

**Funktionelle Charakterisierung
von Th2/1-Hybridzellen
im murinen Infektionsmodell
*Heligmosomoides polygyrus***

**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

Nicole Affinass

aus Berlin

2019

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2015 bis März 2019
unter der Leitung
von Prof. Dr. Susanne Hartmann und Dr. Sebastian Rausch
am Institut für Immunologie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Susanne Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Florian Heyd

Disputation am 18.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
1 Einleitung	1
1.1 Parasiten	1
1.1.1 Ektoparasiten.....	1
1.1.2 Endoparasiten.....	1
1.2 <i>Heligmosomoides polygyrus</i> als Modellorganismus für gastrointestinale Wurminfektionen.....	2
1.3 Immunantwort in Nematodeninfektionen	4
1.3.1 Angeborene und erworbene Immunantwort während einer Nematodeninfektion.....	4
1.4 T-Helferzellsubsets	8
1.4.1 Instruktion von Th1- und Th2-Zellen.....	9
1.4.2 Plastizität von Th1- und Th2-Zellen.....	10
1.5 Ziele der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Geräte.....	13
2.1.2 Antibiotika	13
2.1.3 Enzyme, Chemikalien und rekombinante Zytokine.....	13
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	14
2.1.5 Medien.....	15
2.1.6 Antikörper für Durchflusszytometrie/FACS	16
2.1.7 Antikörper für ELISA	17
2.1.8 Reaktionskits	17
2.1.9 Primer	17
2.1.10 Software	17
2.2 Tiermodelle	18
2.2.1 Mausstämme	18

2.2.2	Infektion mit <i>H. polygyrus</i>	18
2.2.3	Applikation von rekombinanten IFN- γ	18
2.2.4	Immunisierung mit <i>H. polygyrus</i> Antigen	19
2.2.5	Adoptiver Transfer	19
2.2.6	Infestation durch <i>I. ricinus</i>	19
2.2.7	Bestimmung des Wurmbefalls und der Fekundität von <i>H. polygyrus</i>	19
2.2.8	Isolation von <i>H. polygyrus</i> L4	19
2.2.9	Histologische Untersuchung von Darmgewebe	20
2.3	Zellkultur	20
2.3.1	Isolation von Zellen aus Lymphknoten und Milz	20
2.3.2	Isolation von Zellen aus dem Dünndarm (siLP).....	20
2.3.3	Isolation von Zellen aus der Haut.....	21
2.3.4	Isolation von Zellen aus dem Peritoneum	22
2.3.5	Isolation von Zellen aus dem Knochenmark.....	22
2.3.6	Generierung von dendritischen Zellen.....	22
2.3.7	Detektion von <i>H. polygyrus</i> spezifischen CD4 ⁺ T-Effektorzellen via CD40-L- Expression	22
2.3.8	Stimulation von mLN- und Milzzellen	23
2.3.9	Stimulation von peritonealen Zellen mit LPS für NO-Messung	23
2.4	Immunologische Methoden	23
2.4.1	Durchflusszytometrie	23
2.4.2	Isolation von naiven T-Helferzellen für adoptiven Transfer MACS/FACS	24
2.4.3	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	24
2.5	Molekularbiologische und biochemische Methoden	24
2.5.1	Herstellen von <i>H. polygyrus</i> Antigenen (L3, L4, Adult HpAg und HES)	24
2.5.2	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	25
2.6	Statistische Analyse.....	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Expansion und Lokalisation von Th2/1-Hybridzellen in Th2-assoziierten Parasitosen.....	27

3.1.1	Infektion mit <i>H. polygyrus</i>	27
3.1.2	Infestation durch <i>Ixodes ricinus</i>	30
3.2	Funktion, Herkunft und Mikrobiota-Unabhängigkeit von Th2/1-Hybridzellen in <i>H. polygyrus</i> Infektionen.....	31
3.2.1	Th2/1-Hybridzellen sind die dominante parasiten-spezifische IFN- γ -Quelle in <i>H. polygyrus</i> Infektionen.....	31
3.2.2	Th2/1-Hybridzellen entwickeln sich aus naiven T-Helferzellen	35
3.2.3	Die Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen ist unabhängig von der Mikrobiota	37
3.3	Einfluss des Wirtgenotyps auf den Verlauf der <i>H. polygyrus</i> Infektion und der Th2/1-Zelldifferenzierung	38
3.3.1	Unterschiedliche Empfänglichkeit von C57BL/6 und BALB/c Mäusen für <i>H. polygyrus</i> Infektionen	38
3.3.2	Th2/1-Zelldifferenzierung unterscheidet sich in Mäusen mit unterschiedlichem Genotyp.....	40
3.3.3	C57BL/6 und BALB/c Mausstämme bilden unterschiedlich starke parasiten-spezifische T-Helferzellantworten aus.....	42
3.4	Konsequenzen der experimentellen Unterstützung von Th2/1-Hybridzellantworten	43
3.4.1	IFN- γ ist wichtig für die Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen und unterstützt die Parasitenfitness in der akuten Infektionsphase	43
3.4.2	Die Unterstützung der Th2/1-Hybridzellantwort erhöht die Empfänglichkeit in der chronischen Infektionsphase.....	47
3.5	Starke Th2/1-Hybridzellantworten limitieren die Polarisierung von alternativ aktivierten Makrophagen (AAM).....	48
3.6	Applikation von Nematodenantigenen in die Haut führt zur Differenzierung von Th2- und Th2/1-Zellen	50
4	Diskussion	52
4.1	Induktion von Th2/1-Hybridzellen in Th2-assoziierten Parasitosen	52
4.2	IFN- γ ist wichtig für die Induktion von Th2/1-Hybridzellen und deren Einfluss auf die Empfänglichkeit zu <i>H. polygyrus</i>	56

4.3	Mögliche Beeinträchtigung der Vakzinierungseffizienz durch Th2/1-Hybridzellinduktion.....	63
	Eidesstattliche Erklärung	III
	Danksagungen	IV
	Abkürzungsverzeichnis.....	V
	Abbildungsverzeichnis.....	VII
	Publikationen und Konferenzen	VIII
1.1	Publikationen	VIII
1.2	Konferenzen	VIII
	Literaturverzeichnis.....	IX

Zusammenfassung

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge sind zurzeit etwa 1,5 Milliarden Menschen weltweit mit Helminthen infiziert, wobei die Prävalenz vor allem in tropischen und subtropischen Regionen hoch ist. Helminthen sind in der Lage die Immunantwort des Wirts zu modulieren und damit die Wirksamkeit von Impfstoffen zu beeinträchtigen. In dieser Arbeit wurde die Differenzierung und Funktion von Th2/1-Hybridzellen im murinen gastrointestinalen Infektionsmodell *Heligmosomoides polygyrus* untersucht. *H. polygyrus* wird unter anderem als Modellorganismus für die humanpathogenen Hakenwürmern *Necator americanus* sowie *Ancylostoma duodenale* zur Erforschung der Immunantwort und der Entwicklung von Vakzinen gegen diese Wurmart genutzt. In Helmintheninfektionen nachgewiesene Th2/1-Hybridzellen sind durch die Koexpression der Schlüsseltankriptionsfaktoren und Zytokine von Th2- (GATA-3, IL-4, IL-5, IL-13) und Th1-Zellen (T-bet, IFN- γ) gekennzeichnet. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob die Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen ein regulatives Element der protektiven Th2-Immunantwort gegen Helminthen darstellt. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der Rolle von Th2/1-Hybridzellen als IFN- γ -Produzenten, da bereits früher in verschiedenen Infektionsmodellen mit Helminthen gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte IFN- γ Expression mit einer verminderten Kontrolle von Wurminfektionen einhergehen. In dieser Arbeit konnten folgende Charakteristika der Th2/1-Hybridzellantwort in Parasiteninfektionen gezeigt werden: Th2/1-Hybridzellen werden verstärkt in der Milz vorgefunden und stellen die dominante parasiten-spezifische IFN- γ Quelle in einer *H. polygyrus* Infektion dar. Es konnte gezeigt werden, dass Th2/1-Hybridzellen *in vivo* aus naiven CD4⁺ T-Zellen differenzieren können und die Differenzierung unabhängig von der Mikrobiota ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IFN- γ wichtig für die Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen ist. Die Applikation von IFN- γ früh während der Infektion führt zu einer verstärkten Th2/1-Hybridzellantwort sowie Parasitenfitness. Zudem werden Th2/1-Hybridzellen verstärkt in dem hochempfindliche Mausstamm C57BL/6 als im eher resistente Mausstamm BALB/c induziert. Weiterhin konnten Hinweise gefunden werden, dass die starken Th2/1-Hybridzellantworten die Polarisierung von alternativ aktivierten Makrophagen limitieren und damit die Fitness von *H. polygyrus* positiv beeinflussen können. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass BALB/c deutlich mehr parasiten-spezifische CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu C57BL/6 in einer *H. polygyrus* Infektion induzieren und dass beide Mausstämme verstärkter auf Antigene vom Larvenstadium 4 reagieren. Zusätzlich führen von Helminthen gewonnene Antigene ebenfalls zur Induktion von Th2/1-Hybridzellen, was bei der Entwicklung von Impfstoffen beachtet werden sollte.

Summary

Infections with helminths affect approximately 1.5 billion people worldwide and are most prevalent in tropical and sub-tropical regions of the developing world. Helminths can modulate the immune response of the host and can thereby inhibit the efficiency of any applied vaccine.

The differentiation and function of Th2/1 hybrid cells in murine nematode infection was analyzed in this work. The intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is closely related to the human hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. Therefore, it is widely used as a model to study the immune response to helminth infections and for vaccine development. Th2/1 hybrid cells occurring in helminth infections co-express the lineage-defining transcription factors and key cytokines of Th2 (GATA-3, IL-4, IL-5, IL-13) and Th1 (T-bet, IFN- γ) cells. The aim of this work was to analyze the potential of Th2/1 hybrid cells as a regulatory element of the protective Th2 immune response to helminth infections. In several studies of helminth infections, it could be shown that an increase in IFN- γ expression leads to suppressed control of infection. Therefore, the main focus of this work was to assess the ability of Th2/1 hybrid cells to express IFN- γ .

The studies performed here showed that the spleen in mice infected with the intestinal nematode *H. polygyrus* comprise the highest numbers of Th2/1 hybrid cells at all stages of infection and that Th2/1 hybrid cells were the major source of parasite-specific IFN- γ . Furthermore, it could be shown that Th2/1 hybrid cells can differentiate from naive CD4⁺ T cells *in vivo* and that this differentiation is independent of the microbiota. Additionally, IFN- γ is important for Th2/1 hybrid cell induction, as IFN- γ supplementation during early nematode infection led to elevated Th2/1 differentiation, more parasite-specific cells expressing IFN- γ , and increased parasite egg production. Susceptible C57BL/6 mice induce a more pronounced Th2/1 hybrid cell response compared to the more resistant BALB/c line. This work also provides evidence that Th2/1 hybrid cells inhibit the activation of alternatively activated macrophages, which are important for resistance against helminth infections. It was also shown for the first time that BALB/c mice induce significantly more parasite-specific CD4⁺ T helper cells compared to C57BL/6 mice. Independent of the mouse strain used, T cells reacted strongest to antigens obtained from *H. polygyrus* fourth-stage larvae. Interestingly, parasite antigens applied subcutaneously also led to the induction of Th2/1 hybrid cells, which should be considered during vaccine development.

1 Einleitung

1.1 Parasiten

Parasiten sind Organismen, die (temporär) in oder auf einem speziesfremden Wirt leben und von diesen Nährstoffen sowie andere Ressourcen erhalten, ohne für den Wirt von Vorteil zu sein. Darüber hinaus können sie pathogene Eigenschaften besitzen, wodurch sie unter anderem Erkrankungen, Leistungsminderungen und Todesfälle verursachen können [1-3]. Zudem sind sie in der Lage die Immunantwort des Wirts zu modulieren und können damit auch die Wirksamkeit von Impfstoffen beeinträchtigen. Je nach Lokalisation des Parasiten werden sie als Ekto- oder Endoparasiten charakterisiert.

1.1.1 Ektoparasiten

Ektoparasiten, wie zum Beispiel Flöhe, Läuse und Zecken, leben auf oder in der Haut des Wirts. Dabei sind Läuse häufig wirtsspezifisch, während Zecken meist ein breites Spektrum an Wirten befallen können [4, 5]. Bei starkem Befall können sie zu Anämie, Anaphylaxie, Hautentzündungen und -nekrosen bei Mensch und Tier führen [6]. Darüber hinaus stellen viele Ektoparasiten Vektoren für eine Vielzahl von Pathogenen dar und sind Überträger von zoonotischer Infektionserregern wie beispielsweise dem Erreger der Lyme-Borreliose *Borrelia burgdorferi* [7].

1.1.2 Endoparasiten

Endoparasiten leben über längere Zeit innerhalb ihres Wirts. Zu dieser Art von Parasiten gehören Protozoen wie Giardien und *Toxoplasma gondii* sowie parasitäre Würmer (Helminthen) [8]. Helminthen werden in drei Gruppen unterteilt: Cestoden, Trematoden und Nematoden. Cestoden (Bandwürmer) und Trematoden (Saugwürmer) gehören zum Stamm der Plathelminthes (Plattwürmer). Die Endwirte von Cestoden wie dem Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* sind Wirbeltiere, in denen sie die Därme besiedeln und dort, da sie keinen eigenen Darm besitzen, über ihre gesamte Körperlänge Nährstoffe aufnehmen können [9]. Trematoden wie die Pärchenegel *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma haematobium* sowie Leberegel *Fasciola hepatica* und *Dicrocoelium dendriticum* weisen komplexe Lebenszyklen mit Zwischen- und Endwirten und häufig freilebenden Larvenstadien auf [10, 11]. In den Wirbeltieren besiedeln sie den Blutkreislauf beziehungsweise die Gallengänge und die Freisetzung der Eier erfolgt über den Kot beziehungsweise Urin des Wirts. Der Stamm der Nematoden (Fadenwürmer) umfasst viele verschiedenen Arten und besitzt im Gegensatz zu den Plathelminthes ein röhrenförmiges Verdauungssystem mit Öffnungen an beiden Enden.

- Einleitung -

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO; World Health Organization) zufolge sind zurzeit etwa 1,5 Milliarden Menschen weltweit mit Helminthen infiziert, wobei die Prävalenz vor allem in tropischen und subtropischen Regionen hoch ist [3]. Vor allem Menschen in Gebieten, in denen kein oder erschwerter Zugang zu sauberem Wasser und Sanitäranlagen besteht, sind betroffen. Infektionen mit einer geringen Wurmanzahl führen selten zu Symptomen und bleiben daher oft unentdeckt. Schwere Infektionen jedoch können unter anderem zu Anämie, Mangelernährung und Wachstumsstörungen führen [12]. Die häufigsten Vertreter humanpathogener gastrointestinaler Nematoden sind der Spulwurm *Ascaris lumbricoides*, der Peitschenwurm *Trichuris trichiura* und die Hakenwürmer *Necator americanus* sowie *Ancylostoma duodenale* [13, 14]. Ein Befall mit diesen Nematoden führt ohne Behandlung zu chronischen Infektionen und die betroffenen Menschen bleiben nach Abbruch der Infektion durch Anthelminthika empfänglich für Reinfektionen [15, 16]. Zudem häufen sich Fälle von Resistenzentwicklungen von human- und veterinärmedizinisch bedeutenden parasitären Nematoden [17-19]. Bis zu diesem Zeitpunkt sind keine Vakzine für den humanmedizinischen Einsatz erhältlich. In den letzten Jahren wurden jedoch Fortschritte in der Entwicklung veterinärmedizinisch relevanter Vakzine gemacht. Es konnten dabei verschiedene Antigenkandidaten für Vakzinierungen gefunden werden. Dies bedarf jedoch weiterer Analysen der Immunantwort gegen Nematoden, um die Mechanismen der Immunität durch Vakzinierungen besser verstehen sowie die Vakzinherstellung optimieren zu können [20-22].

1.2 *Heligmosomoides polygyrus* als Modellorganismus für gastrointestinale Wurminfektionen

Heligmosomoides polygyrus (*H. polygyrus*, früher: *Nematospiroides dubius*) ist ein natürlicherweise vorkommender Dünndarmparasit von Nagetieren und gehört zu der Familie der Trichostrongylidae [23]. Das Geschlecht adulter Würmer ist morphologisch gut voneinander zu unterscheiden, wobei die Weibchen meist deutlich größer als die Männchen sind. Darüber hinaus laufen die Enden der weiblichen Würmer spitz zu, während das Hinterende von Männchen fächerförmig ist [24]. *H. polygyrus* weist einen direkten Lebenszyklus auf und ist daher von Zwischenwirten unabhängig. Im Wirt kommt es zu einem chronischen Infektionsverlauf, infolgedessen auch die Immunantwort des Wirts vom Parasiten moduliert wird. *H. polygyrus* gehört zur gleichen Ordnung Strongylida wie die humanpathogenen Hakenwürmer *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale* und wird daher oft als gastrointestinales Parasitenmodell in immunologischen, pharmazeutischen und toxikologischen Studien eingesetzt [15, 20].

- Einleitung -

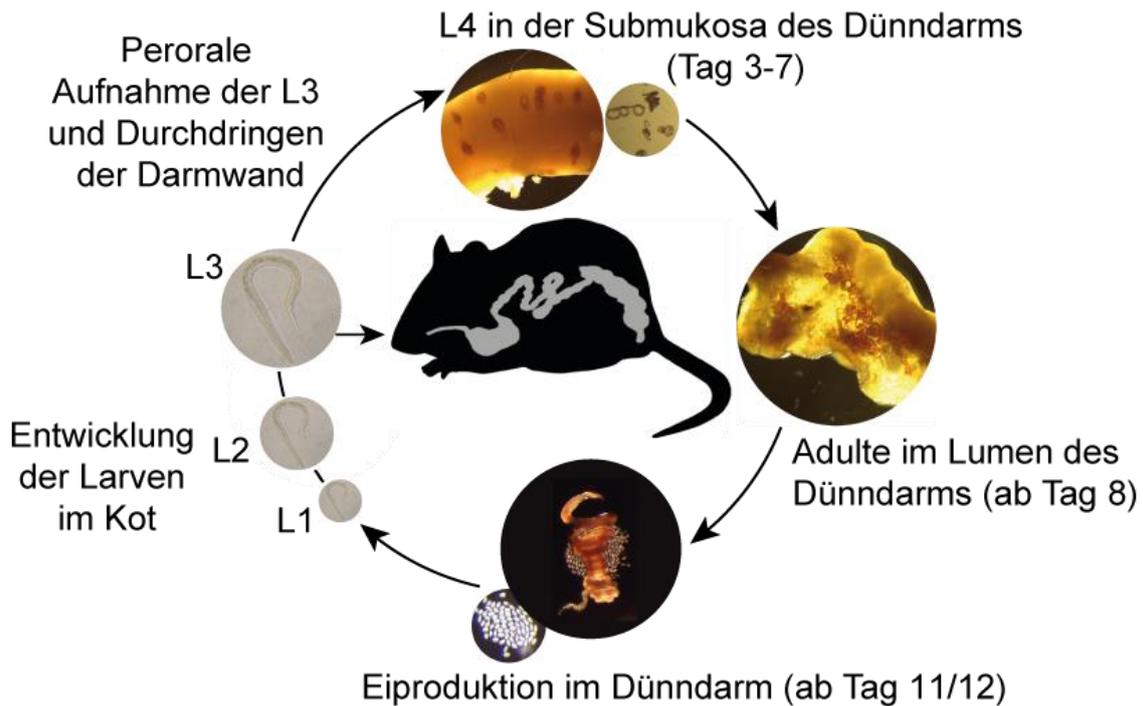


Abb. 1.1 Lebenszyklus von *Heligmosomoides polygyrus*

Die Infektion verläuft ohne Zwischenwirte (direkter Lebenszyklus) und erfolgt über die perorale Aufnahme der freilebenden infektiösen Larve (L3). Die Larve wandert in die Submukosa des Duodenums (Zwölffingerdarm) ein, in der sie zwei Häutungen zur L4 und zum adulten Wurm durchläuft. Etwa acht Tage nach Infektion wandern die adulten Würmer zurück in das Dünndarmlumen, wo sie sich paaren und mit der Eiproduktion beginnen. Die Eier gelangen mit dem Kot des Wirts in die Umwelt. Innerhalb weniger Tage entwickeln sich aus L1 die infektiösen L3.

Wie in Abb. 1.1 gezeigt werden Mäuse durch orale Aufnahme der Larve im infektiösen Stadium 3 (L3) infiziert. Diese Larven tragen die Hüllen des ersten (L1) und zweiten Larvenstadiums (L2), um sich während der Magenpassage zu schützen. Im Dünndarmlumen durchbrechen sie die Dünndarmwand und dringen in die Submukosa ein. Dort entwickeln sie sich zum vierten Larvenstadium (L4). Drei bis sieben Tage nach der Infektion verkapseln sie sich in der Muskelschicht des Dünndarms und reifen zum adulten Wurm heran. Acht bis zehn Tage nach Infektion wandern die adulten Würmer zurück ins Lumen des Dünndarms, wickeln sich um die Mikrovilli und ernähren sich vom Schleimhautgewebe des Wirts. Beginnend mit Tag 11/12 nach Infektion werden Eier von den weiblichen Würmern abgegeben, die über den Kot des Wirts in die Umwelt gelangen und aus denen innerhalb von 24 Stunden die L1 schlüpft und sich zur L2 entwickelt. Das zweite Larvenstadium ernährt sich von Bakterien, bevor es sich zur infektiösen L3 entwickelt, welche keine Nahrung mehr zu sich nehmen [25].

1.3 Immunantwort in Nematodeninfektionen

Die Infektion mit Nematoden induziert eine starke T-Helferzellantwort des Typs 2 (Th2). Diese zeichnet sich durch einen Anstieg an den Interleukinen (IL) 4, IL-5 und IL-13, sowie einer Eosinophilie und einem Anstieg der Antikörper IgE und IgG1 im Serum aus [26, 27].

