	PE-Cy7	X54-5/7.1	Biolegend, CA, USA
anti-Maus CD86	PE-Cy7	GL1	eBioscience, CA, USA
anti-Maus CD103	PE	2E7	eBioscience, CA, USA
anti-Maus Ox40L	APC	RM134L	eBioscience, CA, USA
anti-Maus Gr1	PE-Cy7	RB6-8c5	eBioscience, CA, USA
anti-Maus Ly6G	eFluor450	1A8-Ly6G	eBioscience, CA, USA
anti-Maus MHC-II	PE	M5/114.15.2	BD Biosciences, CA, USA
	PE-Cy5	M5/114.15.2	eBioscience, CA, USA
anti-Maus B220	PE-Cy7	RA3+B2	eBioscience, CA, USA
anti-Maus IgM	eFluo450	eB121-15F9	eBioscience, CA, USA
anti-Maus IgG1	APC	RMG1-1	Biolegend, CA, USA
anti-Maus IgG2a	PerCP-Cy5.5	RMG2a-62	Biolegend, CA, USA
anti-Maus SiglecF	PE	E50-2440	BD Biosciences, CA, USA
anti-Maus Ep-CAM	APC	G8.8	eBioscience, CA, USA
anti-Maus FoxP3	Alexa488	FJK-16s	eBioscience, CA, USA
anti-Maus GATA-3	eFluor660	TWAJ	eBioscience, CA, USA
anti-Maus Tbet	PE-Cy7	eBio4B10	eBioscience, CA, USA
anti-Maus IL-10	APC	JES5-16E3	eBioscience, CA, USA
anti-Maus Relm $\alpha$	Biotin	polyklon	PeptoTech, NJ, USA
Streptavidin	FITC	-	eBioscience, CA, USA
DCE	eF506, eF660, eF780	-	eBioscience, CA, USA

Tab. 2.37.: Eingesetzte Antikörper für ELISA, Western Blot und Histologie.

Spezifität	Hersteller
<b>ELISA</b>	
anti-Maus IL-4 Ready-SET-Go!	eBiosciences, CA, USA
anti-Maus IL-6 Ready-SET-Go!	eBiosciences, CA, USA
anti-Maus IL-10 OptEIA™	BD Biosciences, CA, USA
anti-Maus IL-12p40 OptEIA™	BD Biosciences, CA, USA
anti-Maus IFN $\gamma$ Ready-SET-Go!	eBiosciences, CA, USA
Goat-anti-Mouse-IgG - UNLB	Southern Biotech, AL, USA
Purified Rat-anti-Mouse IgE	BD Biosciences, CA, USA
Rat-anti-mouse IgE heavy chain - HRP	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Goat-anti-Mouse IgG1 - AP	Rockland Immunochemicals, PA, USA
Goat-anti-Mouse IgG2a - AP	Rockland Immunochemicals, PA, USA
<b>Western Blot</b>	
anti-His6-tag antibody	dianova GmbH, Hamburg, DEU
Goat-anti-Mouse IgG-HRP	Southern Biotech, AL, USA
<b>Histologie</b>	
polyclonal rabbit-anti-mouse	Abcam, Cambridge, UK



## 2.7.11. Datenbanken und Software

Tab. 2.38.: Eingesetzte Datenbanken und Software.

Software/ Datenbank	Entwickler/ Herausgeber	Internetadresse
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Software, IRL	-
BD FACSDiva <sup>TM</sup> 7.0	BD Biosciences	-
Clustal Omega	[Sievers et al., 2011]	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
FlowJo <sup>®</sup> v9	FLOWJO, LLC, Ashland, Oregon, USA	-
Gen5 2.04	BioTek <sup>®</sup> , VT, USA	-
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, CA, USA	-
HelmDB	[Mangiola et al., 2013]	<a href="http://www.helmdb.org">www.helmdb.org</a>
ioX v2.8.0.13	EMKA Technologies, Paris, FRA	-
LightCycler <sup>®</sup> 480 Relative Quantification Software	Roche, Basel, CHE	-
NCBI BLAST <sup>®</sup>		<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
NCBI proteins		<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/</a>
NEBcutter V2.0	[Vincze et al., 2003]	<a href="http://www.neb.com/tools/index.aspx?req=nebcutter">http://www.neb.com/tools/index.aspx?req=nebcutter</a>
NetNGlyc 1.0 Server	[Gupta et al., 2004]	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/</a>
NetOGlyc 4.0 Server	[Steentoft et al., 2013]	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/</a>
UNICORN 6.3.2.89	GE Healthcare, Bucking- hamshire, GBR	-
Procarta Plex <sup>TM</sup> Analyst 1.0	eBioscience, CA, USA	-
Signal P 4.1 Server	[Petersen et al., 2011]	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
TMHMM Server v. 2.0	[Sonnhammer et al., 1998]	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Identifizierung sekretierter Proteine von *Trichuris suis* L1 Larven

*In vivo* Krankheitsmodelle mit sekretorischen Komponenten von *T. suis* weisen darauf hin, dass Moleküle im ES immunregulatorische Fähigkeiten besitzen. Deshalb wurde erforscht, welche Proteine von dem Schweinepeitschenwurm *T. suis* sekretiert werden.

Dazu wurden Proteine aus dem Kulturüberstand von *in vitro* geschlüpften *T. suis* Larven gewonnen und mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht. Die Analyse zur Identifizierung von Proteinen wurde von der Arbeitsgruppe Bioanalytik, Massenspektrometrie (Dr. Katharina Janek, Biochemie, Charité, Berlin) durchgeführt.

Als Grundlage für die Analyse wurden die Daten von Jex et al. und Mitreva et al. verwendet, die in der NCBI-Datenbank hinterlegt sind. Massenspektrometrisch identifizierte Peptide wurden mit den theoretischen Peptiden der hinterlegten Proteine verglichen und jeweils zugeordnet. Mehrfach identifizierte Proteine wurden zusammengefasst, sodass insgesamt 29 Proteine im L1 ES identifiziert wurden (Anhang, Tab. B). Die meisten identifizierten Proteine besitzen eine Signalsequenz für die Sekretion, die mit Hilfe der SignalP 4.1 Server-Software vorhergesagt wurde. Für vier der identifizierten *T. suis* Proteine wurden Transmembranhelices mit Hilfe der TMHMM Server-Software vorhergesagt. Jedoch wurde für drei der vier Proteine darauf hingewiesen, dass es sich ebenso um Signalsequenzen handeln könnte.

Unter den Proteinen sind Enzyme wie Serinproteasen (Trypsin) und Chitinasen vertreten, die für die Häutung und Entwicklung von Helminthen wichtig sind [Yang et al., 2015, Tachu et al., 2008]. Außerdem konnte die Metallopeptidase Astacin und eine Methyltransferase nachgewiesen werden. Die Methyltransferase ist für die Übertragung von Methylgruppen auf Nukleotid-Moleküle oder Proteine verantwortlich und kann damit die Zugänglichkeit genetischer Informationen regulieren [Lyko, 2017]. Ein weiteres identifiziertes Protein ist ein Serinproteinase-Inhibitor (Serpine), das allgemein bei einigen Helminthen immunmodulatorische Eigenschaften besitzt [Molehin et al., 2012]. Beispielsweise induziert ein Serpin von *Trichinella pseudospiralis in vitro* die Polarisation von alternativ aktivierten Makrophagen (AAMs) [Xu et al., 2017].

Weitere 18 identifizierte Proteine von *T. suis* L1 wurden als hypothetische Proteine eingestuft, da deren Annotation noch nicht erfolgt oder ihre Funktion noch nicht bekannt ist. Zusammenfassend wurden im *T. suis* L1 ES 29 Proteine identifiziert, von denen 18 auf Grund der vorhergesagten Signalsequenz als sekretorische Proteine bezeichnet werden können.

## 3.2. Rekombinante Herstellung larvaler *Trichuris suis* Proteine mit dem Leishmanien Expressionssystem

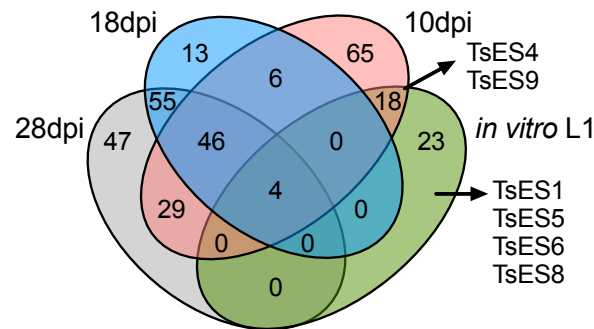
### 3.2.1. Auswahl der Proteine

Ziel war es, ausgewählte ES Proteine von *T. suis* L1 Larven rekombinant herzustellen, um anschließend Funktionsanalysen mit diesen Proteinen durchführen zu können.

Als Auswahlkriterium wurde das Vorhandensein einer Signalsequenz bei gleichzeitiger Abwesenheit von Transmembranhelices vorausgesetzt (Anhang, Tab. B). Ein weiteres Kriterium war, dass diese Proteine ausschließlich in dem L1 Larvenstadium und nicht in späteren *T. suis* Stadien identifiziert wurden (Abb. 3.1). Damit wurde angenommen, dass *T. suis* als Therapiewurm im Menschen hauptsächlich als L1 Larve aktiv ist, da kaum adulte Würmer im Menschen vorkommen.

Für die Auswahl wurden die ES Proteine von *T. suis* Larven, die aus experimentell infizierten Schweinen gewonnen wurden, mit den ES Proteinen von *in vitro* geschlüpften L1 Larven verglichen (Abb. 3.1; Anhang, Tab. B.2). Dabei wurde deutlich, dass Proteine von *in vitro* geschlüpfte *T. suis* L1 Larven die größte Übereinstimmung mit 10dpi Larven hatten und kaum ES Proteine mit späteren Stadien teilen (Abb. 3.1). Insgesamt wurde von *in vitro* geschlüpften L1 Larven eine geringere Anzahl an Proteinen hergestellt. Vermutlich induziert der Kontakt zum Darm des Wirtes die Expression der ES Proteine, die bei *in vitro* geschlüpften Larven fehlt.

Die initiale Datenanalyse der Massenspektrometrie erfolgte auf Grundlage der Daten von Jex et al. und HelmDB [Jex et al., 2014, Mangiola et al., 2013]. Dabei wurden 10 Proteine mit den genannten Kriterien selektiert, die rekombinant hergestellt werden sollten. Die im Anhang aufgeführte Tabelle B fasst die Ergebnisse der Analyse zusammen, die mit der von Mitreva et al. erweiterten Datengrundlage in NCBI durchgeführt wurde [Mitreva et al., 2014]. Hierbei wurden acht weitere Proteine mit den Auswahlkriterien identifiziert. Darunter befanden sich Serinproteasen (Trypsin), hypothetische Proteine und eine Methyltransferase. Obwohl am Ende 18 Proteine mit den Auswahlkriterien identifiziert wurden, wurde mit den 10 initial ausgewählten Proteinen gearbeitet.



**Abb. 3.1.: Vergleich von ES Proteinen verschiedener *T. suis* Stadien.**

*T. suis* Larven wurden zu bestimmten Zeitpunkten aus dem Darm infizierter Schweine gewonnen. Die Würmer wurden für ca. 2 Wochen in Kultur gehalten und die ES Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Dargestellt ist hier die vergleichende Analyse der ES Proteine der verschiedenen *T. suis* Stadien mit den ES Proteinen von *in vitro* geschlüpften L1 Larven. Dabei entspricht 10dpi Larvenstadium L1/ L2, 18dpi Larvenstadium L3/ L4 und 28dpi Larvenstadium L4 bzw. adulten Wurmern. [dpi- days post infection]

Von diesen 10 selektierten Proteinen wurden sechs Proteine mit Hilfe des Leishmanien Expressionssystems hergestellt (Tab. 3.1). Die anderen vier Proteine konnten jedoch nicht kloniert werden (Abschnitt 3.2.2). Die Proteine TsES1, TsES4, TsES5 und TsES6 wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Anna Vetter unter Anleitung hergestellt [Vetter, 2015]. Die Proteine TsES8 und TsES9 wurden im Zusammenhang mit dieser Arbeit kloniert und rekombinant hergestellt.

Die ausgewählten und im ES der *T. suis* L1 Larven identifizierten Proteine besitzen Homologien (Identität > 50%) zu Proteinen des humanpathogenen Nematoden *Trichuris trichiura* (*T. trichiura*) (Tab. 3.1). Darunter befindet sich die *acidic mammalian chitinase* (TsES1), ein *CAP-domain containing protein* (TsES5) und das *venom allergen 5* (TsES6). Die Proteine TsES8 und TsES9 sind zu hypothetischen Proteinen ohne bekannter Funktion von *T. trichiura* homolog und für TsES4 ist kein sequenzähnliches Protein beschrieben.

Da bereits bekannt ist, dass ES Proteine von *T. suis* Glykosylierungen aufweisen, die unter anderem für die Immunregulation von humanen DCs verantwortlich sind [Klaver et al., 2013], wurden die *T. suis* L1 Proteine auf mögliche Zuckerstrukturen hin untersucht. Für die Proteine TsES5 und TsES6 wurden sowohl O-, als auch N-Glykosylierungen vorhergesagt, hingegen für TsES1, TsES4 und TsES9 nur O-Glykosylierungen (Tab. 3.1). Für TsES8 konnten keine Glykosylierungen ermittelt werden.

**Tab. 3.1.:** Klonierte und rekombinant exprimierte *T. suis* L1 ES Proteine. Angegeben sind die NCBI-ID, das Molekulargewicht (MW) in kDa, ein homologes Protein (Datenbank NCBI, BLAST) und die Anzahl der O- und N-Glykosylierungen.

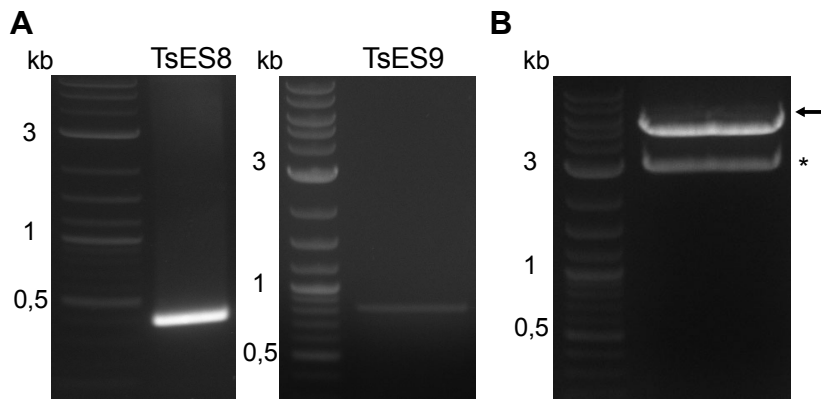
	NCBI-ID	MW (kDa)	Homologes Protein (Identität in %)	O- Glyko.	N- Glyko.
<b>TsES1</b>	KFD48490.1	55,45	Acidic mammalian chitinase [ <i>T. trichiura</i> ] (89%)	28	-
<b>TsES4</b>	KFD55729.1	13,89	-	1	-
<b>TsES5</b>	KFD54802.1	31,06	CAP domain containing protein [ <i>T. trichiura</i> ] (81%)	3	10
<b>TsES6</b>	KFD45500.1	37,04	venom allergen 5 [ <i>T. trichiura</i> ] (83%)	1	24
<b>TsES8</b>	KFD72328.1	14,18	hypothetical protein [ <i>T. trichiura</i> ] (54%)	-	-
<b>TsES9<sup>1</sup></b>	KFD53667.1	31,06	hypothetical protein [ <i>T. trichiura</i> ] (71%)	5	-

<sup>1</sup> Die erste Identifizierung erfolgte mit Hilfe der Datenbank HelmDB, die eine am Proteinanfang um 39 Aminosäuren verkürzte Sequenz für TsES9 ausgewiesen hat. Auf Grundlage dieser Sequenz, die eine über SignalP identifizierte Signalsequenz enthielt, erfolgte die Klonierung und rekombinante Proteinexpression.

### 3.2.2. Klonierung

Die Klonierung der genspezifischen Nukleotidsequenz der *T. suis* ES Proteine erfolgte in mehreren Schritten, die in Abbildung 2.2 in Abschnitt 2.4 zusammengefasst sind. Die Grundlage dafür bildeten die Nukleotidsequenzen der ausgewählten *T. suis* ES Proteine, die zusammen mit den Aminosäuresequenzen im Anhang aufgeführt sind.

Exemplarisch für die Klonierung aller TsES Proteine sind die PCR-Produkte von TsES8 und TsES9 in der Abbildung 3.2 A dargestellt. Von den 10 Proteinen, die für die Klonierung ausgewählt wurden, konnten nur 6 Proteine kloniert werden. Für die anderen 4 Proteine konnte mit den verwendeten Primern und Bedingungen kein PCR-Produkt der gewünschten Größe amplifiziert werden. Von den 6 erfolgreich klonierten Nukleotidsequenzen wurde die jeweilige Expressionskassette gewonnen, sodass die Transfektion von *L. tarentolae* Zellen für die anschließende Proteinherstellung erfolgen konnte (Abb. 3.2 B).



**Abb. 3.2.: PCR-Produkte und Expressionskassette von ausgewählten *T. suis* Proteinen (Exemplarisch für TsES8 und TsES9).**

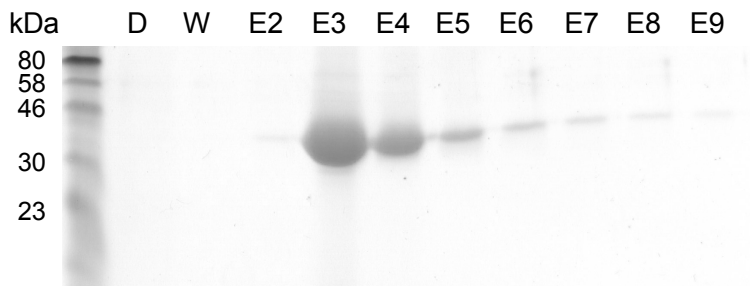
Dargestellt sind die PCR-Produkte von TsES8 (390 bp) und TsES9 (822 bp) im 1%igen Agarosegel, die mit Hilfe genspezifischer Primer aus *T. suis* cDNA durch PCR gewonnen wurden (A). Die angegebenen Nukleotidgrößen beinhalten den Primerbereich. Beispielhaftes 1%iges Agarosegel mit spezifischer Expressionskassette, die durch den Verdau des jeweiligen Plasmids pLEXY-sat2 mit *Swa*I gewonnen wurden (B). Es wurde eine 2-log DNA Ladder als Größenmarker und Midori Green als Färbelösung verwendet. [← Expressionskassette, \* Plasmidrest]

### 3.2.3. Proteinexpression

Die jeweiligen Proteine sollten von transfizierten *L. tarentolae* Zellen exprimiert und über Sekretion in das Kulturmedium abgegeben werden. Um zu überprüfen, ob rekombinante Proteine im Kulturüberstand vorhanden waren, wurden kleine Kulturen mit transfizierten *L. tarentolae* Zellen hergestellt. Der jeweilige Kulturüberstand wurde auf eine Ni-NTA-Agarose-Matrix gegeben, über die die His6-tag fusionierten rekombinanten Proteine gebunden und gereinigt wurden. Alle 6 ausgewählten Proteine konnten aus dem Kulturüberstand transfizierter *L. tarentolae* Zellen isoliert werden, weshalb größere Kulturen hergestellt wurden.

Die Reinigung der Proteine aus dem Kulturüberstand von Großkulturen mit bis zu 1 L Gesamtvolumen erfolgte mit Hilfe der Flüssigchromatografie über HisTrapExcel Säulen (Abschnitt 2.5.3). Dabei wurden ebenfalls die His6-tag fusionierten rekombinanten Proteine aus dem Kulturüberstand an die Matrix der Säule gebunden und gereinigt. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch für TsES9 die klaren Proteinbanden der einzelnen Fraktionen (Durchlauf, Waschfraktionen und Elutionsfraktionen) im SDS-Gel nach dem Färben mit Comassie.

Anschließend wurden 3-5 proteinhaltige Fraktionen der Elution vereinigt, gegen PBS dialysiert und über einen Sterilfilter gegeben, um die Proteine *in vitro* und *in vivo* einsetzen zu können. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCA-Kits ermittelt und ergab, dass bis zu 3 mg Protein aus 500 ml Kultur gewonnen werden konnten. Die LPS-Konzentration aller exprimierten Proteine lag unter 0,8 pg LPS/ $\mu$ g Protein.

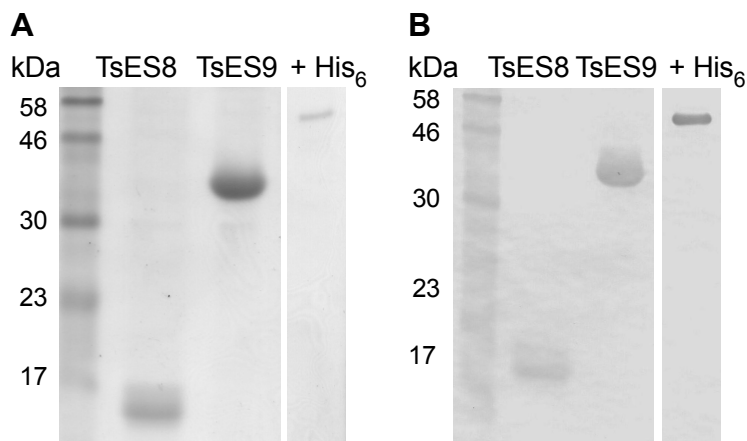


**Abb. 3.3.: Fraktionen der Proteinreinigung von TsES9 (exemplarisch).**

Dargestellt ist ein 12%iges SDS-Gel mit den Fraktionen der Proteinreinigung von TsES9 (31,3 kDa). Es wurden jeweils 16 µl der Fraktion aufgetragen. Die Proteinfärbung erfolgte mit Coomassie. [Durchlauf - D, Waschfraktion - W, Elutionsfraktionen - E]

Die rekombinant hergestellten Proteine tragen am C-terminalen Ende einen His<sub>6</sub>-tag, über den der spezifische Nachweis im Western Blot möglich ist. Dieser Nachweis ist in Abbildung 3.4 für die His<sub>6</sub>-tag tragenden Proteine TsES8 und TsES9 aufgeführt. Ebenso konnten die Proteine TsES1, TsES4, TsES5 und TsES6 über anti-His-tag Antikörper detektiert werden [Vetter, 2015].

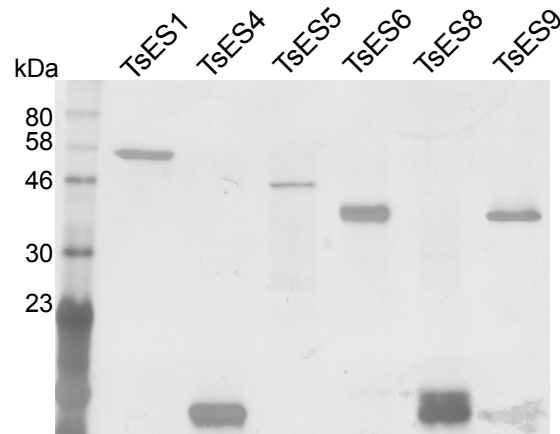
Insgesamt wurden 6 von den 10 ausgewählten Proteinen des *T. suis* L1 ES mit Hilfe des Leishmanien Expressionssystem kloniert, rekombinant hergestellt und gereinigt (Abb. 3.5). Die exprimierten Proteine wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie validiert und für *in vitro* und *in vivo* Versuche verwendet.



**Abb. 3.4.: Spezifischer Proteinnachweis von TsES8 und TsES9 im Western Blot (exemplarisch).**

Dargestellt ist ein 12%iges SDS Gel (A) und der dazugehörige Western Blot (B) mit den rekombinanten Proteinen TsES8(14,2 kDa) und TsES9(31,3 kDa). Es wurden 5 µg Protein aufgetragen. Die Proteinfärbung erfolgte mit Coomassie und der Proteinnachweis im Western Blot mit anti-His<sub>6</sub>-tag Antikörpern (AP-konjugiert, 1:200). Die Detektion wurde über eine AP-Substratlösung durchgeführt. [+His<sub>6</sub> - Positivkontrolle p53-His(6)]





**Abb. 3.5.: Rekombinante und gereinigte TsES L1 Proteine.**

Dargestellt ist ein 12%iges SDS-Gel mit den rekombinanten Proteinen TsES1 (55,5 kDa), TsES4 (13,9 kDa), TsES5 (39,1 kDa), TsES6 (37,1 kDa), TsES8 (14,2 kDa) und TsES9 (31,3 kDa). Es wurden 1-2  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Proteinfärbung erfolgte mit Silber.

### 3.3. Analysen zur Immunmodulation durch rekombinante *Trichuris suis* L1 ES Proteine

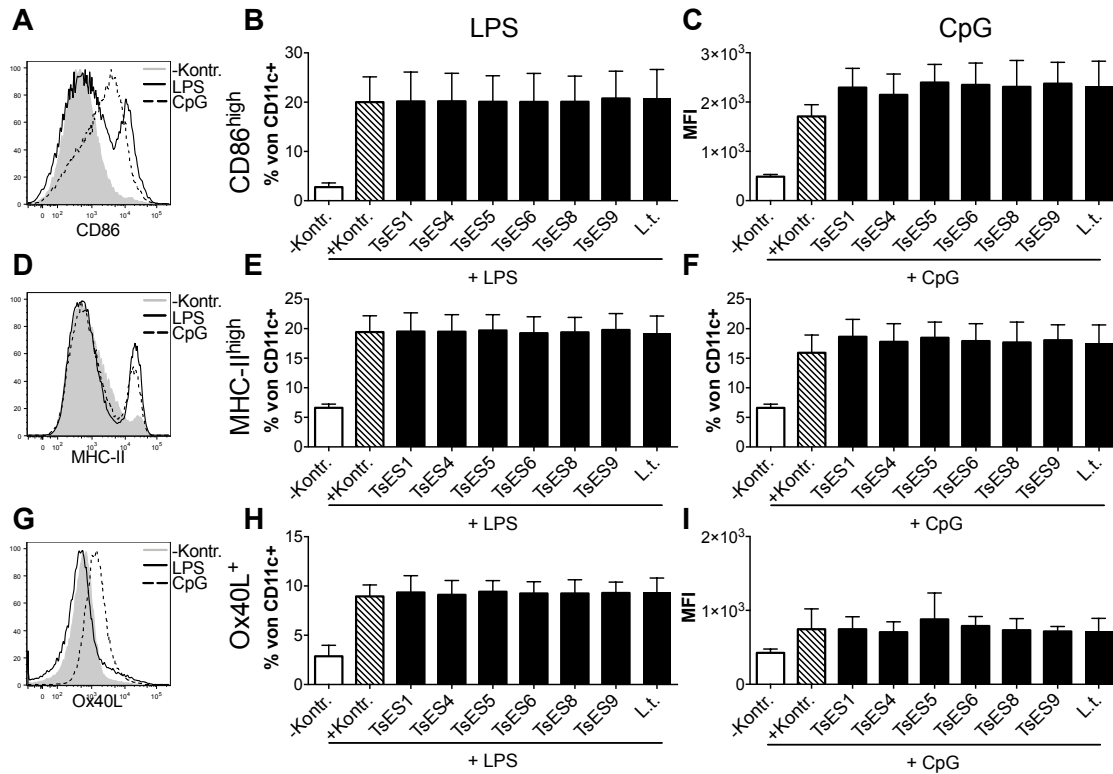
#### 3.3.1. *In vitro* Analysen rekombinanter larvaler *Trichuris suis* L1 ES Proteine

##### Phänotypisierung dendritischer Zellen nach TsES/ TLR-Stimulation

Unsere vorangegangenen Arbeiten haben gezeigt, dass das Gesamt-ES von *T. suis* Larven *in vitro* die Expression von Oberflächenmarkern dendritischer Zellen (DCs) nach TLR-Stimulation mit CpG reduziert [Ebner et al., 2014]. Nachfolgend sollte überprüft werden, ob einzelne, rekombinant hergestellte Proteine des *T. suis* ES in ähnlicher Weise zu einer Reduktion der Markerexpression führen.

Dazu wurden aus murinem Knochenmark generierte DCs mit oder ohne rekombinante *T. suis* Proteine inkubiert und mit LPS oder CpG stimuliert. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex* MHC)-II ist konstitutiv auf DCs exprimiert, wird nach Aktivierung der Zellen während einer Infektion vermehrt exprimiert und bildet das erste Signal für die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Zusammen mit dem kostimulatorischen Molekül CD86, welches als zweites Signal fungiert, wird die Aktivierung vervollständigt [Murphy et al., 2009]. Für die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th1- bzw. Th2-Zellen sind Zytokine und weitere kostimulatorische Moleküle entscheidend. Ox40L ist solch ein Kostimulator auf der Zelloberfläche von DCs, der speziell zur Induktion von Th2-Zellen beiträgt [Jenkins et al., 2007].

Durch die Sekretion von IL-4 wird die Induktion von Th2-Zellen unterstützt, wohingegen die Differenzierung zu Th1-Zellen hauptsächlich durch das Zytokin IL-12 induziert wird [Kaiko et al., 2008].

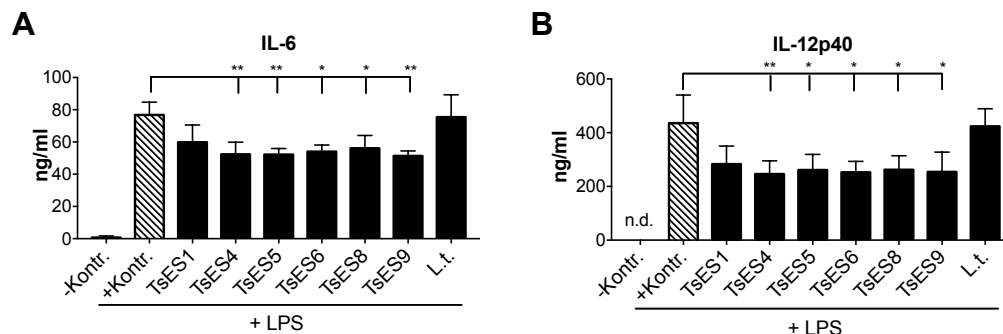


**Abb. 3.6.: Expression der Oberflächenmarker stimulierter DCs.**

Aus dem Knochenmark generierte dendritische Zellen ( $3 \times 10^5$ ) wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  TsES Protein für 2,5 h inkubiert und anschließend für 20 h mit  $100 \text{ ng/ml}$  LPS oder  $1 \mu\text{M}$  CpG stimuliert. Die Expression der Oberflächenmarker CD86 (A, B, C), MHC-II (D, E, F) und Ox40L (G, H, I) wurde über Durchflusszytometrie analysiert. Je Oberflächenmarker ist ein Histogramm dargestellt, dass die Expression für -Kontrolle (grau), LPS (schwarz) und CpG (gestrichelt) zeigt (A, D, G). Daten stammen von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt  $n=9$  Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SD). Statistische Analyse über einen Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Post-hoc-Test (*Dunn's multiple comparison*) zwischen der + Kontrolle und den TsES behandelten Gruppen. [L.t.- Kontrolle mit gereinigtem Überstand nicht transfizierter *L. tarentolae*]

Die Expression der Oberflächenmarker MHC-II, CD86 und Ox40L wurde durch die Stimulation der DCs mit LPS und CpG erhöht (Abb. 3.6). Jedoch führte die zusätzliche Inkubation der DCs mit rekombinant hergestellten *T. suis* Proteinen zu keiner Reduktion der Markerexpression der LPS-stimulierten DCs (Abb. 3.6 B, E, H). Im Unterschied zur LPS-Stimulation führte die CpG-Stimulation bei den Oberflächenmarkern CD86 und Ox40L zu einer Expressionssteigerung der gesamten Zellpopulation, weshalb die mittlere Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity* MFI) für diese Marker angegeben wurde (Abb. 3.6 A, C, G, I). Bei CpG-stimulierten DCs wurde eine leichte Steigerung der Expression von CD86 (MFI  $1,7 \times 10^3$  ->

$2,3 \times 10^3$ ) und MHC-II (ca. 16 % -> ca. 18 %) durch die Behandlung mit allen TsES Proteinen beobachtet (Abb. 3.6 C, I). Als Kontrolle für den Einfluss des Expressionssystems wurde gereinigter Kulturüberstand von untransfizierten Leishmanien-Zellen verwendet, der zu keiner Regulation der Markerexpression der LPS-stimulierten DCs führte (Abb. 3.6 B, E, H). Ebenso wie die TsES Proteine führte die Behandlung mit gereinigtem Überstand nicht transfizierter *L. tarentolae* zu einer leichten Steigerung der Expression von CD86 und MHC-II (Abb. 3.6 C, I). Deshalb kann die Vergrößerung der MFI-Werte von CD86 bzw. Vermehrung MHC-II<sup>high</sup> Zellen durch die Inkubation mit den TsES Proteinen nicht als proteinspezifische Beobachtung bezeichnet werden.



**Abb. 3.7.: Zytokinlevel stimulierter DCs.**

Aus dem Knochenmark generierte dendritische Zellen ( $3 \times 10^5$ ) wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  TsES Protein für 2,5 h inkubiert und anschließend für 20 h mit  $100 \text{ ng/ml}$  LPS oder  $1 \mu\text{M}$  CpG stimuliert. Die Zytokine IL-6 (**A**) und IL-12p40 (**B**) wurden im Zellüberstand bestimmt. Daten stammen von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt  $n=7-9$  Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SD). Statistische Analyse über einen Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Post-hoc-Test (*Dunn's multiple comparison*) zwischen der + Kontrolle und den TsES behandelten Gruppen. Statistische Signifikanz ist durch \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  gekennzeichnet. [L.t.-Kontrolle mit gereinigtem Überstand nicht transfizierter *L. tarentolae*]

Die Zellüberstände wurden am Ende der Stimulation gesammelt, um die Zytokinlevel von IL-6 und IL-12p40 zu ermitteln. Die Stimulation der DCs mit CpG erhöhte die Konzentration von IL-6 und IL-12p40, wobei die Behandlung mit den TsES Proteinen keinen Einfluss auf die IL-6 und IL-12p40 Produktion hatte (Daten nicht aufgeführt). Im Gegensatz dazu wurde das erhöhte Zytokinlevel von IL-6 nach Stimulation mit LPS durch die Inkubation mit rekombinant hergestellten *T. suis* Proteinen signifikant von  $76,8 \pm 7,8 \text{ ng/ml}$  auf  $51-56 \text{ ng/ml}$  reduziert (Abb. 3.7 A). Damit einher ging die Reduktion der Konzentration von IL-12p40 von  $435,9 \pm 104 \text{ ng/ml}$  auf  $246-262 \text{ ng/ml}$  (Abb. 3.7 B). Einzig TsES1 zeigte bei dem verwendeten statistischen Test keine signifikante Reduktion der IL-6 und IL-12p40 Konzentrationen. Anders als bei der Markerexpression, bei der die Inkubation der DCs mit gereinigtem Überstand

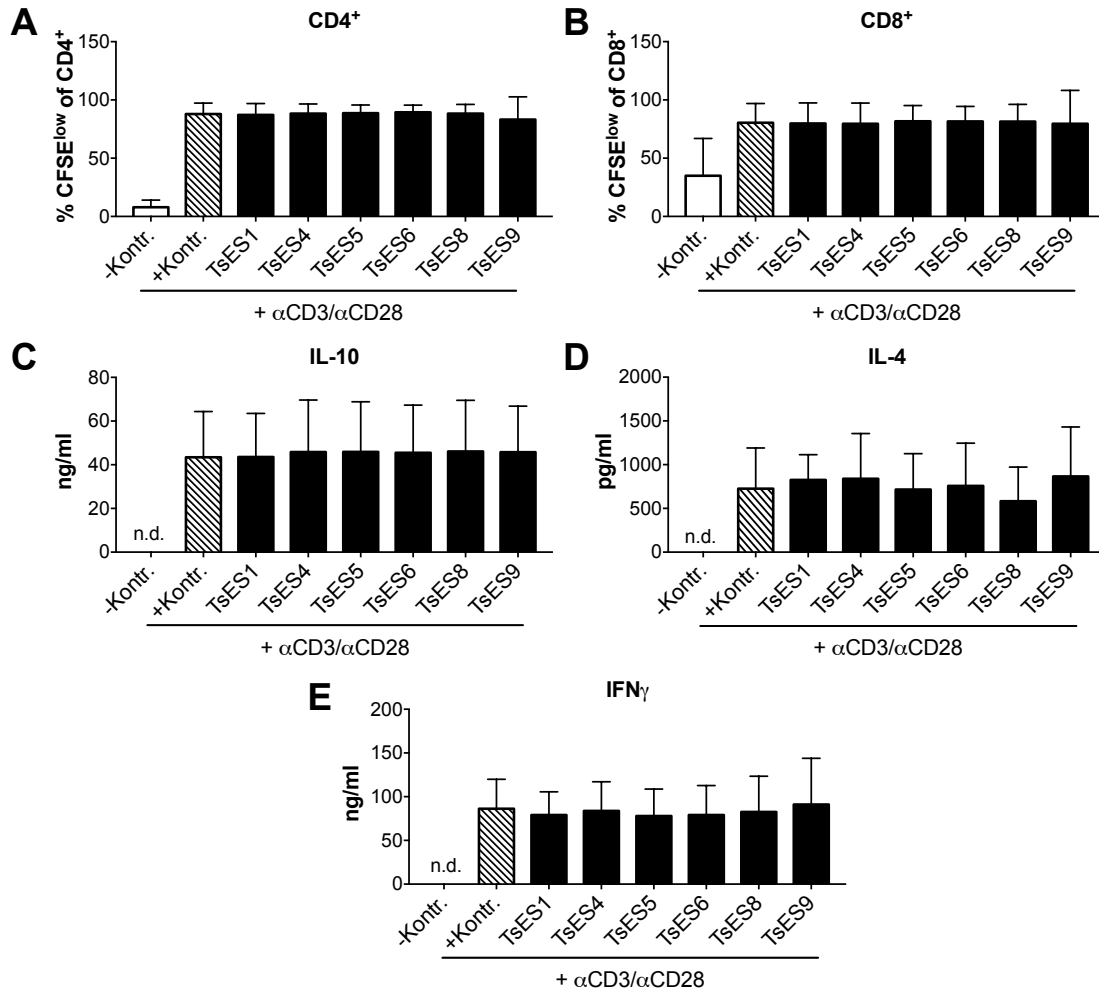
nicht transfizierter *L. tarentolae* gleich der Behandlung mit TsES Proteinen war, wurden die Zytokinlevel von IL-6 und IL-12p40 durch diesen gereinigten *L. tarentolae* Überstand nicht reduziert. Dadurch wird deutlich, dass die Reduktion der Zytokinlevel abhängig von den rekombinanten TsES Proteinen war.

### **Antigenabhängige und -unabhängige T-Zellproliferation in Anwesenheit rekombinanter *Trichuris suis* Proteine**

Die initialen *in vitro* Analysen haben gezeigt, dass LPS-stimulierte DCs in Anwesenheit von rekombinant hergestellten *T. suis* Proteinen weniger IL-6 und IL-12p40 produzieren. Des Weiteren wurde für ES Produkte anderer Helminthen, wie z.B. *H. polygyrus* ES, beschrieben, dass sie die T-Zellproliferation *in vitro* reduzieren und gleichzeitig die Expression von FoxP3 induzieren können [Grainger et al., 2010]. Deshalb sollte der Einfluss der rekombinant hergestellten *T. suis* Proteine auf die antigenabhängige und -unabhängige T-Zellproliferation untersucht werden.

Für die antigenunabhängige Proliferation wurden die rekombinant hergestellten Proteine zu naiven, CFSE gefärbten Milzzellen gegeben, die gleichzeitig über anti-CD3/anti-CD28 unspezifisch zur Proliferation angeregt wurden. Diese Stimulation führte zur Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch einen Anteil von 80 % CFSE<sup>low</sup> Zellen in der positiven Kontrolle gekennzeichnet waren. Die Zugabe von rekombinant hergestellten TsES Proteinen hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.8 A, B).