1.3.1 Angeborene und erworbene Immunantwort während einer Nematodeninfektion

Durch das Eindringen der Würmer in die Submukosa des Dünndarmes des Wirts werden Alarmine wie das Chemokin TSLP (thymic stromal lymphopoietin) und die Zytokine IL-25 und IL-33 von Epithelzellen freigesetzt [28]. Diese Alarmine aktivieren dendritische Zellen (DC), innate lymphoide Zellen vom Typ 2 (ILC2) sowie Granulozyten und Mastzellen [29]. Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie DCs spielen eine zentrale Rolle bei der erworbenen Immunantwort, die zur Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses führt. Nach Aktivierung präsentieren DCs extrazelluläre Proteine über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC; Major Histocompatibility Complex) des Typs II. An diesen MHCII-Protein-Komplex bindet der T-Zellrezeptor von CD4⁺ T-Helferzellen (Th). Bei zusätzlicher Kostimulation durch die CD80 und CD86 Moleküle auf den DCs und Einfluss des Zytokins IL-4 werden Th2-Zellen gebildet [30-32]. Dabei kann das für die Th2-Differenzierung während einer Nematodeninfektion wichtige IL-4 unter anderem von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen sezerniert werden [33, 34]. Die zentrale Bedeutung von CD4⁺ T-Helferzellen konnte in einer Vielzahl von Studien in verschiedenen Nematodeninfektionsmodellen gezeigt werden [35, 36]. Dabei führte beispielsweise der Transfer CD4⁺ T-Helferzellen aus *Nippostrongylus brasiliensis* infizierten Mäusen in Mäuse, die keine T-Zellen haben, zu einer protektiven Immunantwort.

Th2-Zellen sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und können damit ihrerseits Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen aktivieren [37, 38]. IL-4 und IL-13 führen auch zu einer Verstärkung der Darmperistaltik, wodurch die Nematoden leichter ausgeschieden werden können [39, 40]. Dies wird auch durch vermehrte Produktion von Mukus durch Becherzellen, deren Differenzierung und Aktivierung durch IL-4 und IL-13 induziert wird, verstärkt [41]. Weiterhin produzieren Becherzellen das Protein RELM- β (resistin-like molecule β), für das direkte inhibitorische Effekte auf *H. polygyrus* gezeigt werden konnten [42, 43]. Es inhibiert die Nahrungsaufnahme adulter *H. polygyrus* und beeinträchtigt daraufhin die Parasitenfekundität. Die Fekundität beschreibt die Fortpflanzungsleistung einer Art oder eines Individuums und ist damit ein Parameter, der eine Aussage über die Fitness der Individuen erlaubt.

- Einleitung -

Gut untersucht ist die bereits angesprochene Wirkung von IL-4 und IL-13 auf die Differenzierung von alternativ aktivierten Makrophagen (AAM) [44-46]. Klassisch aktivierte Makrophagen, die durch Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktoren (TNF) aktiviert werden, töten intrazelluläre Pathogene unter anderem durch Phagozytose und Produktion von toxischem Stickstoffmonoxid (NO) [47-49]. Dahingegen wurden AAM vor allem in Bezug auf Heilungsprozesse, die durch zerstörtes Gewebe während einer Nematodeninfektion nötig werden, beschrieben [50]. AAM werden durch die Expression von Arginase-1, RELM- α und YM-1 charakterisiert [44, 51]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Arginase-1 die Fitness von *H. polygyrus* sowie *N. brasiliensis* negativ beeinflusst [52, 53]. Dabei führte die Administration vom Arginase-1-Inhibitor S-(2-Boronoethyl)-l-Cystein in *H. polygyrus*-reinfizierten Mäusen zu einem erhöhten Wurmbefall. Dahingegen wurde RELM- α als ein regulatives Molekül von AAM beschrieben, dass die Th2-Antwort inhibierte und zu erhöhtem Wurmbefall in *N. brasiliensis* infizierten Mäusen führte. Gleichzeitig senkte es aber auch die Th2-induzierte Pathologie in *N. brasiliensis* sowie *S. mansoni* Infektionen [54, 55]. YM-1 ist ein Chitinase-like Protein 3, das keine eigene Chitinaseaktivität aufweist, und ist in der Lage an Saccharide mit einer freien Aminogruppe sowie an Heparinsulfate zu binden [56]. Daher wurde in dieser Studie postuliert, dass es an die extrazelluläre Matrix bindet. Die genaue Funktion von YM-1 konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die Bindung von YM-1 könnte einen entzündungshemmenden Effekt haben, indem es die Bindungsstellen von Leukozyten in der extrazellulären Matrix blockiert. Jedoch konnte in weiteren Studien Hinweise gefunden werden, dass YM-1 chemotaktische Aktivität aufweist und zur Einwanderung von T-Zellen, Knochenmarkszellen und eosinophilen Granulozyten führen kann [44, 56, 57]. Zudem konnte gezeigt werden, dass YM-1 RELM- α induzieren kann [50].

Des Weiteren ist IL-4 wichtig bei der T-Zell-abhängigen Aktivierung von B-Zellen und dem Klassenwechsel zu IgG1 und IgE (Maus) beziehungsweise IgG4 und IgE (Mensch) [58, 59]. Für *H. polygyrus* konnte gezeigt werden, dass IgG1 Antikörper die Fekundität signifikant reduzieren, während IgE keine Rolle in der Immunität gegen *H. polygyrus* zu spielen scheint [60]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass B-Zellen eine wichtige Quelle für die T-Zell-Wachstumsfaktoren IL-2 sowie TNF- α darstellen und damit die Effizienz der Immunantwort gegen *H. polygyrus* unterstützen [61]. Schließlich führt das von Th2-Zellen gebildete IL-5 zu einer starken Zunahme von eosinophilen Granulozyten, die als weiterer Faktor für den Klassenwechsel zu IgG1 von B-Zellen in einer *H. polygyrus* Infektion beschrieben wurden [62]. In einer weiteren Studie konnte auch gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten und IgE für die Immunität gegen

- Einleitung -

Onchocerca volvulus, ein Nematode, der zur Onchozerkose (Flussblindheit) beim Menschen führt, essentiell sind [63].

Lange Zeit war unklar, wie das Immunsystem die Infektion durch Helminthen erkennt. Generell erkennt das Immunsystem Pathogene wie Bakterien und Viren über Mustererkennungsrezeptoren (PRR; Pattern Recognition Receptors), einschließlich der Toll-like Rezeptoren (TLR) und C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLR). [64]. Inzwischen weiß man, dass TLRs und CLRs auch wichtig für die Erkennung einiger Helminthenspezies sind. Für Infektionen mit *Schistosoma mansoni* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Aktivierung von Immunzellen durch die Bindung des schistosomalen Glycolipids Lysophosphatidylserin beziehungsweise RNA an TLR2 und TLR3 erfolgen kann [65, 66]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Zuckerstrukturen an CLRs wichtig für die Detektion und damit Immunantwort bei Helmintheninfektionen ist [67]. Beispielsweise bindet der zur CLR-Familie gehörende Mannoserezeptor der Makrophagen Proteine von *Schistosoma mansoni*, woraufhin Makrophagen die Glykoproteine aufnehmen, präsentieren und in der Folge die Ausbildung der Th2-Antwort verstärken. Fehlt der Mannoserezeptor auf Makrophagen führt dies zur verstärkten Produktion des Th1-assoziierten Effektorzytokins IFN- γ durch CD4⁺ T-Helferzellen bei der Immunisierung mit *Schistosoma mansoni* Antigen [68].

Helmintheninfektionen führen demnach zu einer komplexen Immunantwort. Zellen des angeborenen Immunsystems unterstützen die Ausbildung von Th2-Effektorzellen und werden durch die Typ2 Zytokine aktiviert und verstärkt gebildet. Die Th2-Zytokinantwort ist ebenfalls essentiell für die Ausbildung von partiell protektiven Antikörperantworten und führt zu physiologischen Veränderungen der Mukosa, was zum Austreiben intestinaler Helminthen führen kann. Diese stereotype Antwort bewirkt in den meisten murinen Modellen einen effektiven Schutz vor Reinfektionen und führt zu einer schnellen Wundheilung der durch migrierende Würmer verursachten Gewebeschäden. Trotz dieser teilweise sehr starken Immunantwort gegen Helminthen, sind sie sehr erfolgreiche Parasiten, die zu chronische Infektionen führen und sich lange fortpflanzen können. Das Immunsystem von manchen Menschen ist in der Lage den Parasiten zu töten und auszutreiben. Das führt jedoch, durch starke Entzündungsprozesse, sehr oft zu starken immunpathologischen Folgen [69, 70]. Daher wird das Immunsystem meist durch Regulationsprozesse supprimiert und der Parasit toleriert, da die dazu erzeugte Homöostase auch für das Überleben des Wirts und zur Abwehr anderer Krankheitserreger von Bedeutung ist [69, 71]. Zusätzlich besitzen Helminthen jedoch auch die Fähigkeit, Moleküle zu sezernieren, die immunmodellierende Effekte auf den Wirt haben und eine Toleranz des Immunsystems ausbilden können [72-74].

- Einleitung -

H. polygyrus kann unter anderem das Molekül HpARI (*H. polygyrus* alarmin release inhibitor) sezernieren, das in der Lage ist, die Alarmin-Freisetzung bei der Nekrose von Epithelzellen zu unterdrücken [75, 76]. Besonders gut untersucht ist zudem die Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) in der Helmintheninfektion. Die Induktion von Treg-Zellen wird durch die Bindung von TGF- β (transforming growth factor β) an dessen Rezeptor ausgelöst. *H. polygyrus* sezerniert das Molekül Hp-TGM (*H. polygyrus* TGF- β mimic), das in der Lage ist an den TGF- β -Rezeptor zu binden und die Induktion von Treg-Zellen auszulösen [77]. Sowohl HpARI als auch Hp-TGM führen zu einer Reduktion der Typ-2 vermittelten Immunantwort (Abb. 1.2).

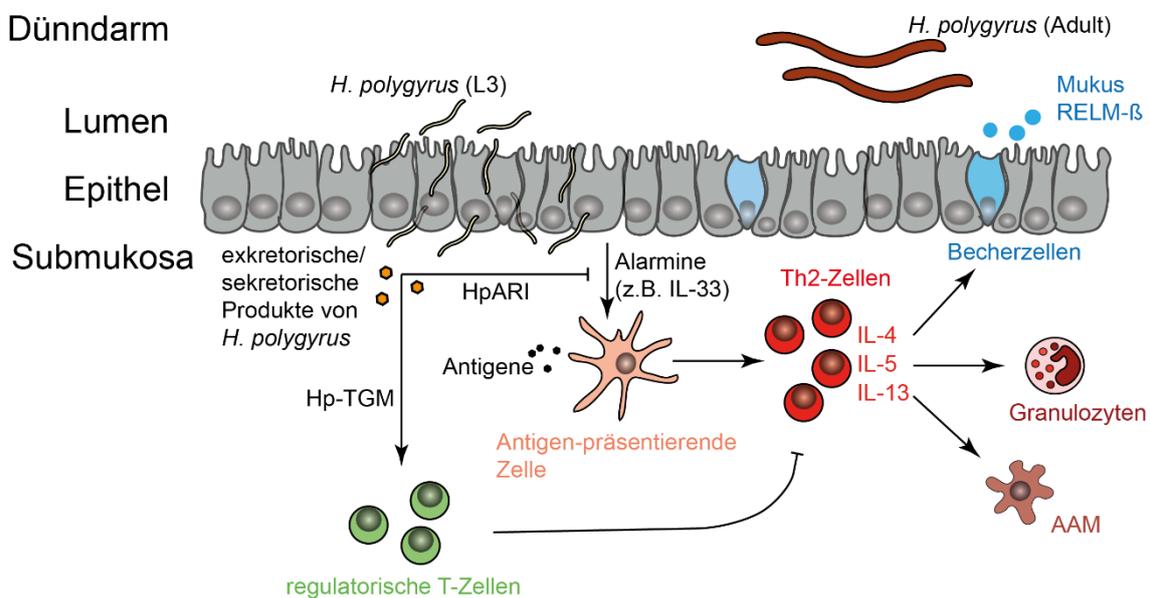


Abb. 1.2 Immunantwort und Immunmodulation in einer *H. polygyrus* Infektion

Nach der peroralen Aufnahme der infektiösen *H. polygyrus* Larven (L3) dringen diese in die Submukosa des Dünndarms ein. Antigene des Parasiten werden von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und T-Helferzellen präsentiert, die sich daraufhin zu Th2-Zellen differenzieren und eine Typ-2-gesteuerte Immunantwort auslösen. Die Expression der Effektorzytokine IL-4, IL-5 und IL-13 führt zur Aktivierung alternativ aktivierter Makrophagen (AAM), Granulozyten und der Differenzierung und Aktivierung von Becherzellen, die daraufhin vermehrt Mukus und RELM- β produzieren. *H. polygyrus* ist jedoch durch die Freisetzung von exkretorischen/sekretorischen Produkten (HpARI, Hp-TGM) in der Lage die Immunantwort zu supprimieren, in dem es zum Beispiel regulatorische T-Zellen aktiviert, die ihrerseits inhibierend auf die Th2-Zellantwort wirken können.

Aus Koinfektionsstudien und anderen experimentellen Modellen ist darüber hinaus bekannt, dass die Ausbildung der Th2-Immunantwort in Nematodeninfektionen durch IFN- γ (bis zur kompletten Inhibierung) herunterreguliert werden kann [78-80]. Daher wurde die Regulation von T-Helferzellsubsets in dieser Arbeit weiter untersucht.

1.4 T-Helferzellsubsets

T-Zellen gehören mit den B-Zellen und natürlichen Killerzellen zu den Lymphozyten und spielen eine wichtige Rolle bei der zellvermittelten Immunität. Vorläuferzellen der T-Zellen entstehen aus Stammzellen im Knochenmark und wandern dann in den Thymus, wo sie ihre T-Zellrezeptoren (TZR) zur Erkennung von MHC-Antigen-Komplexen ausbilden. Dabei erfolgt im Thymus die positive und negative Selektion von T-Zellen, die gewährleistet dass nur Zellen den Thymus verlassen, die an MHC-Moleküle binden, aber nicht auf körpereigene Proteine reagieren können [81, 82]. Reife naive T-Zellen, die diese Selektionsprozesse durchgegangen sind, zirkulieren dann durch das periphere Lymphgewebe und können durch antigen-präsentierende Zellen aktiviert werden.

Generell werden zwei Hauptklassen an T-Zellen unterschieden: CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Der TZR von CD4⁺ T-Helferzellen erkennt kurze Peptidsequenzen, die von APCs im MHCII-Komplex präsentiert werden. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen Peptide, die von allen Zellkern-haltigen Zellen über MHCI präsentiert werden können.

Der Nachweis von Th1- und Th2-Zellen als funktionell unterschiedliche T-Helferzellsubsets gelang vor über 30 Jahren [83]. Bei der Untersuchung von unterschiedlichen CD4⁺ T-Helferzellklonen wurde entdeckt, dass bestimmte Klone ein anderes Profil an Zytokinen exprimierten [83, 84]. Mit der Unterscheidung der IL-4⁺ Th2- und IFN- γ ⁺ Th1-Zellen wurden erstmalig CD4⁺ T-Helferzellen in verschiedene Untergruppen unterteilt und damit ein zentrales Paradigma aufgestellt, wie verschiedene T-Helferzellen bei Immunpathologien oder Infektionen eine Rolle spielen [85]. Seitdem wurden weitere funktionelle Untergruppe wie die Th17 und folliculäre T-Helferzellen sowie verschiedenen Treg-Zellen entdeckt [86-90]. Die Differenzierung der naiven T-Zellen in die verschiedenen Subtypen ist abhängig vom Zytokin-Milieu, der Stärke des TZR-vermittelten Signales, dem genetischen Hintergrund und des Typs und Aktivierungszustandes der DCs [91-94]. Die T-Helferzell-Subtypen können nach ihrer Fähigkeit auf verschiedene Interleukine zu reagieren, ihrer Expression von sogenannten Schlüsseltranskriptionsfaktoren und ihrer Zytokin- sowie Chemokinexpression charakterisiert werden.

1.4.1 Instruktion von Th1- und Th2-Zellen

Wie zuvor beschrieben werden abhängig von den Zytokinsignalen während der Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Helferzellen unterschiedliche Differenzierungsprogramme gestartet. Die Differenzierungsprogramme und die damit verbundene Spezifikation der T-Helferzellen ist verbunden mit der Expression von Schlüsseltranskriptionsfaktoren, die spezifisch für die jeweiligen T-Helferzellsubsets sind und werden daher auch als Schlüsseltranskriptionsfaktoren bezeichnet. Weiterhin unterscheiden sie sich auch in der Expression von speziellen Zytokinen, Chemokinen sowie deren Rezeptoren [95-97].

Der Transkriptionsfaktor T-bet (T-box-containing protein expressed in T cells) ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor für den Th1-Differenzierungsprozess, der durch die Freisetzung von IL-12 und IFN- γ von APCs eingeleitet werden kann. IL-12 und IFN- γ binden an Oberflächenrezeptoren von naiven T-Helferzellen und bewirken die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4). STAT4 initiiert die Expression von IFN- γ , das dann die Phosphorylierung von den Janus-Tyrosin-Kinasen (JAK) 1 und 2 veranlasst und zur Aktivierung von STAT1 führt. STAT1 führt zur Expression von T-bet, das wiederum durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus die IFN- γ Produktion verstärkt [98].

Der Transkriptionsfaktor GATA-3 (GATA-binding protein 3) ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor für den Th2-Differenzierungsprozess, der durch IL-4 gesteuert wird. IL-4 bindet an den Oberflächenrezeptor von naiven T-Helferzellen und führt über JAK 1 sowie 3 zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6. STAT6 führt zu einer stark erhöhten GATA-3-Expression. GATA-3 führt dann zur Expression von den Th2-assoziierten Effektorzytokinen IL-4, IL-5 und IL-13, die wiederum die GATA-3 Expression durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus verstärken [99, 100].

Darüber hinaus bindet T-bet in Th1-Zellen an den Promotor des IL-4 Gens und kann damit dessen Expression inhibieren [101-103]. In Th2-Zellen wiederum bindet GATA-3 an den IFN- γ Promotor und inhibiert dessen Expression [104]. Des Weiteren können T-bet und GATA-3 die Expression des jeweils anderen Transkriptionsfaktors inhibieren [105]. Schließlich regulieren Th2-Zellen die Expression des IL-12 Rezeptors herunter und können daher nur begrenzt auf das Th1-induzierende Effektorzytokin reagieren [106, 107]. Aus diesen Gründen wurde lange Zeit angenommen, dass sich bei der Th1- und Th2-Zelldifferenzierung die hohe Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und

- Einleitung -

GATA-3 gegenseitig ausschließen. Die Beobachtungen sind vorrangig auf *in vitro* Experimente zurückzuführen.

Kurz nach der Entdeckung von Th1- und Th2-Zellen wurden jedoch humane sowie murine T-Zellklone beschrieben, die sowohl das Th1- als auch das Th2-Zytokin IFN- γ und IL-4 koexprimieren konnten [108, 109]. Da damals wenig über die Differenzierung diesen Zellen bekannt war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass naive T-Helferzellen nach Aktivierung einen pluripotenten Status einnehmen bevor sie sich durch weitere Stimulationsrunden endgültig in die stabile Th1- und Th2- Zelllinien differenzieren [110-112].

1.4.2 Plastizität von Th1- und Th2-Zellen

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Differenzierungen in die unterschiedlichen T-Helferzellen unwiderruflich sind. Jedoch wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass polarisierte T-Helferzellen ihren Phänotyp ändern und entweder einen gemischten oder alternativen T-Helferzelltyp annehmen können. Diese Studien stammen vor allem aus Erkenntnissen von Th17 und peripher-induzierten Treg-Zellen [97, 113-115]. Th17-Zellen sind wichtig in der Immunabwehr gegen bestimmte Pilze, extrazelluläre Bakterien sowie Giardien und sind auch während der Homöostase in großer Zahl im Darm vertreten. Durch die Stimulation mit hohen Konzentrationen an TGF- β können Th17-Zellen zu induzierten Treg-Zellen differenzieren [116].

In den vergangenen Jahren konnte dies nun jedoch auch für eine Vielzahl anderer T-Helferzellen gezeigt werden, unter anderem auch für die Th2-Zellen [117, 118]. In Infektionen mit den Nematoden *Heligmosomoides polygyrus*, *Strongyloides ratti* und den Trematoden *Schistosoma mansoni* und *S. japonicum*, aber auch in durch den Fadenwürmer *Strongyloides stercoralis* infizierten Patienten, konnte gezeigt werden, dass viele CD4⁺ T-Helferzellen einen Th2/1-Hybridzellphänotyp aufweisen [117, 119-122]. Diese Th2/1-Hybridzellen sind in der Lage die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet sowie die Th2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5, und IL-13 sowie IFN- γ simultan zu exprimieren (Abb. 1.3).

- Einleitung -

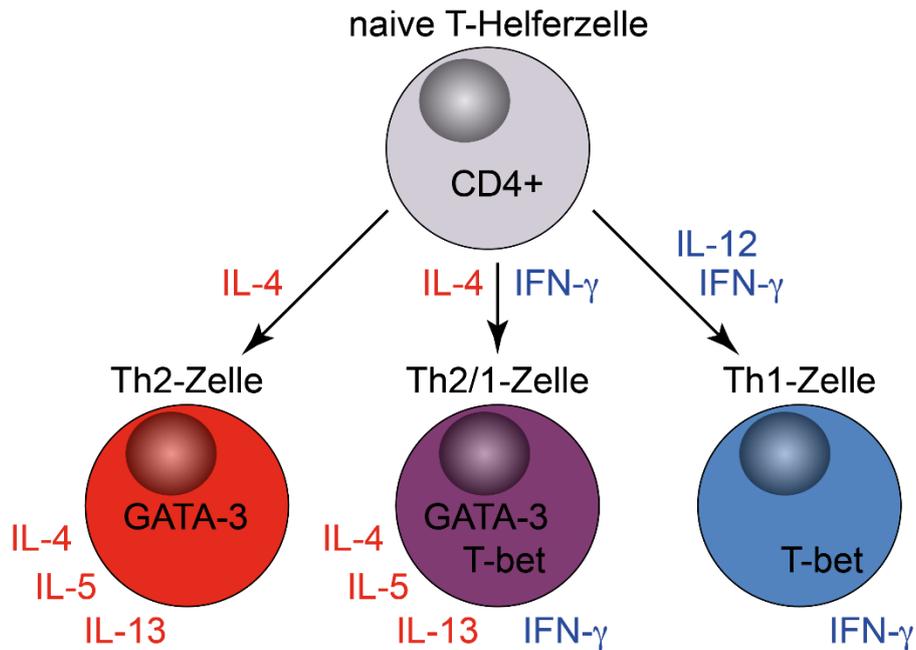


Abb. 1.3 Charakteristika der Th2-, Th2/1- und Th1-Zellen

Naive CD4⁺ T-Helferzellen können in Reaktion auf die einwirkenden Zytokinsignale in unterschiedliche Zelltypen differenzieren. Th2-Zellen werden durch die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 und der Zytokine IL-4, IL-5, und IL-13 charakterisiert. Th1-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet und das Zytokin IFN- γ . Th2/1-Hybridzellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren und Zytokine von Th2- und Th1-Zellen simultan und stabil.

Die Ausbildung von Th2/1-Immunezellen scheint ein regulatives Element in Th2-Entzündungsreaktionen darzustellen, was in einer früheren Arbeit durch adoptive Transfers von Modellantigen-spezifischen Zellen gezeigt werden konnte [120]. In diesen früheren Studien lösten Th2/1-Hybridzellen geringere Th2-Zytokin-abhängige Entzündungsreaktionen im Vergleich zu klassischen Th2-Zellen aus [120]. Darüber hinaus erhielten die *in vitro* – generierte Th2/1-Hybridzellen auch mehrere Wochen nach einem Transfer in Mäuse sowohl ihre T-bet als auch GATA-3 Expression aufrecht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob Th2/1-Hybridzellen die Kontrolle von Wurminfektionen beeinträchtigen.

1.5 Ziele der Arbeit

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, ob die Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen in Infektionen mit dem Dünndarmnematoden *H. polygyrus* ebenfalls ein regulatives Element der protektiven Th2-Immunantwort gegen den Parasiten darstellt. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der Rolle von Th2/1-Hybridzellen als IFN- γ -Produzenten, da bereits früher in verschiedenen Nematodeninfektionsmodellen gezeigt werden konnte, dass erhöhte IFN- γ Expressionswerte mit einer verminderten Kontrolle von Wurminfektionen einhergehen [123-128].

In dieser Arbeit sollten daher in der *H. polygyrus*-Infektion der Maus als einem natürlichen Wirt/Parasiten-Modell folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Th2/1-Hybridzellen stellen die dominante Quelle von parasiten-spezifisch produziertem IFN- γ dar.
2. Die Empfänglichkeit verschiedener Wirtsgenotypen für Nematodeninfektionen steht in Zusammenhang mit der unterschiedlich stark ausgeprägten Ausbildung von Th2/1-Hybridzellantworten.
3. Th2/1-Hybridantworten können experimentell unterstützt werden und beeinträchtigen die Kontrolle der Nematodeninfektion.
4. Stark ausgebildete Th2/1-Hybridzellantworten limitieren die durch Th2-Zytokine induzierte Polarisierung zu alternativ aktivierten Makrophagen.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit geprüft, ob die Exposition gegenüber anderen Parasiten neben Helminthen ebenfalls zur Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen führt. Hierzu wurden die Immunantwort von Mäusen auf Infestationen mit der Zecke *Ixodes ricinus* untersucht. Schließlich wurde in ersten Vakzinierungsstudien geprüft, ob von Helminthen gewonnene Antigene ebenfalls zur Ausbildung von heterogenen Th2- und Th2/1-Zellantworten führen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

BD FACSAria™ II sorter	BD Biosciences, CA, USA
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, CA, USA
Casy® Cell counter Model TT	Roche, Basel, Schweiz
LightCycler®480	Roche, Basel, Schweiz
NanoDrop Spectrophotometer ND 1000	peqLap Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Synergy™ H1 Hybrid Microplate Reader	BioTek Instruments, VT, USA

2.1.2 Antibiotika

Ampicillin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Gentamicin	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Neomycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Streptomycin	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Vancomycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Enzyme, Chemikalien und rekombinante Zytokine

Brefeldin A	Thermo Fisher, Waltham, USA
Collagenase D	Roche, Basel, Schweiz
Collagenase VIII	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DMEM	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
DNase I (4 mg/mL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DPBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
DTE (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
FBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Formalin-Histofix	Roth, Karlsruhe, Germany
Glukose	Roth, Karlsruhe, Germany
GM-CSF	PeproTech, Hamburg, Deutschland

- Material und Methoden -

HBSS	PAA, Pasching, Österreich
Hepes	PAA, Pasching, Österreich
IFN- γ	PeproTech, Hamburg, Germany
Ionomycin in EtOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Glutamin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Liberase DH (5 mg/mL)	Roche, Basel, Schweiz
Liberase TL (5 mg/mL)	Roche, Basel, Schweiz
LPS (Lipopolysaccharid) L5529	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Percoll	GE healthcare life sciences, Schweden
PMA in DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
RPMI-1640	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Blockpuffer	3% BSA in DPBS
Erylyse-Puffer	0,01 M KHCO ₃ 0,155 M NH ₄ Cl 0,1 mM EDTA pH 7,5
FACS Puffer	0,2% BSA 2 ml 0,5 mM EDTA in 500 mL DPBS
Karbonat-Puffer	0,84 g NaHCO ₃ 1,01 g Na ₂ CO ₃ 100 mL dest. H ₂ O pH 9,5
Physiologische NaCl-Lösung (0,9%)	9 g/L NaCl
Stopplösung	100 mM EDTA
Substratlösung	10 mL Karbonatpuffer 1 mM MgCl ₂ Phosphatablette(p-Nitrophenylphosphat)

- Material und Methoden -

2.1.5 Medien

CMF	1,2 g Hepes 0,7 g NaHCO ₃ 10 mL NCS 500 mL HBSS, ohne Ca ²⁺ & Mg ²⁺
CMF/DTE	1,2 g Hepes 0,7 g NaHCO ₃ 50 mL NCS 1,6 mL Dithioerythritol (DTE) 500 mL HBSS, ohne Ca ²⁺ & Mg ²⁺
DMEM/EDTA	500 mL DMEM 5 mL 0,5 mM EDTA 50 mL FBS
DMEM/FCS	500 mL DMEM 25 mL FBS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin
Gut-Medium	25 mL FBS 500 mL RPMI mit HEPES 1 mL Gentamycin
HBSS/EDTA	50 mL NCS 7,5 mL 1 M Hepes 5 mL 0,5 M EDTA
HBSS/Hepes	7,5 mL 1 M Hepes 500 mL HBSS, ohne Ca ²⁺ & Mg ²
Komplettmedium	RPMI-1640 + 10% FBS 20 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin
Waschmedium	RPMI-1640 1% FBS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin
Wurmmedium	RPMI 1640 + 1% Glukose 200 U/mL Penicillin 200 µg/mL Streptomycin

- Material und Methoden -

2.1.6 Antikörper für Durchflusszytometrie/FACS

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
Biotin (Streptavidin)	PE	-	BD Biosciences, CA, USA
CD103	PE	2E7	ThermoFischer, Waltham, USA
CD11b	FITC	M1/70	BD Biosciences, CA, USA
CD25	PE	7D4	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4	BV510	RM4-5	Biolegend, CA, USA
CD4	PerCP	RM4-5	Biolegend, CA, USA
CD40-L	PE	MR1	Biolegend, CA, USA
CD44	eF450	IM7	ThermoFischer, Waltham, USA
CD62-L	APC-eF780	MEL-14	ThermoFischer, Waltham, USA
CD90.1	eF450	OX-7	Biolegend, CA, USA
CXCR3	BV421	CXCR3-173	Biolegend, CA, USA
DCE(Totzellmarker)	eF780/eF560	-	ThermoFischer, Waltham, USA
F4/80	eF450	BM8	Thermo Fisher, Waltham, USA
F _γ RII/III-Block	-	93	Thermo Fisher, Waltham, USA
FoxP3	A488	FJK-16s	Biolegend, CA, USA
FoxP3	PerCP-Cy5.5	FJK-16s	Biolegend, CA, USA
GATA-3	eF660	TWAJ	Biolegend, CA, USA
IFN- γ	eF450	XMG1.2	Biolegend, CA, USA
IL-13	A488	eBio13A	Biolegend, CA, USA
Ki-67	PE-Cy7	SoIA15	Biolegend, CA, USA
T1/ST2	Biotin	RMST2-2	ThermoFischer, Waltham, USA
T-bet	PE-Cy7	eBio4B10	Biolegend, CA, USA
Ym-1	Biotin	nicht bekannt	R&D Systems, Minneapolis, USA, Katalognr.: BAF2446

- Material und Methoden -

2.1.7 Antikörper für ELISA

Ziege-anti-Maus-IgG (Antikörper)	(Capture-)	UNLB Southern Biotech, AL, USA
Ziege-anti-Maus-IgG1-AP (Antikörper)	(Detektions-)	Rockland Immunochemicals, PA, USA

2.1.8 Reaktionskits

BCA-Test bicinchoninic acid test	ThermoFischer, Waltham, USA
eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, CA, USA
High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	Applied Biosystems, CA, USA
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, Schweiz
Mouse IFN gamma ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience, CA, USA
untouched CD4+ T-cell isolation kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.9 Primer

Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland erworben.

Zielgen	Forward Primer	Reverse Primer
RELM- α	TCCCAGTGAATACTGATGAGA	CCACTCTGGATCTCCCAAGA
RELM- β	GGCTGTGGATCGTGGGATAT	GAGGCCAGTCCATGACTGA
iNOS	ATGGACCAGTATAAGGCAAGC	CAATATAGGCTCATCCAGAGC
IFN- γ	ATGAACGCTACACACTGCATC	CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC
GAPDH	TGGATTTGGACGCATTGGTC	TTTGCACTGGTACGTGTTGAT

2.1.10 Software

BD FACSDiva™ 7.0	BD Biosciences, CA, USA
FlowJo® V9 und V10	Tree star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
LightCycler® 480 Relative Quantification Software	Roche, Basel, Schweiz

2.2 Tiermodelle

2.2.1 Mausstämme

Alle Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen gehalten und die Versuche nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes und der Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) mit den Versuchsnummern: G0176/16, T0097/13, T0407/17, H0099/13, H0438/17, H0096/13 durchgeführt. Für die Versuche wurden weibliche Tiere der Linien C57BL/6 (CD90.2) und BALB/c von JANVIER LABS (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich), IFN- γ R1^{-/-} (C57BL/6 Hintergrund) und C57BL/6 (CD90.1) Mäuse von Prof. Max Löhning (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Pitzer-Labor für Arthroseforschung, Berlin) und weibliche keimfreie C57BL/6 Mäuse von André Bleich (Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Versuchstierkunde und Zentrales Tierlaboratorium, Hannover) verwendet.

2.2.2 Infektion mit *H. polygyrus*

Der Lebenszyklus von *H. polygyrus* wurde im Labor durch serielle Passage in Mäusen aufrechterhalten. Mäuse wurden dabei mit 200 infektiösen Larven von *H. polygyrus* mit Hilfe einer Schlundsonde unter einer Reinwerkbank infiziert. L3 wurden durch Kulturen des Kots von Mäusen gesammelt. Dazu wurde Kot von *H. polygyrus* infizierten Mäusen, zwischen Tag 14 und 21 nach Infektion, gesammelt. Der Kot wurde mit destilliertem Wasser ab gespült und in Petrischalen mit angefeuchteten Western-Blot-Papier ausgelegt. Platten wurden unter humiden Bedingungen für fünf bis sieben Tage bei Raumtemperatur inkubiert. L3 wurden von den Platten mit destilliertem Wasser gespült und mehrmals gewaschen, bevor man sie in eine offene Flasche mit destilliertem Wasser zur Lagerung bei 4°C überführte. Die L3 wurden bis zu 8 Wochen nach der Gewinnung aus der Kultur für die Infektion von Mäusen für die beschriebenen Versuche genutzt. Für die Infektion der keimfreien Mäuse wurden die L3 zusätzlich vor der Behandlung eine Woche mit 5 mg/ml Streptomycin, 1 mg/ml Ampicillin, 0,5 mg/ml Gentamicin, 1 mg/ml Neomycin und 0,5 mg/ml Vancomycin behandelt.

2.2.3 Applikation von rekombinanten IFN- γ

Für die Verstärkung der Th2/1-Hybridantwort wurde C57BL/6 Mäusen rekombinantes IFN- γ (2,5 μ g/100 μ L DPBS) zweimal täglich für die ersten fünf Tage einer *H. polygyrus* Infektion intraperitoneal gespritzt. Am Tag 14 und 35 nach Infektion wurde die Immunantwort in den verschiedenen Organen analysiert.

2.2.4 Immunisierung mit *H. polygyrus* Antigen

Die Immunisierung mit exkretorischen/sekretorischen Produkten von *H. polygyrus* (40 µg / 100 µL PBS) erfolgte in den Nackenbereich von C57BL/6 Mäusen. Am Tag 7 nach Applikation wurde die Immunantwort in der Milz und Lymphknoten der Haut analysiert.

2.2.5 Adoptiver Transfer

1-2 x 10⁶ naive T-Zellen, die wie unter Punkt 2.4.2 aus C57BL/6 (CD90.1) isoliert wurden, wurden intravenös in kongene C57BL/6 (CD90.2) Mäuse transferiert. Die Mäuse wurden anschließend mit *H. polygyrus* infiziert. Transferierte Zellen konnten aufgrund der Expression von CD90.1 in den CD90.1^{neg}.CD90.2⁺ C57BL/6 Mäuse am Tag 10 nach Transfer und Infektion in den untersuchten Organen nachgewiesen und deren Differenzierung in die verschiedenen T-Helfersubsets untersucht werden.

2.2.6 Infestation durch *I. ricinus*

Für die Versuche wurden Larven der Zecke *Ixodes ricinus* von Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna (Freie Universität Berlin, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin) verwendet. Pro Maus wurden 50 Zeckenlarven aufgesetzt. Nach sechs Tagen wurde die Immunantwort in der Haut, Lymphknoten der Haut und Milz untersucht.

2.2.7 Bestimmung des Wurmbefalls und der Fekundität von *H. polygyrus*

Der Wurmbefall wurde bestimmt, indem die Würmer am Tag der Sektion aus dem Darm in eine physiologische NaCl-Lösung überführt und gezählt wurden.

Zur Bestimmung der Fekundität wurden zusätzlich acht bis zwölf weibliche Würmer in je ein Well einer 96-Well-Platte mit 200 µL Wurmmedium überführt und bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Eier für jedes Weibchen ausgezählt.

Zur Bestimmung der Eianzahl pro Gramm Kot der C57BL/6 und BALB/c Mäuse wurden zwei bis fünf Kotpellets pro Maus gesammelt und in Glasröhrchen mit 1 mL Leitungswasser überführt und für zehn Minuten eingeweicht. Danach wurde der Kot mit einem Glasstäbchen möglichst gut in dem Wasser zerstampft und 6 mL physiologischer NaCl-Lösung zugegeben, gemischt und 600 µL in eine McMaster-Zählkammer gegeben. Nach fünf Minuten konnte man die Eier mit Hilfe einer Stereolupe zählen.

2.2.8 Isolation von *H. polygyrus* L4

Zur Isolation von *H. polygyrus* Larven des Stadiums 4 (L4) wurden C57BL/6 mit 200 L3 infiziert und am Tag 5 nach Infektion seziiert. Die Dünndärme wurden vorsichtig entfernt und vorne und hinten zugebunden, damit kein Darminhalt austritt. Danach wurden sie in

- Material und Methoden -

Wurmmedium überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die L4, die ins Medium gewandert sind, abgesammelt und mehrmals in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen.

2.2.9 Histologische Untersuchung von Darmgewebe

Stücke vom Dünndarm naiver und *H. polygyrus* infizierter C57BL/6 und BALB/c Mäuse wurden in 10%-iger Formalin-Histofix Lösung konserviert und von PD Dr. Anja Kühl (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Forschungszentrum Immunwissenschaft RCIS) histopathologisch untersucht. Es wurden Gewebeschnitte hergestellt, die mit einer HE (Hämatoxylin/Eosin)-Färbung untersucht wurden.

2.3 Zellkultur

Für die durchflusszytometrische Analyse mussten die Zellen aus den Organen isoliert und Einzelzellsuspensionen gebracht werden. Dazu wurden die entsprechenden Organe aus Mäusen nach zervikaler Dislokation entnommen. Die Zellzahlen nach Isolation wurden mit Hilfe vom CASY Cell Counter bestimmt.

2.3.1 Isolation von Zellen aus Lymphknoten und Milz

Zur Isolation der Zellen aus Lymphknoten (einschließlich mesenterialen, Haut und peripheren Lymphknoten) und der Milz wurden die Organe über einen 70 µm Filter in ein 50 mL Röhrchen mit regelmäßigen Spülen mit Waschmedium gepresst. Die Einzelzellsuspension wurde mit Waschmedium auf 30 – 40 mL aufgefüllt und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C). Die Zellen aus Lymphknoten wurden in 1 mL Kompletmedium aufgenommen und die Zellzahlen bestimmt. Das Milzpellet wurde in 5 mL Erylyse-Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellsuspension mit Waschmedium auf 30 – 40 mL aufgefüllt und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C) wurde. Die Milzzellen wurden in 10 mL Kompletmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.3.2 Isolation von Zellen aus dem Dünndarm (siLP)

Für die Isolation von Zellen aus dem Dünndarm wurden zuerst alle makroskopisch sichtbaren Peyer-Plaques entfernt, der Dünndarm längs aufgeschnitten und der Darminhalt einschließlich des Mukus gründlich abgestrichen, bevor der Darm dreimal in 4°C kühlen CMF gewaschen und danach in 1-2 cm lange Stücke geschnitten wurde. Die Dünndarmstücke werden in 50 mL Röhrchen mit 20 mL 4°C CMF überführt und dreimal bei starkem Schütteln gewaschen. Danach wurden die Darmstücke in 20 mL CMF/DTE (37°C) aufgenommen und für 20 min bei 250 rpm und 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert bevor der Überstand abgegossen wird. Dies wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Darmstücke in 20 mL HBSS/EDTA (37°C) aufgenommen und für 15 min bei

- Material und Methoden -

Raumtemperatur im Schüttler inkubiert, bevor der Überstand abgegossen wurde. Dies wurde zweimal wiederholt. Zum Entfernen des EDTA, das die Funktion der Verdauungsenzyme im Anschluss inhibieren würde, wurden die Darmstücke für 5 min bei Raumtemperatur in Gut-Medium im Schüttler gewaschen. Im Anschluss wurden die Darmstücke in 10 mL Gut-Medium (37°C) mit 200 µL Liberase TL (0,1 mg/mL) und 250 µL DNase I (0,1 mg/mL) überführt und 30 min bei 37°C und 250 rpm im Wasserbadschüttler inkubiert. Danach wurde das Gemisch stark gevortext und durch eine 18G-Nadel gezogen, um eine Zellsuspension zu erhalten, die dann über einen 70 µm Filter gegeben und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C) wurde. Das Zellpellet wurde mit 30 mL HBSS/Hepes (4°C) gewaschen und wieder zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C). Dann wurden die Darmzellen in 3 mL 40%-igen Percoll/Gut-Medium- Gemisch resuspendiert und vorsichtig auf 3 mL 70%igen Percoll/Gut-Medium-Gemisch transferiert und zentrifugiert (300 xg, 20 min, RT, Bremsvorgang aus). Daraufhin konnten die Lymphozyten in der Phase zwischen 40% und 70% Percoll/Gut-Medium-Gemisch abgenommen, in Waschmedium gewaschen und das Zellpellet in 1 mL Kompletmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt werden.