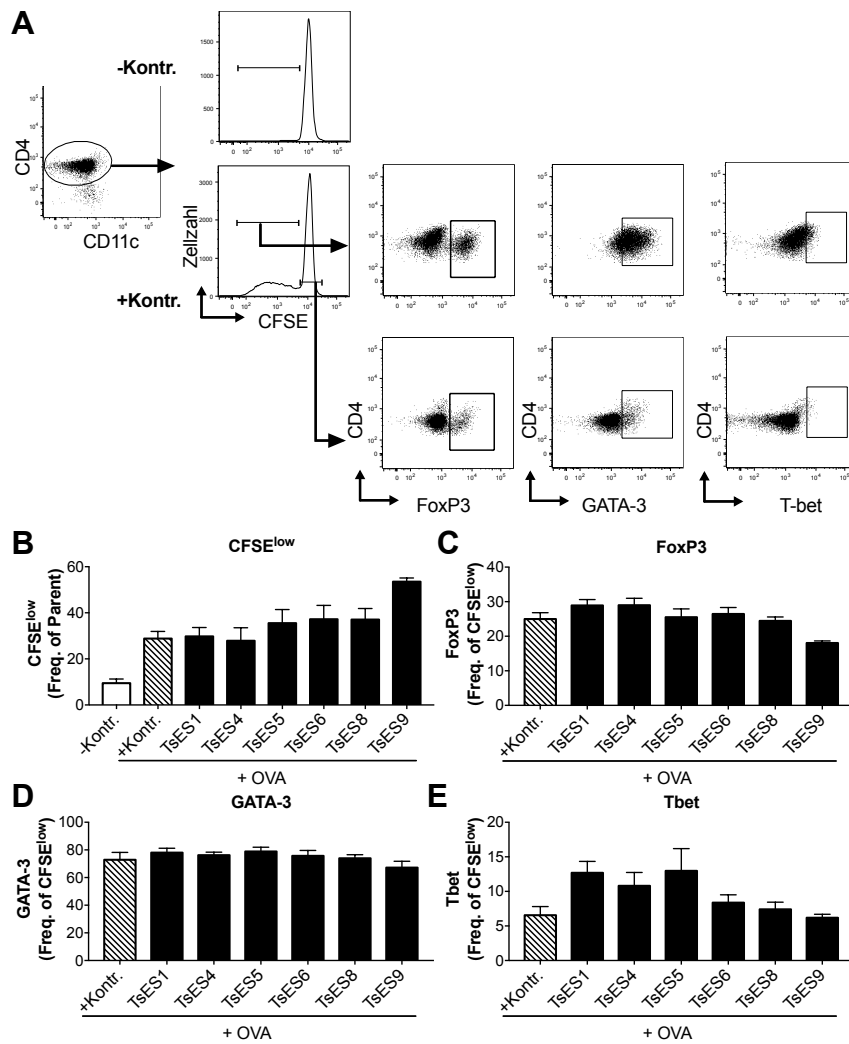
Neben der Zellproliferation kann durch Helminthenprodukte auch die Differenzierung von T-Zellen und deren Zytokinexpression beeinflusst werden. Deshalb wurden die Zellüberstände am Ende der Stimulation gesammelt und die Zytokinlevel der Th2-Zytokine IL-4, IL-10 und des Th1-Zytokins IFN $\gamma$  ermittelt (Abb. 3.8 C, D, E). Alle untersuchten Zytokine wurden deutlich in den Überständen der positiven Kontrolle, jedoch nicht in der negativen Kontrollgruppe, nachgewiesen. Dabei führte nur die Behandlung mit TsES8 zu einer leichten Reduktion der IL-4 Konzentration von 725 pg/ml auf 582 pg/ml (Abb. 3.8 D). Hingegen wurden durch alle anderen TsES Proteine keine veränderten Zytokinlevel gemessen.



**Abb. 3.8.: Antigenunabhängige T-Zellproliferation.**

$4 \times 10^5$  CFSE gefärbte Zellen der Milz wurden für 4 Tage mit  $10 \mu\text{g}$  TsES Protein unter anti-CD3/ anti-CD28 Bedingungen inkubiert. Die Proliferation von  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurde analysiert (A). Die Konzentration der Zytokine IL-10, IL-4 und  $\text{IFN}\gamma$  wurde im Zellüberstand gemessen (C). Daten stammen von 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt  $n=6$  Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SD). Statistische Analyse über einen Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Post-hoc-Test (*Dunn's multiple comparison*) zwischen der + Kontrolle und den TsES behandelten Gruppen.

Für die antigenabhängige Proliferation wurde eine Ko-Kultur aus TsES behandelten, OVA-beladenen DCs mit CFSE gefärbten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen von OVA-transgenen Balb/c Mäusen angesetzt. Neben der Analyse der T-Zellproliferation wurde auch die Expression der Transkriptionsfaktoren FoxP3, GATA-3 und T-bet über spezifische Antikörperfärbungen am Durchflusszytometer ermittelt (Abb. 3.9).

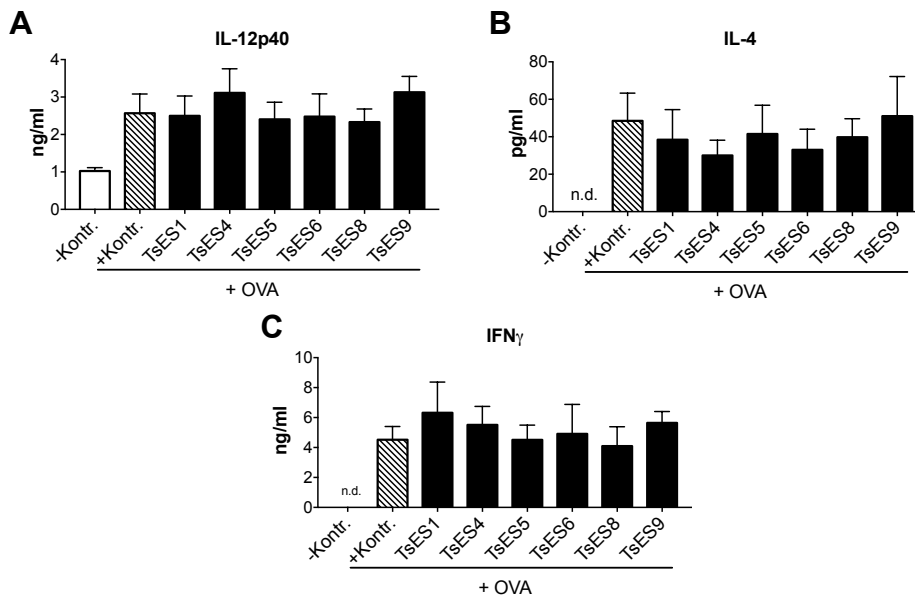


**Abb. 3.9.: OVA-spezifische T-Zellproliferation.**

Aus dem Knochenmark generierte DCs wurden mit 10 µg/ml TsES Protein für 24 h behandelt, mit OVA beladen und als Ko-Kultur mit  $4 \times 10^5$  CFSE gefärbten  $CD4^+$  T-Zellen für 5 Tage inkubiert. Die Proliferation von  $CD4^+$ ,  $CD11c^-$  T-Zellen wurde der Gatingstrategie folgend analysiert (**A**, **B**). Die Expression der Transkriptionsfaktoren FoxP3 (**C**), GATA-3 (**D**) und Tbet (**E**) von  $CFSE^{low}$  T-Zellen wurde analysiert. Daten stammen von 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt  $n=5$  Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SD). Statistische Analyse über einen Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Post-hoc-Test (*Dunn's multiple comparison*) zwischen der + Kontrolle und den TsES behandelten Gruppen.

FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der für regulatorische T-Zellen (Tregs) kennzeichnend ist [Sakaguchi et al., 2008]. Die beiden Transkriptionsfaktoren Tbet und GATA-3 sind Marker-moleküle für die beiden CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zelltypen Th1 (Tbet) und Th2 (GATA-3), die unter anderem die Expression Th1-typischer Zytokine (IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ ) oder Th2-typischer Zytokine (IL-4, IL-13) induzieren [Kaiko et al., 2008]. Da Helminthen die Polarisation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflussen können, wurde die Expression der genannten Transkriptionsfaktoren untersucht.

Die Proliferation der OVA-transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde bei allen OVA-behandelten Proben gemessen (Abb. 3.9 A, B). Die Zugabe von rekombinant hergestellten TsES Proteinen zu den DCs hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.9 B). Jedoch führte die Behandlung mit TsES9 zu einer Proliferationssteigerung von 29 % auf 53 % und zu einer geringeren Frequenz der FoxP3-exprimierenden Zellen (Abb. 3.9 B, C). Die Behandlung mit den Proteinen TsES1, TsES4 und TsES5 erhöhte die Frequenz von Tbet-exprimierenden Zellen im Vergleich zur positiven Kontrolle und induzieren daher Th1-Zellen (Abb. 3.9 E). Signifikante Änderungen der Frequenzen der FoxP3-, GATA-3- oder Tbet-exprimierenden Zellen durch die Inkubation der TsES Proteine mit den DCs wurden nicht ermittelt.



**Abb. 3.10.: Zytokine nach OVA-spezifischer T-Zellproliferation.**

Der Zellüberstand der Ko-Kultur aus OVA-beladenen, TsES-Protein behandelten DCs und CFSE gefärbten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde nach einer Inkubation von 5 Tagen gesammelt. Die Konzentration der Zytokine IL-12p40 (A), IL-4 (B) und IFN $\gamma$  (C) wurde im Zellüberstand gemessen. Daten stammen von 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt n=5 Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SD).

Die Zellüberstände wurden am Ende der Stimulation gesammelt und die Zytokinlevel von IL-4, IL-12p40 und IFN $\gamma$  ermittelt. Die Konzentration der Zytokine wurde durch die OVA-Stimulation erhöht, jedoch wurden durch die Behandlung der DCs mit TsES Proteinen keine signifikanten Änderungen Zytokinlevel gemessen (Abb. 3.10 A, B, C). Trotzdem wurde durch die Behandlung mit TsES4 und TsES6 eine leichte Reduktion des IL-4 Levels detektiert (Abb. 3.10 B). Außerdem führte die Behandlung mit TsES1 zu einer geringen Steigerung der IFN $\gamma$  Konzentrationen im Vergleich zur positiven Kontrolle (Abb. 3.10 C). Damit zeigt vor allem TsES1 durch höhere IFN $\gamma$  Konzentrationen und einem Anstieg der Tbet Expression eine eher Th1 induzierende Eigenschaft.

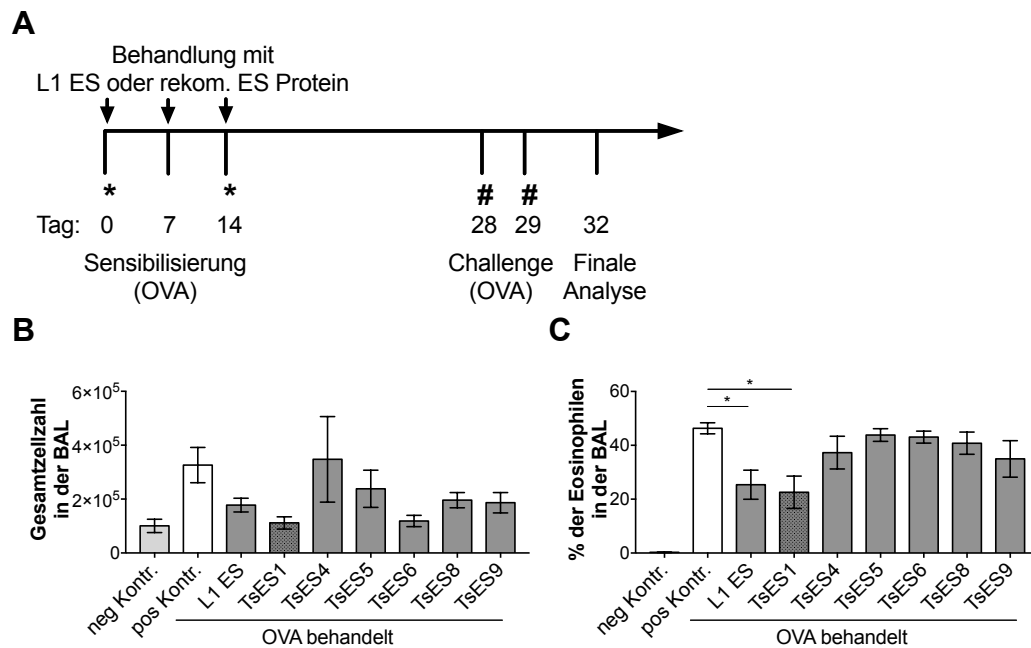
### **3.3.2. Präventive Applikation rekombinanter *Trichuris suis* L1 Proteine im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung**

Parallel zu den *in vitro* Experimenten wurden die rekombinant hergestellten *T. suis* Proteine in einem Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung untersucht. Es wurde in vorangegangenen Arbeiten gezeigt, dass das Gesamt-ES von *T. suis* Larven in einem Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung immunmodulatorisch wirkte [Ebner et al., 2014]. Es sollte daher überprüft werden, ob die ausgewählten, rekombinant hergestellten *T. suis* Proteine in diesem *in vivo* Mausmodell ebenfalls die Infiltration von Immunzellen in die Lunge reduzieren und die Lungenfunktion verbessern.

Das Asthma-Krankheitsmodell in der Maus, das OVA-induzierte Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung (*allergic airway hyperreactivity* - AHR), ist ein akutes Modell für die allergische Th2-Entzündung in der Lunge [Wills-Karp, 1999]. Es bietet die Möglichkeit Th2-abhängige Immunreaktionen in einem relativ kurzen Zeitraum zu analysieren, die in der Lunge durch die Ansammlung von Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, gesteigerter Mukusproduktion und geschwächter Lungenfunktion charakterisiert ist [Taube et al., 2004].

Zur Induktion der allergischen Atemwegserkrankung in der Maus wurde das unter Abschnitt 2.1.2 beschriebene und in Abbildung 3.11 A schematisch dargestellte Modell verwendet. Dazu wurden die Tiere mit OVA systemisch sensibilisiert (i.p.) und über die intranasale Applikation von OVA erfolgte nach 4 Wochen die allergische Reizung der Lunge. Neben den rekombinanten Proteinen wurden folgende Kontrollen mitgeführt: NaCl Sensibilisierung/ OVA Provokation (Asthma negative Kontrolle), OVA Sensibilisierung/ OVA Challenge (Asthma positive Kontrolle) und OVA Sensibilisierung/ OVA Challenge - Behandlung mit *T. suis* L1 Gesamt-ES (positive Kontrolle der Immunmodulation).





**Abb. 3.11.: Präventive Applikation rekombinanter *T. suis* L1 Proteine im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung.**

Dargestellt ist das Schema zur Induktion der allergischen Atemwegserkrankung in der Maus mit präventiver TsES Behandlung (A). Die Gesamtzellzahl (B) und der Anteil eosinophiler Granulozyten (C) in der BAL wurde bestimmt. Daten stammen von 2 Experimenten mit insgesamt  $n=5-10$  Wiederholungen pro Gruppe (Mittelwert  $\pm$  SD). Statistische Analyse über einen Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Post-hoc-Test (*Dunn's multiple comparison*) zwischen der positiven Kontrolle und den TsES behandelten Gruppen. Statistische Signifikanz ist durch \*  $p \leq 0,05$  gekennzeichnet.

Ein für die allergische Atemwegserkrankung charakteristischer Parameter ist die Einwanderung eosinophiler Granulozyten und weiterer Immunzellen in die Lunge. Um diese Zellen zu analysieren wurde eine Lungenspülung (*Brochoalveolare lavage* - BAL) durchgeführt und die Gesamtzellzahl in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Die höchste Zellzahl ( $3,2-3,8 \times 10^5$  Zellen) wurde bei der positiven Kontrollgruppe und der TsES4 behandelten Gruppe ermittelt, die gekennzeichnet waren durch eine hohe Varianz innerhalb der Gruppen (Abb. 3.11 B). Die vorherigen Ergebnisse bestätigend kam es zu einer Reduktion der Zellzahl in der BAL durch die Behandlung mit *T. suis* L1 ES. Die Proteine TsES1 und TsES6 führten ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der Gesamtzellzahl in der BAL (Abb. 3.11 B), wobei TsES1 die Gesamtzellzahl wesentlich stärker verringerte als *T. suis* L1 ES. Durch eine Behandlung mit TsES1 wurde eine Gesamtzellzahl von  $1,1 \times 10^5$  Zellen erreicht, die fast dem Wert der negativen Kontrollgruppe ( $1,0 \times 10^5$  Zellen) entsprach.

Des Weiteren wurden die Zellen der BAL auf Objektträger zentrifugiert und mit Hilfe eines DiffQuick-Färbekits angefärbt, um eine Differential-Zellzählung durchzuführen. Der Anteil an eosinophilen Granulozyten in der Lunge stieg von 0 % auf 46 % für die positive Kontrolle (Abb.

3.11 C). Durch eine Behandlung mit *T. suis* L1 ES wurde der Anteil eosinophiler Granulozyten in der Lunge signifikant reduziert (Abb. 3.11 C). Daneben führte nur die Behandlung mit TsES1 zu einer deutlichen Abnahme der eosinophilen Granulozyten von 46 % auf 23 % in der BAL. Unsere initialen Versuche bestätigten, dass sogar einzelne Komponenten des *T. suis* L1 ES zur Reduktion von infiltrierenden Immunzellen im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung führen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die rekombinant exprimierten TsES Proteine die IL-6 und IL-12p40 Zytokinproduktion von LPS-stimulierten DCs signifikant reduzieren. Jedoch führte die Behandlung nicht zu einer signifikanten Änderung der Expression von Oberflächenmarkern der stimulierten DCs. Die antigenabhängige T-Zellproliferation wurde durch die Inkubation der DCs mit TsES9 leicht gesteigert, wobei die Frequenz der FoxP3-exprimierenden Zellen reduziert vorlag. Die Frequenz CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die den Transkriptionsfaktor Tbet exprimieren, erhöhte sich bei der OVA-abhängigen T-Zellproliferation nach DC-Behandlung mit dem Protein TsES1. Ebenso wurde eine höhere IFN $\gamma$ -Konzentration in der TsES1 behandelten Gruppe detektiert. *In vivo* ergab die Behandlung mit den sechs TsES Proteinen in dem Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung, dass nur das Protein TsES1 ähnlich dem *T. suis* L1 ES zu einer signifikanten Abnahme der eosinophilen Granulozyten in der BAL führt. Insgesamt wurden erste regulatorische Eigenschaften der rekombinant hergestellten TsES Proteine in den ausgewählten *in vitro* und *in vivo* Modellen beobachtet, wobei vor allem das Protein TsES1 mit der deutlichen Reduktion der Eosinophilie in der Lunge im Asthmamodell auffiel.

### **3.4. Das *Trichuris suis* L1 ES Protein TsES1**

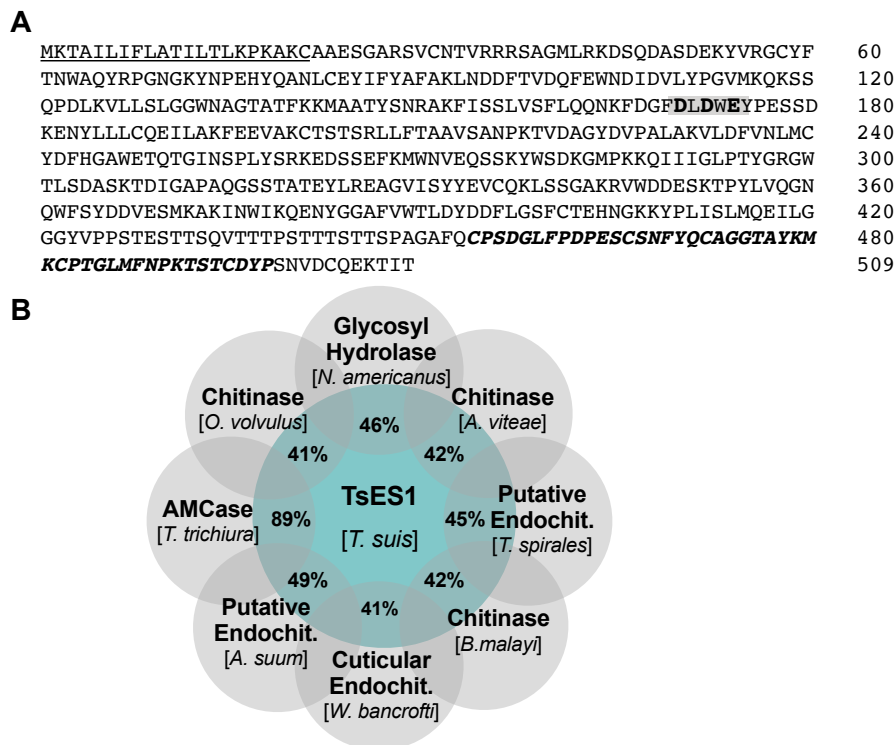
#### **3.4.1. TsES1 besitzt Homologien zu Chitinasen**

Das rekombinant hergestellte *T. suis* Protein TsES1 hat im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung die Anzahl der infiltrierenden eosinophilen Granulozyten in der Lunge reduziert. Als nächstes wurde das Protein und seine möglichen biochemischen Eigenschaften genauer untersucht.

Die Proteinsequenz von TsES1 ist 509 Aminosäuren (AS) lang und besitzt eine Signalsequenz (AS 1-21) zur Sekretion. Das Protein ist mit 55 kDa ein mittelgroßes Protein und trägt eine für Chitinasen typische Enzymdomäne (Abb. 3.12 A). Diese Domäne ist durch das Motiv DxDxE gekennzeichnet und weist auf das aktive Zentrum des Enzyms hin. Des Weiteren wur-

de für die Sequenz von TsES1 eine Chitinase-Binde-Domäne (*chitin binding domain*-CBD) am C-terminalen Ende der Proteinsequenz identifiziert (Abb. 3.12 A). Damit besitzt das Protein TsES1 eindeutige Charakteristika der Enzymklasse der Chitinasen, die zur Familie der Glykosylhydrolasen 18 (GH-18) gehören und Chitin abbauen.

Zusätzlich wurde ein Abgleich der Proteinsequenz von TsES1 mit der Proteindatenbank von NCBI durchgeführt. Dazu wurden Proteinsequenzen von 8 identifizierten Proteinen bekannter Nematoden ausgewählt und über Alignment-Analysen mit TsES1 verglichen. Die Proteinsequenz von TsES1 zeigt deutliche Homologien zu den Chitinasen anderer Nematoden (Abb. 3.12 B). Mit 89% wurde für TsES1 die höchste Sequenzidentität zu der *Acidic Mammalian Chitinase* (AMCase) von dem nahe verwandten Nematoden *T. trichiura* ermittelt. Zu 7 weiteren Nematodenchitinasen zeigte TsES1 Sequenzidentitäten von 41-49%.

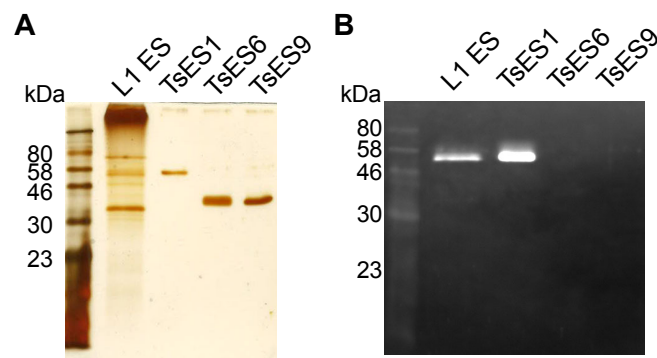


**Abb. 3.12.: Sequenzanalyse des *T. suis* L1 Proteins TsES1.**

Der Vergleich der Proteinsequenz von TsES1 zu Chitinasen anderer Nematoden zeigt die Sequenzidentität zwischen den Proteinen (A). Für das Alignment und die Berechnung der prozentualen Ähnlichkeit wurde ClustalOmega verwendet. Die Aminosäuresequenz des *T. suis* Proteins TsES1 (509 AS) ist dargestellt (B). [unterstrichen - Signalpeptid, dick hervorgehobene Aminosäuren - Enzymmotiv von Chitinasen, dick und kursiv - Chitin-Binde-Domäne]

Als nächstes sollte überprüft werden, ob das rekombinant hergestellte Protein TsES1 auch in natürlicher Form im *T. suis* L1 ES nachgewiesen werden kann. Dazu war es nötig TsES1-spezifische Antikörper zu generieren (siehe Abschnitt 2.1.3), die für die Analyse des ES von *T. suis* L1 Larven zusammen mit dem rekombinant hergestellten TsES1 Protein (495 Aminosäuren, 55,5 kDa) im Western Blot benötigt wurden (Abb. 3.13 A, B). Als Kontrollproteine wurden zwei weitere rekombinant hergestellte *T. suis* L1 ES Proteine mitgeführt.

In dem aufgetrennten *T. suis* L1 ES wurde nach Silberfärbung eine Bande auf Höhe von TsES1 (55,5 kDa) sichtbar (Abb. 3.13 A), die ebenfalls mit TsES1-spezifischen IgG-Antikörpern detektiert wurde (Abb. 3.13 B). Damit konnte natürlich exprimiertes TsES1 mit Antikörpern, die gegen das rekombinant hergestellte Protein TsES1 gebildet wurden, im larvalen Überstand nachgewiesen werden. Da die anderen rekombinanten TsES Proteine nicht detektiert wurden, konnte geschlossen werden, dass His6-tag spezifische Antikörper vermutlich kaum gebildet wurden.



**Abb. 3.13.: Detektion von TsES1 im ES von *T. suis* L1 Larven.**

12%iges SDS-Gel der Proteine *T. suis* L1 ES, TsES1(55,5 kDa), TsES6(37,1 kDa) und TsES9(31,3 kDa) nach Silberfärbung (A). Mit Hilfe von anti-TsES1 spezifischen IgG-Antikörpern (1:500) erfolgte die Detektion im Western Blot (B).

### 3.4.2. TsES1 ist als Chitinase aktiv

Durch die Analyse der Proteinsequenz wurde für das Protein TsES1 ein Chitinase-motiv identifiziert. Es sollte nun überprüft werden, ob das rekombinant hergestellte TsES1 eine Chitinaseaktivität aufweist. Dazu wurde ein Chitinase-Assay durchgeführt, bei dem zwei verschiedene Chitinasesubstrate zur Unterscheidung von Endo- und Exo-Chitinasen eingesetzt wurden. Endo-Chitinasen schneiden innerhalb des Chitinmoleküls, wohingegen Exo-Chitinasen vom Ende einzelne N-Acetylglucosamin-Einheiten abtrennen [Henrissat and Davies, 1997].

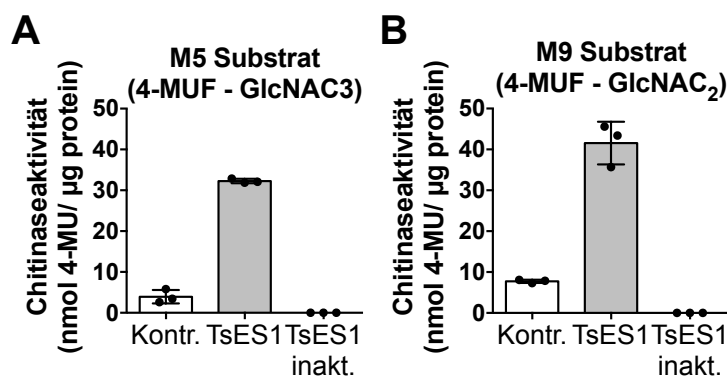
Für das rekombinant hergestellte TsES1 konnte nachgewiesen werden, dass es sowohl eine Endo- als auch Exo-Chitinaseaktivität besitzt (Abb. 3.14). Als Kontrolle wurde eine Chitinase von *Trichoderma viride* eingesetzt, die erstaunlicherweise eine geringere Aktivität als

TsES1 zeigte. Wenn das Protein TsES1 Hitze-inaktiviert wurde, konnte keine enzymatische Aktivität für beide Substrate festgestellt werden.

Es wurde einleitend erwähnt, dass *T. suis* Larven im Darm ihres Wirtes schlüpfen und sich durch mehrmaliges Häuten weiterentwickeln. Bei diesem für Helminthen typischen Entwicklungsmechanismus übernehmen Enzyme, wie z.B. Chitinasen eine wichtige Rolle. Sie unterstützen das Schlüpfen aus dem Ei und die Häutungsprozesse [Tachu et al., 2008]. Zusätzlich herrscht im Darm der Schweine ein relativ saures Milieu, weshalb die Enzyme der Parasiten stabil und resistent sein sollten, um enzymatisch aktiv zu sein. Deshalb wurde die Stabilität des rekombinant hergestellten Proteins TsES1 und dessen pH-abhängige Chitinaseaktivität überprüft.

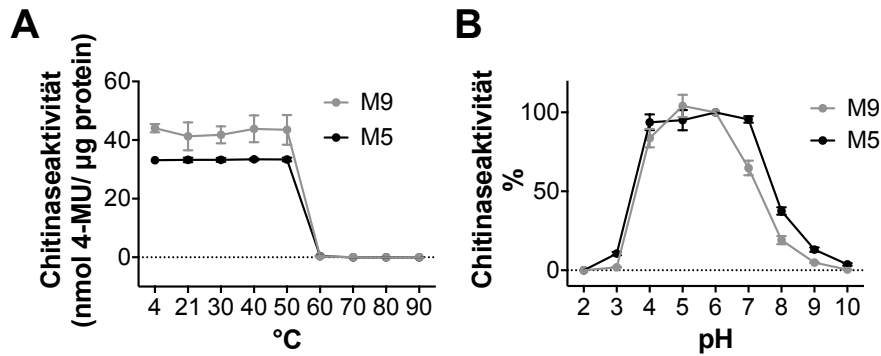
Es wurde gezeigt, dass TsES1 für 1 h bei 50 °C erhitzt werden kann, ohne dass dies einen Einfluss auf die Chitinaseaktivität hat (Abb. 3.15 A). Ab einer Temperatur von 60 °C und höher wurde keine enzymatische Aktivität mehr gemessen. Zur Identifizierung des optimalen pH-Wertes für die Aktivität der Chitinase TsES1 wurde der Assay bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Bei einem pH-Wert zwischen 4-7 wurde für das rekombinant hergestellte Protein TsES1 eine optimale Chitinaseaktivität ermittelt (Abb. 3.15 B).

Das bedeutet, dass das *T. suis* Protein TsES1 eine Chitinase ist, die als rekombinantes Protein eine starke Chitinaseaktivität hat und Homologien zu Chitinasen anderer Helminthen aufweist. Außerdem ist TsES1 relativ hitzestabil und auch bei einem pH-Wert von 4 noch enzymatisch aktiv, sodass diese Chitinase im Darm von Schweinen beim Schlüpfen der Larven beteiligt sein könnte.



**Abb. 3.14.: Chitinaseaktivität von rekombinantem TsES1.**

Die Endo- (A) und Exo-Chitinaseaktivität (B) von TsES1 wurde ermittelt. Die jeweilige Substratlösung wurde 30 min bei 37 °C mit 50 ng TsES1 oder der Kontrolle inkubiert. Die Chitinaseaktivität wurde anhand einer Standardkurve berechnet. [Kontr. - Kontrollchitinase von *Trichoderma viride*]



**Abb. 3.15.: Temperatur- und pH-Wert-abhängige Chitinaseaktivität von rekombinantem TsES1.**

Die Chitinaseaktivität von TsES1 nach einstündiger Hitzebehandlung wurde für die Substrate der Endo- und Exo-Chitinase ermittelt (A). Das pH-Optimum der TsES1 Chitinase wurde über Substratlösungen verschiedener pH-Werte ermittelt (B). Die jeweilige Substratlösung wurde 30 min bei 37 °C mit 50 ng TsES1 inkubiert. Die Chitinaseaktivität wurde anhand einer Standardkurve berechnet.

### 3.4.3. Proteinstruktur von TsES1

Chitinasen bilden eine große Enzymgruppe, die von allen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen gebildet werden [Adrangi and Faramarzi, 2013]. Zu diesen Enzymen sind 223 Strukturanalysen (Stand März 2018) in der PDB-Datenbank hinterlegt, jedoch befand sich keine einzige Struktur von einer Helminthenchitinase darunter. Deshalb wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Makromolekulare Kristallografie von Dr. Manfred Weiss des Helmholtz-Zentrum Berlin die Struktur des Proteins TsES1 untersucht. Zusammen mit Dr. Piotr Malecki wurden die Proteinkristalle hergestellt und Diffraktionsdaten unter Nutzung hochintensiven Röntgenlichts von Synchrotronstrahlungsquellen aufgenommen.

Um die Struktur des Proteins TsES1 analysieren zu können, mussten die richtigen Bedingungen für die Kristallisation gefunden werden. Dazu wurde als erstes mit Hilfe eines Thermofluor-Assays der passende Puffer identifiziert, in dem das Protein TsES1 möglichst stabil vorliegt (siehe Abschnitt 2.6.7). Wie schon beim Chitinase-Assay festgestellt wurde, ist TsES1 ein relativ stabiles Protein, sodass mehrere Pufferbedingungen gleichermaßen die Stabilität des Proteins unterstützten. In einem 50 mM HEPES-Puffer (pH 7) denaturierte das rekombinante Protein TsES1 bei einer Temperatur von 64 °C. In 50 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 4) hingegen war das Protein weniger stabil und denaturierte bereits bei einer Temperatur von 47 °C. Deshalb wurde für TsES1 in den weiteren Schritten der Kristallisation ein HEPES-Puffer verwendet.

Als nächstes sollte der richtige Kristallisationspuffer bestimmt werden. Dazu wurde das rekombinant hergestellte Protein TsES1 auf eine Endkonzentration von 33 mg/ml eingestellt und

mit den Pufferlösungen verschiedener Screens auf Kristallisationsplatten verteilt. Bei einer Temperatur von 20 °C wurden die mit Folie verschlossenen Platten inkubiert und regelmäßig am Mikroskop auf Kristallwachstum überprüft. Dabei führten fünf Pufferlösungen des JSCG-plus Screens zur Ausbildung von Proteinkristallen mit einer Größe von 0,07-0,22 mm. Die gewachsenen Kristalle wurden mit Nylon-Schlaufen aus der Lösung genommen, kryokonserviert (25 % Ethylenglycol) und in flüssigem Stickstoff bis zur Messung aufbewahrt.

Die Aufnahme von Röntgen-Diffraktionsdaten, die Prozessierung der gemessenen Rohdaten und die Strukturbestimmung wurden von Dr. Piotr Malecki durchgeführt. Dabei entstanden in einem Kristallisationspuffer des JSCG-plus Screens bestehend aus 25 % PEG 8000, 20 mM Ammoniumsulfat und 100 mM Bis-Tris pH 7 gut messbare Proteinkristalle von TsES1. Eine Tabelle mit den kristallographischen Parametern zu der finalen Struktur von TsES1 befindet sich in der Tabelle 3.2.

**Tab. 3.2.:** Daten der Kristallanalyse.

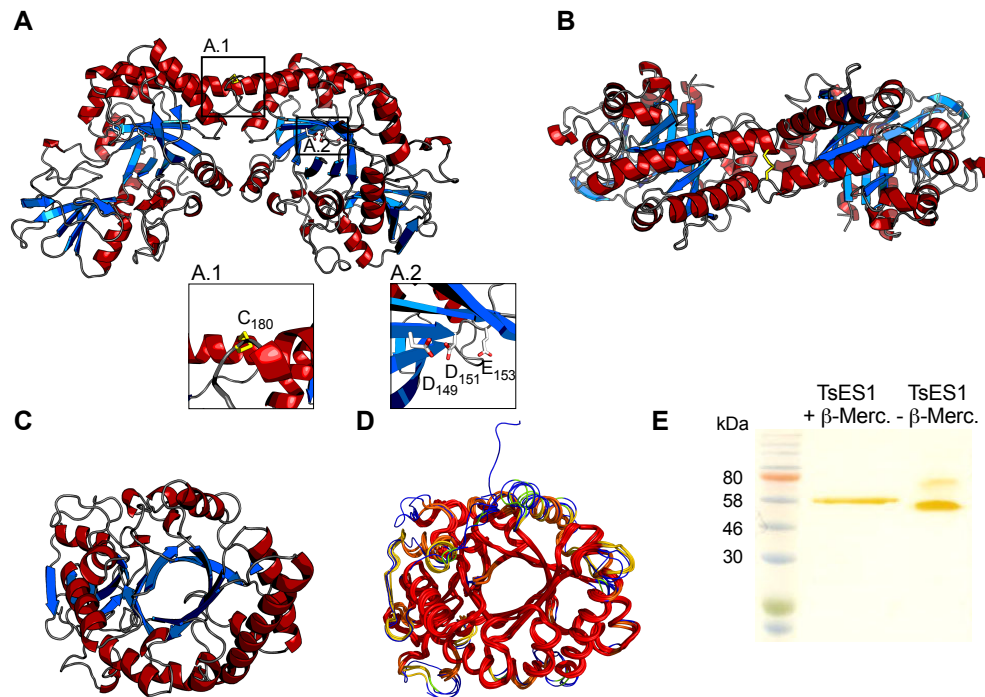
	<b>TsES1</b>
<b>Datensammlung</b>	
Raumgruppe	C2
Zellkonstanten	a; b; c (Å) 196; 52,6; 93.5
	$\alpha$ ; $\beta$ ; $\gamma$ (°) 90; 108,8; 90
Wellenlänge (Å)	0,91841
Auflösung	47,9-1,65
Alle Reflexe	609875
Unabhängige Reflexe	209810
Vollständigkeit	98,3 (97,4)
$R_{\text{merge}}$ (%)	8,2 (270)
$I/\sigma$ (I)	7,42 (0,31)
<b>Verfeinerung</b>	
Anzahl verwendeter Reflexe	209322
Anzahl Reflexe im Test	2200
R-Faktor	0,198
$R_{\text{free}}$	0,219
r. m. s.-Abweichungen	
Bindungslängen	0,007
Bindungswinkel	0,863
Mittlerer B-Faktor	44,11
<b>Ramachandran Statistik</b>	
Reste in bevorzugten Regionen (%)	98,91
Reste in erlaubten Regionen (%)	1,09

Die identifizierte Proteinstruktur von TsES1 ist charakterisiert durch die für Chitinasen typische Kernregion mit 8  $\beta$ -Faltblättern, die von mehreren  $\alpha$ -Helices umschlossen werden (Abb. 3.16 A, B, C). Das aktive Zentrum mit dem Chitinase-Motiv DxDxE wurde in der Abbildung 3.16 A2 vergrößert. Als Besonderheit für das Protein TsES1 wurde festgestellt, dass Proteindimere im Kristall existieren. Die Region mit der Aminosäure C<sub>180</sub>, die für die Dimerisierung verantwortlich ist, wurde in der Abbildung 3.16 A1 vergrößert dargestellt. Um zu überprüfen, ob das Protein auch in Lösung Dimere bildet, wurde das Protein mit zwei verschiedenen Ladepuffern über ein SDS-Gel analysiert. Dabei wurden Ladepuffer mit und ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet, dessen Anwesenheit zur Reduktion von Disulfidbrücken führt. Die Analyse ergab, dass in Abwesenheit des Reduktionsmittels eine zweite, größere Proteinbande von ca. 75 kDa sichtbar wurde (Abb. 3.16 D). Damit wurde gezeigt, dass TsES1 auch in Lösung als Dimere vorliegen kann.

Es konnte von dem Protein TsES1 nur die Struktur im Bereich von Aminosäure 32 bis 400 analysiert werden, da sich der C-terminale Teil (AS 401-495) nicht darstellen ließ. Wie sich mit Hilfe der Massenspektrometrie herausgestellt hat, wurde der C-Terminus von dem restlichen Protein während der Kristallisation abgeschnitten. Der Grund und genaue Prozess der Abspaltung des C-Terminus wurde bisher nicht untersucht. Da der C-Terminus über eine Linker-Sequenz bestehend aus vielen Wiederholungen der Aminosäure Threonin verfügt, wird dieser Sequenzbereich auch als ungeordnete Region (*unordered region*) bezeichnet. Diese Region ist strukturell flexibel und instabil, sodass es hier leicht zum Abtrennen der Sequenz kommen könnte. Für viele andere Chitinasestrukturen konnte der C-Terminus bisher ebenfalls gar nicht oder nur unvollständig strukturell analysiert werden.

Zusätzlich wurde ein Struktur-Alignment von TsES1 mit bekannten Chitinasestrukturen von Mensch und Maus durchgeführt, da bisher keine Chitinasestrukturen anderer Helminthen zur Verfügung standen (Abb. 3.16 D). Bei dem Alignment wurden besonders ähnliche Bereiche der Strukturen rot dargestellt und je mehr die Strukturen voneinander abweichen, desto stärker ändert sich die Farbe von orange/gelb zu grün/blau. Ein großer Teil der Proteinstrukturen, vor allem die Kernregion mit dem aktiven Zentrum, wurde als sehr ähnlich identifiziert (rot dargestellt). Einige Strukturbereiche, die auf den Außenseiten des Proteins liegen, weisen mittlere (orange/ gelb) bis starke (grün/blau) Unterschiede untereinander auf. Dabei führen auch deutliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu stärkeren Unterschieden in der Struktur.





### Abb. 3.16.: Protein-Kristallstruktur von TsES1.

Dargestellt ist die Proteinstruktur von TsES1 (A) mit Vergrößerungen der Dimerverbindung (A.1) und des aktiven Zentrums (A.2) sowie eine um  $90^\circ$  gedrehte Darstellung der Proteinstruktur von TsES1 (B) [ $\beta$ -Faltblätter - blau,  $\alpha$ -Helices - rot]. Zusätzlich wurde die monomere Struktur von TsES1 mit direktem Blick auf das aktive Zentrum aufgeführt (C) Strukturalignment von TsES1 mit den Proteinen AMCase (3FXY, Mensch), Chit1 (1GUV, Mensch), Chi311 (1NWR, Mensch) und Ym1 (1VF8, Maus) (D). Ähnliche Strukturbereiche sind rot dargestellt, wobei sich die Proteinsequenzen und -strukturen von orange/gelb bis grün/blau immer mehr unterscheiden. Dargestellt ist ein 12%iges SDS-Gel von TsES1 (55 kDa) mit und ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol im Ladepuffer nach Silberfärbung (E).