2.3.3 Isolation von Zellen aus der Haut

Zur Isolation von Zellen aus der Haut wurde zuerst das Fell mit Hilfe von Kaltwachsstreifen entfernt. Die Haut (ohne Fell und Fettgewebe) wurde dreimal in DPBS (4°C) gewaschen und in 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke geschnitten. Die Stücke wurden dreimal in 50 mL Röhren mit 20 mL DMEM/EDTA (37°C) für 20 min bei 37°C und 250 rpm im Wasserbadschüttler gewaschen und der Überstand anschließend entfernt. Die Hautstücke wurden 5 min in DMEM/FCS bei Raumtemperatur gewaschen, um das EDTA zu entfernen. Hautstücke wurden nochmal mit einem Skalpell zerkleinert und 10 mL DMEM/FCS (37°C), 150 µL Liberase DH und 250 µL DNase I zugegeben und für 1h bei 37°C und 250 rpm im Wasserbadschüttler inkubiert. Danach wurde das Gemisch stark gevortext, um eine Zellsuspension zu erhalten, die dann über einen 70 µm Filter gegeben wurde. Verbleibende Hautstückchen wurden in 10 mL DMEM/FCS (37°C), 250 µL Collagenase VIII und 250 µL Collagenase D gegeben und für weitere 30 min bei 37°C und 250 rpm im Wasserbadschüttler inkubiert. Danach wurde das Gemisch stark gevortext und durch eine 18G-Nadel gezogen, um eine Zellsuspension zu erhalten, die dann über einen 70 µm Filter gegeben und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C) wurde. Die Zellen wurden in Waschmedium gewaschen und das Zellpellet in 1 mL Kompletmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.3.4 Isolation von Zellen aus dem Peritoneum

Für die Isolation von Zellen aus dem Peritoneum wurden 5-7 mL FACS-Puffer (4°C) in eine Spritze aufgezogen und vorsichtig in den Bauchraum der Maus gespritzt. Nach Ablösen der Zellen wurden diese in einer Spritze aufgezogen und in ein 50 mL Röhrchen überführt, mit Waschmedium aufgefüllt und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 1 mL Kompletmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.3.5 Isolation von Zellen aus dem Knochenmark

Knochenmark für die Differenzierung von dendritischen Zellen wurde aus den Hinterbeinen von Mäusen gewonnen. Die Knochen wurden von Muskeln und Sehnen befreit, in Waschmedium gewaschen und die beiden Enden abgetrennt. Die 27G-Kanüle einer mit Waschmedium gefüllten Spritze wurde in ein Knochenende eingeführt, um das Knochenmark in eine Petrischale zu spülen. Das Knochenmark wurde dann über einen 70 µm Filter in ein 50 mL Röhrchen überführt und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde mit 5 mL Erylyse-Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellsuspension mit Waschmedium auf 30 – 40 mL aufgefüllt und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C) wurde. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden in 10 mL Kompletmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.3.6 Generierung von dendritischen Zellen

Zur Generierung von dendritischen Zellen wurden 5×10^6 Zellen pro 10 mL Kompletmedium und GM-CSF (20 ng/mL) in 100 mm Petrischalen ausgesät und 5-9 Tage bei 37°C 5% CO₂ inkubiert. Nach 3 Tagen wurde frisches Kompletmedium und GM-CSF (20 ng/mL) zugegeben. Alle 2-3 Tage wurde neues GM-CSF zugegeben. Die Zelldifferenzierung wurde am Mikroskop überprüft. Am Tag der Zellernte wurden die nicht-adhären Zellen mit einer Pasteurpipette in ein 50 mL Röhrchen überführt, zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C), in 10 mL Kompletmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.3.7 Detektion von *H. polygyrus* spezifischen CD4⁺ T-Effektorzellen via CD40-L-Expression

2×10^5 aus dem Knochenmark generierten dendritische Zellen wurden mit 100 µL Kompletmedium in eine 96-Well-Platte ausgesät und für 12h mit dem jeweiligen Antigen (50 µg/mL) stimuliert. Zur Messung der CD40-L Expression von T-Helferzellen und Detektion von Zytokinen in Antigen-spezifisch aktivierten Zellen wurden 2×10^6 Zellen der Milz, mesenterialen Lymphknoten oder der Lamina Propria des Dünndarmes (small intestinal/siLP) zu den vorstimulierten dendritischen Zellen zugegeben, kurz abzentrifugiert und für 6h bei 37% inkubiert. Nach 30 min der Inkubation wurde Brefeldin

- Material und Methoden -

A, das den Transport vom Golgi-Apparat stoppt und damit den durchflusszytometrischen Nachweis von Zytokinen ermöglicht, zugegeben. Es wurden dendritische Zellen des Mausstammes, aus dem die Zellen der Organe zum Stimulieren stammen, verwendet.

2.3.8 Stimulation von mLN- und Milzzellen

10^6 Zellen aus der Milz bzw. den mesenterialen Lymphknoten wurden in eine 96-Well-Platte ausgesät und mit $50 \mu\text{g/mL}$ *H. polygyrus* Antigen für fünf Tage stimuliert. Am Tag fünf wurde die Platte zentrifugiert (300 xg , 10 min , 4°C) und der Überstand in eine neue Platte überführt und bei -20°C bis zur Messung der Zytokinkonzentration mit Hilfe eines ELISA eingefroren.

2.3.9 Stimulation von peritonealen Zellen mit LPS für NO-Messung

Die isolierten peritoneale Zellen wurden mit Waschpuffer gewaschen und ein Aliquot mit F4/80 und CD11b fluoreszenzmarkiert und die Zellzahl der Makrophagen innerhalb der Peritonealzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Daraufhin wurden die Peritonealzellen mit 10^5 Makrophagen / $200 \mu\text{L}$ Komplettmedium pro Well in eine 96-Well-Platte ausplattiert. Nach 24h bei 37°C wurde der Überstand für die NO-Detektion (spontan) abgenommen. Nichtadhärente Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS (37°C) entfernt und Wells wurden mit $200 \mu\text{L}$ Komplettmedium ($\pm 200 \text{ ng/mL}$ LPS) aufgefüllt. Nach 24h bei 37°C wurde der NO-Gehalt in den Überständen mit Hilfe der Griess-Reaktion [129] bestimmt.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Identifikation von Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität sowie Expression von Proteinen. Dazu können Oberflächenmoleküle sowie intrazelluläre Moleküle mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt werden. Zur Färbung von Oberflächenmarkern wurden die Zellen in $50 \mu\text{L}$ FACS-Puffer mit $\text{Fc}\gamma\text{RII/III}$ -Block ($20 \mu\text{g/mL}$), um unspezifische Bindungen der Antikörper zu inhibieren, und den jeweiligen Antikörpern für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit $100 \mu\text{L}$ FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (300 xg , 10 min , 4°C) und der Überstand entfernt. Für eine anschließende Messung wurden sie in $100 \mu\text{L}$ FACS-Puffer resuspendiert. Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Zellen in $100 \mu\text{L}$ Fixierlösung des „Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set“ resuspendiert und die intrazelluläre Färbung nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zur Analyse wurden die Zellen nach der Färbung in FACS-Puffer resuspendiert und mit dem BD FACSCanto™ II sowie FACSAria™ II gemessen. Die Analyse erfolgte mit der FlowJo Software.

2.4.2 Isolation von naiven T-Helferzellen für adoptiven Transfer MACS/FACS

Die Isolation von naiven T-Zellen erfolgte aus Zellisolaten von peripheren Lymphknoten und Milz von C57BL/6 (CD90.1). Dazu wurden zuerst CD4⁺ T-Zellen durch magnetisch-basierte Zellsortierung (MACS; Magnetic Activated Cell Sorting) mit Hilfe des „Untouched CD4⁺ T-cell Isolation Kit“ nach Herstellerangaben angereichert. Danach wurden die angereicherten CD4⁺ T-Zellen mit Antikörpern fluoreszenzmarkiert und nach dem folgenden Sortierschema mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS; Fluorescence Activated Cell Sorting) FACS Aria™ II sortiert: CD62-L⁺CD44⁻CD25⁻CD103⁻T1/ST2⁻CXCR3⁻.

2.4.3 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Zur Bestimmung der Konzentration von IFN- γ in Zellkulturüberständen sowie IgG1 im Serum wurden ELISA wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Es wurden Zwei- bis Dreifachbestimmungen pro Probe und Standardreihe angesetzt. Die Konzentration von IFN- γ wurde mit Hilfe des „Mouse IFN gamma ELISA Ready-Set-Go!“ Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurden 50 μ L je Antikörper, Probe, Standard und Detektionslösung (TMB) und 25 μ L der Stopplösung eingesetzt.

Zur Detektion von IgG1 im Serum wurde Wells einer 96-Well-Platte mit je 50 μ L des Capture-Antikörper (für Gesamtkonzentration) beziehungsweise 50 μ g/mL *H. polygyrus* Antigen (für Antigen-spezifische Detektion) in Karbonat-Puffer beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte wurden 200 μ L Blockpuffer pro Well zugegeben, 1h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal gewaschen. Das Mausserum wurde in Blockpuffer verdünnt (250x – 50000x) und je 50 μ L pro Well für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Konzentrationsbestimmung beim Gesamt-IgG1 wurde zusätzliche eine Standardreihe mit definierten Immunglobulinkonzentrationen auf der Platte angelegt. Nach dreimaligem Waschen wurde der IgG1-spezifische Detektionsantikörper, der mit einer Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert war, dazugegeben (1:5000) und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde die Substratlösung zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde die Reaktion mit der Stopplösung beendet und die Absorption bei 405/630 nm mit dem Synergy™ H1 Hybrid Microplate Reader gemessen.

2.5 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.5.1 Herstellen von *H. polygyrus* Antigenen (L3, L4, Adult HpAg und HES)

Zur Präparation von Antigen wurden Würmer für 24h in Wurmmedium kultiviert und danach in PBS überführt und durch Ultraschallbehandlung (1min; 60W) auf Eis

- Material und Methoden -

homogenisiert. Die Homogenisate wurden zentrifugiert (20 min, 20,000g, 4°C) und der Überstand über einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe eines BCA-Tests bestimmt und bei -20°C gelagert.

Zum Sammeln von *H. polygyrus* exkretorischen/sekretorischen Produkten (HES) wurden 300 Würmer in 1 mL Wurmmedium kultiviert. Nach 24h und 48h wurde das Medium gewechselt. Ab Tag 3 bis Tag 14 wurde der Überstand gesammelt und über eine Vivaspin® Säule aufkonzentriert, mit PBS gewaschen und über einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe eines BCA-Tests bestimmt und bei -20°C gelagert.

2.5.2 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Bestimmung der Genexpression in Darmgewebe wurden bei der Sektion 0,5 cm große Abschnitte vom Duodenum mit Hilfe von Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die RNA wurde mit dem „innuPREP RNA Mini Kit“ nach Herstellerangaben extrahiert. Die Elution erfolgte mit RNase-freiem Wasser und die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines NanoDrop bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des „High-Capacity RNA-to-cDNA™“ Kits nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden bis zu 2 µg RNA pro Reaktionsmix eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Die qRT-PCR wurde mit dem „LightCycler® 480 SYBR Green I Master“-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden pro Reaktion 5 µM je Primer und 10 ng cDNA mit Mastermix und Wasser gemischt (Gesamtvolumen 20 µL). Pro Probe und Primerpaar wurden Doppelbestimmungen angesetzt. Die Analyse erfolgte mit der „LightCycler® 480 Relative Quantification Software“. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet.

Programmpunkt	Zeit	Temperatur
Hot Start	10 min	95°C
Amplifikation (45 – 55 x)	15 s	95°C
	30 s	60°C
	20 s	72°C
Schmelzkurve		60°C auf 95°C
Kühlung	∞	8°C

2.6 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit der GraphPad Prism Software (San Diego, USA) durchgeführt. Experimente wurden mit den jeweils angegebenen Gruppengrößen und Wiederholungen durchgeführt. Es wurde der Mittelwert plus Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Bestimmung der Signifikanz wurden folgende Tests angewendet: Kruskal-Wallis Test (Dunn's multiple comparisons test), Mann-Whitney Test und ANOVA (Tukey's multiple comparison testing). Statistische Signifikanz wurde durch * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ sowie **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Expansion und Lokalisation von Th2/1-Hybridzellen in Th2-assozierten Parasitosen

3.1.1 Infektion mit *H. polygyrus*

Wie in Abbildung Abb. 3.1 gezeigt sind die in dieser Arbeit näher untersuchten Th2/1-Hybridzellen durch die Koexpression der Schlüsseltanskriptionsfaktoren und Zytokine von Th2- (GATA-3, IL-13, IL-4) und Th1-Zellen (T-bet, IFN- γ) gekennzeichnet (Abb. 3.1 A, B). Zudem produzieren sie gegenüber Th2-Zellen verminderte Mengen an Th2-Zytokinen, was sich durch die geringeren mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Zytokinsignale nachweisen lässt (Abb. 3.1 C).

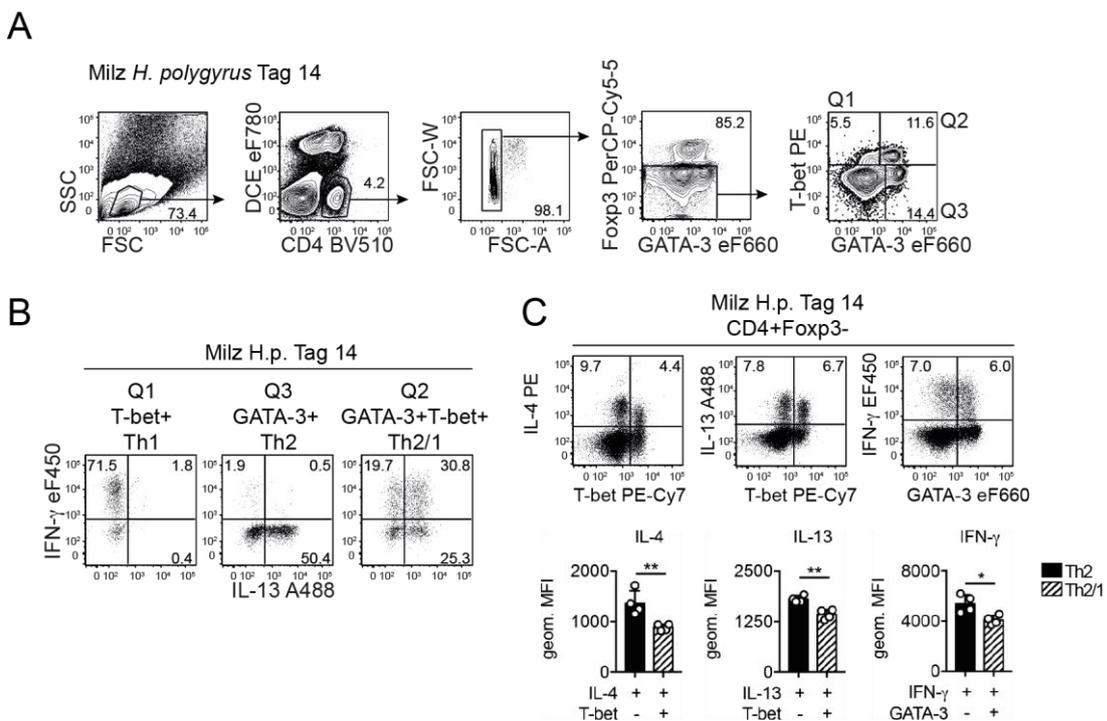


Abb. 3.1 Gatingstrategie für T-Helferzelltypen und deren Zytokinproduktion

(A) CD4⁺ T-Helferzellen aus der Milz einer C57BL/6 Maus am Tag 14 nach *H. polygyrus* Infektion wurden entsprechend der dargestellten Gatingstrategie durchflusszytometrisch analysiert. Nach Ausschluss von toten Zellen, Dubletten sowie Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen lassen sich in den verbleibenden CD4⁺ T-Helferzellen Th1-, Th2- sowie Th2/1-Zellen entsprechend der Expression von T-bet (Q1), GATA-3 (Q3) bzw. GATA-3/T-bet (Q2) nachweisen. (B) Die so definierten Phänotypen weisen klar voneinander abgegrenzte Expressionsprofile der Effektorzytokine IFN- γ und IL-13 auf. (C) Repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der Expression der Th1- und Th2-assozierten Zytokine und Transkriptionsfaktoren in T-Helferzellen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (geom. MFI) für die IL-4, IL-13 und IFN- γ -Zytokinsignale von Th2- und Th2/1- Zellen ist repräsentativ für Milzzellen aus einem Experiment am Tag 14 nach Infektion dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte über Mann-Whitney Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch *p \leq 0,05; **p \leq 0,01.

- Ergebnisse -

Um die Verteilung von Th2/1-Hybridzellen und klassischen Th2-Zellen in den durch eine intestinale Nematodeninfektion betroffenen Organen zu analysieren, wurde die Immunantwort gegen den Dünndarmnematoden *H. polygyrus* über den Verlauf der Infektion in hochempfindlichen C57BL/6 Mäusen untersucht. Dazu wurden die Mäuse mit 200 infektiösen Larven (L3) von *H. polygyrus* infiziert und die T-Helferzellantwort in der Milz, mesenterialen Lymphknoten (mesenterial lymph node; mLN) und der Lamina Propria des Dünndarmes (small intestinal/siLP) während der frühen, akuten und chronischen Phase der Infektion analysiert.

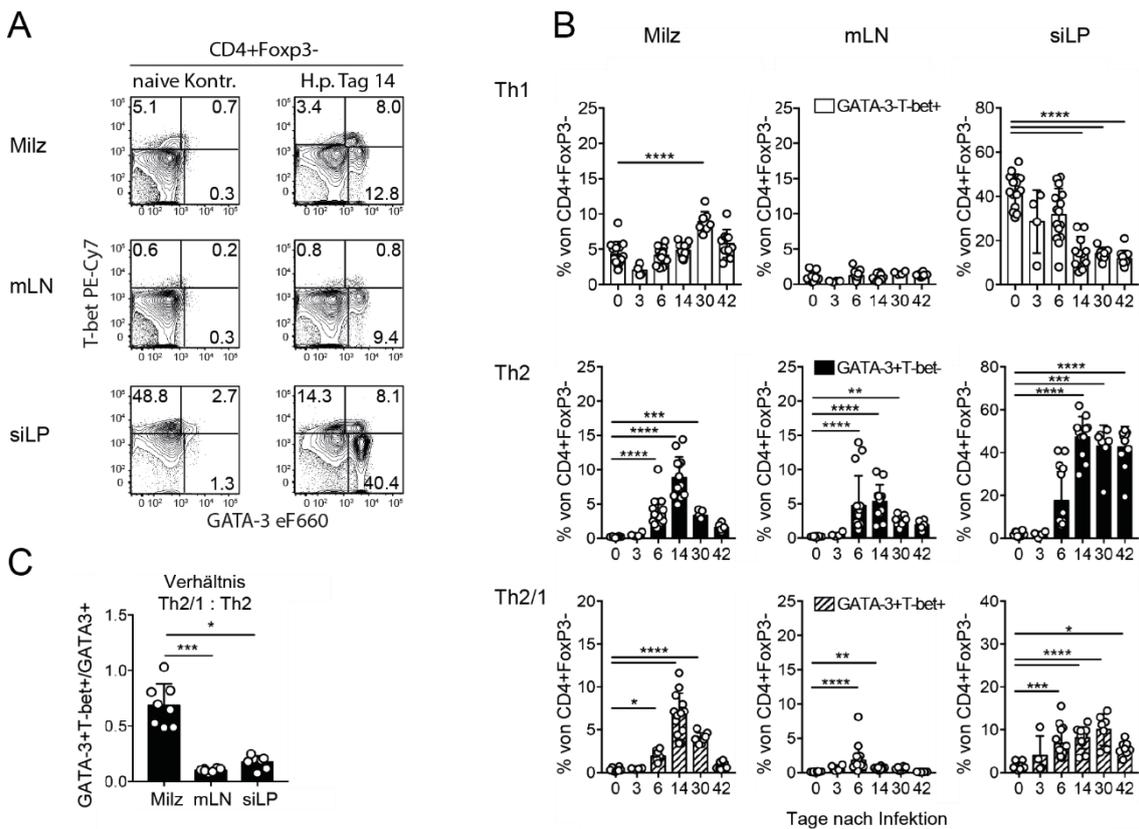


Abb. 3.2 T-Helferzellantwort während verschiedener Phasen der *H. polygyrus* Infektion

T-Helferzellantwort von C57BL/6 Mäusen 3 – 42 Tage nach Infektion mit *H. polygyrus*. Zellisolate der Milz, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Lamina Propria des Dünndarmes (siLP) wurden analysiert. **(A)** Repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet in T-Helferzellen. **(B)** Kinetik der Th1-, Th2- und Th2/1-Zellantwort basierend auf der Transkriptionsfaktoranalyse. **(C)** Verhältnis von Th2/1-Hybridzellen zu Th2-Zellen 14 Tage nach *H. polygyrus*. Die Daten stammen aus 1 – 3 unabhängigen Experimenten mit 4 – 6 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über einfaktorische ANOVA. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Zwei Wochen nach der Infektion mit *H. polygyrus* sind GATA-3⁺T-bet^{neg.} (klassische) Th2-Zellen in allen untersuchten Organen im Vergleich zur naiven Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 3.2 A, B). Weiterhin ist ein signifikanter Anstieg von GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1-Hybridzellen zwischen den Tagen sechs und 14 nach der *H. polygyrus* Infektion in allen Organen zu beobachten (Abb. 3.2 B). Dies ist besonders deutlich in der Milz zu sehen,

- Ergebnisse -

wo am Tag 14 nach Infektion das höchste Verhältnis von Th2/1-Hybridzellen zu Th2-Zellen nachweisbar ist (Abb. 3.2 C). Damit sind also Th2/1-Hybridzellen sowohl in den lymphatischen Organen als auch im durch Nematoden befallenen Dünndarm deutlich nachweisbar. Besonders prominent sind Th2/1-Hybridzellen in der Milz von *H. polygyrus* infizierten Tieren.

- Ergebnisse -

3.1.2 Infestation durch *Ixodes ricinus*

Sämtliche bisher durchgeführten Studien unserer und weiterer Arbeitsgruppen zur Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen in Antwort auf Infektionserreger wurden in Infektionen mit den Helminthen *Schistosoma mansoni*, *H. polygyrus* sowie *Strongyloides ratti* und *S. stercoralis* durchgeführt [119-122, 130]. All diese Infektionen führen zu starken Th2-Zellantworten im Wirt. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch experimentelle Zeckeninfestationen zu starken Th2-Antworten führen [131]. Daher sollte nun überprüft werden, ob auch ein Th2-Immunantwort auslösender Ektoparasit wie die Zecke *Ixodes ricinus* zur Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen führt.

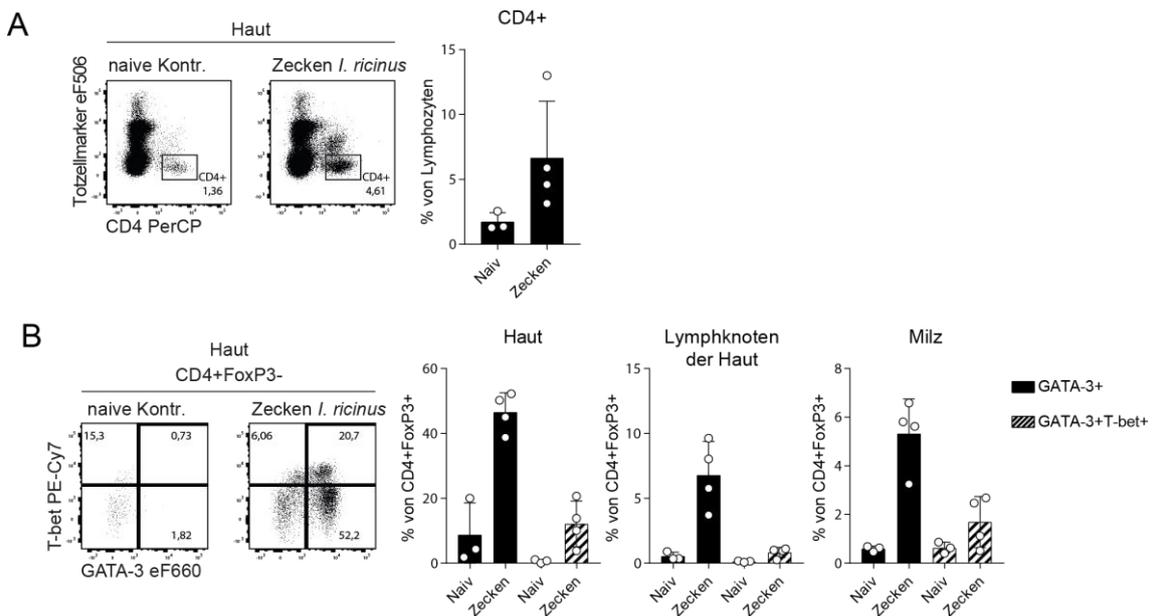


Abb. 3.3 T-Helferzellantwort in Mäusen befallen mit der Zecke *Ixodes ricinus*

C57BL/6 Mäuse wurden mit 50 Larven der Zecke *I. ricinus* infiziert und die Immunantwort in der Milz, der Haut und Lymphknoten der Haut am Tag 6 nach Infestation analysiert. **(A)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots und Frequenzen der CD4⁺ T-Helferzellen in der Haut naiver und befallener Tiere. **(B)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots und Frequenzen von GATA-3⁺ Th2- und T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1-Zellen in der Haut, den Lymphknoten der Haut und in der Milz.

Sechs Tage nach der Infestation fanden sich deutlich erhöhte Frequenzen von CD4⁺ T-Helferzellen in der Haut der Mäuse (Abb. 3.3 A). Diese beinhalteten neben Th2-Zellen auch GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1-Hybridzellen. Th2- und Th2/1-Zellen waren ebenso in Milz sowie in den hautdrainierenden Lymphknoten zu beobachten (Abb. 3.3 B).

Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass sowohl eine intestinale Nematodeninfektion wie auch eine Infestation durch Zecken zur Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen neben klassischen Th2-Zellen führte. Demnach scheint die Lokalisation des auslösenden Erregers keine Rollen bei der Th2- versus Th2/1-Zelldifferenzierung zu spielen.

3.2 Funktion, Herkunft und Mikrobiota-Unabhängigkeit von Th2/1-Hybridzellen in *H. polygyrus* Infektionen

3.2.1 Th2/1-Hybridzellen sind die dominante parasiten-spezifische IFN- γ -Quelle in *H. polygyrus* Infektionen

IFN- γ ist als Effektorzytokin von Th1-Zellen wichtig bei der Immunabwehr gegen Viren, Bakterien und Protozoen. Darüber hinaus ist IFN- γ in der Lage das Th2-assoziierte Effektorzytokin IL-4 zu inhibieren [127, 128]. Wie in Abb. 3.1 und früheren Studien gezeigt sind Th2/1-Hybridzellen in der Lage, IFN- γ zu exprimieren [120, 122]. Daher wurde untersucht, ob sich die Produktion von IFN- γ in der *H. polygyrus* Infektion verändert und ob die Stärke dieser Reaktion die Verteilung von Th2/1-Hybridzellen in den verschiedenen Organen widerspiegelt.

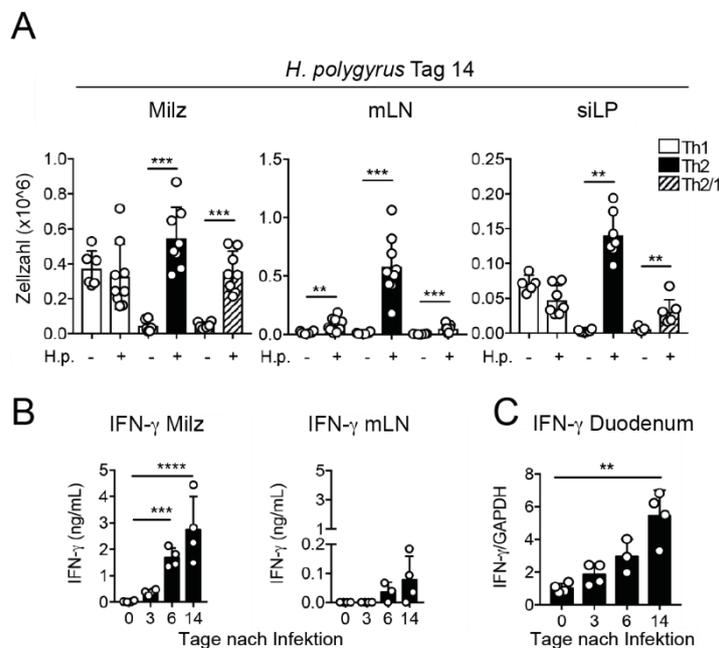


Abb. 3.4 Systemische und lokale IFN- γ Aktivität während *H. polygyrus* Infektion

C57BL/6 Mäuse wurden mit 200 infektiösen Larven von *H. polygyrus* infiziert. **(A)** Zellzahl der Th1-, Th2- und Th2/1-Zellen in der Milz, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Lamina Propria des Dünndarmes (siLP). **(B-C)** Die *H. polygyrus*-spezifische IFN- γ Produktion von Zellen der Milz und mesenterialen Lymphknoten wurde per ELISA untersucht. Die IFN- γ Expression im Dünndarmgewebe wurde per qPCR analysiert. **(B)** 10⁶ Milz- bzw. mesenteriale Lymphknotenzellen wurden mit 50 μ g/mL *H. polygyrus* Antigen für fünf Tage stimuliert. Die IFN- γ Konzentration wurde in den Zellüberständen gemessen. **(C)** Die Detektion von IFN- γ von Dünndarmextrakten erfolgte mittels qPCR. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit 3 – 4 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über Kruskal-Wallis Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001.

Die Untersuchung *H. polygyrus* infizierter C57BL/6 Tiere zeigte, dass die IFN- γ -Produktion in allen untersuchten Organen im Infektionsverlauf ansteigt. Insbesondere Milzzellen setzen nach Stimulation mit *H. polygyrus* Antigen größere Mengen von IFN- γ frei, wohingegen Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten nur geringe Mengen des

- Ergebnisse -

Zytokine produzieren (Abb. 3.4 B). Auch im Gewebe des Dünndarms nimmt die Expression von IFN- γ über den Infektionsverlauf zu (Abb. 3.4 C). Dies spiegelt den in Abb. 3.2 B und Abb. 3.4 A dargestellten erhöhten Anteil von Th2/1-Hybridzellen in Milz und Dünndarm von Nematoden-infizierten Tieren wider.

In der Folge wurde untersucht, ob die parasiten-spezifische IFN- γ Produktion auf die Th2/1-Hybridzellen zurückzuführen ist oder ob Th1-Zellen dazu beitragen. Nach Erkennung von im MHCII-Kontext präsentierten Antigenen exprimieren T-Helferzellen den Marker CD40-L, der wiederum durch spezifische Antikörper nachgewiesen und durchflusszytometrisch gemessen werden kann [132-135]. Dies ermöglicht die genaue Untersuchung von Pathogen-spezifischen T-Helferzellantworten anhand der Expression von Transkriptionsfaktoren und Effektorzytokinen.

Um zu klären, welche CD4⁺ T-Zellen in der Nematodeninfektion IFN- γ produzieren, wurden Zellen aus Milz, mesenterialen Lymphknoten und Dünndarmgewebe von früh, akut und chronisch *H. polygyrus* infizierten Mäusen isoliert. Die Zellisolate wurden mit aus Knochenmark generierten dendritische Zellen kokultiviert, welche zuvor für zwölf Stunden mit Antigenextrakten von *H. polygyrus* prä-inkubiert wurden. Wie in Abb. 3.5 gezeigt lassen sich so parasiten-spezifische CD4⁺CD40-L⁺ T-Zellen in allen untersuchten Organen infizierter Tiere nachweisen. Auffallend ist dabei, dass nur ein sehr kleiner Teil der CD4⁺ T-Zellen auf die Stimulation mit Parasitenantigenen mit erhöhter CD40-L- und Zytokinexpression reagiert, während ein Großteil der in der Infektion gebildeten GATA-3⁺ T-Helferzellen nicht auf die Stimulation reagiert. Bei letzteren Zellen handelt es sich vermutlich um sogenannte ‚Bystander‘ Zellen mit unbekannter Antigenspezifität, welche die Immunreaktion auf den Parasiten möglicherweise unterstützen [136].

- Ergebnisse -

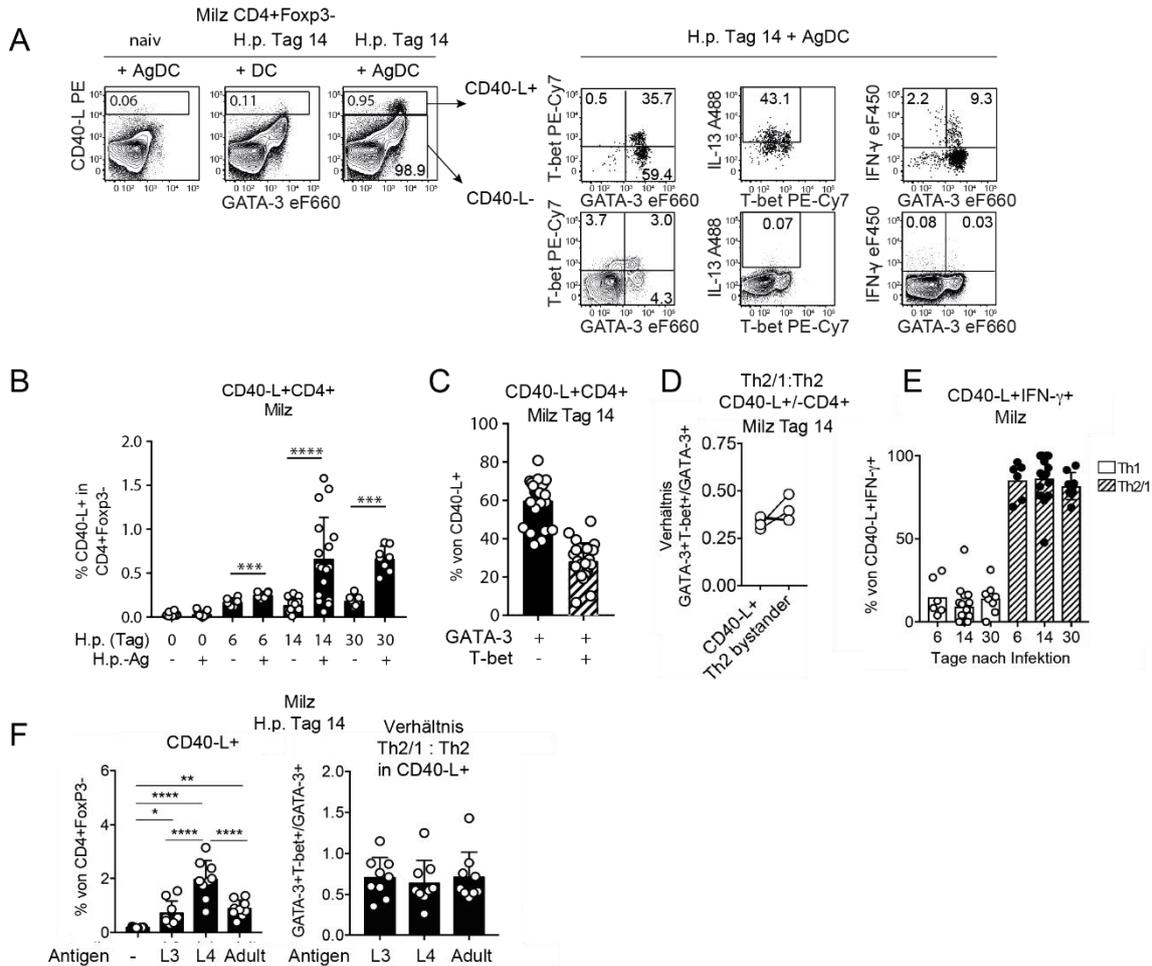


Abb. 3.5 Nachweis der parasiten-spezifischen Produktion von IFN- γ durch Th2/1-Zellen

Milzzellen aus *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 Mäusen wurden mit dendritischen Zellen, die 12 h mit *H. polygyrus* Antigen behandelt wurden (AgDC), für sechs Stunden kokultiviert. Als Kontrolle diente die Kokultur mit dendritischen Zellen ohne Antigen (DC) sowie die Kokultur von Zellen uninfizierter Kontrollen mit AgDC. **(A)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der CD40-L Expression durch T-Helferzellen nach Inkubation mit AgDC bzw. unbeladenen DC. **(B)** Frequenzen der CD40-L Expression durch T-Helferzellen nach Inkubation mit AgDC bzw. unbeladenen DC. **(C)** Frequenzen von CD40-L⁺ Antigen-spezifischen GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1- und GATA-3⁺Th2-Zellen in der Milz am Tag 14 nach Infektion. **(D)** Verhältnis GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1- zu GATA-3⁺Th2-Zellen in der CD40-L⁺ Antigen-spezifischen und CD40-L^{neg}. Bystander Population in der Milz an Tag 14. **(E)** Frequenzen von IFN- γ produzierenden Th2/1- und Th1-Zellen in antigen-spezifischen CD40-L⁺ Zellen der Milz zu verschiedenen Infektionszeitpunkten. **(F)** Antigen-spezifische T-Helferzellantwort der Milzzellen von C57BL/6 Mäusen zu Antigen des infektiösen Larvenstadiums (L3), der Larve, die in der Submukosa des Dünndarms sitzt (L4) und den adulten Würmern von *H. polygyrus*. Verhältnisse von T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1- zu GATA-3⁺ Th2-Zellen in den CD40-L⁺ antigen-spezifischen T-Helferzellen. Die dargestellten Daten stammen aus 2-3 unabhängigen Experimenten, wobei nicht alle infizierten Tiere ausreichend IFN- γ ⁺ Zellen zur weiteren Phänotypanalyse aufwiesen. (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über Kruskal-Wallis Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001.

Wie in Abb. 3.5 gezeigt, besteht die antigenspezifische CD40-L⁺ T-Helferzellpopulation vorrangig aus GATA-3⁺ Th2- und Th2/1-Zellen. Die Produktion von IL-13 und IFN- γ ist erwartungsgemäß auf die CD40-L⁺ Zellpopulation beschränkt (Abb. 3.5 A). Der Großteil der zu verschiedenen Infektionszeitpunkten in Milz nachgewiesenen CD40-L⁺IFN- γ ⁺ T-Helferzellen exprimiert den Transkriptionsfaktor GATA-3 und weist damit einen Th2/1-Hybridphänotyp auf (Abb. 3.5 E). Damit sind in den lymphatischen Organen also

- Ergebnisse -

hauptsächlich Th2/1-Hybridzellen und nicht Th1-Zellen für die parasiten-spezifische Produktion von IFN- γ verantwortlich. Weiter ist festzuhalten, dass CD40-L⁺ parasiten-spezifische und CD40-L^{neg.} ‚Bystander‘ GATA-3⁺ T-Zellen ähnliche Verhältnisse von Th2- und Th2/1-Zellen aufweisen (Abb. 3.5 D), worauf im folgenden Abschnitt eingegangen wird. Darüber hinaus wurde zusätzlich die Reaktivität der T-Helferzellen auf Antigene der Larvenstadien drei (L3) und vier (L4) am Tag 14 nach Infektion überprüft (Abb. 3.5 F). Hier zeigte sich eine deutlich höhere Reaktivität von T-Helferzellen gegenüber Antigenen des in der Submukosa des Dünndarms sitzenden L4-Stadiums. Interessanterweise ist kaum eine antigen-spezifische Aktivierung der T-Helferzellen durch L3-Antigene zu erkennen. Der Unterschied der verschiedenen hohen Spezifität der Antigene scheint jedoch keinen Einfluss auf das Verhältnis der GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1- zu GATA-3⁺T-bet^{neg.} Th2-Zellen zu haben. Wenn nicht anders angegeben, wurde für die parasiten-spezifische Detektion Antigene von adulten Würmern genommen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Anstieg der IFN- γ Produktion in der Milz sowie dem Dünndarm während einer Infektion mit dem gastrointestinalen Nematoden *H. polygyrus* mit dem Anstieg der Th2/1-Hybridzellen in Zusammenhang steht und dass Th2/1-Hybridzellen die Hauptquelle der parasiten-spezifischen IFN- γ Produktion darstellen.

3.2.2 Th2/1-Hybridzellen entwickeln sich aus naiven T-Helferzellen

Eine frühere Studie hat gezeigt, dass Helmintheninfektionen die Konversion von Th1-Zellen in Th2/1- und Th2-Zellen auslösen können [137]. Zudem konnte anhand der CD40-L- und Zytokinexpressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass nur ein kleiner Teil der in der *H. polygyrus*-Infektionen gebildeten GATA-3⁺ T-Zellen spezifisch auf Parasitenantigene reagiert (Abb. 3.5). Es stellte sich damit die Frage, ob die in der *H. polygyrus*-Infektion detektierten Th2/1-Hybridzellen hauptsächlich aus naiven T-Zellen hervorgehen oder ob Th1-Zellen durch Konversion wesentlich zur Ausbildung der Th2/1-Hybridantwort beitragen. Letztere Frage wurde indirekt überprüft, indem der Anteil von T-bet-koexprimierenden Zellen im parasiten-spezifischen (CD40-L⁺) sowie im ‚Bystander‘-Anteil (CD40-L^{neg.}) der GATA-3⁺ Population verglichen wurde (Abb. 3.5 D). Unter der Annahme, dass parasiten-spezifische Effektorzellen bei Erstkontakt mit dem Pathogen aus naiven, T-bet^{neg.} Vorläufern entstehen, wohingegen ‚Bystander‘-Zellen auch aus bereits in großer Zahl vorhandenen Th1-Zellen hervorgehen könnten, müsste der Anteil von Th2/1-Zellen in CD40-L⁺ Zellen deutlich geringer ausfallen als in der ‚Bystander‘-Population. Wie in Abbildung Abb. 3.5 D gezeigt finden sich jedoch in beiden Populationen ähnliche Anteile von Th2/1-Hybridzellen. Damit erscheint es unwahrscheinlich, dass die in der Infektion nachgewiesenen Th2/1-Hybridzellen hauptsächlich durch Konversion von Th1- zu Th2/1-Zellen entstehen. Zudem konnte in zuvor durchgeführten Studien gezeigt werden, dass Th2/1-Hybridzellen *in vitro* aus naiven T-Zellen generiert werden können [120, 122]. Um zu zeigen, dass naive T-Zellen auch in der Infektion in Th2- als auch Th2/1-Zellen differenzieren, wurden naive T-Helferzellen über adoptiven Transfer in C57BL/6 Mäuse übertragen, die anschließend mit *H. polygyrus* infiziert wurden. Um später die transferierten T-Zellen identifizieren zu können, wurden T-Zellen aus CD90.1⁺ kongenen Spendertieren in CD90.2⁺ Empfänger transferiert (Abb. 3.6). Nach zehn Tagen wurde der Phänotyp der transferierten sowie endogenen T-Helferzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

- Ergebnisse -

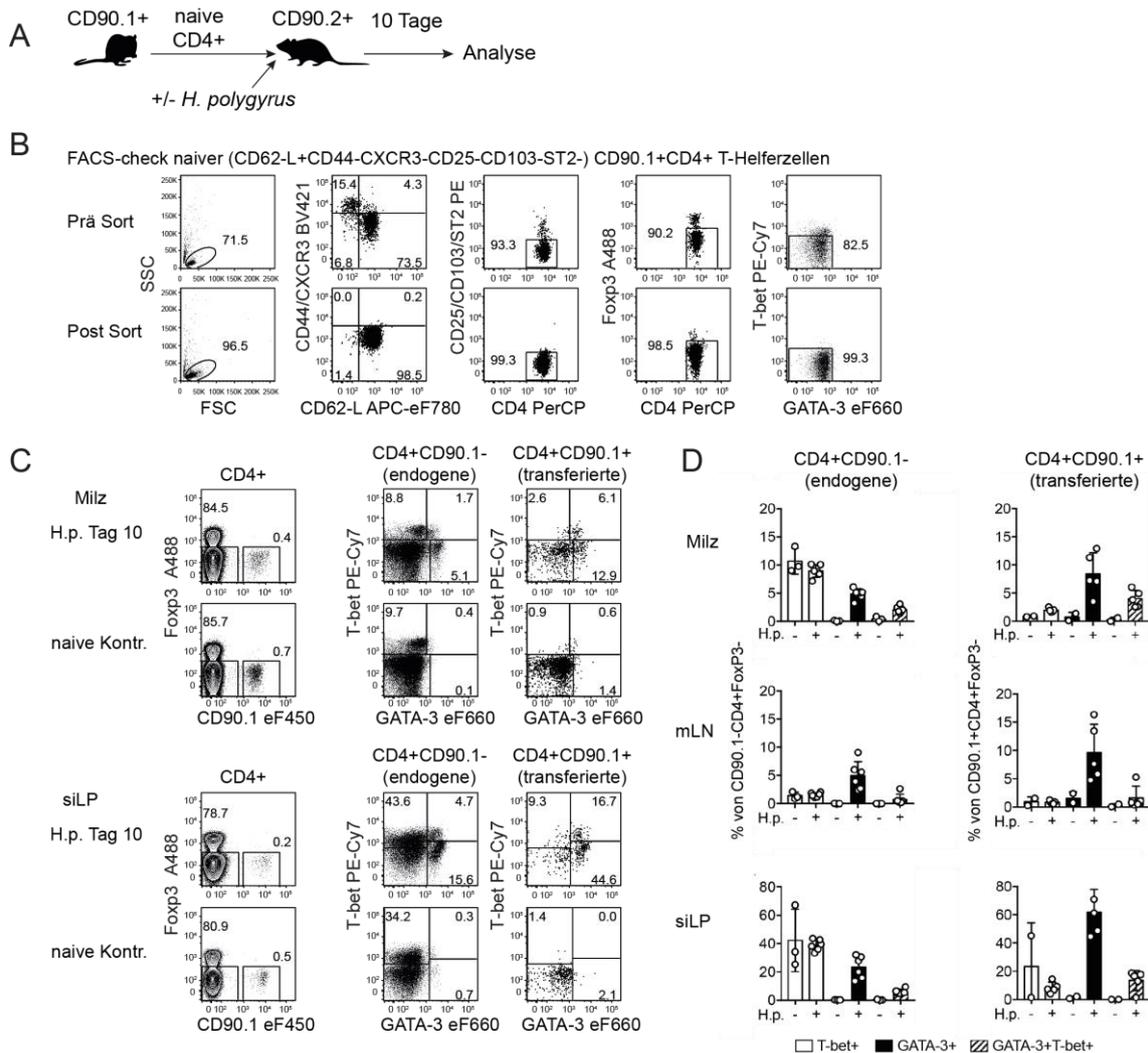


Abb. 3.6 Th2/1-Hybridzellen entstehen aus naiven T-Zellen während einer Nematodeninfektion

1 – 2x10⁶ naive CD62-L⁺CD44⁻CD25⁻CD103⁻ST2⁻CXCR3⁻CD90.1⁺ T-Helferzellen wurden in kongene CD90.2⁺ C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert, die anschließend mit *H. polygyrus* infiziert wurden. **(A)** Schema des adoptiven Transfers von naiven T-Helferzellen. **(B)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots, die die CD4⁺ T-Helferzellen vor und nach der fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) naiver CD62-L⁺CD44⁻CD25⁻CD103⁻ST2⁻CXCR3⁻ Zellen zeigt. **(C)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots, die die GATA-3 und T-bet Expression der endogenen CD90.2⁺CD90.1⁻ und transferierten CD90.1⁺ T-Helferzellen in Milz und Dünndarm zehn Tage nach Transfer und Infektion mit *H. polygyrus* zeigen. **(D)** Frequenzen von T-bet⁺ Th1-, GATA-3⁺ Th2- und T bet⁺GATA-3⁺ Th2/1-Zellen in den endogenen CD90.2⁺CD90.1⁻ und transferierten CD90.1⁺ Zellen der Milz, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und des Dünndarmes (siLP). Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 1-2 uninfizierten und 2-3 infizierten Empfängertieren (Mittelwert ± SD).