Zusammenfassend wurde das im *T. suis* L1 ES identifizierte Protein TsES1 nach Analyse der Aminosäuresequenz als eine Chitinase identifiziert und durch das rekombinant hergestellte Protein, das eine Exo- und Endo-Chitinaseaktivität zeigte, als eine Chitinase bestätigt. Außerdem war die Chitinaseaktivität bis zu einer Temperatur von  $50^\circ\text{C}$  und einem pH-Wert von 4-7 stabil. Des Weiteren konnte mit Hilfe TsES1-spezifischer IgG Antikörper natürlich exprimiertes TsES1 im ES von *T. suis* L1 Larven detektiert werden. Zusätzlich konnte die Proteinstruktur von TsES1 mit einer Auflösung von  $1,65 \text{ \AA}$  erbracht werden, die als Besonderheit eine Disulfidbrücke an Position C<sub>180</sub> aufweist. Damit wurde die erste Struktur einer Helminthenchitinase identifiziert, die teilweise als Dimer vorliegt und deren monomere Form deutlich der Struktur humaner und muriner Chitinasen ähnelt.

## 3.5. Analysen der modulierten Immunantwort durch TsES1 im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung

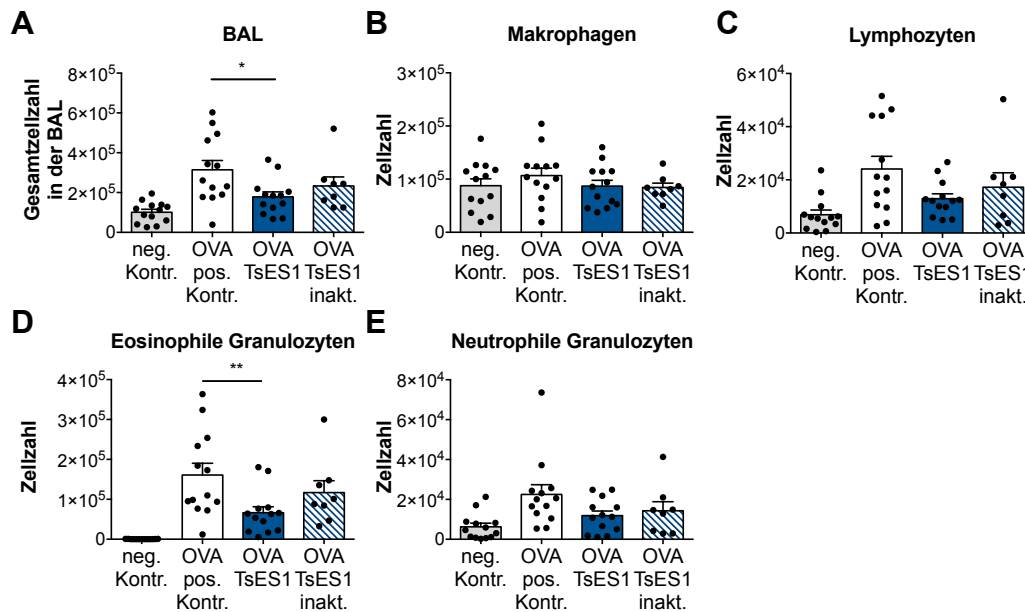
### 3.5.1. TsES1 reduziert die Infiltration von Immunzellen in die Lunge

Das rekombinant hergestellte *T. suis* L1 Protein TsES1 hat in ersten *in vivo* Experimenten den Anteil eosinophiler Granulozyten in den Lungen asthmatischer Mäuse signifikant reduziert. Um die TsES1 vermittelten Effekte genauer zu untersuchen, wurden vertiefende Analysen im selben Mausmodell durchgeführt.

Neben der Behandlung der Tiere mit TsES1 (OVA TsES1) wurde eine Gruppe mit Hitzeinaktiviertem TsES1 (OVA TsES1 inakt.) behandelt, um die Abhängigkeit von der Integrität und Funktion des Proteins zu untersuchen. Zusätzlich zu dem initialen Versuchsablauf erfolgte an Tag 30 die Messung der Lungenfunktion im Doppelkammer-Plethysmograph (Abb. 2.1), wodurch es möglich ist physiologische Änderungen der Lungenfunktion nicht-invasiv zu erfassen.

Die Gesamtzellzahl in der BAL wurde nach einer Lungenspülung bestimmt. Wie in unseren Vorversuchen wurde durch die Behandlung mit TsES1 die Anzahl der in die Lunge einwandernden Zellen signifikant gemindert (Abb. 3.17 A). Ebenso führte die Behandlung mit inaktiviertem TsES1 zu einem Rückgang der Zellzahl in der BAL, jedoch war diese Reduktion nicht signifikant.

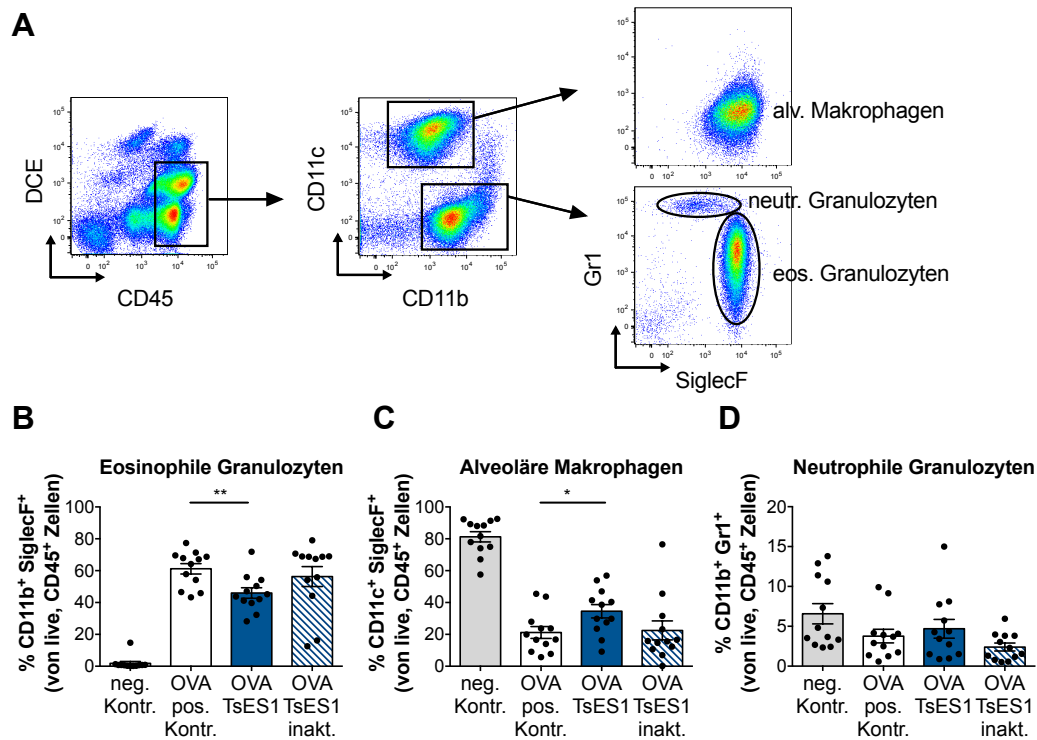
Die Zunahme der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in der BAL der OVA positiven Kontrollgruppe wurde durch die Behandlung mit TsES1 und inaktiviertem TsES1 abgeschwächt (Abb. 3.17 D, E). Jedoch führte nur die Behandlung mit TsES1 zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL (Abb. 3.17 D). Die Zellzahl der Makrophagen wurde durch keine der Behandlungen signifikant beeinflusst (Abb. 3.17 B). Die Anzahl der Lymphozyten in der BAL wurde in der OVA positiven Kontrollgruppe erhöht und durch die Behandlung mit TsES1 oder inaktiviertem TsES1 nicht signifikant reduziert (Abb. 3.17 C).



**Abb. 3.17.: Infiltrierende Immunzellen der gereizten Lunge.**

Die Zellzahl in der BAL von Mäusen mit allergischer Atemwegserkrankung wurde bestimmt (A). Die Differential-Zellzahl der Makrophagen (B), Lymphozyten (C), eosinophilen Granulozyten (D) und neutrophilen Granulozyten (D) wurde nach Diff-Quick-Färbung ermittelt. Daten stammen von 2-3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt  $n=8-13$  Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Statistische Analyse über einen Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanz ist durch \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  gekennzeichnet.

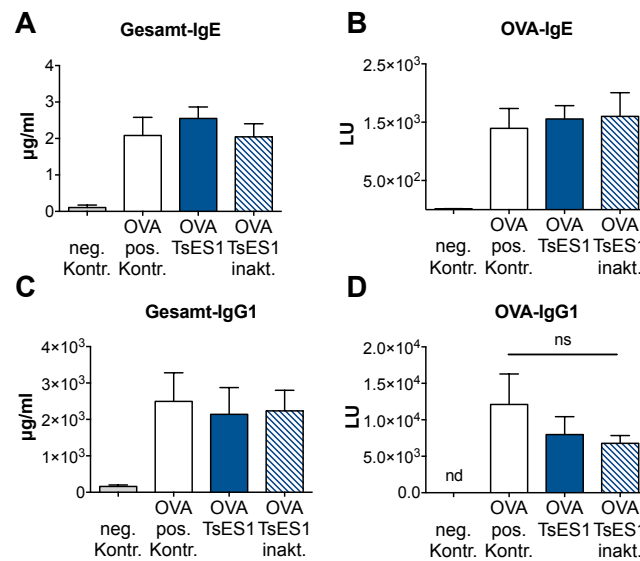
Zusätzlich zur Färbung der Zellen auf Objektträgern erfolgte die Analyse der Zellen aus der BAL am Durchflusszytometer. Durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker konnten die Zellen eindeutig bestimmt werden und mehr Zellen in kürzerer Zeit analysiert werden. Die Zellen wurden nach eosinophilen Granulozyten ( $CD45^+ / CD11c^- / CD11b^+ / SiglecF^+ / Gr1^{low}$ ), alveolären Makrophagen ( $CD45^+ / CD11b^- / CD11c^+ / SiglecF^+$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $CD45^+ / CD11c^- / CD11b^+ / SiglecF^- / Gr1^{high}$ ) unterschieden und gezählt (Abb. 3.18 A). Auch mit dieser Methode wurde nachgewiesen, dass die erhöhte Frequenz der eosinophilen Granulozyten in der positiven Kontrollgruppe durch die Behandlung mit TsES1 signifikant reduziert wurde (Abb. 3.18 B). Diese Infiltrationsabnahme wurde nicht bei der Behandlung mit inaktiviertem TsES1 beobachtet. Der Anteil an alveolären Makrophagen wurde durch die Induktion der allergischen Atemwegserkrankung verringert, dass in der vorherigen Messmethode nicht festgestellt wurde. (Abb. 3.18 C). Dabei brachte die Behandlung mit TsES1 eine signifikante Steigerung der Frequenz von alveolären Makrophagen im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe. Die Frequenzen der neutrophilen Granulozyten wurde durch die Behandlungen nicht signifikant beeinflusst, einhergehend mit den Daten der Cytospinanalyse (Abb. 3.18 D).



**Abb. 3.18.: Durchflusszytometrische Analyse von infiltrierenden Immunzellen der gereizten Lunge.**

Am Durchflusszytometer wurden die CD45<sup>+</sup> Zellen der BAL von Mäusen mit allergischer Atemwegserkrankung der Gatingstrategie folgend analysiert (A). Eingeteilt nach eosinophilen Granulozyten (B), alveolären Makrophagen (C) und neutrophilen Granulozyten (D) wurden die Zellfrequenzen bestimmt. Daten stammen von 2-3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt n=8-13 Wiederholungen (Mittelwert ± SEM). Statistische Analyse über einen Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanz ist durch \* p≤0,05; \*\* p≤0,01 gekennzeichnet.

Im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung kommt es vor allem durch die Expression von IL-4 in B-Zellen zum Antikörper-Klassenwechsel, wodurch vermehrt IgG1- und IgE-Antikörper gebildet werden [Corry et al., 1996]. Eine geringere Entzündung in der Lunge sollte daher mit einer Minderung der induzierten Antikörper einhergehen. Der Anstieg der Gesamt-IgE und IgG1-Konzentration im Serum von OVA-behandelten Mäusen wurde durch die Gabe von TsES1 oder inaktiviertem TsES1 nicht reduziert (Abb. 3.19 A, C). Im Gegensatz dazu wurden OVA-spezifische IgG1-Antikörperlevel in der mit TsES1 und inaktiviertem TsES1 behandelten Gruppe verringert (Abb. 3.19 D). Die OVA-spezifische IgE Konzentration wurde in der positiven Kontrollgruppe erhöht, jedoch nicht durch TsES1 und inaktiviertem TsES1 gesenkt (Abb. 3.19 B). Somit kann auf Grundlage der Antikörperdaten nur von einer schwach gemilderten Entzündung in der Lunge ausgegangen werden.



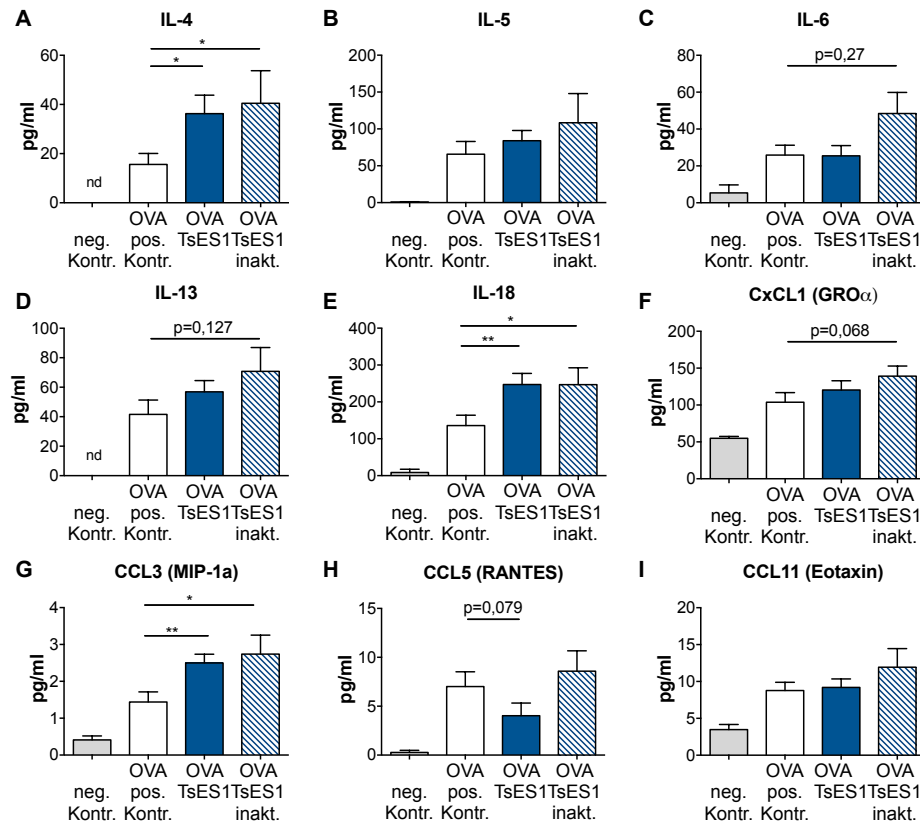
**Abb. 3.19.: IgG1- und IgE-Level im Serum asthmatischer Mäuse.**

Im Serum von Mäusen mit allergischer Atemwegserkrankung wurden die Antikörperlevel von Gesamt-IgE (A), OVA-IgE (B), Gesamt-IgG1 (C) und OVA-IgG1 (D) bestimmt. Daten stammen von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt n=8-12 Wiederholungen (Mittelwert ± SEM). Statistische Analyse über einen Mann-Whitney-Test. [ns- nicht signifikant, nd- nicht detektierbar]

Die allergieinduzierte Entzündung in der Lunge führt außerdem zur gesteigerten Expression von Th2-typischen Zytokinen und Chemokinen [Wills-Karp, 1999]. Deshalb wurden in der BAL-Flüssigkeit die Zytokin- (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-18) und Chemokinlevel (CxCL1, CCL3, CCL5, CCL11) bestimmt, die alle in der positiven Kontrollgruppe im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe erhöht waren (Abb. 3.20). Die Behandlung mit TsES1 und inaktiviertem TsES1 verstärkte die Expression der Zytokine IL-4 (Abb. 3.20 A), IL-18 (Abb. 3.20 E) und des Chemokins CCL3 (Abb. 3.20 G). Im Gegensatz dazu wurde durch die Applikation von TsES1 die CCL5-Konzentration gegenüber der positiven Kontrollgruppe verringert (Abb. 3.20 H). Außerdem wurde bei der inaktivierten TsES1-Behandlungsgruppe eine leichte Zunahme der IL-6, IL-13 und CxCL1-Konzentration im Vergleich zur positiven Kontrolle gemessen. Somit kann denaturiertes TsES1 trotz des Strukturverlustes die Zytokinexpression in der Lunge erhöhen. Damit wurden die Th2-typischen Zytokine eher in ihrer Expression durch TsES1 gesteigert und sprechen für eine etwas stärkere Entzündungsreaktion.

Insgesamt wurden die Antikörperkonzentrationen im Serum durch die Behandlung mit TsES1 und inaktiviertem TsES1 nicht verändert, wenn auch eine deutlich erhöhte IL-4-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit vorlag. Die Eosinophilie in der Lunge wurde durch TsES1 reduziert, obwohl die IL-5- und CCL11-Level, die wichtig für die Rekrutierung und Aktivierung von eo-

sinophilen Granulozyten sind, denen der positiven Kontrolle entsprachen. Inaktiviertes TsES1 verursachte eine leichte Zunahme der IL-5- und CCL11-Level und damit zu keiner Abnahme der eosinophilen Granulozyten in der Lunge. Somit ist die Integrität des Proteins TsES1 für die Regulation der infiltrierenden Zellen entscheidend, jedoch nicht so sehr für die Zunahme der Zytokin-/Chemokin-Level in der BAL-Flüssigkeit.



**Abb. 3.20.: Erhöhte Zytokinlevel in der Lunge nach TsES1 Behandlung.**

Die Zytokinlevel von IL-4 (A), IL-5 (B), IL-6 (C), IL-13 (D), IL-18 (E) und die Chemokinlevel von CxCL1 (F), CCL3 (G), CCL5 (H) und CCL11 (I) wurden in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Daten stammen von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt n=12 Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Statistische Analyse über einen Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanz ist durch \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  gekennzeichnet. [nd- nicht detektierbar]

### 3.5.2. TsES1 reduziert die spezifischen Atemwegsresistenz der Lunge

Um den physiologischen Einfluss der TsES1 Behandlung zu untersuchen, wurde die Lungenfunktion der Mäuse ermittelt. Die Messungen wurden in einem Doppelkammer-Plethysmograph in Kooperation mit der Einrichtung Pathophysiologie-Plattform von Arnd Heuser am Max-Delbrück-Centrum Berlin durchgeführt.

Mit Hilfe eines Doppelkammer-Plethysmographen ist es möglich, auf Grundlage verschiedener Parameter (Tab. 2.1), die Lungenfunktion bei Mäusen nicht-invasiv zu ermitteln. Dazu wur-

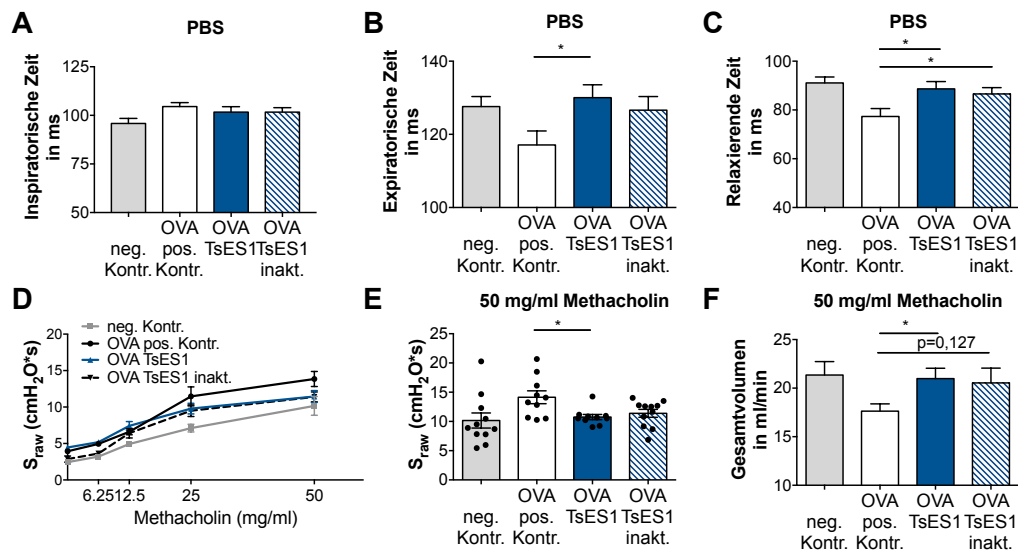
den den Tieren nach einer Adaptation an die Kammer beginnend mit PBS steigende Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin verabreicht. Nach PBS-Vernebelung wurden die Zeiten für Inspiration (Einatmung, Abb. 3.21 A), Expiration (Ausatmung, Abb. 3.21 B) und der relaxierenden Zeit (Zeit der Ausatmung eines spezifischen Volumens, Abb. 3.21 C) festgehalten. Wichtig für die Interpretation der Ergebnisse ist, dass alle Gruppen an den Tagen vor der Lungenfunktionsmessung mit OVA intranasal provoziert wurden und daher auch bei der negativen Kontrollgruppe eine Vorbelastung vorlag.

Für die Inspiration wurden keine Zeitunterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt (Abb. 3.21 A). Hingegen wurde eine Reduktion der expiratorischen Zeit in der positiven Kontrollgruppe im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 3.21 B). Das heißt, die Tiere atmeten in einer kürzeren Zeit aus und damit unruhiger als die negative Kontrollgruppe. Die Behandlung mit TsES1 führte zu einer signifikanten Steigerung der expiratorischen Zeit auf das Niveau der negativen Kontrollgruppe. Des Weiteren reduzierte sich die relaxierende Zeit nach PBS-Vernebelung in der positiven im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe (Abb. 3.21 C). Erneut wurde durch die Behandlung mit TsES1 und auch durch inaktiviertes TsES1 eine signifikante Steigerung der relaxierenden Zeit ermittelt. Damit verbesserte die Behandlung mit TsES1 die basale Atemleistung asthmatischer Mäusen.

Mit steigender Methacholinkonzentration wurde die spezifische Atemwegsresistenz ( $S_{\text{raw}}$ ), also der Lungenwiderstand während der Atmung der Tiere ermittelt. Das bedeutet, je höher der Lungenwiderstand ist, desto mehr Kraft muss aufgewendet werden, um die Lunge mit Luft zu füllen. Durch die Vernebelung von Methacholin wird eine Bronchokonstriktion, also Verengung der Bronchien bei den Tieren ausgelöst, die zur Steigerung der Atemwegsresistenz führt [DeLorme and Moss, 2002].

Bei steigender Methacholinkonzentration erhöhte sich bei allen Gruppen der  $S_{\text{raw}}$ -Wert (Abb. 3.21 D). Der Kurvenanstieg wurde am stärksten bei der OVA-positiven Kontrolle und am geringsten bei der negativen Kontrollgruppe beobachtet. Eine Behandlung mit TsES1 bzw. inaktiviertem TsES1 führte zu geringeren  $S_{\text{raw}}$ -Werten im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe, wobei nur TsES1 zu einer signifikanten Reduktion bei 50 mg/ml Methacholin führte (Abb. 3.21 E). Zusätzlich wurde das Gesamtvolumen der Atmung pro Minute bei 50 mg/ml Methacholin als Endpunktanalyse ausgewählt (Abb. 3.21 F). Es wurde deutlich, dass die OVA-positive Kontrollgruppe am Ende der Behandlungsreihe mit Methacholin wesentlich weniger Luftvolumen pro Minute umgesetzt hat als die negative Kontrollgruppe und die TsES1 bzw. inaktivierte TsES1-Gruppe. Damit zeigten TsES1 behandelte Mäuse im Vergleich zur OVA positiven Kontrollgruppe eine verbesserte Lungenfunktion.

Insgesamt wurde bei der TsES1 behandelten Gruppe sowohl basal, als auch nach Vernebelung von Methacholin eine bessere Lungenfunktion als in der positiven Kontrollgruppe beobachtet.



**Abb. 3.21.: Lungenphysiologie asthmatischer Mäuse.**

Messung der Lungenfunktion unter PBS-Bedingungen und bei steigender Methacholin- Dosierung im Doppelkammer-Plethysmograph. Nach PBS-Vernebelung wurde die inspiratorische (A) und expiratorische Zeit (B) und relaxierende Zeit (C) gemessen. Die spezifische Atemwegsresistenz ( $S_{raw}$ ) wurde bei steigender Methacholin-Dosierung bestimmt (D), mit Endpunktanalyse bei 50 mg/ml Methacholin E. Das Gesamtvolumen pro Minute wurde bei 50 mg/ml Methacholin dargestellt (F). Daten stammen von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt  $n=12$  Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Statistische Analyse über einen Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanz ist durch  $* p \leq 0,05$  gekennzeichnet.

### 3.5.3. TsES1 induziert Relm $\alpha^+$ Leukozyten im Lungengewebe

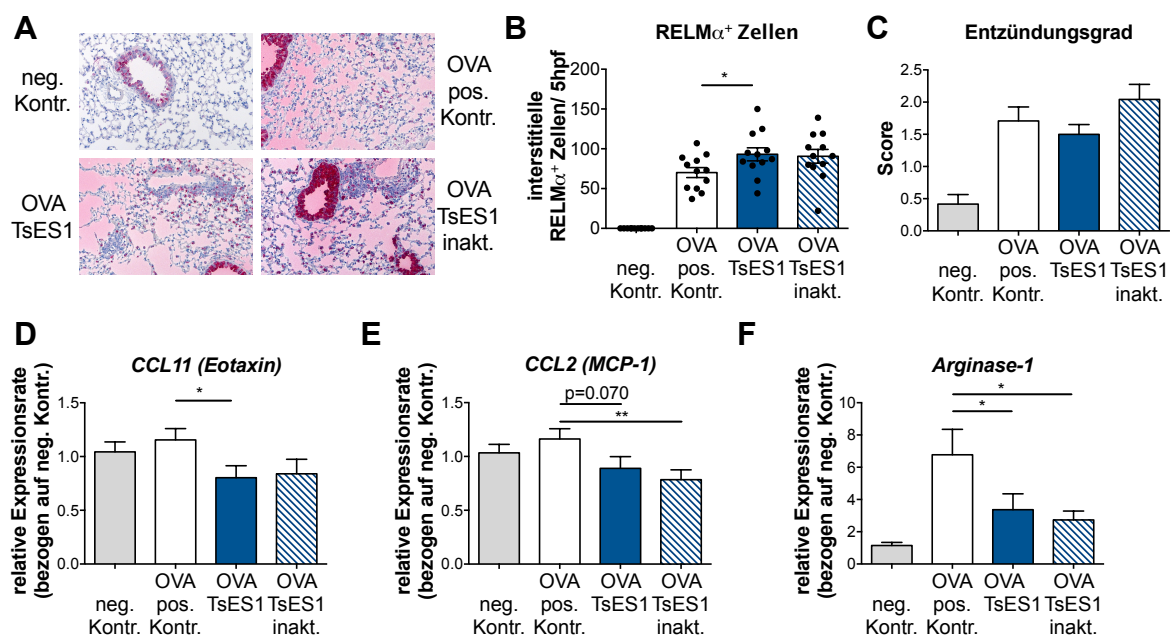
Allergische Entzündungsreaktionen in der Lunge führen auch zur Schädigung des Gewebes und damit zu sichtbaren pathologischen Gewebeveränderungen [Lambrecht and Hammad, 2014]. Deshalb wurden Teile der Lunge für histologische Untersuchungen von Dr. Anja Kühl (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Forschungszentrum Immunwissenschaft RCIS) analysiert.

Angefärbte Kohlenhydrate (PAS-Färbung) zum Nachweis einer gesteigerten Mukusproduktion sollten in entzündeten Lungen deutlich im Epithelbereich lokalisiert sein. Bei den durchgeführten Experimenten wurden selbst in der positiven Kontrollgruppe nur für wenige Schnitte kohlenhydrat-positive Bereiche identifiziert, sodass die Ergebnisse hier nicht aufgeführt sind. Es ist möglich, dass die 5-fach wiederholte Lungenspülung die Mukusschicht abgelöst und abgetragen hat, weshalb es zu keiner Färbung gekommen ist.



Zur Bestimmung des Schweregrades der Entzündung des Lungengewebes wurde die H/E-Färbung durchgeführt und der Score bestimmt (Abb. 3.22 C). In der positiven Kontrollgruppe ist im Gegensatz zur negativen Kontrollgruppe ein dreifacher Score-Wert ermittelt worden, der durch die Behandlung mit TsES1 bzw. inaktiviertem TsES1 nur tendenziell beeinflusst wurde.

Zusätzlich wurden  $\text{Relm}\alpha^+$  Epithelzellen und  $\text{Relm}\alpha^+$  interstitielle Leukozyten analysiert. Allgemein sind *resistin-like molecule* (Relm) Proteine hormonähnliche Moleküle, die antagonistisch zur Insulinfunktion wirken [Patel et al., 2004].  $\text{Relm}\alpha$  wird in aktivierten Epithelzellen in der Lunge exprimiert und kann zur Rekrutierung von DCs führen [Madala et al., 2012]. Darüber hinaus ist  $\text{Relm}\alpha$  ein Markermolekül für alternativ aktivierte Makrophagen (AAM), die in der Lunge zur Aktivierung von Epithelzellen beitragen, über IL-4 Sekretion den Ig-Klassenwechsel unterstützen und bei der Heilung und dem Wiederaufbau von verletztem Gewebe beteiligt sind [Gordon and Martinez, 2010, Dyken and Locksley, 2013].



**Abb. 3.22.: Erhöhte Anzahl interstitieller  $\text{Relm}\alpha^+$  Makrophagen.**

Histologische Schnitte von Teilen der Lunge wurden mit anti- $\text{Relm}\alpha$  Antikörpern angefärbt (A) und die Anzahl  $\text{Relm}\alpha^+$  interstitieller Makrophagen bestimmt (B). Zusätzlich wurde der Entzündungsgrad in der Lunge nach H/E-Färbung ermittelt (C). Die relative Expression der mRNA von *CCL11* (D), *CCL2* (E) und *Arginase-1* (F) wurde von Lungengewebe in Bezug auf die negative Kontrolle bestimmt. Daten stammen von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt n=12 Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Statistische Analyse über einen Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanz ist durch \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  gekennzeichnet.

Alle OVA-behandelten Gruppen zeigten eine erhöhte Zellzahl an Relm $\alpha^+$  Epithelzellen und Relm $\alpha^+$  interstitieller Makrophagen im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe (Abb. 3.22 A, B). Die Gabe von TsES1 und inaktiviertem TsES1 führte zu keiner Reduktion der Relm $\alpha^+$  Epithelzellen, jedoch überraschenderweise zu einer signifikanten Steigerung der Relm $\alpha^+$  Makrophagen gegenüber der positiven Kontrolle (Abb. 3.22 A, B).

Gesondert zu den histologischen Untersuchungen wurden RT-PCR Analysen von Lungengewebe der jeweiligen Gruppen durchgeführt, um die Genexpression der Chemokine *CCL11* und *CCL2* zu ermitteln. *CCL11*, oder auch Eotaxin ist ein Chemokin, das zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten führt, wohingegen *CCL2* (*monocyte chemoattractant protein-1*) eher Makrophagen anlockt [Rothenberg and Hogan, 2006, Deshmane et al., 2009]. Die relative Expression von *CCL11* (*Eotaxin*) reduzierte sich signifikant in der TsES1-behandelten Gruppe im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe (Abb. 3.22 D). Dieses Ergebnis stützt die Daten der verringerten Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit durch TsES1 (Abb. 3.18 B), wohingegen die Chemokinanalyse der BAL-Flüssigkeit keinen Einfluss auf den Eotaxinlevel zeigte (Abb. 3.20 I). Die relative Expression von *CCL2* (*MCP-1*) wurde durch die Behandlung mit TsES1 und inaktiviertem TsES1 im Gegensatz zur positiven Kontrollgruppe reduziert (Abb. 3.22 E). Dieses Ergebnis ist überraschend, da eine größere Anzahl an Relm $\alpha^+$  interstitieller Makrophagen in der Lunge detektiert wurde (Abb. 3.22 A, B). Außerdem wurde entgegen der Erwartungen beobachtet, dass die gesteigerte Expression des Markers für AAM, *Arginase-1*, in der positiven Kontrollgruppe durch die Gabe von TsES1 signifikant reduziert wurde (Abb. 3.22 F).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die präventive Applikation des *T. suis* Proteins TsES1 im Modell der allergischen Atemwegserkrankung zu einer Regulierung der Th2-Immunantwort führt. Auf zellulärer Ebene wurde die Zunahme eosinophiler Granulozyten in der allergischen Lunge durch die Behandlung mit TsES1 gemindert, wohingegen sich die Anzahl Relm $\alpha^+$  interstitieller Makrophagen erhöhte. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Gabe von TsES1 einen positiven Einfluss auf die Lungenfunktion hat und so z.B. die spezifische Atemwegsresistenz im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe deutlich gesenkt wird. Die Zytokin- und Chemokinlevel in der BAL-Flüssigkeit der positiven Kontrollgruppe spiegelten deutlich eine Th2-dominierte Entzündungsreaktion wider, wohingegen die darüber hinaus erhöhten Zytokinlevel durch die TsES1 Behandlung nicht den erwarteten Werten entsprachen. Die gesteigerte IL-4 Konzentration kann damit erklärt werden, dass durch TsES1 auch mehr Relm $\alpha^+$  interstitielle Makrophagen in der Lunge detektiert wurden, welche vermehrt IL-4 produzieren.

Die Analyse der mRNA von *CCL11*, *CCL2* und *Arginase-1* ergab eine markante Abnahme der Expression dieser Gene in der Lunge der TsES1-behandelten Gruppe. Durch die reduzierte Expression von *CCL-11*, nicht aber durch gleichbleibende CCL11-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit, kann die verringerte Chemotaxis der eosinophilen Granulozyten bestätigt werden. Obwohl die Expression von *CCL2* und *Arginase-1* abnahm, wurde der Anstieg interstitieller AAM in der Lunge beobachtet. Zusätzlich wurde im Serum eine leichte Senkung des OVA-spezifischen IgG1 Levels durch die Behandlung mit TsES1 und inaktiviertem TsES1 im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe ermittelt.

Damit konnte gezeigt werden, dass ein einzelnes rekombinantes Protein des *T. suis* L1 ES die Immunreaktionen der allergischen Atemwegserkrankung in der Maus verändert.

### 3.6. Analysen zum immunmodulatorischen Mechanismus von TsES1

Das im *T. suis* L1 ES identifizierte und rekombinant hergestellte Protein TsES1 zeigte im *in vivo* Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung immunmodulatorische Eigenschaften, da es die Anzahl der infiltrierenden eosinophilen Granulozyten in der Lunge reduziert, die gesteigerte Atemwegsresistenz abgemildert, Th2-Zytokinlevel erhöht und die Anzahl Relm $\alpha^+$  interstitieller Makrophagen weiter angereichert hat.

TsES1 wurde als Chitinase charakterisiert und gehört damit zu einer Enzymklasse, die in fast allen Organismen einschließlich Säugetieren exprimiert wird [Adrangi and Faramarzi, 2013]. In der Maus werden Chitinasen und *chitinase like proteins* (CLPs) ebenfalls exprimiert, die als wichtige Proteine des Immunsystems von Säugetieren beschrieben werden [Lee et al., 2011] und besonders während der Th2-Entzündungsreaktionen im Darm oder in der Lunge exprimiert sind [Sutherland et al., 2009, Shuhui et al., 2009].

Damit stellte sich die Frage, wie die zusätzliche Applikation einer Helminthenchitinase die genannten Beobachtungen in der Maus hervorrufen konnte.

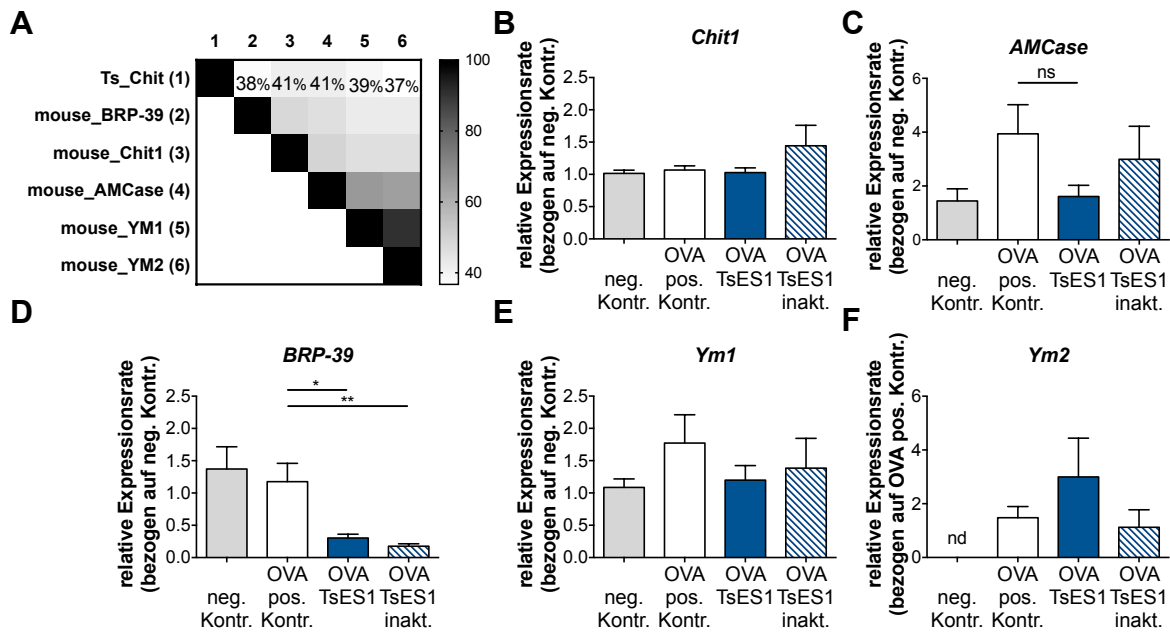
Um beantworten zu können, wie TsES1 immunmodulatorisch im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung wirken kann, wurden in abschließenden Versuchen folgende Hypothesen untersucht:

- TsES1 wirkt wie eine murine Chitinase/CLP und
  - steigert die Expression muriner Chitinasen
  - mindert Apoptose
  - führt zur Vermehrung Relm $\alpha^+$  AAM
- TsES1 wirkt indirekt im Asthmodell, da es Antikörper induziert, die kreuzreaktiv gegen murine Chitinasen sind
- TsES1 induziert regulatorische B-Zellen

### 3.6.1. Hypothese: TsES1 steigert die Expression muriner Chitinasen

Chitinasen und CLPs der Maus werden IL-4- und IL-13-abhängig in der Lunge und im Darm von Epithelzellen, AAM und DCs gebildet [Webb et al., 2001, Zhu, 2004, Lee et al., 2009]. Dabei wurde von Sutherland et al. festgestellt, dass die über Plasmide induzierte Expression eines CLP im peritonealen Bauchraum ebenso die Expression der anderen CLPs steigert [Sutherland et al., 2014]. Außerdem wurde für Ym1 und Ym2 beobachtet, dass deren Expression zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt. Daher sollte überprüft werden, ob TsES1 als eine exogene Chitinase ebenfalls die Expression der murinen Chitinasen im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung regulieren kann.

Dazu wurde zunächst die Proteinsequenz von TsES1 mit den Proteinsequenzen der Maus-Chitinasen verglichen (Abb. 3.23 A). Die Ähnlichkeit zwischen den Proteinen lag bei 37-41 % und war damit vergleichbar mit der Sequenzidentität von TsES1 zu Chitinasen anderer Helminthen (Abb. 3.12). Außerdem ergab der Vergleich der Struktur von TsES1 mit bekannten Strukturen humaner und muriner Chitinasen, dass viele Bereiche konserviert sind (Abb. 3.16). Es kann daher vermutet werden, dass TsES1 auf Grund seiner relativ hohen Ähnlichkeit die gleichen Rezeptoren bindet, wie die Chitinasen/CLPs. Dabei sollte erwähnt werden, dass bisher nur für BRP-39 die Bindung an die Rezeptoren IL13-R $\alpha$ 2 [He et al., 2013], Prostaglandin D2 (CRTH2) [Zhou et al., 2015] und *receptor for advance glycation end product* (RAGE) nachgewiesen wurde [Low et al., 2015].