Zehn Tage nach Transfer und Infektion können sowohl in endogenen CD90.2⁺ wie auch in transferierten CD90.1⁺ T-Zellen neben GATA-3⁺ Th2-Zellen eine deutlich ausgebildete GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1-Hybridzellpopulation in Milz und Dünndarm nachgewiesen werden (Abb. 3.6 C,D). Entsprechend der in Abb. 3.2 aufgezeigten Verteilung von Th2/1-Hybridzellen überwiegen in endogenen und transferierten Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten hingegen klassische Th2-Zellen (Abb. 3.6 D). Zusammenfassend konnte also nachgewiesen werden, dass naive CD4⁺ T-Zellen in der *H. polygyrus*-Infektion zu Th2- als auch Th2/1-Zellen differenzieren und das Th2/1-Hybridzellen auch nach

- Ergebnisse -

Transfer naiver T-Zellen und anschließender Effektorzellausbildung besonders prominent in der Milz vertreten sind. Der Nachweis ähnlicher Th2/1-Hybridzellanteile in parasiten-spezifischen sowie ‚Bystander‘-Zellen spricht gegen die Konversion von Th1-Zellen als einen prominenten Mechanismus der Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen in der *H. polygyrus* Infektion. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der Hauptteil der in Nematodeninfektionen induzierten Th2/1-Hybridzellen aus naiven T-Helferzellen entsteht.

3.2.3 Die Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen ist unabhängig von der Mikrobiota

Nach oraler Aufnahme der infektiösen *H. polygyrus* Larve gelangt diese in den Dünndarm und ist dort umgeben von der Mikrobiota des Wirts. Für die erste Häutung innerhalb des Wirts und endgültige Entwicklung zum adulten Wurm dringen die Larven in die Submukosa des Dünndarmgewebes ein. Dabei könnten ebenso Bakterien, Viren und Pilze in das Gewebe des Dünndarms eindringen und zum Induzieren einer Th1-gerichteten Immunantwort führen. Da *H. polygyrus* eine Th2-gerichtete Immunantwort auslöst, könnten diese verschiedenen Signale zum Auftreten der Th2/1-Hybridzellen führen. Um diese Nebenhypothese zu überprüfen wurden keimfreie Mäuse mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert und die T-Helferzellantwort mit der einer Kontrollgruppe mit normaler Mikrobiota (bis auf die *H. polygyrus*-Infektion spezifisch Pathogen-frei, SPF) verglichen. Um mikrobielle Kontaminationen auszuschließen wurden die Infektionslarven vor Verabreichung für eine Woche in einem Antibiotika-Cocktail gehalten und die keimfreien Mäuse über den Infektionsverlauf über das Trinkwasser mit diesen Antibiotika weiter behandelt. Mikrobiologische und PCR-Analysen des Infektionsmaterials sowie des Kots der Tiere bei Sektion bestätigten die Abwesenheit von bakteriellen Kontaminationen (Daten nicht gezeigt).

- Ergebnisse -

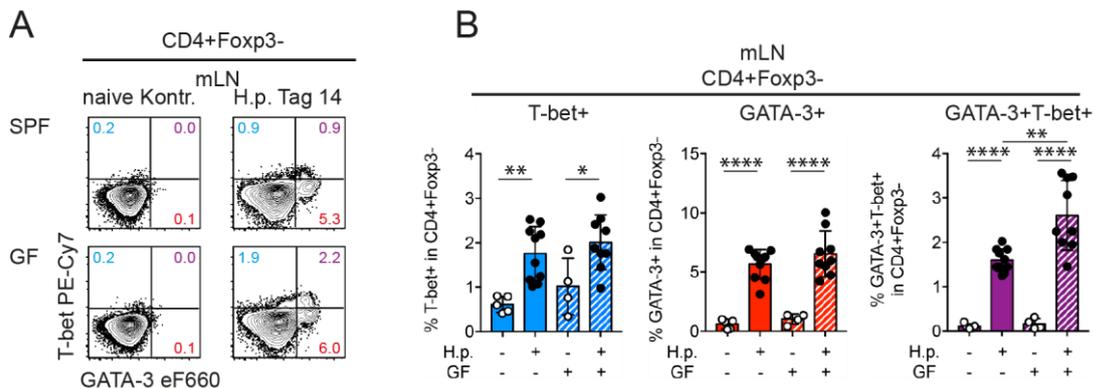


Abb. 3.7 T-Helferzellantwort in C57BL/6 mit und ohne Mikrobiota

Spezifisch Pathogen-freie (SPF) und keimfreie (GF) C57BL/6 Mäuse wurden mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert. Die Analyse der T-Helferzellantwort erfolgte 14 Tage nach Infektion. Die Mikrobiota-freien Mäuse erhielten zusätzlich Antibiotika über das Trinkwasser, um den keimfreien Status aufrecht zu erhalten. **(A)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der GATA-3 und T-bet Expression von T-Helferzellen in SPF und GF C57BL/6 Mäusen. **(B)** Frequenzen von T-bet⁺ Th1-, GATA-3⁺ Th2- und T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten (mLN). Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 2-5 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert ± SD). Die statistische Analyse erfolgte über Kruskal-Wallis Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ****p ≤ 0,0001.

Wie in Abb. 3.7 gezeigt, verläuft die T-Helferzellantwort gegen *H. polygyrus* in keimfreien und konventionell gehaltenen Tieren ähnlich. Neben einem leichten Anstieg von Th1-Zellen weisen die mesenterialen Lymphknoten nach Infektion stark erhöhte Frequenzen von Th2- und Th2/1-Zellen auf. Die Mikrobiota spielt also für Th2/1-Hybridzellinduktion in intestinalen Nematodeninfektionen keine Rolle.

3.3 Einfluss des Wirtgenotyps auf den Verlauf der *H. polygyrus* Infektion und der Th2/1-Zelldifferenzierung

3.3.1 Unterschiedliche Empfänglichkeit von C57BL/6 und BALB/c Mäusen für *H. polygyrus* Infektionen

Zahlreiche Studien belegen Differenzen in der Empfänglichkeit von Mauslinien mit verschiedenem genetischem Hintergrund für die Infektion durch *H. polygyrus* und andere Darmnematoden [125, 138, 139]. Dabei sind C57BL/6 Mäuse sehr empfänglich für die *H. polygyrus* Infektion, da sie mehrere Monate andauernde, chronische Infektionen ausbilden. BALB/c Mäuse hingegen sind deutlich resistenter und in der Lage, die Würmer innerhalb einiger Wochen auszutreiben [140-142]. Die Empfänglichkeit der beiden Linien für verschiedene Infektionserreger steht mit der Ausbildung unterschiedlicher Immunantworten in Zusammenhang. C57BL/6 Mäuse neigen begleitend zur Th2-Antwort zur Ausbildung von vergleichsweise starken IFN- γ -Antworten durch CD4⁺ T-Zellen, wohingegen BALB/c Mäuse, welche die Infektion effizienter kontrollieren, geringere IFN- γ Antworten ausbilden [125, 143]. In der vorliegenden Arbeit sollte die unterschiedliche Empfänglichkeit der beiden Mausstämme für die *H. polygyrus*-

- Ergebnisse -

Infektion verifiziert und die Frage überprüft werden, ob das Ausmaß der Th2/1-Zelldifferenzierung ein Faktor sein könnte, der die unterschiedliche Empfänglichkeit der beiden Mausstämmen für Wurminfektionen begründet.

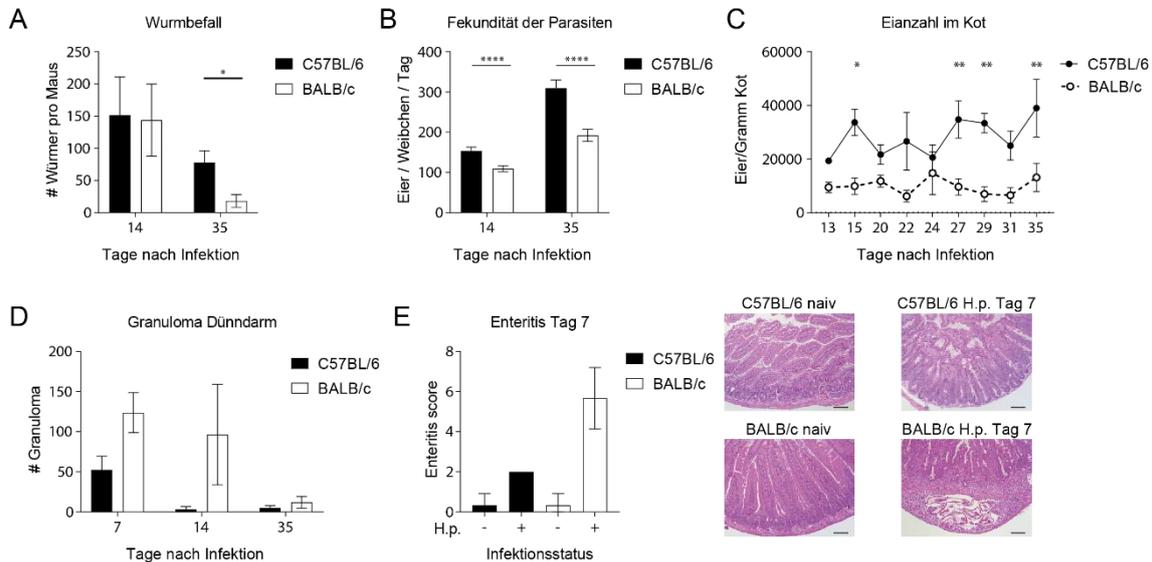


Abb. 3.8 *H. polygyrus* Infektion in C57BL/6 und BALB/c Mäusen

C57BL/6 und BALB/c Mäuse wurden mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion auf Wurmlast, Eiausscheidung sowie Entzündungsreaktionen hin untersucht. **(A)** Anzahl adulter Würmer im Darmlumen am Tag 14 bzw. 35 nach Infektion. **(B)** Fekundität weiblicher Nematoden (Produktion von Eiern innerhalb 24h *in vitro*) am Tag 14 und 35 nach Infektion. **(C)** Anzahl von Eiern pro Gramm Kotprobe der chronisch infizierten Mäuse über den Verlauf der Infektion. **(D)** Anzahl der Dünndarm-Granulome am Tag 7, 14 und 35 nach Infektion. **(E)** Histologischer Entzündungsscore des Dünndarms (Duodenum) und repräsentative Bilder von Dünndarmschnitten (H&E-Färbung) von naiven und für 7 Tage infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm. Die Daten stammen aus je 2 unabhängigen Experimenten pro Infektionszeitpunkten (Tag 7 und 14) bzw. einem Experiment (Tag 35) mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über Mann-Whitney Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

Wie in Abb. 3.8 und früheren Studien gezeigt, finden sich zwei Wochen nach Infektion ähnliche Wurmlasten in C57BL/6 und BALB/c Mäusen ([125], Abb. 3.8 A). Die unterschiedliche Empfänglichkeit für die *H. polygyrus*-Infektion zeigt sich jedoch am Tag 35 mit deutlich reduzierten Wurmlasten in BALB/c gegenüber C57BL/6 Tieren (Abb. 3.8 A). Darüber hinaus weisen weibliche aus BALB/c isolierte *H. polygyrus* Würmer sowohl am Tag 14 als auch 35 eine signifikant geringere Fekundität auf als aus C57BL/6 isolierte Parasiten (Abb. 3.8 B). Dies spiegelt sich in einer geringeren Zahl ausgeschiedener Wurmeier im Kot von infizierten BALB/c gegenüber C57BL/6 Mäusen wider (Abb. 3.8 C). Der Unterschied in der Anzahl ausgeschiedener Wurmeier spiegelt also nicht den Wurmbefall wider, sondern ist zusätzlich von der Fitness und damit der Produktionsfähigkeit der weiblichen Würmer abhängig. BALB/c Mäuse weisen darüber hinaus zu allen untersuchten Zeitpunkten eine höhere Anzahl an Granulomen auf (Abb. 3.8 D). Granulome sind Th2-abhängige, makroskopisch sichtbare Ansammlungen von Makrophagen sowie Lymphozyten, Granulozyten und Fibroblasten, die in sehr

- Ergebnisse -

beschränktem Maß in Erstinfektionen, besonders aber nach Re-Exposition zur Verkapslung und Abtötung des Parasiten führen. Weiterhin zeigen infizierte BALB/c eine stärkere Infiltration von Immunzellen im duodenalen Abschnitt des Dünndarms, das zu einen erhöhten Enteritis-Score im Vergleich zu naiven sowie infizierten C57BL/6 Mäusen führt (Abb. 3.8 E).

3.3.2 Th2/1-Zelldifferenzierung unterscheidet sich in Mäusen mit unterschiedlichem Genotyp

Wie bereits angesprochen hat eine frühere Studie gezeigt, dass *H. polygyrus* infizierte C57BL/6 Mäuse stärkere IFN- γ -Antworten durch CD4⁺ T-Zellen entwickeln als BALB/c Mäuse [125]. Hier sollte nun überprüft werden, ob sich das Ausmaß der Th2- und insbesondere der Th2/1-Zelldifferenzierung zwischen C57BL/6 Mäusen und den weniger empfänglichen BALB/c Tieren unterscheidet und ob die in C57BL/6 Mäusen prominent nachgewiesenen, IFN- γ -kompetenten Th2/1-Hybridzellen in BALB/c Tieren weniger stark vertreten sind.

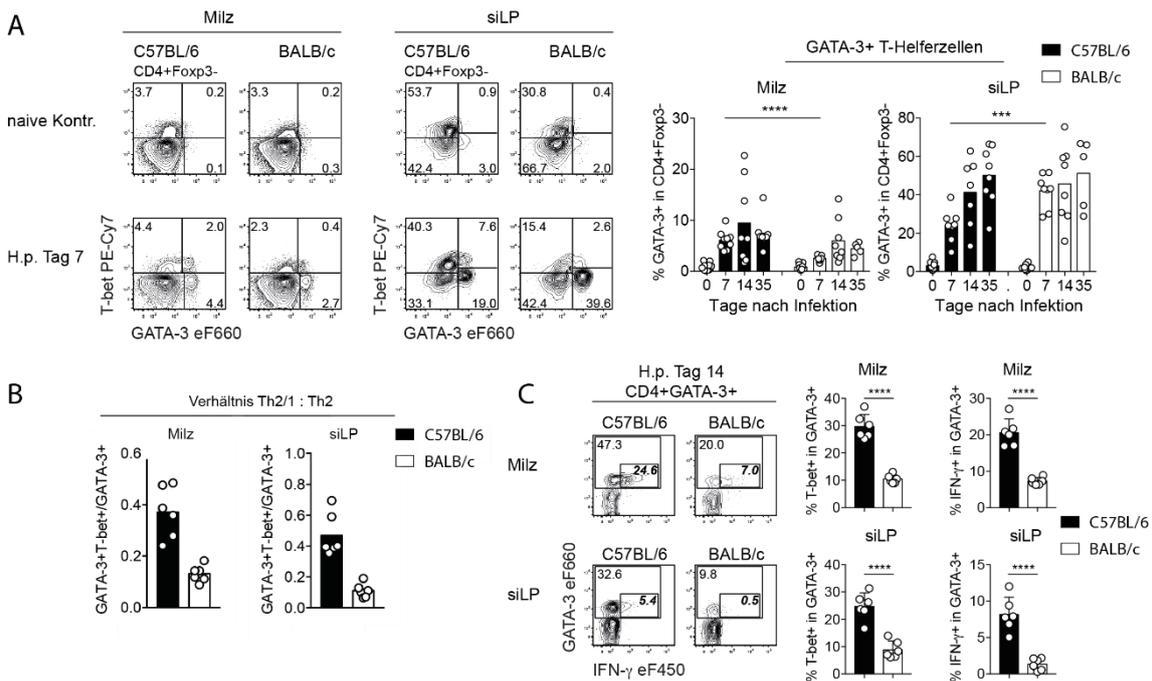


Abb. 3.9 Expansion, Migration und Phänotyp von GATA-3⁺ T-Helferzellen in *H. polygyrus*-infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen

Mäuse der beiden Linien wurden mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert und die Immunantwort 7, 14 und 35 Tage nach Infektion analysiert. **(A)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der Transkriptionsfaktorexpression von CD4⁺ T-Zellen und Frequenzen von GATA-3⁺ T-Helferzellen in der Milz bzw. in der Lamina Propria des Dünndarms (siLP). **(B)** Verhältnisse von T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1 zu GATA-3⁺ Th2 Zellen in Milz und der Lamina Propria des Dünndarms (siLP) am Tag 14. **(C)** Exemplarische Plots der T-bet und IFN- γ -Expression durch GATA-3⁺ Zellen aus Milz und Dünndarm sowie Frequenzen der T-bet⁺ bzw. IFN- γ ⁺ Th2/1-Hybridzellen in GATA-3⁺ Th2-Zellen. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über Mann-Whitney Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001.

- Ergebnisse -

Beide Mauslinien reagieren auf die *H. polygyrus* Infektion mit einer ähnlich stark ausgeprägten Expansion von CD4⁺GATA-3⁺ T-Zellen (Gesamtheit aller Th2- und Th2/1-Zellen) in der Milz (Abb. 3.9 A). Auch die nach zwei und fünf Wochen im Dünndarmgewebe detektierten Frequenzen von CD4⁺GATA-3⁺ T-Helferzellen unterscheiden sich zwischen C57BL/6 und BALB/c Mäusen nicht. Auffallend ist jedoch, dass sich die beiden Stämme in der frühen Infektionsphase unterscheiden: während BALB/c Mäuse nach einer Woche im Mittel bereits nahezu die maximal zu erreichende Frequenz von im Dünndarm akkumulierenden GATA-3⁺ T-Effektorzellen aufweisen, fällt der Wert in infizierten C57BL/6 Tieren zu diesem frühen Infektionszeitpunkt signifikant niedriger aus. Stattdessen lassen sich eine Woche nach Infektion in der Milz von C57BL/6 Tieren signifikant höhere Frequenzen von GATA-3-exprimierenden T-Helferzellen nachweisen (Abb. 3.9 A). Darüber hinaus unterscheidet sich die Zusammensetzung der GATA-3⁺ T-Helferzellen in allen untersuchten Organen. Aus Milz und Dünndarm von C57BL/6 Mäusen isolierte GATA-3⁺ T-Helferzellen beinhalten zu allen Analysezeitpunkten mehr GATA-3⁺T-bet⁺ und IFN- γ ⁺ Th2/1-Hybridzellen, wodurch sich höhere Verhältnisse von Th2/1- zu Th2-Zellen ergeben (Abb. 3.9 B,C exemplarisch für Tag 14). Die GATA-3^{neg}-T-bet⁺ Th1-Zellen nehmen dabei weder in BALB/c noch C57BL/6 Mäusen während der Infektion zu.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die erhöhte IFN- γ Produktion durch CD4⁺ T-Helferzellen [125] in *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 gegenüber BALB/c Mäusen mit der stärkeren Ausbildung von Th2/1-Hybridzellantworten einhergeht.

3.3.3 C57BL/6 und BALB/c Mausstämme bilden unterschiedlich starke parasiten-spezifische T-Helferzellantworten aus

Wie oben geschildert unterscheiden sich die durch *H. polygyrus* infizierte C57BL/6 und BALB/c Mäuse hinsichtlich der durch *H. polygyrus* infizierte C57BL/6 und BALB/c Mäuse ausgebildeten T-Helferzellantworten deutlich hinsichtlich des Anteils von Th2/1-Hybridzellen. Um zu überprüfen, ob sich weitere Unterschiede in der Funktionalität der T-Helferzellpopulationen von infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen nachweisen lassen, wurde die Reaktivität gegenüber Antigenen von *H. polygyrus* genauer untersucht.

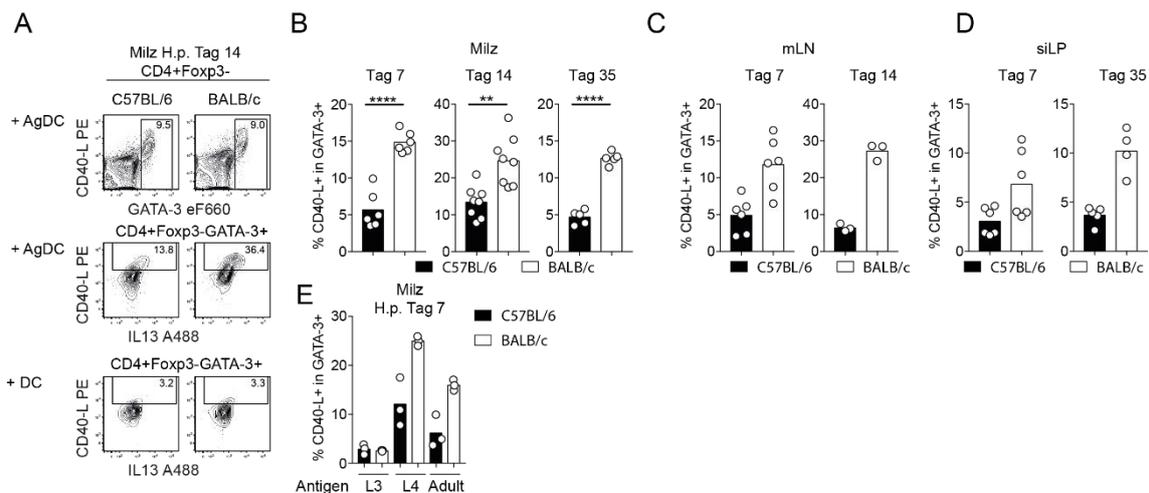


Abb. 3.10 Antigen-spezifische T-Zellantwort im empfänglichen Mausstamm C57BL/6 und eher resistenten Stamm BALB/c bei einer *H. polygyrus* Infektion

Mäuse der Stämme C57BL/6 und BALB/c wurden mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert und die Antigen-spezifische Immunantwort 7, 14 und 35 Tage nach der Infektion analysiert. Milzzellen aus *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen wurden mit dendritischen Zellen, die 12 h mit *H. polygyrus* Antigen vorbehandelt wurden (AgDC), für sechs Stunden kokultiviert. Als Kontrolle diente die Kokultur mit dendritischen Zellen ohne Antigen (DC). **(A)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots, die die Expression von GATA-3 und IL-13 in CD40-L⁺ Antigen-spezifischen T-Helferzellen sowie die Expression von IL-13 in CD40-L^{neg}. Antigen-unspezifischen T-Helferzellen in den beiden Mausstämmen zeigen. **(B-D)** Frequenzen von CD40-L⁺ Antigen-spezifischen T-Zellen in der totalen GATA-3⁺ T-Helferzellpopulation (Th2- und Th2/1-Zellen) in der Milz **(B)**, mesenterialen Lymphknoten (mLN) **(C)** und Zellen des Dünndarms (siLP) **(D)** 7, 14 und 35 Tage nach der Infektion. **(E)** Antigen-spezifische T-Helferzellantwort der Milzzellen von C57BL/6 und BALB/c Mäusen zu Antigenen des infektiösen Larvenstadiums (L3), der Larve, die in der Submukosa des Dünndarms sitzt (L4) und den adulten Würmern von *H. polygyrus*. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über Kruskal-Wallis Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

Dazu wurden Zellen aus der Milz, den mesenterialen Lymphknoten und dem Dünndarm infizierter C57BL/6 beziehungsweise BALB/c Mäuse zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten mit Antigenen des adulten Parasitenstadiums restimuliert und die Frequenzen reaktiver CD40-L⁺ Zellen in der CD4⁺GATA-3⁺ Zellpopulation bestimmt. *H. polygyrus* infizierte BALB/c Mäuse weisen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen zu allen untersuchten Infektionszeitpunkten in allen Organen höhere Frequenzen von parasiten-spezifischen CD40-L⁺ T-Helferzellen auf (Abb. 3.10 A-D). Um dies zu verifizieren, wurde zusätzlich die Reaktivität der T-Helferzellen auf Antigene der Larvenstadien am Tag 7

- Ergebnisse -

nach Infektion überprüft. Auch hier zeigte sich eine deutlich höhere Reaktivität von BALB/c T-Helferzellen gegenüber L4-Antigenen. (Abb. 3.10 E).

Zusammenfassend konnte also durch den Vergleich der Immunantwort zwischen den hoch empfänglichen C57BL/6 und resistenteren BALB/c Mausstämmen gezeigt werden, dass diese zwar ähnlich starke Antworten durch CD4⁺GATA-3⁺ T-Helferzellpopulation ausbilden, C57BL/6 im Vergleich zu BALB/c Mäusen jedoch einen höheren Anteil an T-bet/IFN- γ koexprimierenden Th2/1-Hybridzellen aufweisen. Zusammen mit einer schnelleren Akkumulation von Effektorzellen im parasitierten Dünndarmgewebe sowie der Ausbildung größerer parasiten-spezifischer Antworten trägt dies vermutlich zur effizienteren Kontrolle der Parasitenfitness und -zahl in BALB/c Mäusen bei.

Nachfolgend sollte überprüft werden, ob sich die Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen experimentell beeinflussen lässt und ob sich dies auf die Kontrolle Nematodeninfektion auswirkt.

3.4 Konsequenzen der experimentellen Unterstützung von Th2/1-Hybridzellantworten

3.4.1 IFN- γ ist wichtig für die Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen und unterstützt die Parasitenfitness in der akuten Infektionsphase

In einer vorhergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass *H. polygyrus* infizierte IFN γ -Rezeptor-knock out (IFN- γ R^{-/-}) Mäuse geringere Frequenzen von Th2/1-Hybridzellen ausbilden und dass damit IFN- γ wichtig für die Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen in der Infektion ist [120]. Hier sollte nun näher untersucht werden, ob eine Verschiebung des Th2/1- zu Th2-Zellverhältnisses Einfluss auf die Kontrolle der Parasiteninfektion hat. Dazu wurde die Immunantwort und die Kontrolle der Parasitenfitness durch IFN- γ kompetente C57BL/6 Wildtyp (WT) und IFN- γ R^{-/-} Tiere zwei Wochen nach Infektion verglichen. Eine zusätzliche Gruppe von WT Mäusen wurde mit rekombinanten IFN- γ behandelt, um zu prüfen, ob dies die Ausbeute von Th2/1-Hybridzellen unterstützt und sich auf *H. polygyrus* auswirkt. Da die Gabe hoher Mengen von IFN- γ die Ausbildung der Th2-Zellantwort gegen parasitische Nematoden blockieren kann [127], wurde in diesen Experimenten eine moderate Dosis von IFN- γ zweimal täglich über fünf Tage beginnend mit dem Infektionszeitpunkt intraperitoneal appliziert. Damit wurde die IFN- γ -Behandlung auf die frühe Phase der *H. polygyrus* Infektion und die damit verbundene Aktivierungsphase der T-Zellantwort beschränkt (Abb. 3.11 A).

- Ergebnisse -

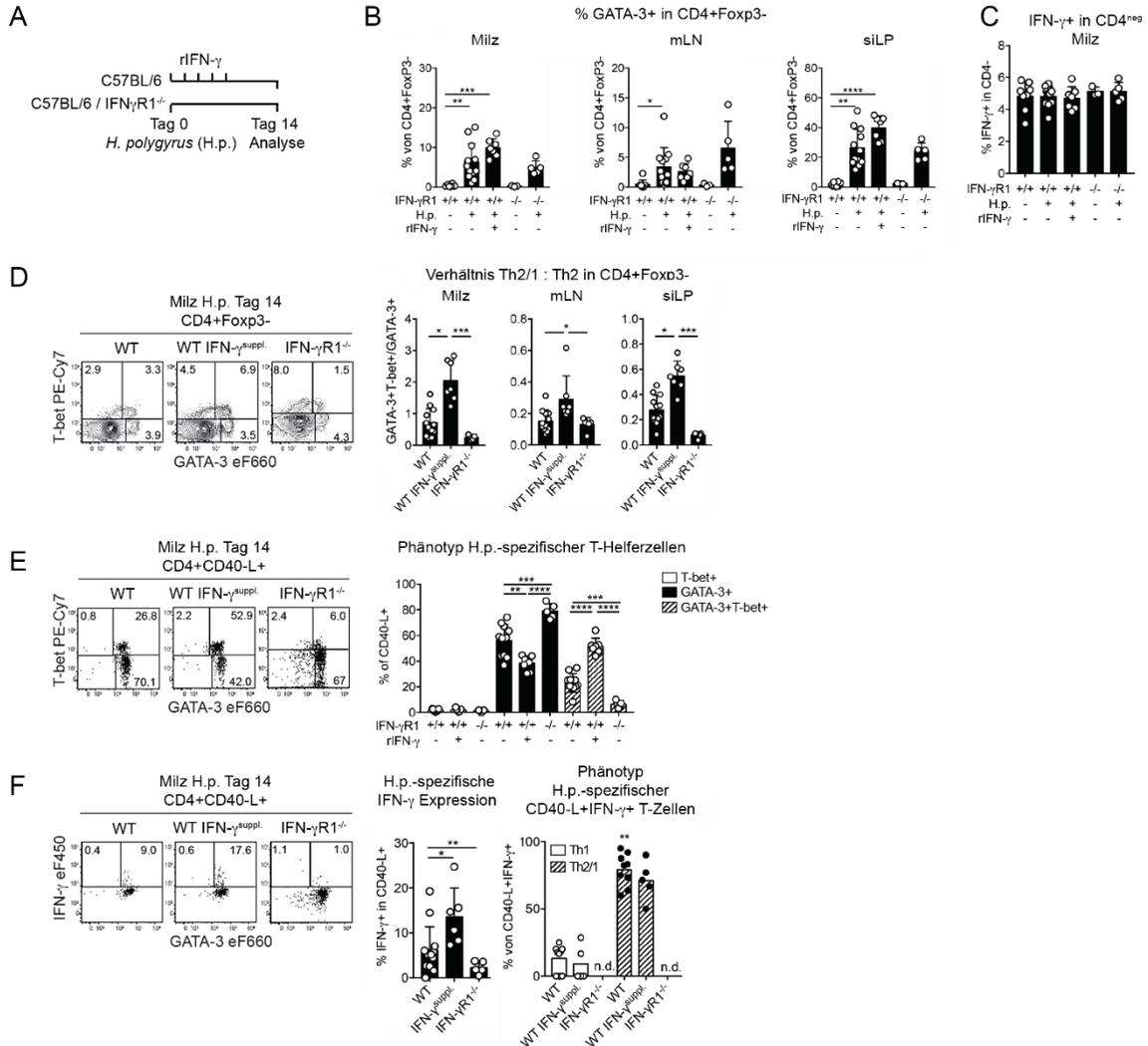


Abb. 3.11 Effekte der IFN γ Applikation und fehlender IFN γ -Signale auf die systemische T-Zellantwort von *H. polygyrus*-infizierten C57BL/6 Mäusen

C57BL/6 und IFN γ R1^{-/-} Mäuse wurden mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert. Zusätzlich wurde einer Gruppe von Wildtyp C57BL/6 Tieren (WT) während der ersten fünf Tage der Infektion zweimal täglich 2,5 μ g rekombinantes IFN γ (rIFN γ) injiziert. Die Analyse erfolgte am Tag 14 während der akuten Immunantwort gegen *H. polygyrus*. **(A)** Schema des Versuchsaufbaus und der drei Versuchsgruppen. **(B)** Statistische Auswertung der Frequenzen von der gesamten GATA-3⁺ Zellpopulation (Th2+Th2/1) ex vivo. **(C)** Frequenzen der IFN γ -produzierenden CD4^{neg} Zellen ex vivo. **(D)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots und statistische Auswertung der Verhältnisse von T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1- zu GATA-3⁺ Th2- Zellen ex vivo. **(E)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots und statistische Auswertung der Frequenzen von T-bet⁺ Th1-, GATA-3⁺ Th2- und T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1-Zellen in der *H. polygyrus* spezifischen CD40-L⁺ T-Helferzellpopulation nach Restimulation mit Parasitenantigenen. **(F)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots und statistische Auswertung der IFN γ Produktion durch Antigen-spezifische GATA-3⁺ T-Helferzellen sowie der Anteile von Th1- bzw. Th2/1-Zellen an der IFN γ produzierenden Population. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 2-4 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über einfaktorielles ANOVA und Kruskal-Wallis Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001.

Zunächst wurde überprüft, ob sich in Ausbildung der CD4⁺GATA-3⁺ T-Zellantwort in Abwesenheit von IFN γ -Signalen beziehungsweise nach transients IFN γ -Gabe unterscheidet. Wie in Abb. 3.11 B gezeigt lassen sich unter beiden Bedingungen ähnliche Frequenzen von GATA-3⁺ T-Helferzellen (Gesamtheit aller Th2 und Th2/1) wie in der unbehandelten WT-Kontrollgruppe nachweisen. Darüber hinaus wurde überprüft,

- Ergebnisse -

ob die kurzzeitige Behandlung mit IFN- γ während der *H. polygyrus* Infektion zu unerwünschten Nebeneffekten auf andere potenzielle IFN- γ Quellen führt. IFN- γ -behandelte beziehungsweise unbehandelte WT Tiere wiesen ähnliche Frequenzen von T-bet⁺IFN- γ ⁺ Th1-Zellen sowie CD4^{neg}IFN- γ ⁺ Zellen in der Milz auf (Abb. 3.11C, F). Auch in IFN- γ R^{-/-} Mäusen fanden sich ähnliche Frequenzen von CD4^{neg}IFN- γ ⁺ Produzenten (Abb. 3.11 C).

Nachdem demnach sichergestellt war, dass weder die Differenzierung GATA-3⁺ T-Helferzellen noch die Reaktionen von Th1-Zellen und anderen potenziellen IFN- γ -Quellen durch die frühe IFN- γ -Gabe betroffen war, wurde überprüft, ob sich der Anteil an Th2/1-Hybridzellen zwischen den Infektionsgruppen unterscheidet. Tatsächlich führte die IFN- γ -Behandlung zu erhöhten Frequenzen von GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1-Hybridzellen und höheren Th2/1- zu Th2-Zellverhältnissen in allen untersuchten Organen (Abb. 3.11 D). Wie aus früheren Untersuchungen zu erwarten [120], war in IFN- γ R^{-/-} Mäusen das Gegenteil der Fall (Abb. 3.11 D). Besonders deutlich wurden diese Unterschiede bei der Untersuchung *H. polygyrus*-spezifischer CD40-L⁺ T-Helferzellen aus der Milz (Abb. 3.11 E,F): Die IFN- γ Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg von Th2/1-Hybridzellen und geringeren Frequenzen von klassischen Th2-Zellen. IFN- γ R^{-/-} Tiere hingegen bildeten einen größeren Anteil an Th2-Zellen und kaum Th2/1-Hybridzellen aus (Abb. 3.11 E). Dies konnte auch auf Zytokinbasis bestätigt werden, da die IFN- γ -Produktion von *H. polygyrus*-spezifischen CD40-L⁺ T-Helferzellen in IFN- γ behandelten WT Tieren erhöht beziehungsweise in IFN- γ R^{-/-} vermindert war (Abb. 3.11 F). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch nach IFN- γ -Gabe die parasiten-spezifische IFN- γ -Produktion vorrangig von Th2/1-Hybridzellen ausging (Abb. 3.11 F).

Ähnliche Effekte zeigten sich auf die Antwort von CD4⁺ T-Effektorzellen im Dünndarm (Abb. 3.12). Die IFN- γ Supplementierung führte auch im Dünndarm zu einem Anstieg der Th2/1-Hybridzellen im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren sowie IFN- γ R^{-/-} Mäusen (Abb. 3.12 A, B). Wie in der Milz konnte auch im Dünndarm nach IFN- γ -Gabe eine Erhöhung von GATA-3⁺IFN- γ ⁺ Th2/1-Hybridzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die Th2/1-Zellinduktion in IFN- γ R^{-/-} Tieren vermindert (Abb. 3.12 A).

Schließlich wurde überprüft, ob sich die Zunahme von Th2/1-Hybridzellen bzw. fehlende IFN- γ -Signale auf die Kontrolle der Parasiteninfektion auswirken.

- Ergebnisse -

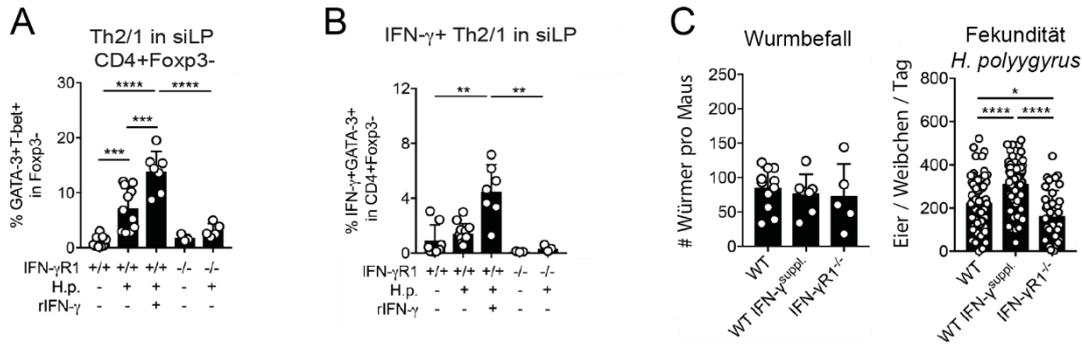


Abb. 3.12 Effekte der IFN- γ Applikation und fehlender IFN- γ -Signale auf die intestinale T-Zellantwort sowie parasitologische Parameter

C57BL/6 und IFN- γ R^{-/-} Mäuse wurden mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert. Zusätzlich wurde einer Gruppe der C57BL/6 Mäuse (WT) zweimal täglich 2,5 μ g rekombinantes IFN- γ (rIFN- γ) für die ersten fünf Tage injiziert. Die Analyse erfolgte am Tag 14 nach Infektion. **(A)** Frequenzen von Th2/1-Hybridzellen in der Lamina Propria des Dünndarms (siLP). **(B)** Frequenzen von GATA-3⁺IFN- γ ⁺ T-Helferzellen nach PMA/Ionomycin Stimulation. **(C)** Anzahl adulter Würmer am Tag 14 nach Infektion und Eiproduktion einzelner weiblicher Würmer innerhalb von 24 Stunden. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 2-4 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über einfaktorielle ANOVA und Kruskal-Wallis Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Wie in Abb. 3.12 gezeigt unterschied sich die Anzahl adulter Würmer zwischen den drei Gruppen am Tag 14 nach der Infektion nicht. Die Quantifizierung der Eiproduktion durch weibliche Parasiten zeigte jedoch eine signifikant höhere Parasitenfitness in IFN- γ behandelten Tieren im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abb. 3.12 C). Währenddessen war die Fekundität von aus IFN- γ R^{-/-} Mäusen isolierten *H. polygyrus* Weibchen deutlich vermindert (Abb. 3.12 C).

Zusammenfassend bewirkten also erhöhte IFN- γ -Spiegel zu Infektionsbeginn beziehungsweise das Fehlen von IFN- γ -Signalen signifikant unterschiedliche Anteile von Th2/1-Hybridzellen in der induzierten GATA-3⁺ T-Helferzellpopulation, was sich auf die Fitness der Parasiten in der akuten Infektionsphase auswirkte.

3.4.2 Die Unterstützung der Th2/1-Hybridzellantwort erhöht die Empfänglichkeit in der chronischen Infektionsphase

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass IFN- γ die Kontrolle chronischer *H. polygyrus* Infektionen negativ beeinflusst [139]. Daher wurde als nächstes untersucht, ob die Erhöhung von Th2/1-Hybridzellen als IFN- γ -Quelle durch kurzzeitige IFN- γ -Gabe einen bleibenden Effekt darstellt und sich auf die Fitness der Nematoden sowie deren Persistenz in der chronischen Phase der Infektion auswirkt (Abb. 3.13).