**Abb. 3.23.: Expressionsregulation muriner Chitinasen in der Lunge.**

Vergleich der Proteinsequenzen von TsES1 und den Maus-Chitinasen AMCase, BRP-39, Chit1, Ym1 und Ym2 (A). Die relative Expression der mRNA von Chit1 (B), AMCase (C), BRP-39 (D), Ym1 (E) und Ym2 (F) wurde untersucht. Daten stammen von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt n=12 Wiederholungen (Mittelwert ± SEM). Statistische Analyse über einen Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanz ist durch \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  gekennzeichnet. [ns-nicht signifikant]

In einem nächsten Schritt wurde die Expression der murinen Chitinasen im Lungengewebe von TsES1-behandelten Mäusen im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung untersucht. Die relative Expression der Gene für AMCase, Ym1 und Ym2 wurde in der OVA-positiven Kontrollgruppe erhöht (Abb. 3.23 B-F). Durch die Behandlung mit TsES1 wurde die relative Expression von *AMCase*, *BRP-39* und *Ym1* reduziert (Abb. 3.23 C-D), wohingegen die relative Expression von *Ym2* gesteigert wurde (Abb. 3.23 F). Die Expression von *Chit1* blieb in den Gruppen unverändert (Abb. 3.23 B). Auffällig war, dass die relative Expression von *BRP-39* in der Lunge durch die Gabe von TsES1 und inaktiviertem TsES1 signifikant verringert wurde (Abb. 3.23 D).

Da die Expression der Gene für die murinen Chitinasen in der Lunge nicht wesentlich gesteigert wurden, ist es nicht überraschend, dass in der BAL der Tiere mit TsES1-Behandlung kein Anstieg neutrophiler Granulozyten detektiert wurde (Abb. 3.17 und 3.18).

Insgesamt wurde festgestellt, dass TsES1 im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung die Expression muriner Chitinasen im Lungengewebe nicht signifikant steigert, aber die *BRP-39*-Expression im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe reduziert wurde. Durch die fehlende Expressionssteigerung der Chitinasen wurde in der Lunge auch keine Zunahme

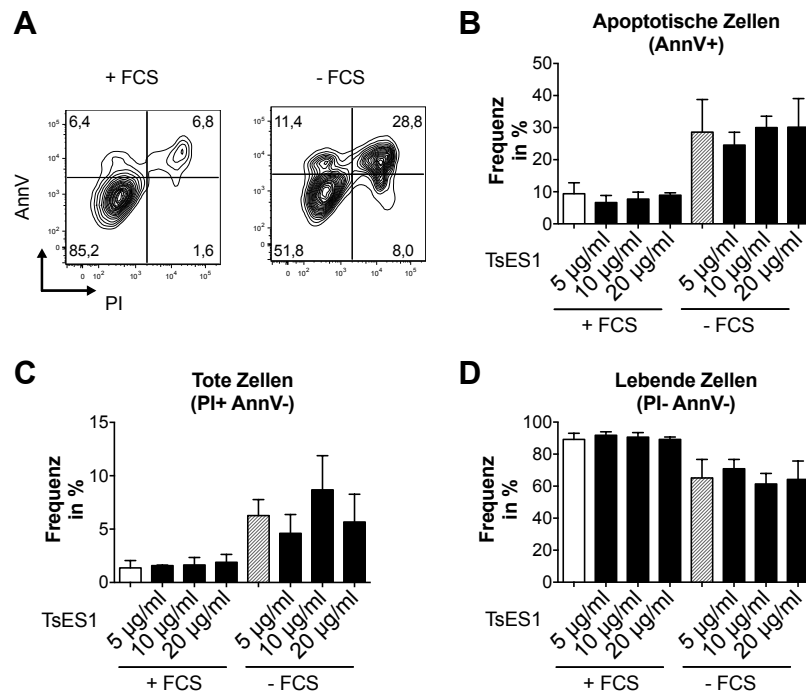
von neutrophilen Granulozyten ermittelt. Somit konnte die erste Hypothese nicht bestätigt werden.

### 3.6.2. Hypothese: TsES1 mindert Apoptose

Sowohl für AMCase, als auch für BRP-39 wurde *in vivo* bzw. *in vitro* nachgewiesen, dass sie die induzierte Apoptose reduzieren können [Hartl et al., 2009, Lee et al., 2009]. Dabei wurde für humane, rekombinante AMCase ein *in vitro*-Modell verwendet, in dem FBS-Mangelmedium die Apoptose von humanen A549-Epithelzellen induzierte [Hartl et al., 2009]. Dieses Modell wurde in gleicher Weise für rekombinanten TsES1 angewendet und der Anteil apoptotischer Zellen über AnnexinV/Propidium Iodid ermittelt (Abb. 3.24). Dabei bindet AnnexinV an Phosphatidylserin, einer Fettsäure der Membraninnenseite, das nur bei apoptotischen Zellen auf der Membranaußenseite vorliegt und gebunden werden kann. Der Lebend/Tod-Farbstoff Propidium Iodid markiert in diesem Versuch bereits abgestorbene A549 Zellen.

Bei dem Experiment wurden die A549-Epithelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von TsES1 inkubiert und mit oder ohne FBS im Medium kultiviert. Der Mangel an FBS führte zum Anstieg apoptotischer (Abb. 3.24 B) und abgetöteter Zellen (Abb. 3.24 C), womit gleichzeitig der Anteil lebender Zellen verringert wurde (Abb. 3.24 B). Die Inkubation mit TsES1 hatte dabei keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil apoptotischer Zellen, jedoch wurde der Anteil abgestorbener Zellen leicht durch TsES1 reduziert. Hingegen wurden bei Anwesenheit von FBS im Medium kaum apoptotische Zellen detektiert, die auch durch die TsES1 Zugabe nicht verringert wurden.

Damit kann festgehalten werden, dass rekombinantes TsES1 im Gegensatz zu humanem AMCase den Anteil apoptotischer Zellen bei FBS-Mangel nicht verringert.



**Abb. 3.24.: *In vitro* induzierte Apoptose.**

*In vitro* wurde durch den Mangel an FBS im Medium die Apoptose in humanen A549-Epithelzellen induziert und der Einfluss von TsES1 untersucht. Mit Hilfe von AnnexinV und Propidium Iodid wurden die Zellen angefärbt und konnten am Durchflusszytometer analysiert werden (A). Dabei wurden apoptotische Zellen (B), bereits abgetötete Zellen (C) und noch lebende Zellen (D) unterschieden. Daten stammen von 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt n=2-3 Wiederholungen (Mittelwert ± SEM).

### 3.6.3. Hypothese: TsES1 führt zur Vermehrung Relm $\alpha^+$ AAM

Wie bereits im Abschnitt 3.5.3 gezeigt wurde, induzierte die Behandlung mit TsES1 im Modell der allergischen Atemwegserkrankung die Anzahl an interstitiellen Relm $\alpha^+$  Makrophagen in der Lunge.

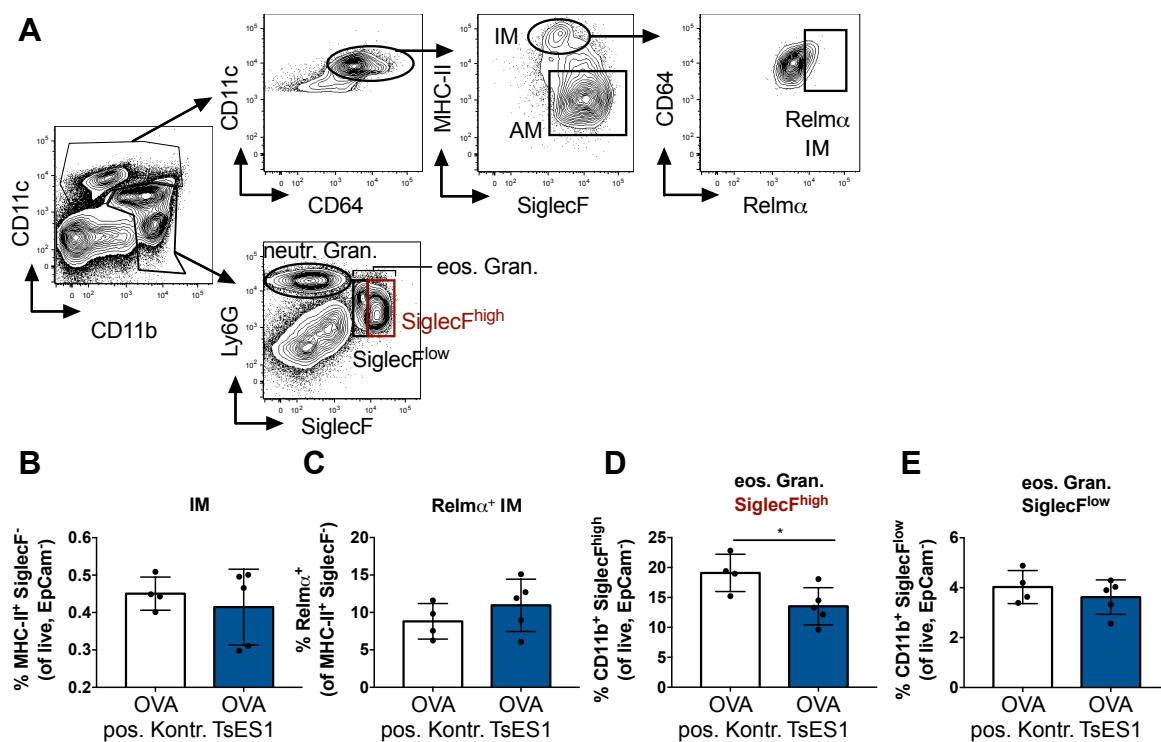
Relm $\alpha$  ist ein Markermolekül für alternativ aktivierte Makrophagen, die in der Lunge zur Aktivierung von Epithelzellen beitragen, über IL-4 Sekretion den Ig-Klassenwechsel unterstützen und bei der Heilung und dem Wiederaufbau von verletztem Gewebe beteiligt sind [Gordon and Martinez, 2010, Dyken and Locksley, 2013]. Daher sollte in einem weiteren Versuch unter Verwendung der Durchflusszytometrie untersucht werden, ob sich die histologischen Beobachtung bestätigen lassen.

Dazu wurde die von Blut befreite Lunge von Mäusen im Modell der allergischen Atemwegserkrankung verdaut und nach Yanaba et al. wurden die isolierten Immunzellen mit Antikörpern spezifisch angefärbt [Yanaba et al., 2008]. Der Gating-Strategie folgend wurden neben Relm $\alpha^+$  interstitiellen Makrophagen auch eosinophile Granulozyten identifiziert (Abb. 3.25 A). Das besondere hierbei ist die Unterscheidung zwischen SiglecF<sup>high</sup> und SiglecF<sup>low</sup> exprimieren-

den eosinophilen Granulozyten. Die SiglecF<sup>high</sup> eosinophilen Granulozyten werden als bereits ins Lumen der Bronchien eingewanderte und aktivierte Zellen beschrieben. Dagegen haben die SiglecF<sup>low</sup> eosinophilen Granulozyten den Einwanderungsprozess noch nicht abgeschlossen und sind weniger aktiviert [Abdala Valencia et al., 2016].

Durch die Behandlung mit TsES1 wurde die Anzahl der SiglecF<sup>high</sup>, aber nicht der SiglecF<sup>low</sup> eosinophilen Granulozyten signifikant reduziert (Abb. 3.25 D, E). Damit wurden einerseits die bisherigen Ergebnisse der BAL-Analysen bestätigt (Abb. 3.17 und 3.18), aber auch gezeigt, dass TsES1 auf eine bisher unbekannte Weise die Wanderung der eosinophilen Granulozyten ins Lumen behindert.

Bei der Analyse der interstitiellen Makrophagen (IM) konnte gezeigt werden, dass der Anteil der gesamten IM in der Lunge durch die Gabe von TsES1 nicht verändert wurde (Abb. 3.25 B). Hingegen wurde der Anteil der interstitiellen Relmα<sup>+</sup> Makrophagen leicht von 8,8% auf 10,9% gesteigert (Abb. 3.25 C).



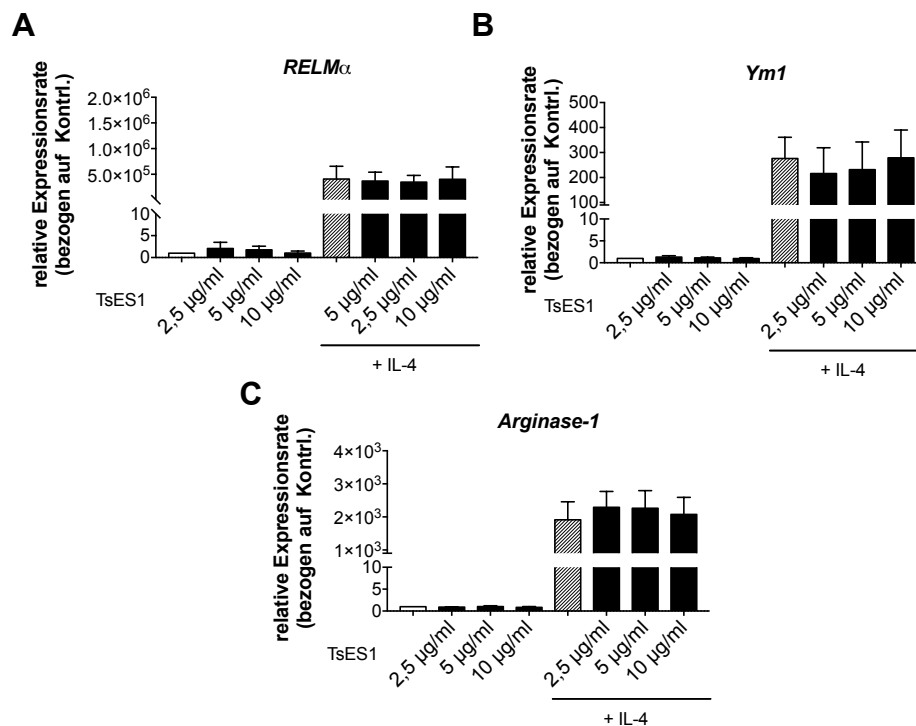
**Abb. 3.25.: Interstitielle Relmα<sup>+</sup> Makrophagen in der Lunge.**

Die Lungen von Tieren mit allergischer Atemwegserkrankung wurden zur Gewinnung von Immunzellen verdaut und am Durchflusszytometer untersucht. EpCAM<sup>-</sup> Zellen wurden der Gatingstrategie folgend analysiert (A). Die Frequenz interstitieller Makrophagen (IM) (B), der Anteil der Relmα<sup>+</sup> Zellen (C) und die Frequenz von eosinophilen Granulozyten (SiglecF<sup>high</sup> (D), SiglecF<sup>low</sup> (E)) wurde gemessen. Daten stammen von einem Experiment mit n=4-5 Wiederholungen (Mittelwert ± SD). Statistische Analyse über einen Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanz ist durch \* p≤0,05 gekennzeichnet.



Zusätzlich wurde untersucht, ob TsES1 auch *in vitro* direkt zur Induktion von  $\text{Relm}\alpha^+$  AAMs beiträgt. Dazu wurden aus dem Knochenmark generierte Makrophagen *in vitro* in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von TsES1 über IL-4 zu AAMs differenziert. In Abbildung 3.26 ist die anschließende Bestimmung der Expression der für AAMs typischen Markergene *Relm $\alpha$*  (A), *Ym1* (B) und *Arginase-1* (C) dargestellt, welche durch IL-4 induziert wurden. Dabei hatte TsES1 weder einen Einfluss auf die Expressionstärke der Gene, noch führte es bei nicht stimulierten Makrophagen zum Anstieg der jeweiligen Genexpression. Somit wurde indirekt durch TsES1 in dem Asthmadmodell die Zunahme  $\text{Relm}\alpha^+$  interstitieller AAMs verursacht.

Insgesamt wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestätigt, dass TsES1 *in vivo* im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung die Anzahl  $\text{Relm}\alpha^+$  interstitieller AAMs erhöht und den Anteil eosinophiler Granulozyten im Lumen der Lunge reduziert. Im Gegensatz dazu konnte *in vitro* keine AAM-induzierende oder -stimulierende Funktion von TsES1 ermittelt werden.



**Abb. 3.26.: RT-PCR Analyse zur Differenzierung von AAMs.**

Makrophagen wurden *in vitro* in An- oder Abwesenheit von TsES1 über IL-4 zu AAMs differenziert und die Expression der Markergene *Relm $\alpha$*  (A), *Ym1* (B) und *Arginase-1* (C) bestimmt. Gleichzeitig wurden Makrophagen ohne IL-4 mit TsES1 behandelt und eine IL-4 Kontrolle sowie eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Daten stammen von 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt n=5-6 Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SEM).

### 3.6.4. Hypothese: TsES1 induziert kreuzreaktive Antikörper

Es wurde festgestellt, dass eine Th2-getriebene Entzündungsreaktion in der Lunge zu einer erhöhten Expression der Chitinasen AMCcase und BRP-39 in der Lunge führt [Zhu, 2004, Lee et al., 2009]. Dabei führte die Neutralisation über Anti-AMCcase Antikörper zur Reduktion der eosinophilen Granulozyten in der Lunge und milderte die allergische Hyperreaktivität [Zhu, 2004]. Gleichermäßen zeigten BRP-39<sup>-/-</sup> Mäuse, die kein BRP-39 exprimieren können, in einem OVA-induzierten Asthmamodell weniger in die Lunge infiltrierende Immunzellen und gemilderte Atemwegsresistenzen als Wildtyp-Mäuse [Lee et al., 2009].

Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass während der Sensibilisierung im verwendeten Mausmodell Antikörper gegen TsES1 gebildet werden, die dann kreuzreaktiv gegen murine Chitinasen/CLPs wirken. Dadurch würden die während der Provokation der Lunge vermehrt gebildeten Chitinasen/CLPs neutralisiert und die Chitinase-induzierten Entzündungsreaktionen abgeschwächt werden.

Durch den Sequenzabgleich von TsES1 mit murinen Chitinasen/CLPs (Abb. 3.23 A) und dem Strukturabgleich mit humanen und murinen Chitinasen/CLPs (Abb. 3.16 C) ist eine ausreichende Übereinstimmung gegeben, die die Bildung und Bindung von kreuzreaktiven Antikörpern erklären kann. Deshalb wurden Seren der Mäuse des Asthmamodells auf kreuzreaktive Antikörper mit Hilfe von Western Blots untersucht. Die dabei verwendeten Maus-Chitinasen wurden von Tara Sutherland (*Division of Infection, Immunity and Respiratory Medicine, The University of Manchester*) zur Verfügung gestellt.

Alle Proteine tragen einen His6-tag, über den sie mit Hilfe spezifischer anti-His6-tag Antikörper detektiert werden konnten (Abb. 3.27 A). Im Serum der OVA-positiven Kontrollgruppe konnten IgG-Antikörper detektiert werden, die das OVA Protein binden, jedoch keine der Chitinasen erkennen (Abb. 3.27 B). Im Gegensatz dazu wurden IgG-Antikörper im Serum der TsES1-behandelten Gruppe detektiert, die die Proteine TsES1, AMCcase, BRP-39 deutlich erkennen und Ym1, Ym2 schwach binden (Abb. 3.27 C). Wenn hingegen Mäuse nur mit TsES1 immunisiert wurden, wurden im Serum IgG-Antikörper detektiert, die nur das rekombinant hergestellte Protein TsES1 gebunden haben (Abb. 3.27 D).

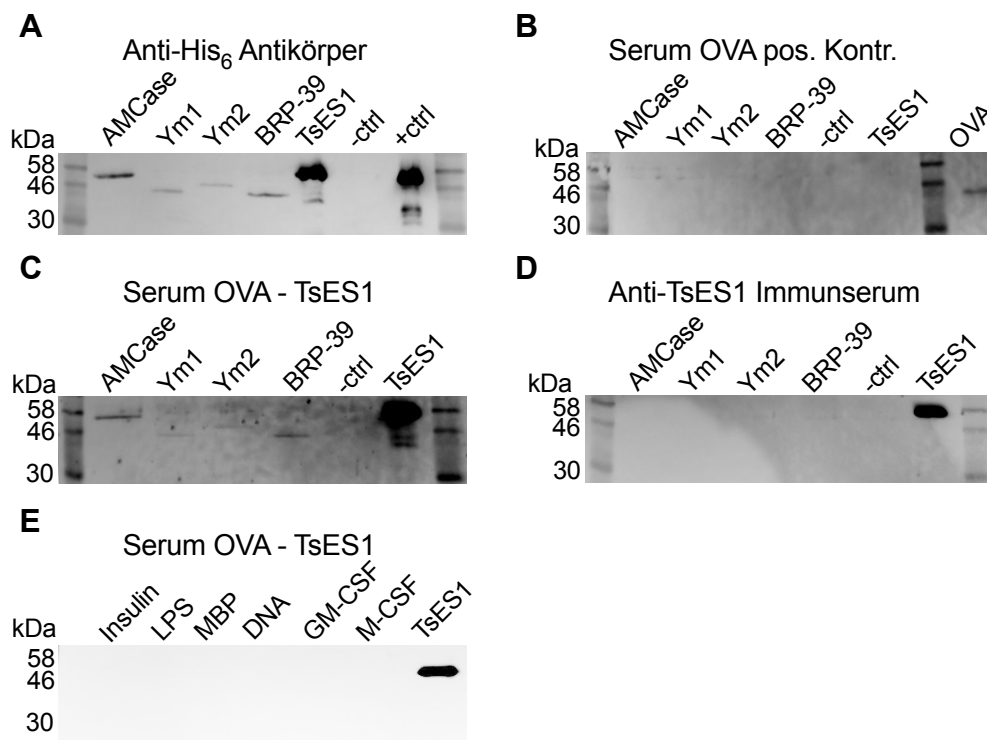
Damit wurde herausgefunden, dass die alleinige Applikation von TsES1 keine zu murinen Chitinasen kreuzreaktiven Antikörper induziert. Bedingt durch die Th2-Entzündungsreaktion in der Lunge beim Asthmamodell, kommt es bei TsES1 Behandlung zur Bildung kreuzreaktiver Antikörper. Dabei ist es erstaunlich, dass bereits 3 Tage nach der ersten Provokation der Lunge kreuzreaktive Antikörper im Serum zu finden sind.

Als Kontrolle wurde ein Western Blot mit weiteren mauseigenen Proteinen und DNA-Proben

durchgeführt, bei dem im Serum der TsES1-behandelten Gruppe IgG-Antikörper detektiert wurden, die nur das rekombinante TsES1 gebunden haben (Abb. 3.27 E).

In einem nachfolgenden Versuch muss geklärt werden, ob die alleinige Gabe dieser Antikörper ausreichend ist, um in einem OVA-induzierten Asthma-Modell die Eosinophilie zu verringern und die Atemwegsresistenz abzuschwächen.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass nur die TsES1 Behandlung im Modell der allergischen Atemwegserkrankung, nicht aber die Immunisierung mit TsES1 allein, zur Bildung von autoreaktiven IgG-Antikörpern gegen murine Chitinasen/CLPs führt.



**Abb. 3.27.: Kreuzreaktive Antikörper im Serum durch TsES1 Behandlung.**

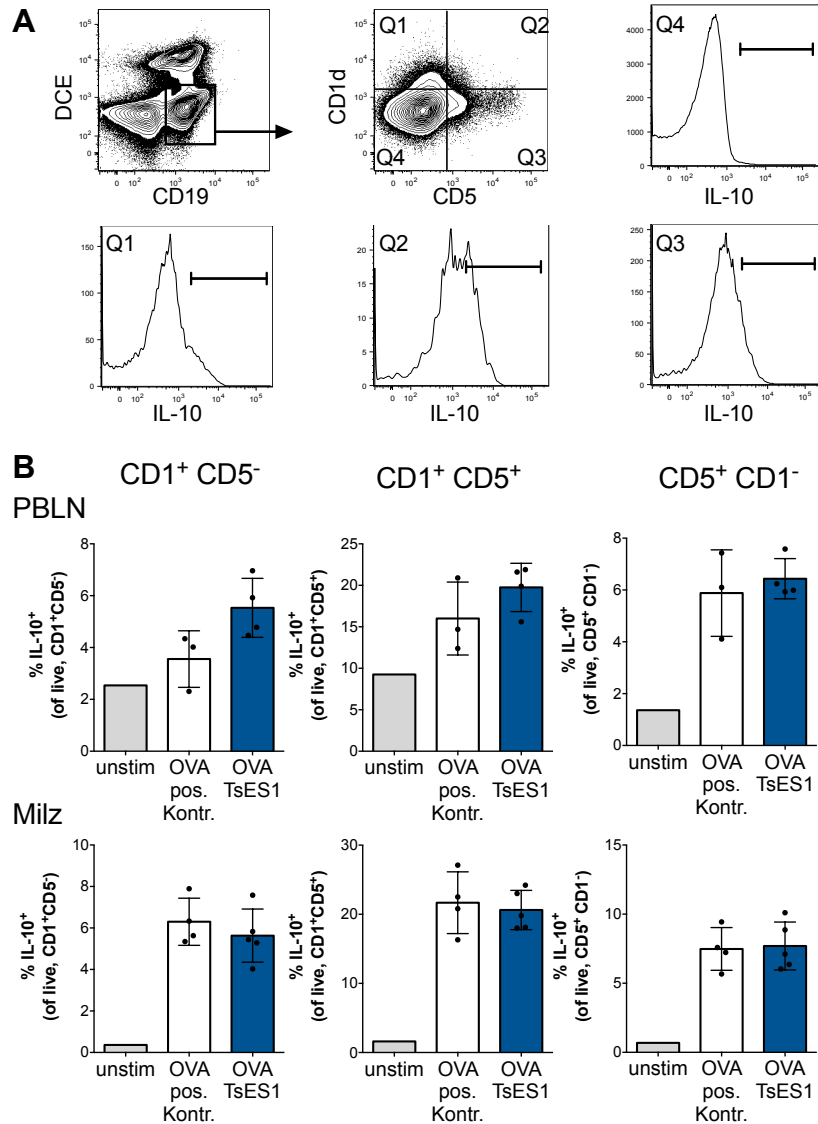
Dargestellt sind Western Blots, auf denen rekombinante Maus-Chitinasen transferiert wurden. Eingesetzt wurden 0,125 µg TsES1, 0,5 µg OVA und 20 µl des Kulturüberstandes transfizierter COS7-Zellen, die die rekombinanten Maus-Chitinasen exprimieren. Die Detektion aller rekombinanten Proteine erfolgte über anti-His6-tag Antikörper (1:200) (A). Für den Nachweis kreuzreaktiver Antikörper wurden Seren von OVA-positiven Kontrolltieren (B), OVA/TsES1 behandelten Tieren (C) oder Tieren, die mit Alum-TsES1 immunisiert wurden (D), verwendet. Als Kontrolle wurde ein Western Blot mit muriner DNA und Proteinen (Insulin, Peptid des Myelin-Basischen Protein-MBP, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*-GM-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*-M-CSF) und dem Serum von OVA/TsES1-behandelter Tieren (E) durchgeführt. Über anti-Maus-IgG-HRP Antikörper (1:2500) erfolgte die Detektion. [-ctrl -Kulturüberstand nicht-transfizierter COS7-Zellen; +ctrl - Positivkontrolle p53-His(6); OVA - Ovalbumin]

### 3.6.5. Hypothese: TsES1 induziert regulatorische B-Zellen

Neben den Hypothesen, dass TsES1 als murine Chitinase/CLP erkannt wird und deren Expression reguliert bzw. Funktion übernimmt, könnte TsES1 auch auf andere Bereiche des Immunsystems wirken. Als Grundlage wurden die erst kürzlich veröffentlichten Daten von IPSE/alpha1 verwendet, einem immunregulatorischen Protein von *S. mansoni*, dass nach intraperitonealer Gabe in der Maus regulatorische B-Zellen (Bregs) induzieren kann [Haeberlein et al., 2017]. Als Bregs werden CD19<sup>+</sup> B-Zellen bezeichnet, die neben IL-10 auch die Oberflächenmarker CD1 und CD5 exprimieren [Yanaba et al., 2008]. Dabei kann der Transfer von Bregs die Eosinophilie und allergische Hyperreaktivität in OVA-induzierten Asthmodellen reduzieren [Amu et al., 2010, Natarajan et al., 2012]. Obwohl für *T. suis* eine Induktion von Bregs bisher nicht bekannt ist, sollte überprüft werden, ob diese Zellen durch TsES1 im murinen Asthmodell gebildet werden.

Dazu wurden isolierte Immunzellen der Milz und der Lungenlymphknoten (PBLN) wie im Abschnitt 2.3.8 beschrieben, stimuliert, um die IL-10 Produktion von Bregs detektieren zu können. Wie der Gating-Strategie zu entnehmen ist, wurden CD1<sup>+</sup> und CD5<sup>+</sup> B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) analysiert, die IL-10 exprimieren (Abb. 3.28 A). Der Anteil an IL-10 exprimierenden B-Zellen der Milz wurde durch die Stimulation in der OVA-positiven und TsES1-behandelten Gruppe deutlich erhöht (Abb. 3.28 B). Jedoch konnte kein Unterschied der Zellfrequenzen zwischen den beiden Behandlungsgruppen gemessen werden. In den PBLN wurde der Anteil der IL-10 exprimierenden B-Zellen durch die Stimulation nur leicht erhöht (Abb. 3.28 B). Hingegen wurde die Frequenz der IL-10 exprimierenden CD1<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup> und CD1<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der TsES1-behandelten Gruppe gegenüber der OVA-positiven Gruppe gesteigert.

Dieser Vorversuch mit einer geringen Tierzahl konnte erste Hinweise für eine lokale Induktion von Bregs durch TsES1 im Modell der allergischen Atemwegserkrankung liefern.



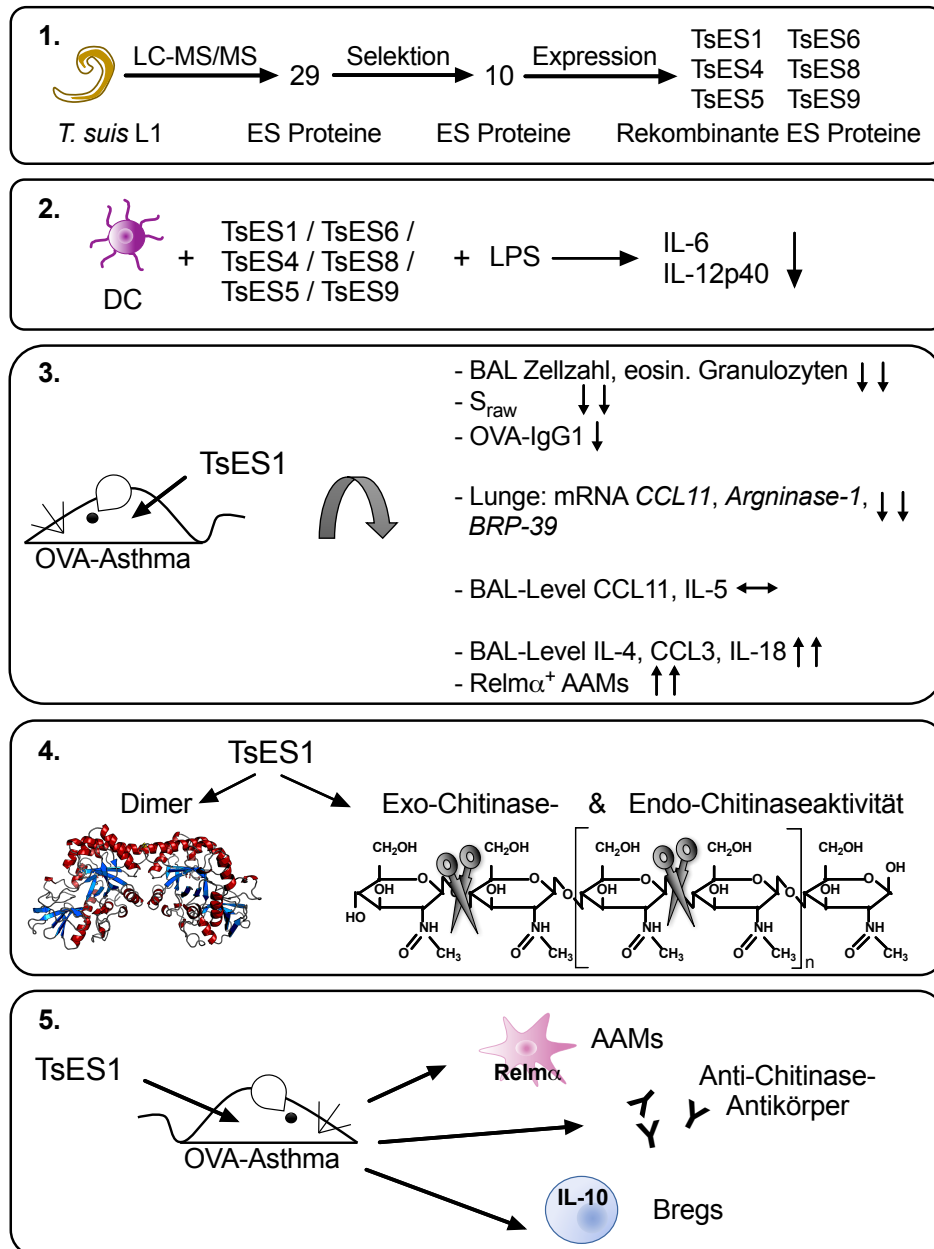
**Abb. 3.28.: Regulatorische B Zellen in Lungenlymphknoten.**

Isolierte Zellen der Milz und der peribronchialen Lymphknoten (PBLN) wurden mit 50 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 10  $\mu$ /ml LPS für 5 h stimuliert. Es wurde eine unstimulierte Kontrolle je Gruppe mitgeführt. Nach den ersten 30 min wurden 2  $\mu$ M Monensin zu jedem Ansatz gegeben. Der Gating-Strategie folgend wurden CD19<sup>+</sup> B-Zellen analysiert (A). Die Frequenz der IL-10 exprimierenden Breg-Zellen (CD1<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> / CD1<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> / CD5<sup>+</sup>CD1<sup>-</sup>) in der Milz und in den PBLN ist dargestellt (B). Daten stammen von einem Experiment mit insgesamt n=3-4 Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SD).

Es wurden verschiedene Hypothesen untersucht, wie die Immunmodulation durch die *T. suis* Chitinase TsES1 im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung erfolgen könnte.

Dabei konnte nicht bestätigt werden, dass TsES1 direkte Funktionen der murinen Chitinasen teilt, da durch TsES1 weder die Apoptose abgeschwächt wurde noch durch eine gesteigerte Expression anderer Chitinasen/CLPs neutrophile Granulozyten angezogen wurden. Hingegen konnte bestätigt werden, dass die Anwesenheit von TsES1 im Asthmamodell die Anzahl an Relm $\alpha^+$  interstitiellen AAMs in der Lunge erhöht, obwohl *in vitro* keine Induktion der AAMs durch TsES1 beobachtet wurde. Zusätzlich wurden kreuzreaktive Antikörper im Serum von TsES1-behandelten Tieren im Asthmamodell detektiert, die möglicherweise murine Chitinasen/CLPs neutralisieren und so zur Reduktion der Eosinophilie führen. Des Weiteren wurden erste Hinweise dafür geliefert, dass ein *T. suis* ES Protein IL-10 produzierende Bregs in den PBLN von Mäusen im Asthmamodell vermehren kann.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass erstmals ein einzelnes *T. suis* L1 ES Protein beschrieben wurde, dass im OVA-Asthmamodell die Anzahl eosinophiler Granulozyten reduziert, die Lungenfunktion verbessert und dabei AAMs in der Lunge erhöht, Bregs in Lungenlymphknoten vermehrt sowie zur Bildung kreuzreaktiver Antikörper beiträgt (Abb. 3.29).



**Abb. 3.29.: Übersicht der Ergebnisse dieser Arbeit.**

(1) Im Rahmen dieser Arbeit wurden von 29 identifizierten *T. suis* L1 ES Proteinen 10 ausgewählt und davon 6 rekombinant exprimiert. (2) Diese 6 TsES Proteine haben *in vitro* jeweils die Zytokinexpression (IL-6, IL-12p40) von LPS-stimulierten DCs reduziert. (3) Von diesen 6 TsES Proteinen konnte nur TsES1 die Immunantwort im OVA-induzierten Asthma-Modell verändern. Die TsES1-Behandlung reduzierte die Anzahl der in die Lunge infiltrierenden Zellen, besonders der eosinophilen Granulozyten, sowie die spezifische Atemwegsresistenz und die Serumkonzentration von OVA-IgG1. Außerdem wurde die Expression von *CCL11*, *Arginase-1* und *BRP-39* gemildert, wohingegen die *CCL11*- und *IL-5*-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit unverändert war. Zusätzlich wurden die *IL-4*-, *CCL3*- und *IL-18*-Level in der BAL-Flüssigkeit sowie die Anzahl Relm $\alpha^+$  interstitieller AAMs in der Lunge erhöht. (4) Die Charakterisierung von TsES1 ergab, dass dieses Protein Dimere bildet und sowohl eine Exo- als auch Endo-Chitinaseaktivität besitzt. (5) Abschließende Analysen zum Mechanismus von TsES1 im Asthma-Modell haben ergeben, dass Relm $\alpha^+$  AAMs, kreuzreaktive Anti-Chitinase-Antikörper und Bregs induziert werden, die möglicherweise die regulatorischen Faktoren darstellen.





## 4. Diskussion

### 4.1. Identifizierung und rekombinante Herstellung sekretierter Moleküle von *Trichuris suis* Larven

Helminthen sind auf Grund ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten für die medizinische Forschung besonders interessant. Zum einen wurde ein Zusammenhang der Reduktion parasitärer Infektionen und dem Anstieg von Allergien und Autoimmunerkrankungen im Menschen festgestellt und unter dem Begriff der Hygiene-Hypothese beschrieben [Gerrard et al., 1976, Strachan, 1989]. Zum anderen wurde gleichzeitig die Modulation der Th2-Immunantwort durch parasitäre Helminthen und deren Effektormoleküle erforscht. Es zeigte sich, dass Proteine und weitere Moleküle verantwortlich sind für die Induktion von regulatorischen T- und B-Zellen, die Differenzierung von alternativ aktivierten Makrophagen und einer insgesamt veränderten Immunreaktion [Hewitson et al., 2009, Coakley et al., 2016, Maizels and McSorley, 2016].

Basierend auf der Immunmodulation durch Helminthen und den Beobachtungen der Hygiene-Hypothese wurde die Idee entwickelt, Helminthen wie den Schweinepeitschenwurm *T. suis* zur Behandlung von Allergien und Autoimmunerkrankungen einzusetzen. Dabei wurde in initialen klinischen Studien positive Effekte der *T. suis ova* (TSO) Therapie für Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn nachgewiesen [Summers, 2003, Summers et al., 2005a]. Jedoch zeigten neuere Studien, dass die TSO-Behandlung in entzündlichen Darmerkrankungen und Multiple Sklerose zwar keine schädlichen Nebenwirkungen für Patienten hat, aber auch keine klinisch relevanten Verbesserungen bringt [Schölmerich et al., 2016, Fleming et al., 2017]. Daher wird die Erforschung der TSO-Therapie in relevanten Krankheitsmodellen immer wichtiger.

Unsere Arbeitsgruppe hat im Vorfeld gezeigt, dass sekretorische (*excretory/ secretory* ES) Produkte von *T. suis* Larven *in vitro* und *in vivo* in einem Modell der allergischen Atemwegserkrankung potente Immunmodulatoren sind [Ebner et al., 2014]. Sie reduzierten die Markerexpression CpG-stimulierter DCs und verringerten im Asthmodell die Eosinophilie und Th2-Zytokinexpression in der Lunge. Des Weiteren wurde auch in Krankheitsmodellen für entzündliche Darmerkrankungen und Multiple Sklerose eine positive Immunmodulation durch *T. suis* und dessen Proteine nachgewiesen [Leonardi et al., 2017, Hansen et al., 2017]. Deshalb war es Ziel im Rahmen dieser Arbeit Proteine im ES von *T. suis* L1 Larven zu identifizieren, rekombinant herzustellen und mögliche immunregulatorische Mechanismen aufzudecken.

### Auswahl einzelner ES Proteine

Auf der Grundlage von Analysen der Massenspektrometrie und den Transkriptomdaten der NCBI-Datenbank zu *T. suis* konnten im L1 ES mehrere sekretierte Proteine identifiziert werden. Damit ist die Vollständigkeit der identifizierten und ausgewählten Proteine maßgeblich von der Datengrundlage abhängig und Änderungen dieser beeinflussen die daraus abgeleiteten Ergebnisse. Im Bearbeitungszeitraum dieser Arbeit wurde die NCBI-Datenbank Ende 2014 mit neuen Transkriptomdaten von *T. suis* erweitert. Durch die wiederholte Analyse der Massenspektrometrie-Daten wurden zusätzliche ES Proteine identifiziert (Anhang, Tab. B.2). Somit ist es wahrscheinlich, dass durch weitere Genom-, Transkriptom- und Proteom-Analysen von *T. suis* auch bisher unbekannte Proteine identifiziert und annotiert werden können.

Es wurden initial 10 Proteine ausgewählt, die eine Signalsequenz, jedoch keine Transmembranhelices aufwiesen und nur im L1 Larvenstadium präsent waren (Anhang, Tab. B). Durch die Erweiterung der Datengrundlage wurden 8 weitere Proteine mit den genannten Kriterien identifiziert.

Die Signalsequenz ist ein Kennzeichen sekretierter Proteine, welche nach der Sekretion in das umliegende Gewebe diffundieren können und viele Zielzellen erreichen. Somit können Helminthen-Proteine das Immunsystem des Wirtes auch systemisch regulieren. Proteine, die über andere Transportmechanismen sezerniert werden, wurden in dieser Arbeit nicht betrachtet. Ein Beispiel dafür sind die sogenannten Exosomen, die von Helminthen gebildet werden und RNA zusammen mit Proteinen bis in die Zielzelle hinein transportieren können [Raposo and Stoorvogel, 2013, Coakley et al., 2015]. Auch für *T. suis* wurde die Bildung von RNA-haltigen Exosomen nachgewiesen, sodass neben Proteinen auch RNA-Moleküle für die Immunmodulation verantwortlich sein können [Hansen et al., 2015].

Unter den 18 ausgewählten ES Proteinen der *T. suis* L1 Larven befinden sich Trypsin-Proteine, eine Chitinase und Methyltransferase sowie viele hypothetische Proteine (Anhang, Tab. B). Helminthen können Chitin oder Derivate von N-Acetylglucosamin bilden und verwenden diesen stabilen Naturbaustein hauptsächlich für die Schale ihrer Eier [Adam et al., 1996, Brydon et al., 1987, Fuhrman and Piessens, 1985]. Daher benötigen sie Serinproteasen und Chitinasen, damit die Larven schlüpfen und sich über Häutungen entwickeln können [Tachu et al., 2008, Gooyit et al., 2014, Yang et al., 2015]. Die Methyltransferase ist für die Übertragung von Methylgruppen auf Nukleotid-Moleküle oder Proteine verantwortlich und kann damit die Zugänglichkeit genetischer Informationen regulieren [Lyko, 2017]. Die Funktion hypothetischer Proteine ist noch nicht bekannt oder deren Annotation ist bisher nicht erfolgt.

Die initial ausgewählten und rekombinant exprimierten ES Proteine besitzen Homologien (Identität > 50 %) zu Proteinen des humanpathogenen Nematoden *Trichuris trichiura* (*T. trichiura*) (Tab. 3.1). Darunter befindet sich die *acidic mammalian chitinase* (TsES1), ein *CAP-domain containing protein* (TsES5) und das *venom allergen 5* (TsES6). Die Proteine TsES8 und TsES9 sind zu hypothetischen Proteinen ohne bekannter Funktion von *T. trichiura* homolog und für TsES4 ist kein sequenzähnliches Protein beschrieben.

Wie bereits erwähnt wurde, sind Chitinasen für die Häutung und Entwicklung von Helminthen wichtig [Yang et al., 2015, Tachu et al., 2008]. Proteine mit einer CAP-Domäne (*CAP-Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5 and pathogenesis-related 1*) gehören zu einer Proteinsuperfamilie, die auch als *sperm-coating glycoprotein* (SCP) Proteinfamilie (Pfam PF00188) bezeichnet wird [Gibbs et al., 2008]. Zu dieser Familie zählen auch die *Activation-associated secreted proteins* - ASP, von denen das *O. volvulus* Protein ASP-1 Eigenschaften eines Adjuvans hat [He et al., 2009]. Das Protein *venom allergen 5* wird ebenfalls der SCP-Superfamilie zugeordnet, die unter Helminthen weit verbreitet ist [Cantacessi and Gasser, 2012].

Die Begrenzung der zur Auswahl stehenden Proteine auf die ES-Proteine der L1 Larve beruhte auf der Annahme, dass *T. suis* im Menschen nicht zu andauernden Infektionen führt und bereits L1/L2 Larven direkt ausgeschieden werden. Neueste Studien zeigen jedoch, dass durchaus adulte *T. suis* Würmer den Darm des Menschen besiedeln können, auch wenn diese dabei keine schwerwiegenden Symptome auslösen [Williams et al., 2017]. Daher sollten auch Proteine späterer *T. suis* Stadien für zukünftige Analysen untersucht werden.

Außerdem wurde bei dem Vergleich der ES Proteine *in vitro* geschlüpfter Larven und isolierter L1 Larven aus dem Schwein deutlich, dass letztere ein wesentlich größeres Spektrum an Proteinen sekretieren. Es ist wahrscheinlich, dass durch die Interaktion der Larven mit dem Wirt die Expression bestimmter ES Proteine angeregt wird. Dies wurde z. B. für das immunregulatorische Protein ASP von *Ancylostoma caninum* gezeigt, das *in vitro* von Larven erst exprimiert wird, nachdem sie über Serum des Wirtes aktiviert wurden [Hawdon et al., 1996]. Daher ist es möglich, dass besonders die Proteine, die für eine gezielte Regulation des Immunsystems benötigt werden, erst nach dem Kontakt mit dem Wirt gebildet werden.

Die Selektion einiger weniger ES Proteine am Anfang dieser Arbeit schloss viele Proteine aus, deren immunmodulatorisches Potential daher nicht näher untersucht wurde. Besonders nach neuen Erkenntnissen, dass *T. suis* sich zum adulten Wurm im Menschen entwickeln kann und eine Regulation des Immunsystems über den gesamten Lebenszeitraum von *T. suis* notwendig ist, sollten zukünftig auch ES Proteine näher untersucht werden, die über alle *T. suis* Stadien hinweg exprimiert werden. Bezogen auf unsere Daten wurden über 200 identifizierte

ES-Proteine nicht in die Analysen einbezogen, die möglicherweise als immunregulatorische Proteine wirken.

### Rekombinante Herstellung

Um die ausgewählten *T. suis* L1 ES Proteine rekombinant herzustellen, wurde das Leishmanien Expressions-System (LEXSY) ausgewählt. Als eukaryotisches Expressionssystem bietet es die Möglichkeit, rekombinante Proteine über den Weg der Sekretion herzustellen, sodass die natürliche Proteinexpression nachempfunden ist. Außerdem werden im Gegensatz zur bakteriellen Proteinexpressionen die posttranskriptionalen Modifikationen, wie die für Eukaryoten typischen Glykosylierungen der Proteine, durchgeführt. Besonders bei Helminthenproteinen ist dieser Punkt wichtig, da nachgewiesen wurde, dass die immunmodulatorischen Funktionen von *T. suis* von Glykosylierungen abhängig sind [Tundup et al., 2012]. Ein weiterer Vorteil von LEXSY ist, dass die Leishmanien kein LPS produzieren und dadurch keine Protein-unspezifische Aktivierung von Immunzellen, wie z.B. den DCs, erfolgt. Damit war keine zusätzliche Reinigung der Proteine über eine LPS-depletierende Säule notwendig, die häufig einen großen Proteinverlust bedeutet. Dennoch wurden trotzdem geringe Mengen LPS bei den rekombinanten TsES Proteinen nachgewiesen, was auf verschiedene Gründe zurückzuführen ist.

In unserem Labor wird gleichzeitig mit einem bakteriellen Expressionssystem gearbeitet und Großgeräte für die Kultivierung und Reinigung der Proteine werden von verschiedenen Anwendern genutzt. Außerdem ist LPS ubiquitär in Luft, Wasser und Boden in geringen Konzentrationen vorhanden [Barnig et al., 2013]. Trotz bestmöglicher Reinigung aller Geräte und der Trennung der verwendeten Gefäße für die Expression, kann eine Kontamination mit LPS nicht verhindert werden. Doch die gemessenen Konzentrationen von maximal 0,8 pg LPS/ $\mu$ g Protein waren sehr gering, weshalb mit den rekombinanten TsES Proteinen *in vitro* und *in vivo* ohne LPS-Depletion gearbeitet werden konnte.

Von den 10 initial ausgewählten Proteinen konnten 6 rekombinant hergestellt werden. Die anderen 4 Proteine ließen sich nicht mit den auf Grundlage der Transkriptomdaten entwickelten Primern aus der hergestellten *T. suis* cDNA vervielfältigen. Da verschiedene cDNA-Proben verwendet wurden, sind die Primer für die jeweiligen Proteine vermutlich fehlerhaft. Daher kann die Expression der ausgewählten Proteine nur durch eine verbesserten Datengrundlage und damit Anpassung der Primer erfolgen.

Alles in allem ist zu berücksichtigen, dass die rekombinante Expression nur ein Modell des natürlichen Proteins zur Verfügung stellt. Jedoch ist die Gewinnung und Reinigung natürlich

exprimierter Proteine meist dadurch limitiert, dass geringe Proteinmengen hergestellt werden und sich Proteine gleicher Größe und Ladung schwer voneinander trennen lassen. Der Vorteil der rekombinanten Expression ist die leichte Reinigung und Detektion der Proteine über einen fusionierten Protein-tag. Gleichzeitig kann dieser tag auch von Nachteil sein, da die Präsentation von Antigenen auf MHC-II Molekülen maßgeblich durch das Vorhandensein eines Protein-tags beeinflusst werden kann [Kim et al., 2017]. Es gibt die Möglichkeit den Protein-tag nach der initialen Reinigung abzutrennen, um dadurch natürlichere Proteine zu erhalten. Dadurch wird aber die einfache Detektion des Proteins über tag-spezifische Antikörper mit einem Western Blot erschwert, weshalb dann Protein-spezifische polyklonale oder monoklonale Antikörper notwendig wären.

Insgesamt wurden von allen identifizierten *T. suis* L1 ES Proteinen 6 rekombinant hergestellt, sodass die Daten ein großes Potential für die Identifizierung weiterer immunmodulatorischer Proteine bieten.

## 4.2. *In vitro* und *in vivo* Funktionsstudien rekombinanter *Trichuris suis* Proteine

### *In vitro* Funktionsstudien: Reduktion der Zytokinlevel stimulierter DCs

Grundlage für die *in vitro* Funktionsstudien der rekombinanten TsES Proteine waren die Voruntersuchungen mit dem gesamten L1 TsES [Ebner et al., 2014]. Dabei wurde *in vitro* die Expression von Oberflächenmarkern CpG-stimulierter DCs durch die Inkubation mit L1 TsES verringert. Ebenso wurde die Sekretion von IL-6 sowohl bei LPS- als auch CpG-Stimulation durch das L1 TsES signifikant reduziert.

Die Expression des Oberflächenmarkers MHC-II wird nach Stimulation der Zellen während einer Infektion gesteigert, mit Antigen beladen und führt zusammen mit dem kostimulatorischen Molekül CD86 zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Ablauf ist wichtig für eine effektive Immunreaktion und wird durch die Sekretion spezifischer Zytokine vervollständigt. Durch die Expression von IL-4 wird die Induktion von Th2-Zellen unterstützt, wohingegen die Differenzierung zu Th1-Zellen hauptsächlich durch das Zytokin IL-12 aktiviert wird [Kaiko et al., 2008]. Für die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist Ox40L als ein weiterer Kostimulator auf der Zelloberfläche von DCs beschrieben, der speziell zur Induktion von Th2-Zellen beiträgt [Jenkins et al., 2007].

Durch die Inkubation von DCs mit den einzelnen rekombinanten TsES Proteinen konnten die *in vitro* Ergebnisse der Voruntersuchungen mit Gesamt-ES nicht vollständig widerspiegelt werden. Es konnte keine Reduktion der Oberflächenmarker MHC-II, CD86 und OX40L auf LPS- oder CpG-stimulierte DCs nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Jedoch wurde die Abnahme der Th1-Zytokinlevel (IL-6, IL-12p40) von LPS-stimulierten DCs nach Behandlung mit rekombinanten Proteine ebenfalls detektiert (Abb. 3.7).

Interessanterweise führten alle rekombinanten Proteine zu einem ähnlichen Effekt. Es ist möglich, dass Zuckerstrukturen auf der Oberfläche der Proteine dafür verantwortlich sind, denn eine glykanabhängige Regulation der Zytokinexpression in humanen DCs durch *T. suis* soluble products (SP) wurde bereits nachgewiesen [Klaver et al., 2013]. Fehlten die Glykane auf den *T. suis* SP Proteinen, wurde z.B. die LPS-induzierte Expression von IL-6, IL-12p70 und TNF $\alpha$  nicht mehr reduziert. Die bioinformatische Analyse möglicher Glykosylierungen der *T. suis* L1 ES Proteine konnte keine Glykosylierungen für TsES8 vorhersagen. Trotzdem hat auch TsES8 die Expression der Zytokine IL-6 und IL-12p40 in dem Stimulationsversuch verringert. Es ist möglich, dass die Vorhersage mit der für Säugetiere ausgelegten Software nicht direkt auf Helminthenproteine übertragbar ist. Da es aber bis jetzt kein spezifisches Programm für die Analyse von Glykanen von Helminthen gibt, sind Aussagen in diesem Bereich limitiert. Jedoch könnte das verwendete Expressionsmodell LEXSY, das für seine eukaryotische Glykosylierung von Proteinen bekannt ist [Breitling et al., 2002, Klatt et al., 2013], allen Proteinen die jeweils passenden Glykane hinzugefügt haben. Besonders, da der gereinigte Kontrollüberstand von untransfizierten Leishmanien keine Reduktion der Zytokinlevel erbrachte, wurde eine proteinabhängige Regulation der Zytokinexpression aufgedeckt. Zur Überprüfung, ob die Glykosylierungen der Proteine die Zytokinsekretion von DCs hemmen, muss man die Glykane der Proteinen enzymatisch abschneiden oder mit Natriumperodat oxidieren.

Zytokine sind für die Polarisation der T-Zellen wichtig und da bereits nachgewiesen wurde, dass die rekombinanten Proteine die Zytokinexpression stimulierter DCs minimieren können, wurde der Einfluss rekombinanter TsES Proteine auf die T-Zellproliferation untersucht.

In den Voruntersuchungen von Ebner et al. wurde kein Einfluss der L1 ES-Gesamtproteine auf die antigenabhängige T-Zellproliferation beobachtet, jedoch wurde die Expression der Zytokine IFN $\gamma$  und IL-4 gehemmt [Ebner et al., 2014]. Von den rekombinanten Proteinen induzierte nur TsES9 eine höhere Proliferationsfrequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einem OVA-abhängigen Proliferationsansatz (Abb. 3.9). TsES4 und TsES6 reduzierten zwar die Zytokinlevel von IL-4 leicht, jedoch zeigten die rekombinanten Proteine insgesamt keinen signifikanten Einfluss auf

die Zytokinlevel (Abb. 3.10). Trotzdem war es interessant, dass TsES1 sowohl den Transkriptionsfaktor Tbet, als auch das dazu passende Th1-Zytokin  $\text{IFN}\gamma$  in der Expression erhöhte (Abb. 3.10, 3.9).

Da die rekombinanten Proteine nur einen geringen Anteil des Gesamt-ES von *T. suis* darstellen, sind die abweichenden Ergebnisse nicht überraschend. Außerdem ist möglich, dass mehrere Proteine nur zusammen aktiv sind und nur dann die Markerexpression von DCs abschwächen bzw. die Zytokinexpression von T-Zellen verringern können. Die Interaktionen verschiedener ES-Proteine untereinander ist weitgehend unerforscht, sodass dieses Gebiet unbekannte Mechanismen der Immunmodulation bereit halten könnte.

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, sind neben DCs und T-Zellen weitere Immunzellen wie Makrophagen, B-Zellen und neutrophile Granulozyten Zielzellen der Immunmodulation durch Helminthen. Für *T. suis* Proteine wurde nachgewiesen, dass sie die Differenzierung von humanen Monozyten hin zu Makrophagen mit einem alternativen Phänotyp verursachen [Hoeksema et al., 2016]. Daher ist es sowohl für *T. suis* Gesamt-ES Proteine, als auch für die einzelnen rekombinanten Proteine wissenswert, ob diese weitere Immunzellen in ihrer Entwicklung oder Funktion beeinflussen können.

### ***In vivo* Funktionsstudien: TsES1 reduziert die Eosinophilie**

Um den potentiellen immunmodulatorischen Effekt der rekombinanten Proteine in einem *in vivo* Krankheitsmodell zu untersuchen, wurde das bereits für Gesamt-ES von *T. suis* L1 Larven verwendete Modell der OVA-induzierten allergischen Atemwegserkrankung verwendet [Ebner et al., 2014]. Dieses Modell bietet die Möglichkeit typische Th2-Immunreaktionen, wie die Induktion von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen, deren Sekretion von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-13, IL-5), die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und die Induktion alternativ aktivierter Makrophagen zu untersuchen.

Das *in vivo* Screening aller rekombinanten Proteine im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung hat ergeben, dass neben L1 TsES auch die Proteine TsES1 und TsES6 die Gesamtzahl der in die Lunge einwandernden Zellen reduzierten (Abb. 3.11). Jedoch ergab die Differential-Zellzählung, dass durch die Behandlung mit L1 TsES und dem rekombinanten Protein TsES1 eine signifikante Reduktion der eosinophilen Granulozyten erreicht werden konnte. Deshalb wurden vertiefende Analysen in dem verwendeten Asthma-Modell mit dem TsES1 Protein durchgeführt.

Obwohl alle anderen Proteine die in die Lunge infiltrierenden Zellen nicht signifikant gesenkt haben, können sie in anderen Krankheitsmodellen trotzdem immunmodulatorisch wirken. Mit

Hilfe weiterer Krankheitsmodelle oder *in vitro* Studien könnten immunregulatorische Eigenschaften entdeckt werden, die in dem Asthmadmodell nicht auftreten. So wurde bereits für das Gesamtprotein von *T. suis* eine Verbesserung der Score-Werte im EAE-Modell nachgewiesen [Kuijk et al., 2012, Hansen et al., 2017]. Dabei wurden die in diesem Modell induzierten CD4<sup>+</sup> IL-17-produzierenden T-Zellen durch die Behandlung mit *T. suis* Proteinen verringert. Daher ist es vorstellbar, dass die rekombinanten TsES Proteine einen Einfluss auf die Induktion oder Expansion dieser Th17-Zellen haben, die in dem OVA-Asthma-Modell nicht beteiligt sind. Des Weiteren wurde im Kolitis-Modell von Kaninchen beobachtet, dass eine TSO-Behandlung den Score-Wert verringert und zu einer Reduktion eosinophiler Granulozyten führt [Leonardi et al., 2017]. Somit ist dies ein zusätzliches Krankheitsmodell, in dem die rekombinanten TsES Proteine getestet werden sollten.

### 4.3. TsES1 ist eine enzymatisch aktive Chitinase, die Dimere bildet

Die vergleichende Analyse der Proteinsequenz von TsES1 mit der NCBI-Proteindatenbank ergab, dass das *T. suis* L1 ES Protein eine Signalsequenz, eine Chitinase-Domäne und eine Chitin-bindende Domäne besitzt (Abb. 3.12). Ein anschließendes Alignment mit bekannten Chitinasen anderer Helminthen belegte, dass TsES1 im Durchschnitt 40 % Sequenzübereinstimmung zu diesen Helminthenchitinasen aufweist (Abb. 3.12). Damit ist es wahrscheinlich, dass TsES1 ebenfalls den Chitinasen zugeordnet werden kann.

Chitinasen sind Enzyme, die zur Gruppe der Glykosylhydrolasen zählen und Chitin, ein Polymer aus *beta*-1,4-N-Acetylglucosamin, in seine monomeren Bestandteile trennen [Cohen-Kupiec and Chet, 1998]. Chitinasen werden von allen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen gebildet, obwohl nicht alle Chitin bilden können [Adrangi and Faramarzi, 2013]. Basierend auf Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz werden Chitinasen verschiedenen Familien bzw. Klassen zugeordnet [Henrissat et al., 1991], wobei die zwei größten Familien die Glykosylhydrolase Familie 18 (GH-18) und 19 (GH-19) sind. Chitinasen von Säugetieren werden der GH-18 Familie zugeteilt, die neben enzymatisch aktiven Chitinasen auch sogenannte *chitinase like proteins* (Chitinase-ähnliche Proteine) besitzen, die Chitin nicht abbauen können [Adrangi and Faramarzi, 2013].

TsES1 kann auf Grund seiner Sequenz und dem enthaltenen Chitinase-Enzym-Motiv Dx Dx E ebenfalls der GH-18 Familie zugeordnet werden. Daher war es wichtig zu klären, ob TsES1 als rekombinant hergestelltes Protein chitinolytisch aktiv ist. Wie sich herausgestellt hat, besitzt



TsES1 sowohl eine Endo-, als auch Exo-Chitinaseaktivität, die sogar höher als die Aktivität des Kontrollproteins war (Abb. 3.14).

Wie es für *Acanthocheilonema viteae* (*A. viteae*), *Onchocerca volvulus* (*O. volvulus*) und *Brugia malayi* (*B. malayi*) gezeigt wurde, können Helminthen Chitin oder Derivate von N-Acetylglucosamin in der Eihülle und der Hülle von Mikrofilarien bilden [Adam et al., 1996, Brydon et al., 1987, Fuhrman and Piessens, 1985]. Damit die Larven aus dem Ei schlüpfen können, werden Chitinasen benötigt, die auch bei der Häutung der Larven wichtig sind. Dies wurde eindrucksvoll von Tachu et al. gezeigt, da eine Inhibition der Expression der Chitinasen durch doppelsträngige RNA in *A. viteae* zu einer verringerten Schlupf- und Häutungsrate führte [Tachu et al., 2008]. Die wichtige Funktion der Helminthenchitinasen konnte vor kurzem auch für *O. volvulus* gezeigt werden. Denn durch den Einsatz eines spezifischen Inhibitors der Chitinase OvCHIT1 wurde das Schlüpfen der L3 Larven verhindert [Gooyit et al., 2014]. Somit sind Chitinasen wichtige Enzyme für die Entwicklung von Helminthen.

Für *T. suis* Larven und deren Enzyme ist es außerdem wichtig, dass sie im sauren Darmmilieu ihres Wirtes stabil und damit enzymatisch aktiv sind, um das Schlüpfen und Häuten unterstützen zu können. Deshalb wurde die Temperatur- und pH-abhängige Chitinaseaktivität des rekombinant hergestellten Proteins TsES1 überprüft. Erstaunlicherweise war das rekombinante TsES1 bis zu einer Temperatur von 50°C enzymatisch aktiv, einer Temperatur, die im natürlichen Umfeld von *T. suis* keine Rolle spielt (Abb. 3.15). Außerdem wurde eine chitinolytische Aktivität zwischen pH 4-7 nachgewiesen, die eine Beteiligung des Enzyms bei der Häutung im sauren Darm des Wirtes möglich macht.

Mit Hilfe von TsES1-spezifischen IgG-Antikörpern sollte überprüft werden, ob das rekombinant hergestellte Protein TsES1 auch in natürlicher Form im *T. suis* L1 ES nachgewiesen werden kann. Im Western Blot konnte eine Proteinbande im *T. suis* L1 ES detektiert werden, die ungefähr auf gleicher Höhe lag wie die TsES1 Bande (Abb. 3.13). Zusätzlich wurden als Kontrollen zwei andere TsES Proteine verwendet, die jedoch nicht detektiert wurden. Damit sind die gewonnenen TsES1-IgG-Antikörper spezifisch für die Helminthenchitinase und enthalten keine anti-His6tag Antikörper.

Um das Protein TsES1 weiter zu charakterisieren wurde nach Strukturen von verwandten Chitinasen gesucht. Wie sich herausgestellt hat, beinhaltet die PDB-Datenbank zu dem Recherchezeitpunkt keine Struktur einer Helminthenchitinase. Deshalb wurde zusammen mit einem Kooperationspartner die Struktur von TsES1 mit einer Auflösung von 1,65 Å aufgeklärt und erstaunlicherweise als Dimer identifiziert (Abb. 3.16).

Eine Dimerisierung von Chitinasen wurde bereits beschrieben [Shoresh and Harman, 2010], es ist jedoch keine generelle Eigenschaft dieser Proteinklasse. Außerdem ergab ein NCBI-Datenbankabgleich des Sequenzbereiches von TsES1, welches das für die Dimerisierung verantwortliche Cystein enthält, keine homologen Sequenzen zu anderen Proteinen. Damit scheint das Cystein auf der Oberfläche von TsES1 eine einzigartige Aminosäure in der Sequenz von Chitinasen zu sein.

Für ES Proteine anderer Helminthen sind ebenfalls Dimere beschrieben, die immunregulatorische Eigenschaften haben. So wurde für das dimere Protein *28-kDa glutathione S-transferase* (P28GST) von Schistosomen ermittelt, dass es im Kolitis-Modell der Maus die Läsionen und Th2-Zytokinexpression abhängig von eosinophilen Granulozyten reduziert [Johnson et al., 2003, Driss et al., 2016]. Ebenso ist das bereits erwähnte *S. mansoni* Protein IPSE/alpha-1 ein Dimer, das auch nur als Dimer effektiv basophile Granulozyten aktivieren kann [Meyer et al., 2015].

Des Weiteren konnte für TsES1 bestätigt werden, dass es auch in Lösung Dimere bilden kann und daher potentiell die immunregulatorische Funktion von TsES1 unterstützt. Um den Einfluss der Dimerisierung auf die Immunregulation von TsES1 im Asthma-Modell untersuchen zu können, muss das für die Dimerisierung verantwortliche Cystein zu Alanin oder Serin mutiert werden. Dadurch wird die Bildung einer Disulfidbrücke verhindert und monomere TsES1 Proteine entstehen. Jedoch war der Anteil dimerer TsES1 Proteine in Lösung relativ gering, sodass der Einsatz von mutierten monomeren Proteinen im Asthma-Mausmodell möglicherweise ähnliche Ergebnisse liefert wie nicht-mutiertes TsES1.

Der entschlüsselten Proteinstruktur fehlen am C-Terminus 94 Aminosäuren, die kristallografisch nicht analysiert werden konnten. Wie sich mit Hilfe der Massenspektrometrie herausgestellt hat, weisen die Moleküle innerhalb des Proteinkristalls diesen C-Terminus nicht auf. Das heißt, während der Kristallisation wurde der über eine relativ flexible Linker-Sequenz verbundene C-Terminus abgetrennt. Wie genau es dazu gekommen ist und ob das Protein autolytisch zum Abschneiden der Sequenz führt, wurde bisher nicht untersucht. Es könnte sein, dass durch veränderte Pufferbedingungen während der Kristallisation die Struktur stabilisiert und damit der Verlust des C-Terminus verhindert werden kann. Für viele andere Chitinasen konnte der C-Terminus bisher ebenfalls gar nicht oder wie bei der humanen Chitotriosidase (Chit1) nur unvollständig strukturell analysiert werden [Fadel et al., 2016]. Um dies überhaupt zu erreichen, mussten als Erstes Kristalle von Chit1-Proteinen ohne C-Terminus hergestellt werden. Diese wurden dann als Impfkristalle für Proteinlösungen verwendet, die das vollständig exprimierte Chit1-Protein enthielten. Vielleicht ist diese Methode für die Analyse der vollständigen

Struktur von TsES1 ebenfalls nötig, um das Abspalten des C-Terminus zu verhindern. Insgesamt wurde erstmals eine Chitinase von *T. suis* charakterisiert, die bis zu einer Temperatur von 50 °C stabil und enzymatisch aktiv ist. Zusätzlich wurde die Struktur von TsES1 entschlüsselt und damit die erste Struktur einer Helminthenchitinase analysiert. Dabei scheint die Dimerisierung von TsES1 für Chitinasen einzigartig zu sein.

#### 4.4. Immunmodulation des Wirtes durch die *Trichuris suis* Chitinase TsES1

Das rekombinant hergestellte *T. suis* L1 ES Protein TsES1 ist eine Chitinase, die im Vergleich zu den anderen rekombinanten Proteinen im *in vivo* Asthmamodell immunregulatorische Eigenschaften gezeigt hat, da sie die Anzahl eosinophiler Granulozyten in der Lunge verringert hat. Deshalb wurden zusätzliche Analysen in diesem Krankheitsmodell mit TsES1 durchgeführt, die zur Bestätigung der initialen Ergebnisse führten und weitere Erkenntnisse lieferten. Es wurde sowohl mikroskopisch als auch am Durchflusszytometer nachgewiesen, dass TsES1 im verwendeten Asthmamodell eine Reduktion der Eosinophilie in der Lunge verursacht (Abb. 3.17, 3.18). Außerdem wurden die Zytokine IL-4, IL-18 und das Chemokin CCL3 in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe erhöht (Abb. 3.20). Gleichzeitig milderte eine TsES1 Behandlung die spezifische Atemwegsresistenz (Abb. 3.21) und erhöhte die Anzahl alternativ aktivierter Makrophagen (AAMs) in der Lunge (Abb. 3.22). Teilweise sind diese Beobachtungen auf die Integrität des Proteins zurückzuführen, da das Hitze-inaktivierte TsES1 zu keiner signifikanten Reduktion der eosinophilen Granulozyten führte, aber die Zytokinlevel ebenfalls erhöhte. Ob dieser Unterschied jedoch auf Grund der fehlenden Enzymfunktion oder nur auf den Strukturverlust zurückzuführen ist, wurde bisher nicht geklärt. Da die gesteigerte Zytokinexpression und die geminderte Expression von *Arginase-1* in der Lunge aber unabhängig von der Proteinintegrität erfolgten, wird eine Mutation des dimeren TsES1 hin zu einem monomeren Protein wahrscheinlich keine wesentlichen Funktionsänderungen herbeiführen. Doch es stellte sich die Frage, welchen Einfluss eine Helminthenchitinase auf eosinophile Granulozyten, die Lungenfunktion und AAMs in einem Asthmamodell der Maus haben kann, wenn dieses Modell selbst zur Expression von Chitinasen und *chitinase like proteins* CLPs führt.

In der Maus werden die zwei Chitinasen *acidic mammalian chitinase* (AMCase) und die Chitotriosidase-1 (Chit1) exprimiert, die als aktive Enzyme Chitin abbauen können. Die CLPs der Maus Ym1 (Chitinase3-like3, Chi3l3), Ym2 (Chitinase3-like4, Chi3l4) sowie das *breast*

*regression protein-39* (BRP-39; Chitinase3-like1, Chi3l1) besitzen hingegen keine Chitinaseaktivität. Eine Funktion der Chitinasen ist der Abbau von Chitin zur Nahrungsverwertung im Säugtiermagen [Ohno et al., 2012]. Bedeutender ist jedoch, dass Chitinasen und CLPs als wichtige Proteine des Immunsystems von Säugetieren beschrieben werden [Lee et al., 2011] und besonders während der Th2-Entzündungsreaktionen im Darm oder in der Lunge exprimiert sind [Sutherland et al., 2009, Shuhui et al., 2009]. CLPs haben auf Grund von Mutationen im aktiven Zentrum die Fähigkeit verloren Chitin zu spalten, jedoch wurde beobachtet, dass sie bei der Kontrolle von Helmintheninfektionen und der dabei entstehenden Gewebeerstörung beteiligt sind [Sutherland, 2018]. So wurde festgestellt, dass während einer *N. brasiliensis*-Infektion in der Maus die CLPs Ym1/Ym2 über eine Aktivierung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen neutrophile Granulozyten in die Lunge rekrutiert werden [Sutherland et al., 2014]. Dabei stimulieren CLPs sich gegenseitig in ihrer Expression und aktivieren neutrophilen Granulozyten, die zusammen mit AAMs an der Bekämpfung der Larven beteiligt sind. Jedoch entstehen dadurch auch Gewebeschäden, die nach der Wanderung der Larven in der Lunge nur in Anwesenheit der CLPs beseitigt werden. Außerdem wurde für das CLP BRP-39 nachgewiesen, dass es *in vivo* und *in vitro* die Apoptose mindern kann, zur Induktion von AAM beiträgt und es in BRP-39 knock-out Tieren zu einer geringeren Ausprägung der allergie-induzierten Lungenentzündung kommt [Lee et al., 2009]. Zusätzlich dazu haben Xu et al. gezeigt, dass BRP-39 überexprimierende DCs in einem OVA-Asthmamodell die Expression von Th2-Zytokinen erhöhen und eine stärkere Eosinophilie auslösen [Xu et al., 2012]. Ebenso wurde für die murine Chitinase AMCase gezeigt, dass diese in einem OVA-Asthmamodell IL-13 abhängig vermehrt exprimiert wird [Zhu, 2004]. Die Neutralisation über Anti-AMCase Antikörper führt zur Reduktion der eosinophilen Granulozyten in der Lunge sowie der Abschwächung der allergischen Hyperreaktivität [Zhu, 2004].

Um zu klären, wie TsES1 in dem Netzwerk mauseigener Chitinasen in einem Modell der allergischen Atemwegserkrankung immunregulierend wirken kann, wurden in abschließenden Versuchen mehrere Hypothesen untersucht. Zusätzlich zur Hypothese, dass TsES1 wie eine mauseigene Chitinase/CLP agiert, wurden indirekte Mechanismen der Immunregulation über autoreaktive Antikörper und regulatorische B-Zellen (Bregs) analysiert.

### **TsES1 induziert alternativ aktivierte Makrophagen**

Würde TsES1 als murinen Chitinasen erkannt, müsste es auf Grund von Sequenz- und Strukturähnlichkeit ähnliche Funktionen in der Maus ausüben. Die Sequenz von TsES1 stimmt zu ca. 40 % mit denen der murinen Chitinasen und CLPs überein (Abb. 3.12). Ebenso ergab der

Vergleich der Struktur von TsES1 mit bekannten Strukturen humaner und muriner Chitinasen, dass viele Bereiche konserviert sind (Abb. 3.16). Daher schien es möglich zu sein, dass TsES1 wie eine murine Chitinase/CLP erkannt wird und als solche aktiv ist. Dabei sollte erwähnt werden, dass bisher nur für BRP-39 die Bindung an die Rezeptoren IL13-R $\alpha$ 2 [He et al., 2013], Prostaglandin D2 (CRTH2) [Zhou et al., 2015] und *receptor for advance glycation end product* (RAGE) nachgewiesen wurde [Low et al., 2015].

Für Ym1/Ym2 ist beschrieben, dass sie die Expression der murinen CLPs erhöhen und neutrophile Granulozyten in die Lunge oder in den peritonealen Bauchraum rekrutieren können [Sutherland et al., 2014]. Deshalb wurde untersucht, ob auch TsES1 die Expression der murinen CLPs erhöhen kann.

Allerdings führte die Behandlung mit TsES1 im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung zu keiner signifikanten Steigerung der CLP-Expression, aber zu einer deutlichen Abnahme der *BRP-39*-Transkripte im Vergleich zur positiven Kontrolle (Abb. 3.23). In der Literatur ist die Überexpression von BRP-39 in DCs in einem OVA-Asthmamodell beschrieben, die zur Expressionssteigerung von Th2-Zytokinen beitrug und eine stärkere Eosinophilie auslöste [Xu et al., 2012]. Zusätzlich wurde in BRP-39 knock-out Tieren beobachtet, dass diese eine geringere Ausprägung der allergie-induzierten Lungenentzündung bekommen [Lee et al., 2009]. Daher könnte die geringere Expression von BRP-39 durch TsES1-Behandlung die reduzierte Eosinophilie im verwendeten Asthmamodell erklären.

Es wurde im Vergleich zur Publikation von Sutherland et al. mit einem rekombinanten Protein und nicht mit der Transfektion von Plasmiden gearbeitet, die nach der Aufnahme in die Zellen zur Expression des jeweiligen CLPs führen. Es könnten daher intrinsische Mechanismen für die gegenseitige Expressionssteigerung der CLPs verantwortlich sein, die durch die Verwendung rekombinanter Proteine nicht erzielt werden.

Im Gegensatz zu den eher verstärkenden, pathologischen Effekten von BRP-39 wurde sowohl für AMCase, als auch für BRP-39 *in vivo* bzw. *in vitro* nachgewiesen, dass sie die induzierte Apoptose mildern können [Hartl et al., 2009, Lee et al., 2009]. TsES1 zeigt diese Fähigkeit bei mangelinduzierter Apoptose von A549-Epithelzellen *in vitro* jedoch nicht (Abb. 3.24), obwohl in der Lunge asthmatischer Mäuse mit TsES1-Behandlung eine leichte Abnahme des Score-Wertes beobachtet wurde (Abb. 3.22).

Zusätzlich wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht, ob TsES1 die initial ermittelte Vermehrung interstitieller Relm $\alpha^+$  Makrophagen erhöht. Für Ym1 wurde beschrieben, dass es interstitielle Makrophagen (IM) in der Lunge vermehrt, aber bisher wurden diese Zellen nicht als AAMs definiert [Sutherland et al., 2014]. Allgemein ist für IM beschrieben,

dass sie über IL-10 die Migration von DCs verhindern und dadurch OVA-induziertes Asthma unterdrücken [Bedoret et al., 2009]. Ebenso können IL-10-produzierende IM das Asthma der Maus mildern, das durch den Anstieg neutrophiler Granulozyten gekennzeichnet ist [Kawano et al., 2016].

Die Behandlung mit TsES1 im OVA-Asthmamodell erhöhte die Anzahl interstitieller Relm $\alpha^+$  Makrophagen in der Lunge, die nicht auf eine generelle Steigerung der interstitiellen Makrophagen zurückzuführen war (Abb. 3.25). Da die detektierten IM nicht auf die Sekretion von IL-10 untersucht wurden, kann keine Aussage getroffen werden, ob die interstitiellen Relm $\alpha^+$  Makrophagen IL-10 herstellen. Es ist jedoch auch für AAMs bekannt, dass sie IL-10 sekretieren können und dadurch immunsupprimierend wirken [Katakura et al., 2004, Gordon and Martinez, 2010]. Deshalb wäre es interessant zu untersuchen, ob die im Asthmamodell durch TsES1 vermehrt auftretenden AAMs IL-10 sekretieren und auf diesem Weg zur Immunregulation beitragen.

*In vitro* führte TsES1 nicht zur Induktion von AAMs und steigerte auch nicht die IL-4 stimulierte Expression der Markergene *Relm $\alpha$* , *Arginase-1* und *Ym1* (Abb. 3.26). Demnach scheint TsES1 nur während der Th2-Entzündung in der Lunge interstitielle Relm $\alpha^+$  Makrophagen zu induzieren.

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass durch TsES1 zwar die SiglecF<sup>high</sup>, aber nicht die SiglecF<sup>low</sup> exprimierenden eosinophilen Granulozyten in der Lunge signifikant reduziert wurden. Die SiglecF<sup>high</sup> eosinophilen Granulozyten werden als bereits ins Lumen der Bronchien eingewanderte und aktivierte Zellen beschrieben, wohingegen die SiglecF<sup>low</sup> eosinophilen Granulozyten den Einwanderungsprozess noch nicht abgeschlossen haben und weniger aktiviert sind [Abdala Valencia et al., 2016]. Daher scheinen die eosinophilen Granulozyten durch die TsES1-Behandlung an der Einwanderung in das Lumen gehindert zu werden und nicht die eigentliche Rekrutierung der Zellen zur Lunge zu verhindern.

Bisherigen Studien beobachteten hauptsächlich, dass Chitinasen und CLPs negativ mit Th2-Entzündungen korrelieren und eine Neutralisation oder Inhibition der Chitinasen/CLPs die Th2-Immunreaktion schwächt. In einem Kolitis-Mausmodell wurde die Entstehung der Kolitis durch die orale Gabe von Koffein verzögert, weil Koffein an YKL-40 (Homolog zu murinem BRP-39) bindet [Lee et al., 2014]. Außerdem hatten die Koffein-behandelten Mäuse einen geringeren Score-Wert und geminderte Zytokinlevel für IFN $\gamma$  und IL-17. Ebenso blockieren die Chitinaseinhibitoren Allosamidin und Bisdionin F die murine AMCCase *in vivo* und verhindern so eine starke OVA-induzierte Allergie in der Lunge [Sutherland et al., 2011, Zhu, 2004].

Trotzdem gibt es Hinweise, dass CLPs und Chitinasen zur Bekämpfung von Helminthen während der Th2-Entzündung wichtig sind. In der Arbeit von Sutherland et al. wurde festgestellt, dass vor allem Ym1 während einer *N. brasiliensis* Infektion zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beiträgt und diese dann zusammen mit AAMs die Parasiten bekämpfen [Sutherland et al., 2014]. Die dabei verstärkt auftretenden Gewebeschäden in der Lunge blieben aus, wenn Ym1 in diesem Modell fehlte, aber gleichzeitig wurden auch weniger Parasiten eliminiert. Außerdem konnte die Reparatur der Lunge ohne Ym1 nur langsam erfolgen. Demnach sind CLPs für die Bekämpfung von Helminthen wichtig, verursachen dadurch aber mehr Gewebeschäden, die nur im Beisein dieser CLPs effektiv behoben werden können.

Eine weitere Arbeit von Vannella et al. zeigte, dass die Expression von AMCcase im Darm von Mäusen für die Th2-Immunantwort gegen *N. brasiliensis* und *H. polygyrus* notwendig ist [Vannella et al., 2016]. Infizierte AMCcase knock-out Mäuse hatten eine geringe Mukusproduktion, exprimierten weniger *IL-13*, *Relmβ* und *Ym1* und zeigten eine insgesamt langsamere Ausschleusung der Würmer. Somit sind Chitinasen und CLPs wichtige Immunfaktoren für die Abwehr von Helminthen und verstärken aber in unregulierten Th2-Entzündungsreaktionen wie bei Asthma oder Colitis die Pathologie.

In diesem Netzwerk der wirtseigenen Immunregulation durch Chitinasen /CLPs aktiviert TsES1 die Induktion von AAMs in der Lunge.

### **TsES1 induziert kreuzreaktive Antikörper**

Wie bereits erwähnt wurde, konnte die Neutralisation von AMCcase mit Hilfe von Antikörpern oder dem knock-out von BRP-39 eine Th2-getriebene Entzündungsreaktion in der Lunge verhindern [Zhu, 2004, Lee et al., 2009]. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass während der Sensibilisierung im verwendeten Mausmodell Antikörper gegen TsES1 gebildet werden, die dann kreuzreaktiv gegen murine Chitinasen/CLPs wirken. Dadurch würden die während der Provokation der Lunge vermehrt gebildeten Chitinasen/CLPs neutralisiert und die Chitinase-induzierten Entzündungsreaktionen abgeschwächt werden.

Die Sequenz von TsES1 stimmt zu ca. 40 % mit denen der murinen Chitinasen und CLPs überein und auch der Strukturvergleich deckte viele homologe Bereiche auf, sodass die Bildung kreuzreaktiver Antikörper in der Maus möglich ist. Daher wurden Seren der Mäuse des Asthmodells auf kreuzreaktive Antikörper gegen AMCcase, Ym1, Ym2 und BRP-39 mit Hilfe von Western Blots untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass nur Seren von TsES1-behandelten Asthmodellen kreuzreaktive Antikörper hergestellt haben, nicht aber TsES1-immunisierte Mäuse (Abb. 3.27). Damit scheint die Entzündungsreaktion in der Lunge oder die dadurch

ausgelöste Expression der murinen Chitinasen/CLPs notwendig zu sein, um kreuzreaktive Antikörper zu induzieren.

Ob die durch TsES1 induzierten kreuzreaktiven Antikörper für die gemilderte Eosinophilie verantwortlich sind, kann durch einen Transfer der Seren bzw. isolierten Antikörper in Mäuse, die dann ebenfalls ein OVA-induziertes Asthmamodell durchlaufen, überprüft werden.

Abweichend von der Studie von Zhu et al., bei der AMCase eine Asthma-verstärkende Wirkung zugesprochen wurde [Zhu, 2004], wurde bei der Analyse von AMCase knock-out Mäusen kein Zusammenhang zur Th2-Entzündungsreaktion in der Lunge nachgewiesen [Vannella et al., 2016]. Jedoch wurden unterschiedliche Asthmamodelle verwendet, die andere immunologische Systeme ansprechen. Im AMCase knock-out Versuch wurde das *house dust mite* (HDM)-Modell eingesetzt, wohingegen Zhu et al. OVA als Allergen zur Induktion von Asthma genutzt haben. Außerdem wurde bei Zhu et al. ein gegen AMCase produziertes, polyklonales Serum verwendet, dessen Antikörper auch die anderen CLPs in der Lunge binden könnten und dadurch eine Inhibition der Th2-Entzündung noch verstärken. Somit bleibt unklar, ob AMCase im Allgemeinen in einer Th2-Entzündungsreaktion in der Lunge verstärkend wirkt oder nicht. Da in der vorliegenden Arbeit aber mit einem ähnlichen OVA-Asthmamodell gearbeitet wurde wie in der Studie von Zhu et al., ist die Hypothese, dass die nachgewiesenen kreuzreaktiven Antikörper für die reduzierte Eosinophilie und gemilderte Atemwegsresistenz in diesem Modell mit verantwortlich sind, weiterhin wahrscheinlich und sollte durch weitere Experimente bestätigt werden.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob während einer TSO-Therapie beim Menschen ebenfalls Antikörper wichtige immunregulatorische Funktionen übernehmen und diese vielleicht nur im Rahmen von Entzündungsreaktionen gebildet werden.

Bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie *inflammatory bowel disease* (IBD) und Multiple Sklerose (MS) spielen autoreaktive Antikörper eine wichtige Rolle, da sie die Entzündungsreaktion verstärken können [Pröbstel et al., 2015, Roggenbuck et al., 2016]. Die klinischen Studien zur Behandlung dieser Krankheiten mit TSO liefern im Hinblick auf die Wirksamkeit von TSO als Therapeutikum kein eindeutiges Bild. Da sogenannte Entzündungsschübe für IBD und MS kennzeichnend sind, wäre folgender Gedankengang möglich: Angenommen kreuzreaktive Antikörper werden innerhalb einer TSO-Therapie nur von den Patienten gebildet, die gleichzeitig in einer Entzündungsphase sind und diese Antikörper eliminieren unerwünschte Proteine, sodass die Entzündung abgeschwächt wird. Dann würde durch die initiale Bildung der Antikörper während einer solchen Phase der Schweregrad der Entzündung bzw. die Entstehung weiterer Schübe reduziert werden. Somit könnte eine TSO-Therapie nur für



die Patienten wirksam sein, die zu Behandlungsbeginn einen Schub hatten.

Jedoch ist im Allgemeinen eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs durch die Induktion kreuzreaktiver Antikörper denkbar, sodass dieser mögliche Mechanismus der TSO-Therapie genau untersucht werden muss. Außerdem wurde im Bereich der Tumorforschung festgestellt, dass die CLPs Ym1, Ym2 und BRP39 bereits als Autoantigene wirken und so in einem Epidermis-Modell Antikörper binden, die dann zur Entzündung und Karzinogenese beitragen [Qureshi et al., 2011]. Dadurch ist ebenfalls der genau gegenteilige Gedankengang möglich: Angenommen innerhalb einer TSO-Therapie bilden nur die Patienten kreuzreaktive Antikörper, die gleichzeitig in einer Entzündungsphase sind und deshalb eine Verschlechterung ihrer Symptome erfahren. Dann würden diese Antikörper die Entzündung bzw. Entstehung weiterer Schübe verstärken. Das heißt, vielleicht lassen sich über die Bildung autoreaktiver Antikörper die heterogenen Ergebnisse der TSO-Therapie erklären und sollten deshalb in der Zukunft sehr genau untersucht werden.

### **TsES1 induziert regulatorische B-Zellen**

Neben den Erkenntnissen zu Chitinasen/CLPs und ihren immunregulatorischen Eigenschaften in der Maus, könnte TsES1 auch andere Signalwege des Immunsystems aktivieren. So wurde nachgewiesen, dass eine Infektion mit *S. mansoni* regulatorische B-Zellen induziert, die nach Übertragung in eine andere Maus diese vor OVA-induziertem Asthma schützen [Amu et al., 2010]. Dabei werden CD19<sup>+</sup> B-Zellen als Bregs bezeichnet, die neben IL-10 auch die Oberflächenmarker CD1 und CD5 exprimieren [Yanaba et al., 2008]. Obwohl für *T. suis* eine Induktion von Bregs bisher nicht bekannt ist, sollte überprüft werden, ob diese Zellen durch TsES1 im murinen Asthmodell gebildet werden.

Es wurde festgestellt, dass in den PBLN die Frequenz der IL-10 exprimierenden CD1<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup> und CD1<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der TsES1 behandelten Gruppe gegenüber der OVA-positiven Gruppe gesteigert wurde (Abb. 3.28). Auf Grund der geringen Anzahl an Tieren in diesem Versuch können diese Ergebnisse lediglich als erste Hinweise für eine Induktion von Bregs im Asthmodell der Maus durch TsES1 gesehen werden. Vielleicht sollte auch das gesamte TsES auf die Induktion von Bregs untersucht werden, um damit möglicherweise einen neuen Regulationsweg für *T. suis* zu beschreiben. Vor allem über die Sekretion von IL-10 werden aktivierte Immunzellen wie T-Zellen und Makrophagen supprimiert und produzieren weniger entzündliche Zytokine [Rosser and Mauri, 2015]. Damit sind Bregs durch ihre immunsupprimierende Eigenschaft interessante Zielzellen für eine Therapie gegen Autoimmunerkrankungen und Allergien.

Es wurden verschiedene Hypothesen untersucht, wie die Immunmodulation durch die *T. suis* Chitinase TsES1 im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung erfolgen kann.

Auf Grund der bisher selbst noch nicht vollständig aufgeklärten immunologischen Funktionen der einzelnen CLPs und Chitinasen und den widersprüchlichen Ergebnissen zu ihren Eigenschaften, können Funktionen von TsES1 nur bedingt auf Chitinase/CLP-eigene Mechanismen zurückgeführt werden. Die Induktion kreuzreaktiver Antikörper und lokal auftretender Bregs bilden neue Wege der Immunregulation durch *T. suis*, die weiter verfolgt werden sollten. Vor allem im Hinblick auf die heterogene Ergebnislage der klinischen Studien, ist die genauere Betrachtung kreuzreaktiver/autoreaktiver Antikörper notwendig.

## 5. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von zehn potentiellen Immunregulatoren, die im ES von *T. suis* L1 Larven identifiziert wurden, sechs Proteine mit dem Leishmanien Expressionssystem rekombinant hergestellt. Anschließend wurde in *in vitro* Versuchen bei dendritischen Zellen (DCs) die LPS-induzierte Zytokinsekretion durch die Behandlung mit den rekombinanten Proteinen reduziert, wobei weder die Expression der DC-Oberflächenmarker, noch die antigenabhängige T-Zellproliferation reguliert wurden. Von den sechs rekombinant exprimierten Proteinen wurde eines als eine Chitinase charakterisiert, das *in vivo* über die Reduktion der Eosinophilie in der Lunge, die Abschwächung der Atemwegsresistenz und die Vermehrung interstitieller Relm $\alpha^+$  Lungenmakrophagen die allergische Atemwegserkrankung milderte. Da auch Mäuse Chitinasen und Chitinase-like Proteine (CLPs) produzieren, waren die Beobachtungen der Immunregulation durch die Behandlung mit einer Helminthenchitinase auffallend. Nachfolgende Untersuchungen haben ergeben, dass Relm $\alpha^+$  AAMs, kreuzreaktive Antikörper und regulatorische B-Zellen durch die TsES1 Behandlung induziert wurden und diese möglicherweise die regulatorischen Faktoren darstellen.

Trotz dieser neuen Erkenntnisse bleiben viele Fragen unbeantwortet. Ein wichtiger Punkt hierbei ist die limitierte Anzahl analysierter Proteine, die auf Grund der Selektionskriterien gegeben war. Es sind viele TsES Proteine bisher nicht näher untersucht worden, die ebenfalls potentielle Immunmodulatoren sind. Es wäre von großem Vorteil, wenn wesentlich mehr rekombinante Proteine von *T. suis* vorhanden wären und in standardisierten Assays analysiert werden könnten. Außerdem wurden die rekombinanten TsES Proteine bisher nur in einem ausgewählten Krankheitsmodell getestet, wobei nur ein Protein die im Modell induzierte Th2-Entzündungsreaktion regulierte.

Der Einsatz der rekombinanten Proteine in weiteren klinisch relevanten Krankheitsmodellen wäre interessant, da bereits Kolitis- und MS-Patienten im Rahmen von klinischen Studien mit TSO behandelt wurden. Eine vertiefende Grundlagenforschung auf dem Gebiet einzelner TsES Proteine bietet außerdem mehrere Vorteile. Zum einen können immunregulatorische Mechanismen von Helminthen im Allgemeinen besser und genauer untersucht werden. Zum anderen können Moleküle, die zu einer effektiven Verbesserung im Krankheitsmodell führen, als spätere Medikamente detailliert untersucht werden.

TsES1 induzierte kreuzreaktive Antikörper in einem OVA-induzierten Asthmodell, die möglicherweise für die gemilderte Eosinophilie in der Lunge verantwortlich sind. Durch einen Transfer der Seren bzw. isolierten Antikörper in Mäuse, die dann ebenfalls ein OVA-induziertes

Asthmamodell durchlaufen, kann diese Hypothese überprüft werden. Jedoch können dabei auch anti-OVA-Antikörper die Induktion des Asthmamodells behindern, sodass entweder das Serum von OVA-positiven Tieren als Kontrollen mitgeführt werden muss oder OVA-spezifische Antikörper in dem Serum TsES1-behandelter Tiere depletiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines anderen Asthma-Modells, wie dem HDM-Modell, wodurch die OVA-spezifischen Antikörper vernachlässigt werden können. Dafür muss zuvor geklärt werden, ob TsES1 in dem HDM-Modell ebenfalls die Eosinophilie reduziert und kreuzreaktive Antikörper induziert.

Ebenso wurden erste Hinweise gefunden, dass eine TsES1-Behandlung im Asthmamodell regulatorische B-Zellen induzieren kann. Da für *T. suis* eine Induktion von Bregs bisher nicht bekannt ist, sollte diese Beobachtung mit weiteren *in vitro* und *in vivo* Experimenten verfolgt werden.

Zusammenfassend wurden im ES von *T. suis* L1 mehrere Proteine identifiziert, die als potentielle Immunregulatoren weiter untersucht werden sollten. Obwohl für TsES1 kein eindeutiger Mechanismus der Immunregulation identifiziert werden konnte und der Einsatz dieses Proteins als Medikament anstelle einer TSO-Therapie unwahrscheinlich erscheint, wurden neue und interessante Regulationswege beschrieben, die die Erforschung von weiteren TsES Proteinen und *T. suis* als Therapiewurm rechtfertigen.

# A. Abkürzungsverzeichnis

<b>AAM</b>	<i>alternatively activated macrophages</i> -Alternativ aktivierte Makrophagen
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>A. viteae</b>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
<b>AHR</b>	Airway hyperresponsiveness
<b>AMCase</b>	<i>Acidic mammalian chitinase</i>
<b>AMP</b>	Ampicillin
<b>Aqua dest.</b>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
<b>ad.</b>	auf
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>A. lumbricoides</b>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<b>ASP</b>	<i>Ancylostoma caninum secreted protein/ Activation-associated secreted protein</i>
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BCIP</b>	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>BRP-39</b>	<i>Breast regression protein 39</i>
<b>B. malayi</b>	<i>Brugia malayi</i>
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
<b>CAP</b>	<i>Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5 and pathogenesis-related 1</i>
<b>CBD</b>	Chitin-Binde-Domäne
<b>CD</b>	<i>Cluster determinant</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
<b>Chit</b>	Chitotriosidase
<b>CLP</b>	<i>Chitinase-like-protein</i>
<b>CLR</b>	<i>c-type lectin receptor</i>
<b>DC</b>	<i>dendritic cell</i>
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)

<b>dpi</b>	<i>days post infection</i>
<b>DSS</b>	Dextrannatriumsulfat
<b>dNTP</b>	desoxy-Nukleotriphosphate
<b>EAE</b>	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ES</b>	<i>excretory/secretory</i> (sekretorisch)
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> (und andere)
<b>FACS</b>	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
<b>FBS</b>	<i>fetal bovine serum</i>
<b>Foxp3</b>	<i>Forkhead box P3</i>
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>H. polygyrus</b>	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>
<b>His6-Tag</b>	Hexa-Histidin-Tag
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>ILCs</b>	<i>innate lymphoid cells</i>
<b>IPSE</b>	<i>IL-4-inducing principle of schistosome eggs</i>
<b>kb</b>	kilo Basen
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>L1</b>	Larvenstadium 1
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>L. tarentolae</b>	<i>Leishmania tarentolae</i>
<b>LEXSY</b>	Leishmanien-Expressionssystem
<b>LNFPIII</b>	<i>lacto-N-fucopentaose III</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>M</b>	Molar
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>MWCO</b>	<i>molecular weight cutoff</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

<b>NBT</b>	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
<b>N. brasiliensis</b>	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
<b>N. americanus</b>	<i>Necator americanus</i>
<b>NIF</b>	<i>neutrophil inhibitory factor</i>
<b>NK</b>	<i>natural killer cell</i>
<b>nt</b>	Nukleotide
<b>NTC</b>	Nourseothricin
<b>OD<sub>xxx</sub></b>	optische Dichte bei xxx nm
<b>Oligo(dT)</b>	oligo Desoxythymidine
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>O. volvulus</b>	<i>Onchocerca volvulus</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBMC</b>	<i>periph al blood mononuclear cell</i> (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<b>Pen-Strep</b>	Penicillin-Streptomycin
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
<b>RELM</b>	<i>Resistin-like molecule</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RTase</b>	reverse Transkriptase
<b>S. mansoni</b>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<b>SCF</b>	<i>short chain fatty acid</i>
<b>SCP</b>	<i>sperm-coating glycoprotein</i>
<b>SD</b>	<i>standard deviation</i> -Standardabweichung
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Smapins</b>	<i>small serine protease inhibitors</i>
<b>SP</b>	<i>soluble products</i>
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyethyl)phosphin

<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>Th</b>	<i>helper T cell</i> (T-Helferzelle)
<b>TLR</b>	<i>Toll-like</i> Rezeptor
<b>T. muris</b>	<i>Trichuris muris</i>
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>Tris</b>	Tri-(hydroxylmethyl-) aminomethan
<b>Treg</b>	<i>regulatory T cell</i> (regulatorische T-Zelle)
<b>TSLP</b>	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
<b>T. spiralis</b>	<i>Trichinella spiralis</i>
<b>T. suis, Ts</b>	<i>Trichuris suis</i>
<b>TSO</b>	<i>Trichuris suis ova</i>
<b>T. trichiura</b>	<i>Trichuris trichiura</i>
<b>TWEEN 20</b>	Handelsname für Polysorbat-20
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>w/v</b>	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
<b>v/v</b>	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)



## B. Anhang

### Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Die Signalsequenzen der *T. suis* Proteine wurden unterstrichen und nicht für die Klonierung verwendet. Die Aminosäuresequenz der rekombinant hergestellten TsES Proteine trägt am C-Terminus einen His6-tag mit folgender Sequenz: THHHHHH.

#### TsES1 KFD48490.1 (M513\_10624)

##### Nukleotidsequenz

ATGAAAACTGCTATTCTGATTTTTCTGGCCACCATCCTCACTCTGAAACCAAAGCTAAA 60  
TGCGCAGCTGAAAGCGGAGCACGTTCTGTGTGCAATACAGTGAGGCGGAGGAGCGCTGGA 120  
ATGCTGCGAAAAAGATAGTCAGGATGCGTCGGACGAAAAATATGTACGGGCTGCTATTTTT 180  
ACAAACTGGGCTCAATACAGGCCTGGAAATGGAAAAATATAACCCAGAACATTATCAAGCC 240  
AACCTGTGTGAATACATATTTTATGCTTTTGCCAAACTGAACGACGACTTCACTGTGCGAC 300  
CAATTTGAATGGAATGACATTGACGTTCTTTATCCGGGCGTCATGAAACAAAAGTCTTCC 360  
CAGCCAGACCTCAAGGTGTTGCTCTCTCTTGGCGGATGGAACGCTGGAACCTGCAACCTTC 420  
AAGAAGATGGCAGCCACATATTCCAACAGAGCAAAGTTTATATCCTCACTCGTTAGCTTC 480  
CTTCAGCAGAACAAATTTGACGGTTTCGATTTGGACTGGGAATATCCAGAGAGTTCAGAC 540  
AAGGAAAATTACCTTCTGTTATGTCAGGAAATTTCTTGCCAAGTTTGAAGAGGTAGCCAAA 600  
TGCACAAGTACGTCAAGATTGCTGTTACCGGCCGAGTATCAGCGAACCCATAAACGGTT 660  
GATGCAGGCTATGATGTACCAGCGCTAGCCAAGGTGCTGGATTTTGTTAATCTCATGTGC 720  
TATGATTTTACGGGGCATGGGAAACGCAAACCTGGAATCAATTCGCCCTTGTTATTCTCGA 780  
AAAGAAGATTCAAGCGAATTCAAAATGTGGAACGTCGAACAATCGTCAAAAATACTGGGAGC 840  
GACAAAAGGAATGCCAAAAGAAGCAAATTATAATCGGCTTGCCAACGTATGGGCGCGGTTGG 900  
ACTCTAAGTGATGCCTCTAAAACCGATATTGGTGCACCTGCCAAGGTTTATCCACAGCT 960  
ACAGAATACCTAAGAGAAGCCGGAGTTATTTTCTACTACGAGGTTTGCCAAAAGCTATCT 1020  
AGTGGAGCGAAGAGGGTATGGGATGATGAGAGTAAGACGCCCTACCTCGTGCAAGGAAAT 1080  
CAGTGGTTTAGCTACGATGACGTTGAAAAGCATGAAAAGCAAAGATCAACTGGATTAAACAA 1140  
GAAAATTATGGTGGCGCATTCTGTGGACTCTTGATTACGATGACTTCTGGGAAGCTTT 1200  
TGCACCGAGCACAATGGAAAGAAAATATCCCCTTATCAGCCTGATGCAAGAAAATACTAGGA 1260  
GGCGGCTACGTGCCTCCCTCGACAGAGTCCACAACACTAGTCAAGTGACAACTACGCCATCA 1320  
ACGACTACCTCGACAACAAGCCCTGCTGGTGCCTTTTCAGTGCCTTCCGACGGCTTGTTT 1380  
CCGGATCCAGAGAGCTGCAGCAATTTTTATCAGTGCAGGGAGGCACCGCCTACAAAATG 1440  
AAGTGTCCGACTGGACTAATGTTCAACCCAAAAACATCCACCTGTGACTATCCCAGCAAC 1500  
GTTGATTGCCAAGAGAAAACCATAACG 1527

##### Aminosäuresequenz

MKTAILIFLATILTLKPKAKCAAESGARSVCNTVRRRSAGMLRKDSQDASDEKYVRGCYF 60  
TNWAQYRPGNGKYNPEHYQANLCEYIFYAFKLNDDFTVDQFEWNDIDVLYPGVMKQKSS 120  
QPDLKVLVSLGGWNAGTATFFKMAATYSNRAKFISSLVSFQQNKFDGFDLDWEYPSSD 180  
KENYLLLCQEILAKFEEVAKCTSTSRLLFATAAVSANPKTVDAGYDVPALAKVLDVFNLMC 240  
YDFHGAWETQTGINSPLYSRKEDSSEFKMWNVEQSSKYWSDKGMPKKQIIIGLPTYGRGW 300  
TLSDASKTDIGAPAQGSSTATEYLREAGVISYYEVCQKLSSGAKRVWDDSKTPYLVQGN 360  
QWFSYDDVESMKAKINWIKQENYGGAFVWTLDYDDFLGFSFCTEHNGKKYPLISLMQEILG 420  
GGYVPPSTESTTSQVTTTPTSTTTSTTSPAGAFQCPDGLFPDPESCSNFYQCAGGTAYKM 480  
KCPTGLMFNPKTSTCDYPSNVDCQEKTIIT 509

**TsES4** KFD55729.1 (M513\_03477)

Nukleotidsequenz

ATGCAGACGGTACGCACGCTTCGCCTTGTTTTCTTTGCTTCAGTGTTGCTTACTGCGGA 60  
CGAACGAGGATTCCAACCTGATGAAGAGGTCGAGATGGCTTACACACTTTTGAATAAGGTA 120  
TTTCCGCCCACAAGAGGACCCGTCAAAGTCGTACATCGAATTGACCAAGTTACCTACAGT 180  
GGGGAAGAGGATAAATATACTTTAAAATTTATGGCGGTGGATTTCGACGTGCCAAACTG 240  
TTGGCCGGTATGGACCAAAGGACTGCGCACCAGTGAGTTATCCAATAAGGAAAATTTTC 300  
AAATACTTTCATTGGAAATATTAAGAGACTGGCAGCGGATATGAAGTCTTAGGTGGCAGC 360  
TTCAGGAACCCCGAAGCAGTCGAGTTTCTCGAAGTTGACCGC 402

Aminosäuresequenz

MQTVRTLRLVFLCFVAYCGRTRIPTDEEVEMAYTLLNKVFPPTRGPVKVVHRIDQVTYS 60  
GEEDKYTLKFMVDSTCQTLLAGMDQKDCAPVSYPTKENFKYFIGNIKKTGSGYEVVLGGS 120  
FRNPEAVEFLEVDR 134

**TsES5** KFD54802.1 (M513\_04236)

Nukleotidsequenz

ATGGGATGGTGTCTAGCGCTTCCTTGTTATTCTCAGCTTAGCGCTTTACTGGCGCTCCTCT 60  
CAGGGTCAAAATCTTGAGACGTTTACAGCAACCGAGAGAACGCAAATTGTGTCAAGTCAC 120  
AACAAGTTCAGAGGTATGCTGGAAGGAGGCAATGAGCAATGCATAACAGGTTATGACACC 180  
AGTTTGCAAGCGATAGCAGAGAGCGTTGCCGTAACCTGCAGCATTCAAGACGTGCGGGAT 240  
CGAGTGGATCAATATGGCCTGGCTTTCTATTTCAAGTTGTTACCAGACACGCGACCAACA 300  
ATGGAAGAGTTCGTTGAAGACATATACACTGGCGTAAACTCGTATGACTACACAGCGGCA 360  
AACTGTATTGACGAAATACCGTGCCATTCTTTCTAGCGTTCTCTTGGTTTGAAAACCTCG 420  
CGTGTGCGTTGTGCGTTGGCTACCTGCGCAAGCGTTAAGGCCGCTGAGGATGAGAATAGT 480  
CAACAATACTTTGGCGTCTGCGCCTATAACTATAAGGCTGACCTGACAGCAAGACCGTAC 540  
GTAGCGCCACCGGAATGCCAATTTTGCCCAAGCAACGCAAAGATTTGTACCAATCACTTG 600  
TGCTGTCCGTATGACTTGACTGCAATGACGTGTCCGGAAGGGGCCGGCGCTGGCGTCCCA 660  
GCAAGTCTAAAAGCCTTTATCGCGTTCATCACACCCGTGCGAACACGGTCCCTTACCACG 720  
AACGAAACGGAAGTGGATCAGCTGGTACAAGCGGGCGGCACGTCAGCTGGCATTATTGGG 780  
CGAATAGCTACAGGAAACGATTCCAGCTGTTTCTCAAACCAGTCCATCACATTTAT 840  
AGCCACATTTTAAATCCAATTACTACATGACGGATGATTATTTGTTTAAAGTTTGAATG 900  
AAGGAAGGCTATGAGAACAAGGCATCATAGGATACGCAGTTCAAGGCGTTCATTCATGT 960  
AATGCCACGATAGCAATATACGATTTCTTTAGACCCACGGATGGCATAACACACATTCCA 1020  
AATAGCACAGAAGTGCAGAATTATGAACATAAATCAGGTTACATATAACCACGGTGTC 1080  
AGTTTTCGCACTATGGGCC 1098

Aminosäuresequenz

MGWCQRFLVILSLALYWRSSQGQNLETFTATERTQIVSSHNKFRGMLEGGNEQCITGYDT 60  
SLQAI AESVAVNC SIQDVRDRVDQYGLAFYFKLLPDTRPTMEEFVEDIYTG VNSYDYTAA 120  
NCIDEIPCHSFLAFSWFENSRVGCALATCASVKAEDENSQQYFGVCA YNYKADLTARPY 180  
VAPPECQFCPSNAKICTNHLCCPYDLTAMTCPEGAGAGVPASLKS LSLYRVHHLTRANVLT 240  
NETEVDQLVQAGGTSAGIIGRIATGNDSSCSFLKPVHHIYSPHF KSNYYMTDDYLFKVRM 300  
KEGYENKGIIGYAVQGVHSCNATIAIYDFFRPTDGI THIPNSTEVQNYMNYKSGYIYHGV 360  
SFALWA 366

**TsES6** KFD45500.1 (M513\_13623)

## Nukleotidsequenz

ATGAGAATGCTTTGGCAGCTGTTATTTTCTCAGCTGTTCCCTCATAGCTCCTGTGATGCCT 60  
 TATGGGTTACACTTTGGGTAAATGGCAAACAAGTGACAGATCCTGCACAACTGGAAAAG 120  
 TTTTCCAGCGATATCCGCAATTCAAGCCTCCAAATTTGGGGAGGTAAGTGGGCAATCCGTA 180  
 AAGCCGACTTCCACTGCTAAGCCTGTCACTCCGAAACCACAACAATCTTCTCCGTACCA 240  
 ACAGAGACGAATACAAATGTTAATAATGAAGCAAAAAGAAACACAAACACAGCTGAGCTCA 300  
 ACAGCTCCGGGCGCGATCTCCCTTTTCGGCCAACGTGATAAAAATTTGCCCTTGAAGAACAC 360  
 AACAAATTACCGCAAAAAAGGTTGCCAAAAGGACAAAGTGACCAACATGCCAGCAGCTACCGCG 420  
 ATGAATGAGTTAGCTTGGTCAAATGCAATAGCTGCAAACGCAAGTGCATGGGCTGCTAAA 480  
 TGTTCAATGACCCATACTCCAAGCGGATACTACTGCGGCTTGGAGGGTTATGATAACATT 540  
 GGAGAAAACCTGGCAGCAAGTACTACAAGCTCAAGTGGTCTAAGCAGCGATGAGCAACTG 600  
 AAAAGCGCATTTCAGAGTGCCTTCAAGAGTTGGTTTCGACGAATACAAAAGACTACAACTTT 660  
 AATACTAGAGCATGTTCTAGAGTATGTGGGCATTTTACGCAGATGATAAAGGATTCATCA 720  
 GAAAAGCTCGGTTGTGGAATAGCACTGTGCAAAAATGGAATCAGTGGGTTTCATCCTTGA 780  
 AGACCGAGTTACATAATTTGTCTGCAACTATGGCCCCGGCAATAACTTTTCAAATAAGCCT 840  
 GCATACGAAACTGCAAAAAGGGACAGAGTGCCCAAGTGCGGCCGATACGTAAAGACGAC 900  
 CTTTGCCTGGCAGCGGAAAAAGGGACCAAAAAACTGCGTAGACAATACTAGCTATTGT 960  
 TCCGTCTGAAAAACGAAGGAAAAATGCGAACTGTGCAATAACCCCTACTACAACCTGGATG 1020  
 GCGGGAGAGTGCCCTCGTACTTGTGGAATATGCTCA 1056

## Aminosäuresequenz

MRMLWQLLFSQLFLIAPVMPYGFTLWVNGKQVTDPAQLEKFFQRYPQFKPPNWGGTGQSV 60  
 KPTSTAKPVTPKPQQSSPSPTEETNTNVNNEAKETQTQLSSSTAPGAIISLSANVIKFALEEH 120  
 NNYRKKVAKGQVTNMPAATAMNELAWSNAIAANASAWAAKCSMTHTPSGYYCGLEGYDNI 180  
 GENLAASTTSSSGLSSDEQLKSAFQSAFKSWFDEYKDYFNTRACSRVCGHFTQMIKDSS 240  
 EKLGGIALCKNGISGFIILGRPSYIIVCNYGPGNNFVSNKPAYETAKGTECPQVRP IRKDD 300  
 LCTGSGKRGPKNCVDNTSYCSVWKNKGKCELCNNPYYNWMAGECPRTCIGICS 352

**TsES8** KFD72328.1 (M514\_11481)

## Nukleotidsequenz

ATGAAGATGAATCCATGCATGCTTATTTCCATTCTGGCCCTCCTAGTACTAAGAGCCGCAAGCGAATGTG 70  
 TGACGCATAAAGACTGCCGTTCCGCACAATCACTCTGTTTCGACGGATATTGCTTACTAGCAACTGCAGT 140  
 GCCTGGGAAATGCACCACGTCTGCAGACTGCAGAACGCAACTTTCAGTCATGCAAAACGCCGGAAGAGGG 210  
 TGTAGAAAACAACATATGCTACGAAATTATAACTAACAAGTTGTGTAAGTGGTACGTTGCGGATGACG 280  
 CGCAAGTGTGCATTAGAAACCATTGCGTTCCCTTCAGTTGCCACCTCCGCGAAATGCCATGTCGGGGCACT 350  
 GTGCGCCGCTGGCCAGCGATGTTTGGGCGGAATTTGCTATGAGCCGCTTGAACCTTCGCGGGTATTAGAA 420  
 ACCGACAATTCTCGTTAA 438

## Aminosäuresequenz

MKMNPCMLLISILALLVLRAASECVTHKDCRSAQSLCFDGYCLLATAVPGKCTTSADCRTQLSVMQNAARG 70  
 CRNNICYEIIITNKLCTGHVSCDDAQVCIRNHCVPVSVATSAKCHVGALCAAGQRCLGGICYEPLPSRVLE 140  
 TDNSR 145

**TsES9** KFD53667.1 (M513\_05372)

Nukleotidsequenz

ATGCACACGTTCTTGGCCGTTGCTTTTCTTGCTTTAAGCGAATTATGTGCAGTGCACCCATGGGATGGTT 70  
CACCATATACACTTGAGCAGCTGGCAACTAGGCCAGACCTCGCGTCAGTTTTCCCTGGTTTGTACTGAT 140  
TAAAACACCGAGGAACAAATGTGTTGGAACCATTCTACGAGCAGACGACTCCCACAAGACTCCACTAGTG 210  
TTAGCGCCATCAGAATGCTTGCTAACGGCGGATATCAGTGTTAATGACACGAGTCAGGGACAGAATGAAA 280  
CGCGTCTGGAAATTTCCAGTATGGTGGAAATAGTTGGCAGCAATTTTTTCGTCTGTGGCAAAGAACCTGTA 350  
TTTATCTGTGAAAACCGGCTATCCAGTGGTTTTTTATTAAGTGAAGAACCCTACAGAGGTCCAACCTGTC 420  
TTGGTAGACCGTGCTGTCTACTTCACTGGCAACGTGACGAAGTGCATACTGGTGCCTTCTCTTCTTTCAG 490  
AAACCCAGAAACGGCAACTGCTGAGCAACGATGATTCTCTGTAAAGATTCCGGGAGGAAGAGGAGATTTG 540  
TAGAAACAGTACGGCGAGTGAAACAGGCATACTTGACGGACAAGGCTTGACTTGTAAGGCTGGAGACGGT 630  
CTGTGGACTTTTCTACGGCTTTTTCGGGTGAAGAAGGGTTTGAGAGCATATACGTGCCAGTCCAGCCGCTTA 700  
TCAAACCTGATTACATACGCAGCTAGAGAGATGGAGTTGTACAAAAAGGATGAAGTTCTCAAAGGGCGAAA 770  
AATTTCTTATAAACACTCTTTTCTTTCATGGACAAGAAGTATGGACCGTCCAGAGGGGTCGCCAACGAAA 840  
ATTTATTACAGGGAACCTGTTTTGTAA 867

Aminosäuresequenz

MHTFLAVAFLLALSELCAVHPWDGSPYTLQLATRPRPRVSPFPWFVLIKTPRNKCVGTILRADDSHKTPLV 70  
LAPSECLLTADISVNDTSQGQNETRLEIPSMVEIVGSNFSVAKNLYLSVKTYGYPVVFIKLEEPYRGPTV 140  
LVDRAVYFTGNVTKCILVRFSSSETQKRQLLSNDDSPVRFREEEEICRNSTASETGILDGQGLTCKAGDG 210  
LWTFYGFCEEGFESIYVPVQPLIKLITYAAREMELYKKDEVLKGRKISYKHSFLHGQEVWTVTRGRQTK 280  
IYYREPVL 288

**Tab. B.1.:** Identifizierte *T. suis* L1 ES Proteine

Der konzentrierte Überstand von *in vitro* geschlüpften *T. suis* L1 Larven wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht. Auf Grundlage der NCBI-Datenbank wurden die aufgelisteten Proteine identifiziert und auf Signalpeptide und Transmembranhelices (TM) untersucht. (J-Ja, N-Nein, n\*- Ja, aber vermutlich Signalpeptid), SP-Signalpeptid Schnittstelle

Mitreva et. al		Jex et. al				
Accession Nummer	Protein Name	Accession Nummer	Protein Name	Mascott score	SP	TM
KHJ43321.1	Trypsin	KFD58862.1	hypo. Protein M513_00025	143/ -	18/19	N
-		KFD58453.1	hypo. Protein M513_00679	179/ -	21/22	N
KHJ39810.1	hypo. Protein D918_10164	KFD58102.1	hypo. Protein M513_00865	1407/ 633	N	N
KHJ49092.1	Trypsin	KFD57430.1	hypo. Protein M513_01533	2156/ 712	22/23	N
-		KFD57438.1	hypo. Protein M513_01541	93/ 68	19/20	N
KHJ49103.1	Trypsin	KFD57442.1	hypo. Protein M513_01545	234/ 99	21/22	n*
-		KFD57566.1	hypo. Protein M513_01669	226/ -	N	N
KHJ48050.1	hypo. Protein D918_01317	KFD55729.1	hypo. Protein M513_03477	690/ 378	19/20	N
-		KFD54802.1	hypo. Protein M513_04236	436/118	22/23	N
-		KFD54477.1	hypo. Protein M513_04624	200/ -	21/22	N
-		KFD54358.1	hypo. Protein M513_04701	-/ 148	21/22	N
KHJ48893.1	hypo. Protein D918_01198	KFD53667.1	hypo. Protein M513_05372	542/ -	N	N
KHJ47027.1	hypo. Protein D918_02572	KFD53607.1	hypo. Protein M513_05523	1215/ 451	N	N
KHJ47029.1	Trypsin	KFD53610.1	hypo. Protein M513_05526	1808/ 824	18/19	N
KHJ41357.1	Copper/Zinc-Superoxid Dismutase	KFD53515.1	hypo. Protein M513_05621	222/ -	N	N
KHJ42712.1/	Glucose-6-Phosphat Isomerase/	KFD52717.1	hypo. Protein M513_06373	993/ 584	N	J
KHJ42711.1	Serine Proteinase Inhibitor					
-		KFD52316.1	hypo. Protein M513_06879	73/ -	19/20	N
-		KFD51823.1	hypo. Protein M513_07350	186/ 180	N	N
KHJ40946.1	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	KFD49992.1	hypo. Protein M513_09085	142/ -	20/21	N
KHJ41808.1	Astacin	KFD48975.1	hypo. Protein M513_10127	1421/ 655	20/21	N
-		KFD49000.1	hypo. Protein M513_10152	227/ -	21/22	N

Tab. B.1.: (Fortsetzung)

<b>Mitreva et. al</b>		<b>Jex et. al</b>				
Accession Nummer	Protein Name	Accession Nummer	Protein Name	Mascott score	SP	TM
KHJ46953.1	Chitin binding Peritrophin-A domain Protein	KFD48490.1	hypo. Protein M513_10624	1629/ 493	21/22	N
KHJ49294.1	hypo. Protein D918_00419	KFD47618.1	hypo. Protein M513_11481	172/ -	21/22	N
KHJ45348.1	Chitinase Class I	KFD47603.1	hypo. Protein M513_11522	906/ -	N	N
KHJ46940.1	hypo. Protein D918_02479	KFD45818.1	hypo. Protein M513_13299	295/ -	N	N
-		KFD45500.1	hypo. Protein M513_13623	442/ -	20/21	n*
-		KFD62836.1	hypo. Protein M514_24957	175/ -	N	n*
KHJ45241.1	hypo. Protein D918_04545	-		143/ 72	N	N
KHJ42074.1	Trypsin	-		330/ 162	18/19	N

**Tab. B.2.:** MS Tabelle *T. suis* Stadien

Der konzentrierte Überstand von *in vitro* geschlüpften *T. suis* L1 Larven und verschiedenen Larvenstadien, die aus dem Schwein isoliert wurden, wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht. Auf Grundlage der NCBI Datenbank wurden die aufgelisteten Proteine identifiziert und mit Mascott Score aufgeführt.

<b>Proteinbezeichnung</b>	<b>10dpi (168 hits)</b>	<b>18dpi (124 hits)</b>	<b>28dpi (181 hits)</b>	<b>L1 in vitro (45 hits)</b>
5'-nucleotidase protein		246		
astacin				655
Carboxylesterase	228			
cathepsin propeptide inhibitor	102			
domain protein				
chitin binding Peritrophin-A domain				493
protein				
chitinase class I				906
collagen triple helix repeat protein		65	96	
copper/zinc superoxide dismutase				222
deoxyribonuclease II	314	148	65	
dipeptidyl carboxydipeptidase family	199		76	
protein				
eukaryotic aspartyl protease	158			
glycerol-3-phosphate dehydrogenase	3027	660	398	
[NAD(P) <sup>+</sup> ]				
hypo. prot. D918_00022		107		
hypo. prot. D918_00204, partial	90			
hypo. prot. D918_00205		84	171	
hypo. prot. D918_00794			68	
hypo. prot. D918_01088	111		138	
hypo. prot. D918_01317	130			378
hypo. prot. D918_01432		476	777	
hypo. prot. D918_01462		117		
hypo. prot. D918_01923	194		137	
hypo. prot. D918_02126	69			
hypo. prot. D918_02479				295
hypo. prot. D918_02591		229	106	
hypo. prot. D918_02595	140	160	193	
hypo. prot. D918_02746		316	891	
hypo. prot. D918_02817	184			
hypo. prot. D918_02980	115	160	218	
hypo. prot. D918_03106	220			
hypo. prot. D918_03205		126	208	
hypo. prot. D918_03253	218		178	
hypo. prot. D918_03945			118	
hypo. prot. D918_04345		88		
hypo. prot. D918_04420	67			
hypo. prot. D918_04545	110			72
hypo. prot. D918_04548	145			
hypo. prot. D918_04914			118	
hypo. prot. D918_04921	165			
hypo. prot. D918_04979	88			
hypo. prot. D918_05935			108	
hypo. prot. D918_06254			183	
hypo. prot. D918_06364	112		88	
hypo. prot. D918_06438	74		167	
hypo. prot. D918_06825	444			
hypo. prot. D918_07287		71	251	
hypo. prot. D918_08127	100	65		

<b>Proteinbezeichnung</b>	<b>10dpi (168 hits)</b>	<b>18dpi (124 hits)</b>	<b>28dpi (181 hits)</b>	<b>L1 in vitro (45 hits)</b>
hypo. prot. D918_08193		66	69	
hypo. prot. D918_09267	99			
hypo. prot. D918_09642	425			
hypo. prot. D918_10164				633
hypo. prot. M513_00025	178			143
hypo. prot. M513_00299, partial			143	
hypo. prot. M513_00573		80	964	
hypo. prot. M513_00638	148			
hypo. prot. M513_00679				179
hypo. prot. M513_00705	154			
hypo. prot. M513_00865				633
hypo. prot. M513_01063	1583	174	430	
hypo. prot. M513_01096			118	
hypo. prot. M513_01139	158			
hypo. prot. M513_01155		151	160	
hypo. prot. M513_01156	314			
hypo. prot. M513_01283	305		81	
hypo. prot. M513_01343, partial	121			
hypo. prot. M513_01523	1445			
hypo. prot. M513_01527	90	117	204	
hypo. prot. M513_01529		84	171	
hypo. prot. M513_01531		236	308	
hypo. prot. M513_01533	839			712
hypo. prot. M513_01541	145			68
hypo. prot. M513_01545	202			99
hypo. prot. M513_01548	421			
hypo. prot. M513_01631	176	70	63	
hypo. prot. M513_01669	104			226
hypo. prot. M513_01675		73	73	
hypo. prot. M513_01736			70	
hypo. prot. M513_01916	163	166	103	
hypo. prot. M513_01929		85		
hypo. prot. M513_02266, partial	69			
hypo. prot. M513_02643	609	81	270	
hypo. prot. M513_02830	95			
hypo. prot. M513_02878	82	100	89	
hypo. prot. M513_02956		345	521	
hypo. prot. M513_02959			108	
hypo. prot. M513_02985, partial	3027	660	364	
hypo. prot. M513_03048	151	163	180	
hypo. prot. M513_03282	636	474	971	
hypo. prot. M513_03361		458	1182	
hypo. prot. M513_03423	103			
hypo. prot. M513_03477	130			378
hypo. prot. M513_03550		278	451	
hypo. prot. M513_03628	168			
hypo. prot. M513_03629	168			
hypo. prot. M513_03657		71	251	
hypo. prot. M513_03688	531			
hypo. prot. M513_03825			88	
hypo. prot. M513_03842	145			
hypo. prot. M513_03843	70	148	137	
hypo. prot. M513_04058	111		138	
hypo. prot. M513_04236				118
hypo. prot. M513_04328	61			
hypo. prot. M513_04624				200



<b>Proteinbezeichnung</b>	<b>10dpi (168 hits)</b>	<b>18dpi (124 hits)</b>	<b>28dpi (181 hits)</b>	<b>L1 in vitro (45 hits)</b>
hypo. prot. M513_04629	385			
hypo. prot. M513_04701	695	171	238	148
hypo. prot. M513_04702	548	74	345	
hypo. prot. M513_04750			71	
hypo. prot. M513_04837		88		
hypo. prot. M513_05014	229	480	628	
hypo. prot. M513_05021			80	
hypo. prot. M513_05101			250	
hypo. prot. M513_05264, partial	239	99	126	
hypo. prot. M513_05301	174			
hypo. prot. M513_05339	575	187	237	
hypo. prot. M513_05372	244			542
hypo. prot. M513_05511		62		
hypo. prot. M513_05523, partial				451
hypo. prot. M513_05526	288			824
hypo. prot. M513_05555	140	160	193	
hypo. prot. M513_05621				222
hypo. prot. M513_05720	245			
hypo. prot. M513_05968			157	
hypo. prot. M513_05970			157	
hypo. prot. M513_06011			183	
hypo. prot. M513_06133	533			
hypo. prot. M513_06373	116			584
hypo. prot. M513_06427			95	
hypo. prot. M513_06559	99		383	
hypo. prot. M513_06707		127	203	
hypo. prot. M513_06715		506	221	
hypo. prot. M513_06801		66	69	
hypo. prot. M513_06879	157			73
hypo. prot. M513_06970	88			
hypo. prot. M513_07011	88	204	196	
hypo. prot. M513_07012	148	111		
hypo. prot. M513_07066		658	1601	
hypo. prot. M513_07110, partial		107		
hypo. prot. M513_07111			392	
hypo. prot. M513_07304	119		153	
hypo. prot. M513_07350, partial	150			180
hypo. prot. M513_07352			112	
hypo. prot. M513_07445	199		76	
hypo. prot. M513_07451	102			
hypo. prot. M513_07603	220			
hypo. prot. M513_07662		146	175	
hypo. prot. M513_07694	1155	148	284	
hypo. prot. M513_07983	218		178	
hypo. prot. M513_07989			156	
hypo. prot. M513_08053		65	96	
hypo. prot. M513_08058	127	97	99	
hypo. prot. M513_08123	444			
hypo. prot. M513_08330		173	794	
hypo. prot. M513_08967, partial	321		70	
hypo. prot. M513_08977	112	62	141	
hypo. prot. M513_09085	370	249	404	142
hypo. prot. M513_09161	115	160	218	
hypo. prot. M513_09606			68	
hypo. prot. M513_09650	227			
hypo. prot. M513_09697	67			

<b>Proteinbezeichnung</b>	<b>10dpi (168 hits)</b>	<b>18dpi (124 hits)</b>	<b>28dpi (181 hits)</b>	<b>L1 in vitro (45 hits)</b>
hypo. prot. M513_09708	158			
hypo. prot. M513_09721			126	
hypo. prot. M513_09923	331		141	
hypo. prot. M513_10127				655
hypo. prot. M513_10152	167			227
hypo. prot. M513_10380	329			
hypo. prot. M513_10412		104		
hypo. prot. M513_10502		235	227	
hypo. prot. M513_10504	146		80	
hypo. prot. M513_10507			73	
hypo. prot. M513_10508		102	61	
hypo. prot. M513_10624				493
hypo. prot. M513_10856	100	65		
hypo. prot. M513_10945	425			
hypo. prot. M513_11170			157	
hypo. prot. M513_11174	416	601	1251	
hypo. prot. M513_11177	91			
hypo. prot. M513_11184			130	
hypo. prot. M513_11423		689	1801	
hypo. prot. M513_11481				172
hypo. prot. M513_11522				906
hypo. prot. M513_11596		293	517	
hypo. prot. M513_11839	416	601	1251	
hypo. prot. M513_11843	105		173	
hypo. prot. M513_12087		264		
hypo. prot. M513_12184			454	
hypo. prot. M513_12191			118	
hypo. prot. M513_12222	342	499		
hypo. prot. M513_12223, partial	1312	220	179	
hypo. prot. M513_12276	174		64	
hypo. prot. M513_12471		194	948	
hypo. prot. M513_12827	165	170		
hypo. prot. M513_13062	229			
hypo. prot. M513_13112	172	592	860	
hypo. prot. M513_13254	62		146	
hypo. prot. M513_13257, partial		109	62	
hypo. prot. M513_13284		451	1789	
hypo. prot. M513_13299				295
hypo. prot. M513_13311	209			
hypo. prot. M513_13363		126	208	
hypo. prot. M513_13381	120		80	
hypo. prot. M513_13457			335	
hypo. prot. M513_13496		287	654	
hypo. prot. M513_13529		117	314	
hypo. prot. M513_13623				442
hypo. prot. M513_13670		97	664	
hypo. prot. M513_13694	184			
hypo. prot. M513_13760			69	
hypo. prot. M513_13834	203			
hypo. prot. M513_13969	112		88	
hypo. prot. M513_14229, partial			195	
hypo. prot. M513_14359, partial			417	
hypo. prot. M514_00541			1228	
hypo. prot. M514_00865				633
hypo. prot. M514_01139, partial	158			
hypo. prot. M514_01527	90	117	357	

<b>Proteinbezeichnung</b>	<b>10dpi (168 hits)</b>	<b>18dpi (124 hits)</b>	<b>28dpi (181 hits)</b>	<b>L1 in vitro (45 hits)</b>
hypo. prot. M514_01529		84	171	
hypo. prot. M514_01531		236	308	
hypo. prot. M514_01545	202			99
hypo. prot. M514_01631	176	70	63	
hypo. prot. M514_01669	104			226
hypo. prot. M514_02266, partial	69			
hypo. prot. M514_03048, partial	151	163	180	
hypo. prot. M514_03282	636	474	971	
hypo. prot. M514_03300, partial	430		167	
hypo. prot. M514_03361		458	1182	
hypo. prot. M514_03629, partial	168			
hypo. prot. M514_03657		71	251	
hypo. prot. M514_03842	145			
hypo. prot. M514_04629	385			
hypo. prot. M514_05301	174			
hypo. prot. M514_05551, partial		229	106	
hypo. prot. M514_05621				222
hypo. prot. M514_06012			133	
hypo. prot. M514_06559	99	541	383	
hypo. prot. M514_06801		66	69	
hypo. prot. M514_06970	88			
hypo. prot. M514_07011	88	204	196	
hypo. prot. M514_07066		658	1601	
hypo. prot. M514_07110, partial		107		
hypo. prot. M514_07111			195	
hypo. prot. M514_07445	199		76	
hypo. prot. M514_07603	220			
hypo. prot. M514_07662		146	175	
hypo. prot. M514_07694	1155	148	284	
hypo. prot. M514_08058	127	97	99	
hypo. prot. M514_08330		173	794	
hypo. prot. M514_08977	112	62	141	
hypo. prot. M514_09606			68	
hypo. prot. M514_10152	167	401	790	227
hypo. prot. M514_10412, partial		104		
hypo. prot. M514_10502		235	227	
hypo. prot. M514_10624, partial				493
hypo. prot. M514_10707	1022			
hypo. prot. M514_10945	425			
hypo. prot. M514_11177, partial	91			
hypo. prot. M514_11217			94	
hypo. prot. M514_11481				172
hypo. prot. M514_11522				906
hypo. prot. M514_11842	203			
hypo. prot. M514_11843	105		173	
hypo. prot. M514_12087		264	1298	
hypo. prot. M514_12191			118	
hypo. prot. M514_12219	710	499	1230	
hypo. prot. M514_12276	174		64	
hypo. prot. M514_12825	494	170		
hypo. prot. M514_13112	172	400	304	
hypo. prot. M514_13381	120		80	
hypo. prot. M514_13515	276		71	
hypo. prot. M514_13659			126	
hypo. prot. M514_13670		97	664	
hypo. prot. M514_13694	184			

<b>Proteinbezeichnung</b>	<b>10dpi (168 hits)</b>	<b>18dpi (124 hits)</b>	<b>28dpi (181 hits)</b>	<b>L1 in vitro (45 hits)</b>
hypo. prot. M514_13969	112		88	
hypo. prot. M514_15631	278			
hypo. prot. M514_17021	314			
hypo. prot. M514_17022		151	160	
hypo. prot. M514_17400			157	
hypo. prot. M514_18178		414	451	
hypo. prot. M514_18642	1242	681	776	
hypo. prot. M514_20584		126	509	
hypo. prot. M514_22380	70	148	137	
hypo. prot. M514_23670	416	601	130	
hypo. prot. M514_24178	67			
hypo. prot. M514_24411		264	1281	
hypo. prot. M514_24426, partial			387	
hypo. prot. M514_24957	168			175
hypo. prot. M514_25363	184			
hypo. prot. M514_26563			1198	
hypo. prot. M514_27025			64	
hypo. prot. M514_27457, partial			95	
hypo. prot. M514_27479			69	
hypo. prot. M514_27538			157	
hypo. prot. M514_27543	416	601	1251	
hypo. prot. M514_27845		233	389	
hypo. prot. M514_27849, partial		623	503	
hypo. prot. M514_27940	989		107	
hypo. prot. M514_28048	414	109	62	
hypo. prot. M514_28192			130	
kinase domain protein		474		
Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain protein		190	382	
molybdenum cofactor biosynthesis protein A			69	
nematode cuticle collagen domain protein	69	71	82	
SCP-like protein	331		141	
serine proteinase inhibitor	116			584
trypsin	2086	458	1182	162
trypsin Inhibitor like cysteine rich domain protein	151	163	180	
WAP-type ~four-disulfide core		235	227	
WAP-type 'four-disulfide core	103			

# Abbildungen

1.1. Mechanismen der Immunmodulation durch Parasiten. . . . .	7
1.2. Infektionszyklus von <i>Trichuris suis</i> . . . . .	13
2.1. Induktionsschema des Mausmodells der allergischen Atemwegserkrankung. . .	19
2.2. Schema der Klonierung und Proteinexpression mit dem Leishmanien Expressionsystem . . . . .	32
3.1. Vergleich von ES Proteinen verschiedener <i>T. suis</i> Stadien. . . . .	59
3.2. PCR-Produkte und Expressionskassette von <i>T. suis</i> Proteinen (Exemplarisch für TsES8 und TsES9). . . . .	61
3.3. Fraktionen der Proteinreinigung von TsES9 (exemplarisch). . . . .	62
3.4. Spezifischer Proteinnachweis von TsES8 und TsES9 im Western Blot (exemplarisch). . . . .	62
3.5. Rekombinante und gereinigte TsES L1 Proteine. . . . .	63
3.6. Expression der Oberflächenmarker stimulierter DCs. . . . .	64
3.7. Zytokinlevel stimulierter DCs. . . . .	65
3.8. Antigenunabhängige T-Zellproliferation. . . . .	67
3.9. OVA-spezifische T-Zellproliferation. . . . .	68
3.10. Zytokine nach OVA-spezifischer T-Zellproliferation. . . . .	69
3.11. Präventive Applikation rekombinanter <i>T. suis</i> L1 Proteine im Mausmodell der allergischen Atemwegserkrankung. . . . .	71
3.12. Sequenzanalyse des <i>T. suis</i> L1 Proteins TsES1. . . . .	73
3.13. Detektion von TsES1 im ES von <i>T. suis</i> L1 Larven. . . . .	74
3.14. Chitinaseaktivität von rekombinantem TsES1. . . . .	75
3.15. Temperatur- und pH-Wert-abhängige Chitinaseaktivität von rekombinantem TsES1. . . . .	76
3.16. Protein-Kristallstruktur von TsES1. . . . .	79
3.17. Infiltrierende Immunzellen der gereizten Lunge. . . . .	81
3.18. Durchflusszytometrische Analyse von infiltrierenden Immunzellen der gereizten Lunge. . . . .	82
3.19. IgG1- und IgE-Level im Serum asthmatischer Mäuse. . . . .	83
3.20. Erhöhte Zytokinlevel in der Lunge nach TsES1 Behandlung. . . . .	84
3.21. Lungenphysiologie asthmatischer Mäuse. . . . .	86
3.22. Erhöhte Anzahl interstitieller Relm $\alpha^+$ Makrophagen. . . . .	87
3.23. Expressionsregulation muriner Chitinasen in der Lunge. . . . .	91
3.24. <i>In vitro</i> induzierte Apoptose. . . . .	93
3.25. Interstitielle Relm $\alpha^+$ Makrophagen in der Lunge. . . . .	94
3.26. RT-PCR Analyse zur Differenzierung von AAMs. . . . .	95
3.27. Kreuzreaktive Antikörper im Serum durch TsES1 Behandlung. . . . .	97
3.28. Regulatorische B Zellen in Lungenlymphknoten. . . . .	99
3.29. Übersicht der Ergebnisse dieser Arbeit. . . . .	101



# Tabellen

1.1. Publierte klinische Studien zur TSO-Therapie. . . . .	15
2.1. Gemessene Parameter im Zweikammer-Plethysmographen. . . . .	21
2.2. Protokoll der Messung im Zweikammer-Plethysmographen. . . . .	22
2.3. Zusammensetzung ELISA Coating Puffer. . . . .	24
2.4. Zusammensetzung der Substrat- und Stopplösungen. . . . .	24
2.5. Zusammensetzung FACS-Puffer. . . . .	25
2.6. Zusammensetzung von Zellkulturmedien. . . . .	26
2.7. Zusammensetzung Lyse-Puffer (pH 7,5). . . . .	26
2.8. RT-PCR-Programm. . . . .	31
2.9. <i>Trichuris suis</i> Wurmmedium. . . . .	31
2.10. Reaktionslösungen zur cDNA Herstellung. . . . .	33
2.11. Reaktionslösung der genspezifischen PCR. . . . .	34
2.12. PCR-Programm. . . . .	34
2.13. Genspezifische PCR-Bedingungen. . . . .	34
2.14. Zusammensetzung eines 1%igen TAE Agarosegels. . . . .	35
2.15. Nährmedien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> JM109 und XL-1 Blue. . . . .	35
2.16. Nährmedien zur Kultivierung von <i>Leishmania tarentolae</i> . . . . .	38
2.17. Zusammensetzung TE-Puffer (pH 8). . . . .	40
2.18. Puffer für die Proteinreinigung. . . . .	41
2.19. Zusammensetzung PBS-Puffer (pH 7,4). . . . .	42
2.20. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel. . . . .	43
2.21. Pufferzusammensetzung für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese. . . . .	43
2.22. Zusammensetzung Transfer- und Blockpuffer Western Blot. . . . .	44
2.23. Zusammensetzung AP-Substratlösung. . . . .	44
2.24. Pufferzusammensetzung für den Chitinase-Aktivitätstest. . . . .	46
2.25. HEPES-Laufpuffer. . . . .	47
2.26. Eingesetzte Geräte und Apparaturen. . . . .	48
2.27. Eingesetzte Chemikalien. . . . .	48
2.28. Eingesetzte Verbrauchsmaterialien. . . . .	49
2.29. Medien, Puffer und Additives. . . . .	50
2.30. Eingesetzte Antibiotika. . . . .	50
2.31. Eingesetzte Präparations- und Reaktionskits. . . . .	51
2.32. Eingesetzte Organismen zur Klonierung und Proteinexpression. . . . .	52
2.33. Eingesetzte Primer. . . . .	52
2.34. Eingesetzte Plasmide. . . . .	53
2.35. Eingesetzte Enzyme. . . . .	53
2.36. Eingesetzte Antikörper für die Durchflusszytometrie. . . . .	53
2.37. Eingesetzte Antikörper für ELISA, Western Blot und Histologie. . . . .	54
2.38. Eingesetzte Datenbanken und Software. . . . .	55
3.1. Klonierte und rekombinant exprimierte <i>T. suis</i> L1 ES Proteine. . . . .	60
3.2. Daten der Kristallanalyse. . . . .	77
B.1. Identifizierte <i>T. suis</i> L1 ES Proteine . . . . .	131
B.2. MS Tabelle <i>T. suis</i> Stadien . . . . .	133





# Literaturverzeichnis

- [Abdala Valencia et al., 2016] Abdala Valencia, H., Loffredo, L. F., Misharin, A. V., and Berdnikovs, S. (2016). Phenotypic plasticity and targeting of Siglec-F <sup>high</sup> CD11c <sup>low</sup> eosinophils to the airway in a murine model of asthma. *Allergy*, 71(2):267–271.
- [Abraham et al., 2004] Abraham, D., Leon, O., Schnyder-Candrian, S., Wang, C. C., Galisto, A. M., Kerepesi, L. A., Lee, J. J., and Lustigman, S. (2004). Immunoglobulin E and eosinophil-dependent protective immunity to larval *Onchocerca volvulus* in mice immunized with irradiated larvae. *Infection and immunity*, 72(2):810–817.
- [Adam et al., 1996] Adam, R., Kaltmann, B., Rudin, W., Friedrich, T., Marti, T., and Lucius, R. (1996). Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3):1441–1447.
- [Adrangi and Faramarzi, 2013] Adrangi, S. and Faramarzi, M. A. (2013). From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*, 31(8):1786–1785.
- [Akdis et al., 1998] Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B., and Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *The Journal of clinical investigation*, 102(1):98–106.
- [Akiho et al., 2002] Akiho, H., Blennerhassett, P., Deng, Y., and Collins, S. M. (2002). Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 282(2):G226–32.
- [Aksoy et al., 2005] Aksoy, E., Zouain, C. S., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M., Capron, M., Ryffel, B., and Trottein, F. (2005). Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1):277–283.
- [Allen and MacDonald, 1998] Allen, J. E. and MacDonald, A. S. (1998). Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunology*, 20(5):241–247.
- [Allen and Maizels, 2011] Allen, J. E. and Maizels, R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, 11(6):375–388.
- [Allen and Sutherland, 2014] Allen, J. E. and Sutherland, T. E. (2014). Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Seminars in Immunology*, 26(4):329–340.
- [Amu et al., 2010] Amu, S., Saunders, S. P., Kronenberg, M., Mangan, N. E., Atzberger, A., and Fallon, P. G. (2010). Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(5):1114–1124.e8.
- [Annacker and Powrie, 2002] Annacker, O. and Powrie, F. (2002). Homeostasis of intestinal immune regulation. *Microbes and Infection*, 4(5):567–574.
- [Anthony et al., 2006] Anthony, R. M., Urban, J. F. J., Alem, F., Hamed, H. A., Roza, C. T., Boucher, J.-L., Van Rooijen, N., and Gause, W. C. (2006). Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature medicine*, 12(8):955–960.

- [Arpaia et al., 2013] Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veecken, J., DeRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeiffer, K., Coffey, P. J., and Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480):451–455.
- [Artis et al., 2004] Artis, D., Wang, M. L., Keilbaugh, S. a., He, W., Brenes, M., Swain, G. P., Knight, P. a., Donaldson, D. D., Lazar, M. a., Miller, H. R. P., Schad, G. a., Scott, P., and Wu, G. D. (2004). RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37):13596–600.
- [Atochina et al., 2008] Atochina, O., Da'dara, A. A., Walker, M., and Harn, D. A. (2008). The immunomodulatory glycan LNFPIII initiates alternative activation of murine macrophages in vivo. *Immunology*, 125(1):111–121.
- [Atochina and Harn, 2006] Atochina, O. and Harn, D. (2006). Prevention of psoriasis-like lesions development in fsn/ fsn mice by helminth glycans. *Experimental dermatology*, 15(6):461–468.
- [Bager et al., 2010] Bager, P., Arned, J., Rønberg, S., Wohlfahrt, J., Poulsen, L. K., Westergaard, T., Petersen, H. W., Kristensen, B., Thamsborg, S., Roepstorff, A., Kapel, C., and Melbye, M. (2010). Trichuris suis ova therapy for allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(1):123–30.e1–3.
- [Bager et al., 2011] Bager, P., Kapel, C., Roepstorff, A., Thamsborg, S., Arned, J., Rønberg, S., Kristensen, B., Poulsen, L. K., Wohlfahrt, J., and Melbye, M. (2011). Symptoms after Ingestion of Pig Whipworm Trichuris suis Eggs in a Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Clinical Trial. *{PLoS} One*, 6(8):e22346.
- [Balic et al., 2004] Balic, A., Harcus, Y., Holland, M. J., and Maizels, R. M. (2004). Selective maturation of dendritic cells by Nippostrongylus brasiliensis-secreted proteins drives Th2 immune responses. *European journal of immunology*, 34(11):3047–3059.
- [Barnig et al., 2013] Barnig, C., Reboux, G., Roussel, S., Casset, A., Sohy, C., Dalphin, J.-C., and de Blay, F. (2013). Indoor dust and air concentrations of endotoxin in urban and rural environments. *Letters in applied microbiology*, 56(3):161–167.
- [Bedoret et al., 2009] Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Calvo, F. Q., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., De Leval, L., Van Rooijen, N., Le Moine, A., Vanderplasschen, A., Cataldo, D., Drion, P. V., Moser, M., Lekeux, P., and Bureau, F. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(12):3723–3738.
- [Beer, 1976] Beer, R. J. (1976). The relationship between Trichuris trichiura (Linnaeus 1758) of man and Trichuris suis (Schrank 1788) of the pig. *Research in veterinary science*, 20(1):47–54.
- [Benzel et al., 2012] Benzel, F., Erdur, H., Kohler, S., Frentsch, M., Thiel, A., Harms, L., Wandinger, K.-P., and Rosche, B. (2012). Immune monitoring of Trichuris suis egg therapy in multiple sclerosis patients. *Journal of Helminthology*, 86:339–347.
- [Bernal et al., 2014] Bernal, D., Trelis, M., Montaner, S., Cantalapiedra, F., Galiano, A., Hackenberg, M., and Marcilla, A. (2014). Surface analysis of Dicrocoelium dendriticum. The molecular characterization of exosomes reveals the presence of miRNAs. *Journal of proteomics*, 105:232–241.

- [Bower et al., 2008] Bower, M. A., Constant, S. L., and Mendez, S. (2008). Necator americana: the Na-ASP-2 protein secreted by the infective larvae induces neutrophil recruitment in vivo and in vitro. *Experimental parasitology*, 118(4):569–575.
- [Breitling et al., 2002] Breitling, R., Klingner, S., Callewaert, N., Pietrucha, R., Geyer, A., Ehrlich, G., Hartung, R., Müller, A., Contreras, R., Beverley, S. M., and Alexandrov, K. (2002). Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein expression and purification*, 25(2):209–18.
- [Brydon et al., 1987] Brydon, L. J., Gooday, G. W., Chappell, L. H., and King, T. P. (1987). Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 25(3):267–272.
- [Buck et al., 2014] Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., Harcus, Y., Ceroni, A., Babayan, S. a., Blaxter, M., Ivens, A., and Maizels, R. M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5:5488.
- [Cadman et al., 2014] Cadman, E. T., Thyse, K. A., Bearder, S., Cheung, A. Y. N., Johnston, A. C., Lee, J. J., and Lawrence, R. A. (2014). Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microfilariae. *PLoS pathogens*, 10(3):e1003988.
- [Cantacessi and Gasser, 2012] Cantacessi, C. and Gasser, R. B. (2012). SCP/TAPS proteins in helminths—where to from now? *Molecular and cellular probes*, 26(1):54–9.
- [Cantacessi et al., 2011] Cantacessi, C., Young, N. D., Nejsum, P., Jex, A. R., Campbell, B. E., Hall, R. S., Thamsborg, S. M., Scheerlinck, J.-P., and Gasser, R. B. (2011). The transcriptome of *Trichuris suis*—first molecular insights into a parasite with curative properties for key immune diseases of humans. *PloS one*, 6(8):e23590.
- [Charlier et al., 2014] Charlier, J., Morgan, E. R., Rinaldi, L., van Dijk, J., Demeler, J., Höglund, J., Hertzberg, H., Ranst, B. V., Hendrickx, G., Vercruyssen, J., and Kenyon, F. (2014). Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Veterinary Record*, 175(10):250 LP – 255.
- [Chen et al., 2012] Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Rozo, C., Bowdridge, S., Rooijen, N. V., Jr, J. F. U., Wynn, T. A., and William, C. (2012). An essential role for the Th2-type response in limiting tissue damage during helminth infection. *National Institute of Health*, 18(2):260–266.
- [Chen et al., 2003] Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*, 198(12):1875–1886.
- [Chen and Ten Dijke, 2016] Chen, W. and Ten Dijke, P. (2016). Immunoregulation by members of the TGFbeta superfamily. *Nature reviews. Immunology*, 16(12):723–740.
- [Cliffe et al., 2005] Cliffe, L. J., Humphreys, N. E., Lane, T. E., Potten, C. S., Booth, C., and Grecis, R. K. (2005). Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5727):1463–1465.
- [Coakley et al., 2016] Coakley, G., Buck, A. H., and Maizels, R. M. (2016). Host parasite communications—Messages from helminths for the immune system: Parasite communication and cell-cell interactions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 208(1):33–40.

- [Coakley et al., 2015] Coakley, G., Maizels, R. M., and Buck, A. H. (2015). Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends in Parasitology*, 31(10):477–489.
- [Cohen-Kupiec and Chet, 1998] Cohen-Kupiec, R. and Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(3):270–277.
- [Cooper et al., 2001] Cooper, P. J., Chico, M., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Levine, M. M., Griffin, G. E., and Nutman, T. B. (2001). Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infection and immunity*, 69(3):1574–1580.
- [Corrêa-Oliveira et al., 2016] Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., and Vinolo, M. A. R. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*, 5(4):e73.
- [Corry et al., 1996] Corry, D. B., Folkesson, H. G., Warnock, M. L., Erle, D. J., Matthay, M. A., Wiener-Kronish, J. P., and Locksley, R. M. (1996). Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *The Journal of experimental medicine*, 183(1):109–117.
- [Dainichi et al., 2001] Dainichi, T., Maekawa, Y., Ishii, K., Zhang, T., Nashed, B. F., Sakai, T., Takashima, M., and Himeno, K. (2001). Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infection and immunity*, 69(12):7380–7386.
- [DeLorme and Moss, 2002] DeLorme, M. P. and Moss, O. R. (2002). Pulmonary function assessment by whole-body plethysmography in restrained versus unrestrained mice. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 47(1):1–10.
- [DeSchoolmeester et al., 2009] DeSchoolmeester, M. L., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Else, K. J. (2009). The mannose receptor binds *Trichuris muris* excretory/secretory proteins but is not essential for protective immunity. *Immunology*, 126(2):246–255.
- [Deshmane et al., 2009] Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B. E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(6):313–326.
- [Driss et al., 2016] Driss, V., El Nady, M., Delbeke, M., Rousseaux, C., Dubuquoy, C., Sarazin, A., Gatault, S., Dendooven, A., Riveau, G., Colombel, J. F., Desreumaux, P., Dubuquoy, L., and Capron, M. (2016). The schistosome glutathione S-transferase P28GST, a unique helminth protein, prevents intestinal inflammation in experimental colitis through a Th2-type response with mucosal eosinophils. *Mucosal Immunology*, 9(2):322–335.
- [Dyken and Locksley, 2013] Dyken, S. J. V. and Locksley, R. M. (2013). Interleukin-4- and Interleukin-13-mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease. *Annual Review of Immunology*, pages 317–343.
- [Ebner et al., 2014] Ebner, F., Hepworth, M. R., Rausch, S., Janek, K., Niewianda, A., Kühl, A., Henklein, P., Lucius, R., Hamelmann, E., and Hartmann, S. (2014). Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease. *Allergy*, 69(11):1489–1497.
- [Eichenberger et al., 2018] Eichenberger, R. M., Talukder, M. H., Field, M. A., Wangchuk, P., Giacomini, P., Loukas, A., and Sotillo, J. (2018). Characterization of *Trichuris muris* secreted

- proteins and extracellular vesicles provides new insights into host–parasite communication. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1):1428004.
- [Eijck and Borgsteede, 2005] Eijck, I. and Borgsteede, F. (2005). A Survey of Gastrointestinal Pig Parasites on Free-range, Organic and Conventional Pig Farms in The Netherlands. *Veterinary Research Communications*, 29(5):407–414.
- [Everts et al., 2012] Everts, B., Husaarts, L., Driessen, N. N., Meevissen, M. H., Schramm, G., van der Ham, A. J., van der Hoeven, B., Scholzen, T., Burgdorf, S., Mohrs, M., Pearce, E. J., Hokke, C. H., Haas, H., Smits, H. H., and Yazdanbakhsh, M. (2012). Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(10):1753–1767.
- [Fadel et al., 2016] Fadel, F., Zhao, Y., Cousido-Siah, A., Ruiz, F. X., Mitschler, A., and Podjarny, A. (2016). X-Ray crystal structure of the full length human chitotriosidase (CHIT1) reveals features of its chitin binding domain. *PLoS ONE*, 11(4):1–15.
- [Fallon et al., 2006] Fallon, P. G., Ballantyne, S. J., Mangan, N. E., Barlow, J. L., Dasvarma, A., Hewett, D. R., McIlgorm, A., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. (2006). Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *The Journal of experimental medicine*, 203(4):1105–1116.
- [Ferguson et al., 2015] Ferguson, B. J., Newland, S. A., Gibbs, S. E., Tourlomousis, P., Fernandes dos Santos, P., Patel, M. N., Hall, S. W., Walczak, H., Schramm, G., Haas, H., Dunne, D. W., Cooke, A., and Zaccane, P. (2015). The *Schistosoma mansoni* T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1beta secretion in macrophages. *International journal for parasitology*, 45(13):809–813.
- [Fleming et al., 2017] Fleming, J., Hernandez, G., Hartmann, L., Maksimovic, J., Nace, S., Lawler, B., Risa, T., Cook, T., Agni, R., Reichelderfer, M., Luzzio, C., Rolak, L., Field, A., and Fabry, Z. (2017). Safety and efficacy of helminth treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of the HINT 2 clinical trial. *Multiple Sclerosis Journal*, 23(2s):153–156.
- [Fleming et al., 2011] Fleming, J. O., Isaak, a., Lee, J. E., Luzzio, C. C., Carrithers, M. D., Cook, T. D., Field, a. S., Boland, J., and Fabry, Z. (2011). Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 17(6):743–754.
- [Fuhrman and Piessens, 1985] Fuhrman, J. A. and Piessens, W. F. (1985). Chitin synthesis and sheath morphogenesis in *Brugia malayi* microfilariae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 17(1):93–104.
- [Gerrard et al., 1976] Gerrard, J. W., Geddes, C. A., Reggin, P. L., Gerrard, C. D., and Horne, S. (1976). Serum IgE levels in white and metis communities in Saskatchewan. *Annals of allergy*, 37(2):91–100.
- [Gibbs et al., 2008] Gibbs, G. M., Roelants, K., and O’Bryan, M. K. (2008). The CAP superfamily: Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins - Roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocrine Reviews*, 29(7):865–897.
- [Gooyit et al., 2014] Gooyit, M., Tricoche, N., Lustigman, S., and Janda, K. D. (2014). Dual protonophore-chitinase inhibitors dramatically affect *O. Volvulus* molting. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(13):5792–5799.

- [Gordon and Martinez, 2010] Gordon, S. and Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*, 32(5):593–604.
- [Grainger et al., 2010] Grainger, J. R., Smith, K. a., Hewitson, J. P., McSorley, H. J., Harcus, Y., Filbey, K. J., Finney, C. a. M., Greenwood, E. J. D., Knox, D. P., Wilson, M. S., Belkaid, Y., Rudensky, A. Y., and Maizels, R. M. (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- $\beta$  pathway. *The Journal of experimental medicine*, 207(11):2331–41.
- [Gregory and Maizels, 2008] Gregory, W. F. and Maizels, R. M. (2008). Cystatins from filarial parasites: evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(6-7):1389–1398.
- [Grencis et al., 2014] Grecnis, R. K., Humphreys, N. E., and Bancroft, A. J. (2014). Immunity to gastrointestinal nematodes: Mechanisms and myths. *Immunological Reviews*, 260(1):183–205.
- [Gupta et al., 2004] Gupta, R., Jung, S., and Brunak, E. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.
- [Haeberlein et al., 2017] Haeberlein, S., Obieglo, K., Ozir-Fazalalikhan, A., Chayé, M. A., Veninga, H., van der Vlugt, L. E., Voskamp, A., Boon, L., den Haan, J. M., Westerhof, L. B., Wilbers, R. H., Schots, A., Schramm, G., Hokke, C. H., and Smits, H. H. (2017). Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/ $\alpha$ -1, trigger the development of regulatory B cells. *PLoS Pathogens*, 13(7):1–28.
- [Hall et al., 2008] Hall, A., Hewitt, G., Tuffrey, V., and De Silva, N. (2008). A review and meta-analysis of the impact of intestinal worms on child growth and nutrition. *Maternal and Child Nutrition*, 4(SUPPL.1):118–236.
- [Hansen et al., 2017] Hansen, C. S., Henrik, H., Hyldgaard, B. I., Milan, T. S., Fryd, J. F., and Helene, K. (2017). *Trichuris suis* secrete products that reduce disease severity in a multiple sclerosis model.
- [Hansen et al., 2015] Hansen, E. P., Kringel, H., Williams, A. R., and Nejsum, P. (2015). Secretion of RNA-Containing Extracellular Vesicles by the Porcine Whipworm, *Trichuris suis*. *Journal of Parasitology*, 101(3):336–340.
- [Harnett et al., 2004] Harnett, W., McInnes, I. B., and Harnett, M. M. (2004). ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. *Immunology letters*, 94(1-2):27–33.
- [Harris and Gause, 2011] Harris, N. and Gause, W. C. (2011). To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends in immunology*, 32(2):80–88.
- [Hartl et al., 2009] Hartl, D., He, C. H., Koller, B., Silva, C. A. D., Kobayashi, Y., Lee, C. G., Flavell, R. A., Elias, J. A., Da, C. A., Kobayashi, Y., Lee, C. G., Richard, A., Elias, J. A., Hartl, D., He, C. H., Koller, B., Silva, C. A. D., Kobayashi, Y., Lee, C. G., Flavell, R. A., and Elias, J. A. (2009). Acidic Mammalian Chitinase Regulates Epithelial Cell Apoptosis via a Chitinolytic-Independent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 182(8):5098–5106.
- [Hartmann et al., 1997] Hartmann, S., Kyewski, B., Sonnenburg, B., and Lucius, R. (1997). A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *European Journal of Immunology*, 27(9):2253–2260.

- [Hartmann and Lucius, 2003] Hartmann, S. and Lucius, R. (2003). Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *International Journal for Parasitology*, 33(11):1291–1302.
- [Hasnain et al., 2011] Hasnain, S. Z., Evans, C. M., Roy, M., Gallagher, A. L., Kindrachuk, K. N., Barron, L., Dickey, B. F., Wilson, M. S., Wynn, T. A., Grecis, R. K., and Thornton, D. J. (2011). Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *The Journal of experimental medicine*, 208(5):893–900.
- [Hawdon et al., 1996] Hawdon, J. M., Jones, B. F., Hoffman, D. R., and Hotez, P. J. (1996). Cloning and characterization of Ancylostoma-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae. *The Journal of biological chemistry*, 271(12):6672–6678.
- [He et al., 2013] He, C., Lee, C. G., Dela Cruz, C. S., Lee, C.-M., Zhou, Y., Ahangari, F., Ma, B., Herzog, E., Rosenberg, S. A., Li, Y., Nour, A. M., Parikh, C. R., Schmidt, I., Modis, Y., Cantley, L., and Elias, J. A. (2013). Chitinase 3-like 1 Regulates Cellular and Tissue Responses via IL-13 Receptor  $\alpha 2$ . *Cell Reports*, 4(4):830–841.
- [He et al., 2009] He, Y., Barker, S. J., MacDonald, A. J., Yu, Y., Cao, L., Li, J., Parhar, R., Heck, S., Hartmann, S., Golenbock, D. T., Jiang, S., Libri, N. A., Semper, A. E., Rosenberg, W. M., and Lustigman, S. (2009). Recombinant Ov-ASP-1, a Th1-Biased Protein Adjuvant Derived from the Helminth *Onchocerca volvulus*, Can Directly Bind and Activate Antigen-Presenting Cells. *The Journal of Immunology*, 182(7):4005–4016.
- [Henrissat and Davies, 1997] Henrissat, B. and Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases.
- [Henrissat et al., 1991] Henrissat, B., Vegetales, M., and Grenoble, F. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. *Biochemical Journal*, 280((Pt 2)):309–316.
- [Hepworth, 2012] Hepworth, M. (2012). Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. *Proceedings of the . . .*
- [Hepworth et al., 2012] Hepworth, M. R., Maurer, M., and Hartmann, S. (2012). Regulation of type 2 immunity to helminths by mast cells. *Gut microbes*, 3(5):476–81.
- [Herbert et al., 2009] Herbert, D. R., Yang, J.-Q., Hogan, S. P., Groschwitz, K., Khodoun, M., Munitz, A., Orekov, T., Perkins, C., Wang, Q., Brombacher, F., Urban, J. F. J., Rothenberg, M. E., and Finkelman, F. D. (2009). Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection. *The Journal of experimental medicine*, 206(13):2947–2957.
- [Hewitson et al., 2009] Hewitson, J. P., Grainger, J. R., and Maizels, R. M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology*, 167(1):1–11.
- [Hewitson et al., 2011a] Hewitson, J. P., Harcus, Y., Murray, J., van Agtmaal, M., Filbey, K. J., Grainger, J. R., Bridgett, S., Blaxter, M. L., Ashton, P. D., Ashford, D. a., Curwen, R. S., Wilson, R. A., Dowle, A. a., and Maizels, R. M. (2011a). Proteomic analysis of secretory products from the model gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* reveals dominance of venom allergen-like (VAL) proteins. *Journal of proteomics*, 74(9):1573–94.
- [Hewitson et al., 2011b] Hewitson, J. P., Harcus, Y., Murray, J., van Agtmaal, M., Filbey, K. J., Grainger, J. R., Bridgett, S., Blaxter, M. L., Ashton, P. D., Ashford, D. A., Curwen,

- R. S., Wilson, R. A., Dowle, A. A., and Maizels, R. M. (2011b). Proteomic analysis of secretory products from the model gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* reveals dominance of venom allergen-like (VAL) proteins. *Journal of proteomics*, 74(9):1573–1594.
- [Hiemstra et al., 2014] Hiemstra, I. H., Klaver, E. J., Vrijland, K., Kringel, H., Andreasen, A., Bouma, G., Kraal, G., van Die, I., and den Haan, J. M. M. (2014). Excreted/secreted *Trichuris suis* products reduce barrier function and suppress inflammatory cytokine production of intestinal epithelial cells. *Molecular immunology*, 60(1):1–7.
- [Hoeksema et al., 2016] Hoeksema, M. A., Laan, L. C., Postma, J. J., Cummings, R. D., De Winther, M. P. J., Dijkstra, C. D., Van Die, I., and Kooij, G. (2016). Treatment with *Trichuris suis* soluble products during monocyte-to-macrophage differentiation reduces inflammatory responses through epigenetic remodeling. *FASEB Journal*, 30(8):2826–2836.
- [Huang and Paul, 2016] Huang, Y. and Paul, W. E. (2016). Inflammatory group 2 innate lymphoid cells. *International Immunology*, 28(1):23–28.
- [Humphreys and Xu, 2008] Humphreys, N. and Xu, D. (2008). IL-33, a Potent Inducer of Adaptive Immunity to Intestinal Nematodes. *The Journal of Immunology*, 180.
- [Hung et al., 2013] Hung, L.-Y., Lewkowich, I. P., Dawson, L. A., Downey, J., Yang, Y., Smith, D. E., and Herbert, D. R. (2013). IL-33 drives biphasic IL-13 production for non-canonical Type 2 immunity against hookworms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1):282–287.
- [Iwasaki and Medzhitov, 2015] Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16:343.
- [Janicova et al., 2016] Janicova, L., Rzepecka, J., Rodgers, D. T., Doonan, J., Bell, K. S., Lumb, F. E., Suckling, C. J., Harnett, M. M., and Harnett, W. (2016). Testing small molecule analogues of the *Acanthocheilonema viteae* immunomodulator ES-62 against clinically relevant allergens. *Parasite immunology*, 38(6):340–351.
- [Jenkins et al., 2005] Jenkins, S. J., Hewitson, J. P., Ferret-Bernard, S., and Mountford, A. P. (2005). Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and -independent pathways. *International immunology*, 17(11):1409–1418.
- [Jenkins et al., 2007] Jenkins, S. J., Perona-Wright, G., Worsley, a. G. F., Ishii, N., and MacDonald, a. S. (2007). Dendritic Cell Expression of OX40 Ligand Acts as a Costimulatory, Not Polarizing, Signal for Optimal Th2 Priming and Memory Induction In Vivo. *The Journal of Immunology*, 179(6):3515–3523.
- [Jex et al., 2014] Jex, A. R., Nejsum, P., Schwarz, E. M., Hu, L., Young, N. D., Hall, R. S., Korhonen, P. K., Liao, S., Thamsborg, S., Xia, J., Xu, P., Wang, S., Scheerlinck, J.-P. Y., Hofmann, A., Sternberg, P. W., Wang, J., and Gasser, R. B. (2014). Genome and transcriptome of the porcine whipworm *Trichuris suis*. *Nature genetics*.
- [Jia et al., 2012] Jia, T.-W., Melville, S., Utzinger, J., King, C. H., and Zhou, X.-N. (2012). Soil-Transmitted Helminth Reinfection after Drug Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5):e1621.
- [Johnson et al., 2003] Johnson, K. A., Angelucci, F., Bellelli, A., Hervé, M., Fontaine, J., Tsernoglou, D., Capron, A., Trottein, F., and Brunori, M. (2003). Crystal structure of the 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. *Biochemistry*, 42(34):10084–10094.



- [Johnston et al., 2017] Johnston, C. J., Smyth, D. J., Kodali, R. B., White, M. P., Harcus, Y., Filbey, K. J., Hewitson, J. P., Hinck, C. S., Ivens, A., Kemter, A. M., Kildemoes, A. O., Le Bihan, T., Soares, D. C., Anderton, S. M., Brenn, T., Wigmore, S. J., Woodcock, H. V., Chambers, R. C., Hinck, A. P., McSorley, H. J., and Maizels, R. M. (2017). A structurally distinct TGF- $\beta$  mimic from an intestinal helminth parasite potently induces regulatory T cells. *Nature Communications*, 8(1).
- [Jourdan et al., 2017] Jourdan, P. M., Lamberton, P. H., Fenwick, A., and Addiss, D. G. (2017). Soil-transmitted helminth infections. *The Lancet*, 6736(17):1–14.
- [Jouvin and Kinet, 2012] Jouvin, M.-H. and Kinet, J.-P. (2012). Trichuris suis ova: testing a helminth-based therapy as an extension of the hygiene hypothesis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 130(1):3–10; quiz 11–2.
- [Kaiko et al., 2008] Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W., and Hansbro, P. M. (2008). Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*, 123(3):326–338.
- [Katakura et al., 2004] Katakura, T., Miyazaki, M., Kobayashi, M., Herndon, D. N., and Suzuki, F. (2004). CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(3):1407–1413.
- [Kawano et al., 2016] Kawano, H., Kayama, H., Nakama, T., Hashimoto, T., Umemoto, E., and Takeda, K. (2016). IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *International Immunology*, 28(10):489–501.
- [Kazura and Grove, 1978] Kazura, J. W. and Grove, D. I. (1978). Stage-specific antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of *Trichinella spiralis*. *Nature*, 274(5671):588–589.
- [Kim et al., 2017] Kim, A., Boronina, T. N., Cole, R. N., Darrah, E., and Sadegh-Nasseri, S. (2017). Distorted Immunodominance by Linker Sequences or other Epitopes from a Second Protein Antigen During Antigen-Processing. *Scientific Reports*, 7(April):46418.
- [Klatt et al., 2013] Klatt, S., Rohe, M., Alagesan, K., Kolarich, D., Konthur, Z., and Hartl, D. (2013). Production of glycosylated soluble amyloid precursor protein alpha (sAPPalpha) in leishmania tarentolae. *Journal of Proteome Research*, 12(1):396–403.
- [Klaver et al., 2013] Klaver, E. J., Kuijk, L. M., Laan, L. C., Kringel, H., van Vliet, S. J., Bouma, G., Cummings, R. D., Kraal, G., and van Die, I. (2013). Trichuris suis-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated. *International journal for parasitology*, 43(3-4):191–200.
- [Knott et al., 2007] Knott, M. L., Matthaei, K. I., Giacomini, P. R., Wang, H., Foster, P. S., and Dent, L. A. (2007). Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis. *International journal for parasitology*, 37(12):1367–1378.
- [Konkel and Chen, 2011] Konkel, J. E. and Chen, W. (2011). Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal immune system. *Trends in molecular medicine*, 17(11):668–676.
- [Kooij et al., 2015] Kooij, G., Braster, R., Koning, J. J., Laan, L. C., van Vliet, S. J., Los, T., Eveleens, A. M., van der Pol, S. M. A., Förster-Waldl, E., Boztug, K., Belot, A., Szilagyi, K., van den Berg, T. K., van Buul, J. D., van Egmond, M., de Vries, H. E., Cummings, R. D., Dijkstra, C. D., and van Die, I. (2015). Trichuris suis induces human non-classical

- patrolling monocytes via the mannose receptor and PKC: implications for multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, 3(1):45.
- [Kringel et al., 2006] Kringel, H., Iburg, T., Dawson, H., Aasted, B., and Roepstorff, A. (2006). A time course study of immunological responses in *Trichuris suis* infected pigs demonstrates induction of a local type 2 response associated with worm burden. *International Journal for Parasitology*, 36(8):915–924.
- [Kringel and Roepstorff, 2006] Kringel, H. and Roepstorff, A. (2006). *Trichuris suis* population dynamics following a primary experimental infection. *Veterinary parasitology*, 139(1-3):132–9.
- [Kuijk et al., 2012] Kuijk, L. M., Klaver, E. J., Kooij, G., van der Pol, S. M. a., Heijnen, P., Bruijns, S. C. M., Kringel, H., Pinelli, E., Kraal, G., de Vries, H. E., Dijkstra, C. D., Bouma, G., and van Die, I. (2012). Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular immunology*, 51(2):210–8.
- [Lambrecht and Hammad, 2014] Lambrecht, B. N. and Hammad, H. (2014). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, 16(1):45–56.
- [Latz et al., 2013] Latz, E., Xiao, T. S., and Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13:397.
- [Lee et al., 2011] Lee, C., Silva, C. D., Dela Cruz, C. S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M. J., He, C., and Takyar, S. (2011). Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual review of . . .*, 73:1–28.
- [Lee et al., 2009] Lee, C. G., Hartl, D., Lee, G. R., Koller, B., Matsuura, H., Da Silva, C. a., Sohn, M. H., Cohn, L., Homer, R. J., Kozhich, A. A., Humbles, A., Kearley, J., Coyle, A., Chupp, G., Reed, J., Flavell, R. A., and Elias, J. A. (2009). Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 206(5):1149–1166.
- [Lee et al., 2014] Lee, I.-A., Low, D., Kamba, A., Llado, V., and Mizoguchi, E. (2014). Oral caffeine administration ameliorates acute colitis by suppressing chitinase 3-like 1 expression in intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol.*, 49(8):1206–1216.
- [Leonardi et al., 2017] Leonardi, I., Gerstgrasser, A., Schmidt, T. S. B., Nicholls, F., Tewes, B., Greinwald, R., von Mering, C., Rogler, G., and Frey-Wagner, I. (2017). Preventive *Trichuris suis* ova (TSO) treatment protects immunocompetent rabbits from DSS colitis but may be detrimental under conditions of immunosuppression. *Scientific Reports*, 7(1):16500.
- [Levecke et al., 2014] Levecke, B., Montresor, A., Albonico, M., Ame, S. M., Behnke, J. M., Bethony, J. M., Noumedem, C. D., Engels, D., Guillard, B., Kotze, A. C., Krolewiecki, A. J., McCarthy, J. S., Mekonnen, Z., Periago, M. V., Sopheak, H., Tchuem-Tchuente, L.-A., Duong, T. T., Huong, N. T., Zeynudin, A., and Vercruyssen, J. (2014). Assessment of Anthelmintic Efficacy of Mebendazole in School Children in Six Countries Where Soil-Transmitted Helminths Are Endemic. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(10):e3204.
- [Leverly et al., 1992] Leverly, S. B., Weiss, J. B., Salyan, M. E., Roberts, C. E., Hakomori, S., Magnani, J. L., and Strand, M. (1992). Characterization of a series of novel fucose-containing glycosphingolipid immunogens from eggs of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of biological chemistry*, 267(8):5542–5551.

- [Low et al., 2015] Low, D., Subramaniam, R., Lin, L., Aomatsu, T., Mizoguchi, A., Ng, A., DeGruttola, A. K., Lee, C. G., Elias, J. A., Andoh, A., Mino-Kenudson, M., and Mizoguchi, E. (2015). Chitinase 3-like 1 induces survival and proliferation of intestinal epithelial cells during chronic inflammation and colitis-associated cancer by regulating S100A9. *Oncotarget*, 6(34):36535–36550.
- [Lucius and Loos-Frank, 2007] Lucius, R. and Loos-Frank, B. (2007). *Biologie von Parasiten*. Springer, 2 edition.
- [Lyko, 2017] Lyko, F. (2017). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19:81.
- [Lynch et al., 1993] Lynch, N. R., Hagel, I., Perez, M., Di Prisco, M. C., Lopez, R., and Alvarez, N. (1993). Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 92(3):404–411.
- [Madala et al., 2012] Madala, S. K., Edukulla, R., Davis, K. R., Schmidt, S., Davidson, C., Kitzmiller, J. A., Hardie, W. D., and Korfhagen, T. R. (2012). Resistin-like molecule alpha1 (Fizz1) recruits lung dendritic cells without causing pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 13(1):51.
- [Maizels and McSorley, 2016] Maizels, R. M. and McSorley, H. J. (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(3):666–675.
- [Maloy and Powrie, 2001] Maloy, K. J. and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature immunology*, 2(9):816–822.
- [Mangiola et al., 2013] Mangiola, S., Young, N. D., Korhonen, P., Mondal, A., Scheerlinck, J.-P., Sternberg, P. W., Cantacessi, C., Hall, R. S., Jex, A. R., and Gasser, R. B. (2013). Getting the most out of parasitic helminth transcriptomes using HelmDB: Implications for biology and biotechnology. *Biotechnology advances*, 31(8):1109–19.
- [Manoury et al., 2001] Manoury, B., Gregory, W. F., Maizels, R. M., and Watts, C. (2001). Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Current biology : CB*, 11(6):447–451.
- [Marcilla et al., 2014] Marcilla, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., de Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., Fernandez-Becerra, C., Almeida, I. C., and del Portillo, H. A. (2014). Extracellular vesicles in parasitic diseases. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1):25040.
- [Marques et al., 2016] Marques, R. E., Marques, P. E., Guabiraba, R., and Teixeira, M. M. (2016). Exploring the Homeostatic and Sensory Roles of the Immune System .
- [McCoy et al., 2008] McCoy, K. D., Stoel, M., Stettler, R., Merky, P., Fink, K., Senn, B. M., Schaer, C., Massacand, J., Odermatt, B., Oettgen, H. C., Zinkernagel, R. M., Bos, N. A., Hengartner, H., Macpherson, A. J., and Harris, N. L. (2008). Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. *Cell host & microbe*, 4(4):362–373.
- [McDermott et al., 2003] McDermott, J. R., Bartram, R. E., Knight, P. A., Miller, H. R. P., Garrod, D. R., and Grencis, R. K. (2003). Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13):7761–7766.

- [McInnes et al., 2003] McInnes, I. B., Leung, B. P., Harnett, M., Gracie, J. A., Liew, F. Y., and Harnett, W. (2003). A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(4):2127–2133.
- [McSorley et al., 2014] McSorley, H. J., Blair, N. F., Smith, K. a., McKenzie, a. N., and Maizels, R. M. (2014). Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. *Mucosal immunology*, 7(5):1–11.
- [Mehlhorn, 2012] Mehlhorn, H. (2012). *Die Parasiten der Tiere. Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen*. Spektrum Akademischer Verlag, 7 edition.
- [Melendez et al., 2007] Melendez, A. J., Harnett, M. M., Pushparaj, P. N., Wong, W. S. F., Tay, H. K., McSharry, C. P., and Harnett, W. (2007). Inhibition of Fc epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes. *Nature medicine*, 13(11):1375–1381.
- [Meyer et al., 2015] Meyer, N. H., Mayerhofer, H., Tripsianes, K., Blindow, S., Barths, D., Mewes, A., Weimar, T., Köhli, T., Bade, S., Madl, T., Frey, A., Haas, H., Mueller-Dieckmann, J., Sattler, M., and Schramm, G. (2015). A crystallin fold in the interleukin-4-inducing principle of schistosoma mansoni eggs (IPSE/ $\alpha$ -1) mediates IgE binding for antigen-independent basophil activation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(36):22111–22126.
- [Min et al., 2004] Min, B., Prout, M., Hu-Li, J., Zhu, J., Jankovic, D., Morgan, E. S., Urban, J. F. J., Dvorak, A. M., Finkelman, F. D., LeGros, G., and Paul, W. E. (2004). Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *The Journal of experimental medicine*, 200(4):507–517.
- [Mitreva et al., 2014] Mitreva, M., Pepin, K. H., Abubucker, S., Martin, J., Minx, P., Warren, C., Palsikar, V. B., Zhang, X., Rosa, B. A., and K, W. R. (2014). Draft genome.
- [Mohrs et al., 2001] Mohrs, M., Shinkai, K., Mohrs, K., and Locksley, R. M. (2001). Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter. *Immunity*, 15(2):303–311.
- [Molehin et al., 2012] Molehin, A. J., Gobert, G. N., and McManus, D. P. (2012). Serine protease inhibitors of parasitic helminths. *Parasitology*, 139(6):681–695.
- [Morgan and van Dijk, 2012] Morgan, E. R. and van Dijk, J. (2012). Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Veterinary Parasitology*, 189(1):8–14.
- [Moyle et al., 1994] Moyle, M., Foster, D. L., McGrath, D. E., Brown, S. M., Laroche, Y., De Meutter, J., Stanssens, P., Bogowitz, C. A., Fried, V. A., and Ely, J. A. (1994). A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18. *The Journal of biological chemistry*, 269(13):10008–10015.
- [Murphy et al., 2009] Murphy, K. M., Travers, P., and Walpor, M. (2009). *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum, 7 edition.
- [Murray et al., 2001] Murray, J., Gregory, W. F., Gomez-Escobar, N., Atmadja, A. K., and Maizels, R. M. (2001). Expression and immune recognition of *Brugia malayi* VAL-1, a homologue of vespid venom allergens and *Ancylostoma* secreted proteins. *Molecular and biochemical parasitology*, 118(1):89–96.

- [Nair et al., 2009] Nair, M. G., Du, Y., Perrigoue, J. G., Zaph, C., Taylor, J. J., Goldschmidt, M., Swain, G. P., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A., Karow, M., Stevens, S., Pearce, E. J., and Artis, D. (2009). Alternatively activated macrophage-derived RELM- $\alpha$  is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. *The Journal of experimental medicine*, 206(4):937–952.
- [Natarajan et al., 2012] Natarajan, P., Singh, A., McNamara, J. T., Secor, E. R. J., Guernsey, L. A., Thrall, R. S., and Schramm, C. M. (2012). Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5+, express TGF- $\beta$ , and co-localize with CD4+Foxp3+ T cells. *Mucosal immunology*, 5(6):691–701.
- [Neill et al., 2010] Neill, D. R., Wong, S. H., Bellosi, A., Flynn, R. J., Daly, M., Langford, T. K. A., Bucks, C., Kane, C. M., Fallon, P. G., Pannell, R., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464(7293):1367–1370.
- [Nejsum et al., 2009] Nejsum, P., Thamsborg, S. M., Petersen, H. H., Kringel, H., Fredholm, M., and Roepstorff, A. (2009). Population dynamics of *Trichuris suis* in trickle-infected pigs. *Parasitology*, 136(6):691–697.
- [Nowacki et al., 2015] Nowacki, F. C., Swain, M. T., Klychnikov, O. I., Niazi, U., Ivens, A., Quintana, J. F., Hensbergen, P. J., Hokke, C. H., Buck, A. H., and Hoffmann, K. F. (2015). Protein and small non-coding RNA-enriched extracellular vesicles are released by the pathogenic blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1):28665.
- [Ohno et al., 2012] Ohno, M., Tsuda, K., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., and Oyama, F. (2012). Chitinase mRNA Levels by Quantitative PCR Using the Single Standard DNA: Acidic Mammalian Chitinase Is a Major Transcript in the Mouse Stomach. *PLoS ONE*, 7(11).
- [Ooi et al., 1993] Ooi, H. K., Tenora, F., Itoh, K., and Kamiya, M. (1993). Comparative study of *Trichuris trichiura* from non-human primates and from man, and their difference with *T. suis*. *The Journal of veterinary medical science*, 55(3):363–366.
- [Oppenheim and Yang, 2005] Oppenheim, J. J. and Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 17(4):359–365.
- [Patel et al., 2004] Patel, S. D., Rajala, M. W., Rossetti, L., Scherer, P. E., and Shapiro, L. (2004). Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674):1154–1158.
- [Paveley et al., 2011] Paveley, R. A., Aynsley, S. A., Turner, J. D., Bourke, C. D., Jenkins, S. J., Cook, P. C., Martinez-Pomares, L., and Mountford, A. P. (2011). The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN $\gamma$  production. *International journal for parasitology*, 41(13-14):1335–1345.
- [Petersen et al., 2011] Petersen, T., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*.
- [Pfaffl, 2001] Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):45e–45.
- [Pröbstel et al., 2015] Pröbstel, A. K., Sanderson, N. S., and Derfuss, T. (2015). B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7):16576–16592.

- [Qureshi et al., 2011] Qureshi, A. M., Hannigan, A., Campbell, D., Nixon, C., and Wilson, J. B. (2011). Chitinase-like proteins are autoantigens in a model of inflammation-promoted incipient neoplasia. *Genes Cancer*, 2(1):74–87.
- [Raes et al., 2002] Raes, G., De Baetselier, P., Noël, W., Beschin, A., Brombacher, F., and Hassanzadeh Gh, G. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 71(4):597–602.
- [Raposo and Stoorvogel, 2013] Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4):373 LP – 383.
- [Rausch et al., 2008] Rausch, S., Huehn, J., Kirchhoff, D., Rzepecka, J., Schnoeller, C., Pillai, S., Loddenkemper, C., Scheffold, A., Hamann, A., Lucius, R., and Hartmann, S. (2008). Functional Analysis of Effector and Regulatory T Cells in a Parasitic Nematode Infection. *Infect Immun*, 76(5):1908–1919.
- [Reese et al., 2007] Reese, T. A., Liang, H.-E., Tager, A. M., Luster, A. D., Van Rooijen, N., Voehringer, D., and Locksley, R. M. (2007). Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*, 447(7140):92–96.
- [Reinhard et al., 2013] Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., and Weiss, M. S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(2):209–214.
- [Rhoads et al., 2000] Rhoads, M. L., Fetterer, R. H., Hill, D. E., and Urban Jr., J. F. (2000). *Trichuris suis*: A Secretory Chymotrypsin/Elastase Inhibitor with Potential as an Immunomodulator. *Experimental Parasitology*, 95(1):36–44.
- [Rodgers et al., 2015] Rodgers, D. T., Pineda, M. A., Suckling, C. J., Harnett, W., and Harnett, M. M. (2015). Drug-like analogues of the parasitic worm-derived immunomodulator ES-62 are therapeutic in the MRL/Lpr model of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 24(13):1437–1442.
- [Rodrigues et al., 2015] Rodrigues, J. A., Acosta-Serrano, A., Aebi, M., Ferguson, M. A., Rou-tier, F. H., Schiller, I., Soares, S., Spencer, D., Titz, A., Wilson, I. B., and Izquierdo, L. (2015). Parasite Glycobiology: A Bittersweet Symphony. *PLoS Pathogens*, 11(11):1–7.
- [Roepstorff et al., 2011] Roepstorff, A., Mejer, H., Nejsun, P., and Thamsborg, S. M. (2011). Helminth parasites in pigs: New challenges in pig production and current research highlights. *Veterinary Parasitology*, 180(1-2):72–81.
- [Roggenbuck et al., 2016] Roggenbuck, D., Reinhold, D., Baumgart, D. C., Schierack, P., Conrad, K., and Laass, M. W. (2016). Autoimmunity in Crohn’s Disease-A Putative Stratification Factor of the Clinical Phenotype. *Advances in clinical chemistry*, 77:77–101.
- [Rosser and Mauri, 2015] Rosser, E. C. and Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*, 42(4):607–612.
- [Rothenberg and Hogan, 2006] Rothenberg, M. E. and Hogan, S. P. (2006). the Eosinophil. *Annual Review of Immunology*, 24(1):147–174.
- [Rzepecka et al., 2006] Rzepecka, J., Lucius, R., Doligalska, M., Beck, S., Rausch, S., and Hartmann, S. (2006). Screening for immunomodulatory proteins of the intestinal parasitic nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite immunology*, 28(9):463–472.

- [Rzepecka et al., 2013] Rzepecka, J., Siebeke, I., Coltherd, J. C., Kean, D. E., Steiger, C. N., Al-Riyami, L., McSharry, C., Harnett, M. M., and Harnett, W. (2013). The helminth product, ES-62, protects against airway inflammation by resetting the Th cell phenotype. *International Journal for Parasitology*, 43(3-4):211–223.
- [Sakaguchi et al., 2008] Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, 133(5):775–787.
- [Sandborn et al., 2013] Sandborn, W. J., Elliott, D. E., Weinstock, J., Summers, R. W., Landry-Wheeler, A., Silver, N., Harnett, M. D., and Hanauer, S. B. (2013). Randomised clinical trial: the safety and tolerability of *Trichuris suis* ova in patients with Crohn’s disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 38:255–63.
- [Satoguina et al., 2005] Satoguina, J. S., Weyand, E., Larbi, J., and Hoerauf, A. (2005). T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(8):4718–4726.
- [Satoh et al., 2010] Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T., Matsushita, K., Okazaki, T., Saitoh, T., Honma, K., Matsuyama, T., Yui, K., Tsujimura, T., Standley, D. M., Nakanishi, K., Nakai, K., and Akira, S. (2010). The *Jmjd3-Irf4* axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nature immunology*, 11(10):936–944.
- [Schnoeller et al., 2008] Schnoeller, C., Rausch, S., Pillai, S., Avagyan, A., Wittig, B. M., Loddenkemper, C., Hamann, A., Hamelmann, E., Lucius, R., and Hartmann, S. (2008). A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(6):4265–72.
- [Schölmerich et al., 2016] Schölmerich, J., Fellermann, K., Seibold, F. W., Rogler, G., Langhorst, J., Howaldt, S., Novacek, G., Petersen, A. M., Bachmann, O., Matthes, H., Hesselbarth, N., Teich, N., Wehkamp, J., Klaus, J., Ott, C., Dilger, K., Greinwald, R., Mueller, R., and International TRUST-2 Study Group (2016). A Randomised, Double-blind, Placebo-controlled Trial of *Trichuris suis* ova in Active Crohn’s disease. *Journal of Crohn’s & colitis*, pages 1–10.
- [Schonemeyer et al., 2001] Schonemeyer, A., Lucius, R., Sonnenburg, B., Brattig, N., Sabat, R., Schilling, K., Bradley, J., and Hartmann, S. (2001). Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(6):3207–3215.
- [Schramm et al., 2003] Schramm, G., Falcone, F. H., Gronow, A., Haisch, K., Mamat, U., Doenhoff, M. J., Oliveira, G., Galle, J. J., Dahinden, C. A., and Haas, H. (2003). Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20):18384–18392.
- [Schramm et al., 2007] Schramm, G., Mohrs, K., Wodrich, M., Doenhoff, M. J., Pearce, E. J., Haas, H., and Mohrs, M. (2007). Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(10):6023–6027.
- [Segura et al., 2007] Segura, M., Su, Z., Piccirillo, C., and Stevenson, M. M. (2007). Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *European journal of immunology*, 37(7):1887–1904.

- [Shin et al., 2001] Shin, E. H., Osada, Y., Sagara, H., Takatsu, K., and Kojima, S. (2001). Involvement of complement and fibronectin in eosinophil-mediated damage to *Nippostrongylus brasiliensis* larvae. *Parasite immunology*, 23(1):27–37.
- [Shoresh and Harman, 2010] Shoresh, M. and Harman, G. E. (2010). Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC plant biology*, 10:136.
- [Shuhui et al., 2009] Shuhui, L., Mok, Y. K., and Wong, W. S. F. (2009). Role of mammalian chitinases in asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 149(4):369–377.
- [Sievers et al., 2011] Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1):539.
- [Smallwood et al., 2017] Smallwood, T. B., Giacomini, P. R., Loukas, A., Mulvenna, J. P., Clark, R. J., and Miles, J. J. (2017). Helminth immunomodulation in autoimmune disease. *Frontiers in Immunology*, 8(APR).
- [Sonnhammer et al., 1998] Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., and Krogh, a. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6:175–182.
- [Spencer and Weller, 2010] Spencer, L. A. and Weller, P. F. (2010). Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunology and cell biology*, 88(3):250–256.
- [Stanley and Stein, 2003] Stanley, P. and Stein, P. E. (2003). BmSPN2, a serpin secreted by the filarial nematode *Brugia malayi*, does not inhibit human neutrophil proteinases but plays a noninhibitory role. *Biochemistry*, 42(20):6241–6248.
- [Stear et al., 2007] Stear, M. J., Doligalska, M., and Donskow-Schmelter, K. (2007). Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology*, 134(2):139–151.
- [Steentoft et al., 2013] Steentoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T.-B. G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N. B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Bennett, E. P., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H. H., Levery, S. B., and Clausen, H. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO journal*, 32(10):1478–1488.
- [Steinfeldt et al., 2009] Steinfeldt, S., Andersen, J. F., Cannons, J. L., Feng, C. G., Joshi, M., Dwyer, D., Caspar, P., Schwartzberg, P. L., Sher, A., and Jankovic, D. (2009). The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *The Journal of Experimental Medicine*, 206(8):1681 LP – 1690.
- [Strachan, 1989] Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene and household size. *BMJ : British Medical Journal*, 299(November):1259–1260.
- [Strandmark et al., 2016] Strandmark, J., Steinfeldt, S., Berek, C., Köhl, A. A., Rausch, S., and Hartmann, S. (2016). Eosinophils are required to suppress Th2 responses in Peyer’s patches during intestinal infection by nematodes. *Mucosal Immunology*, 10:661.
- [Summers, 2003] Summers, R. (2003). *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 98(9):2034–2041.



- [Summers et al., 2005a] Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Thompson, R., and Weinstock, J. V. (2005a). Trichuris suis therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54(1):87–90.
- [Summers et al., 2005b] Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban Jr, J. F., Thompson, R. A., and Weinstock, J. V. (2005b). Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 128(4):825–832.
- [Sutherland, 2018] Sutherland, T. E. (2018). Chitinase-like proteins as regulators of innate immunity and tissue repair : helpful lessons for asthma ? *Biochemical Society Transactions*, 46(1).
- [Sutherland et al., 2011] Sutherland, T. E., Andersen, O. A., Betou, M., Eggleston, I. M., Maizels, R. M., Van Aalten, D., and Allen, J. E. (2011). Analyzing airway inflammation with chemical biology: Dissection of acidic mammalian chitinase function with a selective drug-like inhibitor. *Chemistry and Biology*, 18(5):569–579.
- [Sutherland et al., 2014] Sutherland, T. E., Logan, N., Ruckerl, D., Humbles, A. a., Allan, S. M., Papayannopoulos, V., Stockinger, B., Maizels, R. M., and Allen, J. E. (2014). Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage. *Nature immunology*, 15(12):1116–1125.
- [Sutherland et al., 2009] Sutherland, T. E., Maizels, R. M., and Allen, J. E. (2009). Chitinases and chitinase-like proteins: Potential therapeutic targets for the treatment of T-helper type 2 allergies. *Clinical and Experimental Allergy*, 39:943–955.
- [Tachu et al., 2008] Tachu, B., Pillai, S., Lucius, R., and Pogonka, T. (2008). Essential role of chitinase in the development of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *Infection and Immunity*, 76(1):221–228.
- [Taube et al., 2004] Taube, C., Dakhama, A., and Gelfand, E. W. (2004). Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *International Archives of Allergy and Immunology*, 135(2):173–186.
- [Thomas et al., 2003] Thomas, P. G., Carter, M. R., Atochina, O., Da'Dara, A. A., Piskorska, D., McGuire, E., and Harn, D. A. (2003). Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(11):5837–5841.
- [Tielens et al., 2010] Tielens, A. G. M., van Grinsven, K. W. A., Henze, K., van Hellemond, J. J., and Martin, W. (2010). Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists. *International journal for parasitology*, 40(4):387–397.
- [Topping, 1996] Topping, D. L. (1996). Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 5(1):15–19.
- [Tundup et al., 2012] Tundup, S., Srivastava, L., and Harn, D. a. (2012). Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253:E1–E13.
- [Uchikawa et al., 2000] Uchikawa, R., Matsuda, S., and Arizono, N. (2000). Suppression of gamma interferon transcription and production by nematode excretory-secretory antigen during polyclonal stimulation of rat lymph node T cells. *Infection and immunity*, 68(11):6233–6239.
- [van der Kleij et al., 2002] van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J. F. H. M., Kruize, Y. C. M., Schmitz, M., Kurt-Jones, E. A., Espevik, T., de Jong, E. C., Kapsenberg, M. L., Golenbock,

- D. T., Tielens, A. G. M., and Yazdanbakhsh, M. (2002). A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *The Journal of biological chemistry*, 277(50):48122–48129.
- [van Die and Cummings, 2017] van Die, I. and Cummings, R. D. (2017). The mannose receptor in regulation of helminth-mediated host immunity. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV):1–9.
- [van Die et al., 2003] van Die, I., van Vliet, S. J., Nyame, A. K., Cummings, R. D., Bank, C. M. C., Appelmelk, B., Geijtenbeek, T. B. H., and van Kooyk, Y. (2003). The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology*, 13(6):471–478.
- [van Kooyk, 2008] van Kooyk, Y. (2008). C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 6):1478–1481.
- [Vannella et al., 2016] Vannella, K. M., Ramalingam, T. R., Hart, K. M., de Queiroz Prado, R., Scieurba, J., Barron, L., Borthwick, L. A., Smith, A. D., Mentink-Kane, M., White, S., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Bock, K., Moore, I., Fitz, L. J., Urban, J. F., and Wynn, T. A. (2016). Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes. *Nature Immunology*, 17:1–9.
- [Varyani et al., 2017] Varyani, F., Fleming, J. O., and Maizels, R. M. (2017). Helminths in the gastrointestinal tract as modulators of immunity and pathology. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(6):G537–G549.
- [Vetter, 2015] Vetter, A. (2015). *Eukaryotische Expression und Aufreinigung von Nematoden-Proteinen im Leishmanien- Expressionssystem (LEXSY)*. PhD thesis, Freie Universität Berlin.
- [Vignali et al., 1989] Vignali, D. A., Crocker, P., Bickle, Q. D., Cobbold, S., Waldmann, H., and Taylor, M. G. (1989). A role for CD4+ but not CD8+ T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections. *Immunology*, 67(4):466–472.
- [Vincze et al., 2003] Vincze, T., Posfai, J., and Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic acids research*, 31:3688–3691.
- [Voldsgaard et al., 2015] Voldsgaard, A., Bager, P., Garde, E., Akeson, P., Leffers, A., Madsen, C., Kapel, C., Roepstorff, A., Thamsborg, S., Melbye, M., Siebner, H., Sondergaard, H., Sellebjerg, F., and Sorensen, P. S. (2015). *Trichuris suis* ova therapy in relapsing multiple sclerosis is safe but without signals of beneficial effect. *Multiple Sclerosis Journal*, pages 1–7.
- [Wammes et al., 2014] Wammes, L. J., Mpairwe, H., Elliott, A. M., and Yazdanbakhsh, M. (2014). Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(11):1150–1162.
- [Webb et al., 2001] Webb, D. C., McKenzie, A. N. J., and Foster, P. S. (2001). Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: Identification of a novel allergy-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45):41969–41976.
- [Whelan et al., 2000] Whelan, M., Harnett, M. M., Houston, K. M., Patel, V., Harnett, W., and Rigley, K. P. (2000). A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(12):6453–6460.

- [Whelan et al., 2014] Whelan, R. A., Rausch, S., Ebner, F., Günzel, D., Richter, J. F., Hering, N. A., Schulzke, J.-D., Köhl, A. A., Keles, A., Janczyk, P., Nöckler, K., Wieler, L. H., and Hartmann, S. (2014). A Transgenic Probiotic Secreting a Parasite Immunomodulator for Site-Directed Treatment of Gut Inflammation. *Molecular Therapy*.
- [Williams et al., 2017] Williams, A. R., Dige, A., Rasmussen, T. K., Hvas, C. L., Dahlerup, J. F., Iversen, L., Stensvold, C. R., Agnholt, J., and Nejsum, P. (2017). Immune responses and parasitological observations induced during probiotic treatment with medicinal *Trichuris suis* ova in a healthy volunteer. *Immunology Letters*, 188(May):32–37.
- [Wills-Karp, 1999] Wills-Karp, M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual review of immunology*, 17:255–281.
- [Wilson et al., 2003a] Wilson, E. H., Deehan, M. R., Katz, E., Brown, K. S., Houston, K. M., O’Grady, J., Harnett, M. M., and Harnett, W. (2003a). Hyporesponsiveness of murine B lymphocytes exposed to the filarial nematode secreted product ES-62 in vivo. *Immunology*, 109(2):238–245.
- [Wilson et al., 2003b] Wilson, E. H., Katz, E., Goodridge, H. S., Harnett, M. M., and Harnett, W. (2003b). In vivo activation of murine peritoneal B1 cells by the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *Parasite immunology*, 25(8-9):463–466.
- [Xu et al., 2017] Xu, N., Liu, X., Tang, B., Wang, L., Shi, H. N., Boireau, P., Liu, M., and Bai, X. (2017). Recombinant *Trichinella pseudospiralis* serine protease inhibitors alter macrophage polarization in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP):1–11.
- [Xu et al., 2012] Xu, Q., Chai, S. J., Qian, Y. Y., Zhang, M., and Wang, K. (2012). Breast regression protein-39 (BRP-39) promotes dendritic cell maturation in vitro and enhances Th2 inflammation in murine model of asthma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(12):1525–1532.
- [Yanaba et al., 2008] Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M., and Tedder, T. F. (2008). A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity*, 28(5):639–650.
- [Yang et al., 2015] Yang, Y., Wen, Y. J., Cai, Y. N., Vallée, I., Boireau, P., Liu, M. Y., and Cheng, S. P. (2015). Serine Proteases of Parasitic Helminths. *Korean J Parasitol*, 53531(11):1–11.
- [Yanisch-Perron et al., 1985] Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33:103–19.
- [Yatsuda et al., 2002] Yatsuda, A. P., Eysker, M., Vieira-Bressan, M. C. R., and De Vries, E. (2002). A family of activation associated secreted protein (ASP) homologues of *Cooperia punctata*. *Research in Veterinary Science*, 73(3):297–306.
- [Yazdanbakhsh et al., 2002] Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., and Van Ree, R. (2002). Allergy, Parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 296(April):490–494.
- [Zaiss et al., 2015] Zaiss, M. M., Rapin, A., Lebon, L., Dubey, L. K., Mosconi, I., Sarter, K., Piersigilli, A., Menin, L., Walker, A. W., Rougemont, J., Paerewijck, O., Geldhof, P., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., Croese, J., Giacomini, P. R., Loukas, A., Junt, T., Marsland, B. J., and Harris, N. L. (2015). The Intestinal Microbiota Contributes to the Ability of Helminths to Modulate Allergic Inflammation. *Immunity*, 43(5):998–1010.

- [Zamanian et al., 2015] Zamanian, M., Fraser, L. M., Agbedanu, P. N., Harischandra, H., Moorhead, A. R., Day, T. A., Bartholomay, L. C., and Kimber, M. J. (2015). Release of Small RNA-containing Exosome-like Vesicles from the Human Filarial Parasite *Brugia malayi*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(9):e0004069.
- [Zang et al., 2000] Zang, X., Atmadja, A. K., Gray, P., Allen, J. E., Gray, C. A., Lawrence, R. A., Yazdanbakhsh, M., and Maizels, R. M. (2000). The serpin secreted by *Brugia malayi* microfilariae, Bm-SPN-2, elicits strong, but short-lived, immune responses in mice and humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(9):5161–5169.
- [Zang et al., 1999] Zang, X., Yazdanbakhsh, M., Jiang, H., Kanost, M. R., and Maizels, R. M. (1999). A novel serpin expressed by blood-borne microfilariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases. *Blood*, 94(4):1418–28.
- [Zhou et al., 2015] Zhou, Y., He, C. H., Herzog, E. L., Peng, X., Lee, C.-M., Nguyen, T. H., Gulati, M., Gochuico, B. R., Gahl, W. A., Slade, M. L., Lee, C. G., and Elias, J. A. (2015). Chitinase 3-like-1 and its receptors in Hermansky-Pudlak syndrome-associated lung disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(8):3178–3192.
- [Zhu et al., 2012] Zhu, B., Trikudanathan, S., Zozulya, A. L., Sandoval-Garcia, C., Kennedy, J. K., Atochina, O., Norberg, T., Castagner, B., Seeberger, P., Fabry, Z., Harn, D., Khoury, S. J., and Guleria, I. (2012). Immune modulation by Lacto-N-fucopentaose III in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 142(3):351–361.
- [Zhu, 2004] Zhu, Z. (2004). Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. *Science*, 304(5677):1678–1682.

---

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Berlin,

Katja Balster