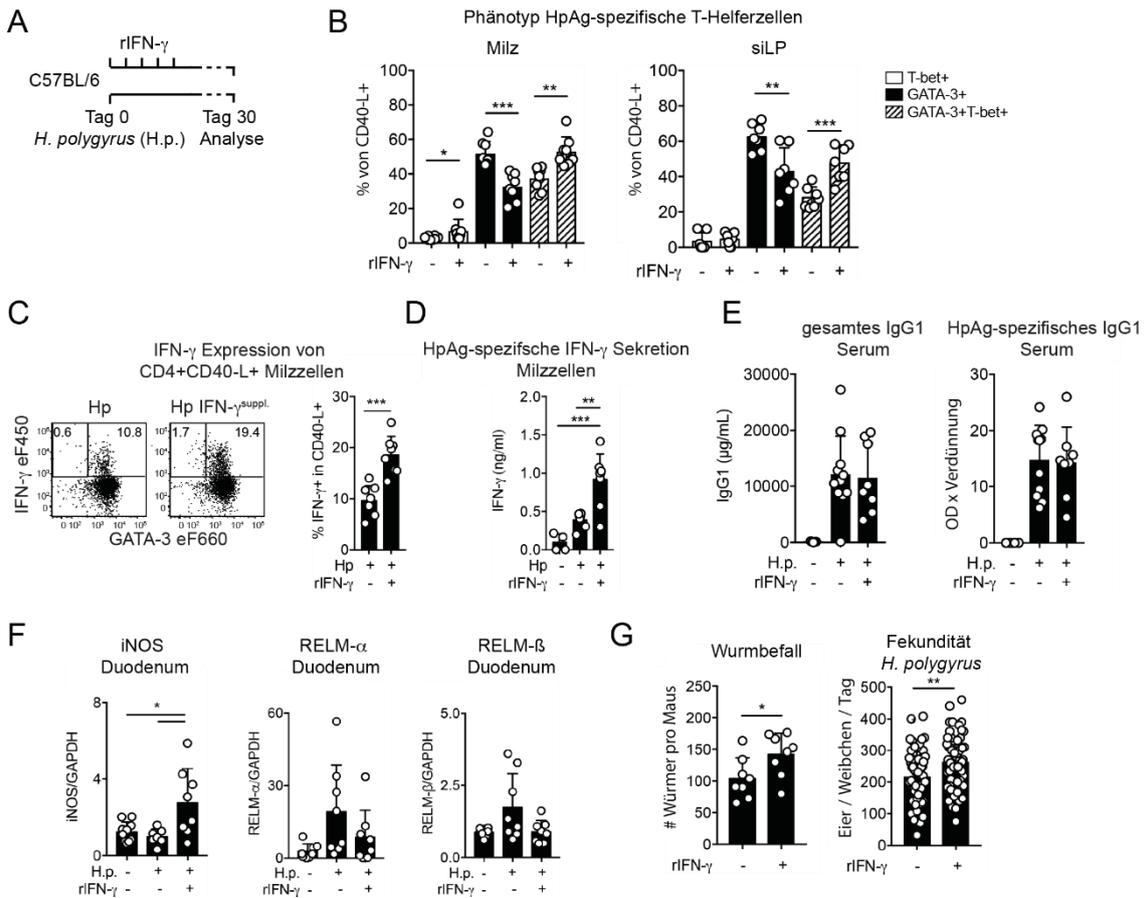


Abb. 3.13 Effekte der frühen IFN- γ Gabe auf immunologische und parasitologische Parameter in der chronischen Infektionsphase einer *H. polygyrus* Infektion

C57BL/6 Mäuse wurden mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert. Zusätzlich wurde einer Gruppe der C57BL/6 Mäuse (WT) zweimal täglich 2,5 μ g rekombinantes IFN- γ (rIFN- γ) für die ersten fünf Tage der Infektion injiziert. Die Analyse erfolgte am Tag 30 während der chronischen Phase der Immunantwort gegen *H. polygyrus*. **(A)** Versuchsaufbau. **(B)** Frequenzen von T-bet⁺ Th1-, GATA-3⁺ Th2- und T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1-Zellen in *H. polygyrus* spezifischen CD40-L⁺ T-Helferzellpopulation aus Milz und Dünndarm (siLP). **(C)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots und statistische Auswertung der IFN- γ Produktion durch Antigen-spezifische CD40-L⁺ T-Helferzellen. **(D)** Detektion der IFN- γ Sekretion von Milzzellen nach Restimulation mit *H. polygyrus* Antigen für fünf Tage mittels ELISA. **(E)** Detektion der IgG1 Konzentration (gesamt und *H. polygyrus*-Antigen-spezifisch) im Serum mittels ELISA. **(F)** Bestimmung der Expression von iNOS, RELM- α und RELM- β im Dünndarm mittels qPCR. GAPDH diente als Housekeeping Gen. **(G)** Anzahl der Würmer sowie individuelle Eiproduktion am Tag 30 nach Infektion. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 4 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über einfaktorielles ANOVA, Kruskal-Wallis Test und Mann-Whitney Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

- Ergebnisse -

Die IFN- γ -Behandlung während der frühen Phase der Immunantwort gegen *H. polygyrus* führte zu erhöhten Frequenzen von GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1-Hybridzellen in der chronischen Infektionsphase (Abb. 3.13 B). Ähnlich wie für die akute Immunantwort in IFN- γ behandelten Tieren gezeigt (Abb. 3.11) ist der Anstieg der IFN- γ Expression auch in der chronischen Phase 25 Tage nach der letzten IFN- γ -Gabe noch nachweisbar (Abb. 3.13 C,D). Trotz des erhöhten IFN- γ -Spiegels in IFN- γ behandelten Mäusen konnte keine Änderung der Konzentration des Th2-assoziierten Antikörpers IgG1 im Serum in den mit *H. polygyrus* infizierten Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.13 E).

IFN- γ gilt als ein wichtiger Aktivator von klassisch aktivierten Makrophagen, die eine erhöhte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Expression der induzierten NO-Synthase (iNOS) aufweisen [144]. Die IFN- γ -Behandlung und die daraus resultierende erhöhte IFN- γ Aktivität führte zu einem signifikanten Anstieg der iNOS-Expression im Dünndarm. Darüber hinaus wurden RELM- α , ein Molekül, das von alternativ aktivierten Makrophagen exprimiert wird [46], und RELM- β , ein Effektormolekül von Becherzellen mit anthelminthischer Wirkung [43], in geringerem Maße in IFN- γ behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolltruppe exprimiert (Abb. 3.13 F).

IFN- γ -Gabe früh während der Infektion führte demnach zu einer dauerhaften und noch in der chronischen Phase detektierbaren Verschiebung des Th2/1- zu Th2-Zellverhältnis in Richtung der Th2/1-Hybridzellen. Damit kam es zu einem Anstieg des Th1-assoziierten Effektormoleküls iNOS und einer Abnahme von Th2-assoziierten Effektormolekülen RELM- α und RELM- β , die wichtig für die Parasitenabwehr sind. Die IFN- γ -Supplementierung führte zu einem signifikant erhöhten Wurmbefall und Fekundität und damit einer längeren Infektion mit dem Nematoden *H. polygyrus* (Abb. 3.13 G).

3.5 Starke Th2/1-Hybridzellantworten limitieren die Polarisierung von alternativ aktivierten Makrophagen (AAM)

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass AAM sowohl in der ersten wie auch einer zweiten Infektion mit *H. polygyrus* wichtig für eine schützende Immunantwort sind [52, 125]. Dabei konnte die durch AAM vermittelte schützende Immunantwort in einer Reinfektion durch die Gabe eines Inhibitors des Effektormoleküls Arginase von AAM gehemmt werden. Für die Differenzierung von AAM sind die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 von entscheidender Bedeutung, während IFN- γ die Differenzierung zu klassisch aktivierten F4/80⁺Ym-1^{neg}iNOS⁺ Makrophagen induziert [145].

- Ergebnisse -

Wie in den oben beschriebenen Experimenten gezeigt werden konnte, stellen die Th2/1-Hybridzellen die Hauptquelle parasiten-spezifischer IFN- γ Produktion dar (Abb. 3.5 E). Darüber hinaus konnte der Anteil von Th2/1-Hybridzellen in mit IFN- γ behandelten Tieren signifikant erhöht werden, das wiederum zu einem Anstieg des Th1 assoziiertem Effektormoleküls iNOS und einer Abnahme von Th2 assoziierten Effektormolekülen RELM- α und RELM- β führte (Abb. 3.11 - Abb. 3.13). Zudem ließ sich IFN- γ früh in lymphatischen Organen und Darmgeweben von C57BL/6, jedoch kaum in BALB/c Mäusen nachweisen [123-128]. Daher wurde als nächstes untersucht, ob die Erhöhung von Th2/1-Hybridzellen als IFN- γ -Quelle in C57BL/6 im Unterschied zu BALB/c Mäusen einen Einfluss auf die Polarisierung von Makrophagen hat. Hierzu wurden leicht zugängliche Makrophagen aus der Bauchhöhle (Peritoneum) genutzt.

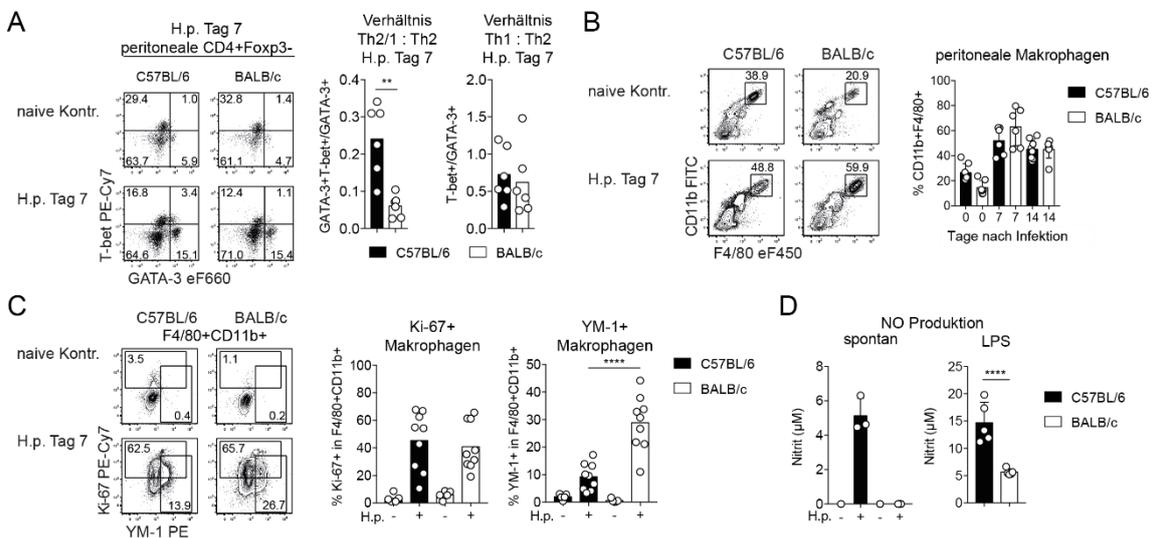


Abb. 3.14 Makrophagen-Polarisierung *H. polygyrus* infizierter C57BL/6 und BALB/c Mäuse
Mäuse der Stämme C57BL/6 und BALB/c wurden mit 200 infektiösen *H. polygyrus* Larven infiziert und die Immunantwort im Peritoneum am Tag 7 nach der Infektion analysiert. **(A)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der Transkriptionsfaktorexpression von CD4⁺ T-Zellen und Verhältnisse von T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1- zu GATA-3⁺Th2-Zellen sowie T-bet⁺ Th1- zu GATA-3⁺ Th2-Zellen im Peritoneum. **(B)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots der Oberflächenmarker von Makrophagen in naiven Kontrollen und am Tag 7 nach Infektion. **(C)** Repräsentative durchflusszytometrische Plots und Frequenzen Ki-67⁺ sowie Ym-1⁺ Makrophagen am Tag 7 nach der Infektion. **(D)** Detektion des NO-Gehalts im Kulturüberstand von peritonealen Zellen nach Stimulation mit/ohne LPS. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse erfolgte über Mann-Whitney Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

Zunächst wurde überprüft, ob sich das Verhältnis von Th2/1-Hybridzellen zu Th2-Zellen auch im Peritoneum von C57BL/6 und BALB/c Mäusen unterscheidet. Wie in Abb. 3.14 A gezeigt, wiesen C57BL/6 Tiere nach Infektion ein signifikant höheres Verhältnis von T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1- zu GATA-3⁺ Th2-Zellen als BALB/c Mäuse auf. Die Verhältnisse von T-bet⁺ Th1- zu GATA-3⁺ Th2-Zellen waren hingegen in beiden Stämmen gleich (Abb. 3.14 A). Zudem war auch die durch die Infektion bedingte Zunahme der Peritoneal-Makrophagen in beiden Stämmen gleich (Abb. 3.14 B), was sich auch in der

- Ergebnisse -

gleichstarken Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 widerspiegelte (Abb. 3.14 C). In Übereinstimmung mit anderen Studien [125] wiesen BALB/c Mäuse höhere Frequenzen YM-1⁺ alternativ aktivierter Makrophagen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen auf (Abb. 3.14 C). Weiterhin zeigten Makrophagen von *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 im Gegensatz zu BALB/c Mäusen eine höhere Bereitschaft zur Produktion von NO, das von iNOS⁺ klassisch aktivierten Makrophagen produziert wird, nach 24-stündiger Inkubation *ex vivo* freizusetzen (Abb. 3.14 D). Die spontane Freisetzung von NO in den peritonealen Zellen ist vermutlich auf die Expression von IFN- γ und damit Stimulation der klassisch aktivierten Makrophagen in der Kultur zurückzuführen. Die zusätzliche Stimulation mit LPS führte zu einer verstärkten Sezernierung von NO in beiden Mausstämmen, wobei Zellen von BALB/c Mäusen nur schwach reagierten.

3.6 Applikation von Nematodenantigenen in die Haut führt zur Differenzierung von Th2- und Th2/1-Zellen

Exkretorisch/sekretorischen Produkte von *H. polygyrus* (HES) stellen vielversprechende Kandidaten zur Vakzinentwicklung dar [146-148]. Entscheidend für den Schutz der Vakzinierung ist der Aufbau eines immunologischen Gedächtnis und die Produktion von parasiten-spezifischen IgG1 Antikörpern [58]. Das Th2-Zytokin IL-4 ist wichtig für den Klassenwechsel der B-Zellen zu IgG1. Dies kann jedoch durch die Produktion von IFN- γ inhibiert werden und zur Produktion von Th1-assoziierten Antikörpern IgG2a führen [149]. Abschließend sollte daher untersucht werden, ob die Vakzinierung mit adulten HES ohne Zuhilfenahme von Adjuvantien zur Ausbildung von Th2- sowie Th2/1-Zellen führt.

- Ergebnisse -

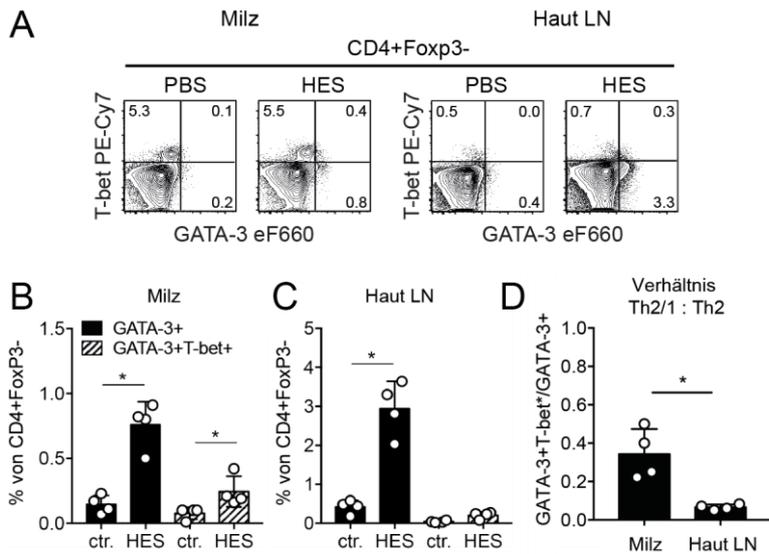


Abb. 3.15 Effekte der HES-Applikation auf die Th2- und Th2/1-Zellantwort in C57BL/6 Mäusen

C57BL/6 Mäuse wurden subkutan mit exkretorisch-sekretorischen Produkten des Adultstadiums von *H. polygyrus* (HES) vakziniert und die T-Helferzellantwort in der Milz und Lymphknoten der Haut (Haut LN) im Nackenbereich sieben Tage später durchflusszytometrisch analysiert. Die Kontrollmäuse erhielten PBS. **(A)** Repräsentative Plots der Transkriptionsfaktorexpression von T-Helferzellen. **(B-C)** Frequenzen von GATA-3⁺ Th2- und T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1-Zellen in der Milz **(B)** und den Lymphknoten der Haut (Haut LN) **(C)**. **(D)** Verhältnisse von T-bet⁺GATA-3⁺ Th2/1- zu GATA-3⁺ Th2-Zellen in der Milz und den Lymphknoten der Haut (Haut LN). Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 2 Mäusen pro Gruppe (Mittelwert ± SD). Die statistische Analyse erfolgte über Mann-Whitney Test. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch *p ≤ 0,05.

Eine einmalige subkutane Applikation von HES adulter *H. polygyrus* ohne Nutzung von Adjuvantien führte zu einer leichten, jedoch signifikanten Induktion von GATA-3⁺ Th2-Zellen in der Milz und Lymphknoten der Haut. Weiterhin, konnte auch ein signifikanter Anstieg von Th2/1-Hybridzellen in der Milz, jedoch nicht in den hautdrainierenden Lymphknoten beobachtet werden (Abb. 3.15 A-C). Der signifikant kleinere Anteil an Th2/1-Hybridzellen in den hautdrainierenden Lymphknoten im Vergleich zu Milzzellen (Abb. 3.15 D) ähnelt dem Verhältnis von Th2/1-Hybridzellen in der Milz und den mesenterialen Lymphknoten nach Infektion mit lebenden Nematoden (Abb. 3.2 C). Diese vorläufigen Daten zeigen, dass auch nach Immunisierung mit Nematodenantigenen Th2/1-Hybridzellen neben klassischen Th2-Zellen auftreten. Inwieweit deren Anteil an der Immunantwort die Protektion gegen Belastungsinfektionen beeinflussen könnte, bleibt zu untersuchen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th2/1-Hybridzellen im murinen gastrointestinalen Infektionsmodell *H. polygyrus* untersucht. *H. polygyrus* führt zu chronischen Infektionen und wird unter anderem als Modellorganismus für die humanpathogenen Hakenwürmern *Necator americanus* sowie *Ancylostoma duodenale* zur Erforschung der Immunantwort und der Entwicklung von Vakzinen gegen diese Wurmart verwendet [14, 20]. Th2/1-Hybridzellen konnten bisher in verschiedenen murinen Infektionsmodellen mit Helminthen einschließlich *Schistosoma mansoni* und *Strongyloides ratti*, aber auch in *Strongyloides stercoralis* infizierten Patienten nachgewiesen werden [120, 122]. In diesen früheren Studien schienen die Th2/1-Hybridzellen ein regulatives Element in Th2-Entzündungsreaktionen darzustellen, da sie geringere Th2-Zytokin-abhängige Entzündungsreaktionen im Vergleich zu klassischen Th2-Zellen auslösten [120]. Daher lag der Fokus dieser Arbeit auf der Rolle der Th2/1-Hybridzellen als mögliche IFN- γ Produzenten, da gezeigt werden konnte, dass erhöhte IFN- γ Expressionswerte mit einer verminderten Kontrolle der Nematodeninfektion einhergehen [123-128].

4.1 Induktion von Th2/1-Hybridzellen in Th2-assoziierten Parasitosen

In Infektionen mit gastrointestinalen Helminthen erfolgt die Induktion der T-Effektorzellantwort hauptsächlich in den mesenterialen Lymphknoten (mLN), die anschließend in den Darm wandern [150, 151]. Zusätzlich zu den mLN findet man viele GATA3⁺ T-Helferzellen in der Milz. Nach der *H. polygyrus* Infektion konnte ein signifikanter Anstieg von GATA-3⁺ Th2-Zellen und GATA-3⁺T-bet⁺ Th2/1-Hybridzellen beobachtet werden. Der Anstieg von Th2/1-Hybridzellen war insbesondere in Milz und Dünndarm zu beobachten. In der Milz wurde jedoch 14 Tage nach Infektion das höchste Verhältnis von Th2/1-Hybridzellen zu Th2-Zellen nachgewiesen. Dahingegen wurde der parasiten-induzierte CD4⁺ T-Effektorzellpool in mLN und Darmgewebe von Th2-Zellen dominiert. Die hohe Anzahl an Th2/1-Hybridzellen in der Milz *H. polygyrus*-infizierter Mäuse könnte darin begründet liegen, dass die antigen-präsentierenden Zellen in der Milz im Gegensatz zu den mLN darauf angewiesen sind, Antigene aus dem Blut aufzunehmen. [152, 153]. Damit können auch Antigene präsentiert werden, die nicht unbedingt vom eigentlichen Infektionserreger stammen. In Abwesenheit einer Entzündung führt dies zu einer Ausbildung einer Toleranz gegenüber diesen Antigenen, da die für die Ausbildung von T-Effektorzellen notwendigen kostimulierenden Signale fehlen [154]. Da *H. polygyrus* die Dünndarmwand durchbricht, könnten jedoch ebenso Antigene vom Dünndarminhalt sowie Bakterien, Viren und Pilze in den Blutkreislauf

- Diskussion -

gelangen und dadurch zum Induzieren einer Th1-gerichteten Immunantwort führen. Somit könnte es im Falle einer Helmintheninfektionen zu einer Verstärkung von Th1-induzierten Zytokinen und damit zu der verstärkten Th2/1-Hybridzellinduktion kommen. Weiterhin könnte die Expansion von Th2/1-Hybridzellen im Vergleich zu Th2-Zellen in der Milz aufgrund des weniger Th2-polarisierenden Milieus, wie es in den mLN während einer Helmintheninfektion zu finden ist, begünstigt sein. Bisher ist die Rolle der Milz als Ort der Differenzierung von T-Effektorzellen in Helmintheninfektionen noch unerforscht, aber sollte, vor allem im Hinblick auf die Entwicklung von wirksamen Impfstoffen, mehr erforscht werden. Dazu könnte beispielsweise mit splenektomierten Mäusen untersucht werden, ob die Milz essentiell für die Ausbildung einer Th2/1-Hybridzellantwort ist.

Ein wichtiger Faktor, der auch zur erhöhten Ausbildung von Th2/1-Hybridzellpopulationen beitragen könnte, ist die mögliche Konversion von bereits in naiven Tieren vorkommenden Th1-Zellen. Vorherige Studien haben gezeigt, dass Th2/1-Hybridzellen aus Th1-Zellen entstehen können [137, 155]. Es stellte sich damit die Frage, ob die in der *H. polygyrus*-Infektion detektierten Th2/1-Hybridzellen hauptsächlich aus naiven T-Zellen hervorgehen oder ob Th1-Zellen durch Konversion wesentlich zur Ausbildung der Th2/1-Hybridantwort beitragen. Aus diesem Grund wurden naive T-Helferzellen über adoptiven Transfer in C57BL/6 Mäuse übertragen, die anschließend mit *H. polygyrus* infiziert wurden. Im Falle, dass Th2/1-Hybridzellen hauptsächlich aus Th1-Zellen konvertieren würden, hätten wir in der transferierten T-Helferzellpopulation deutlich weniger Th2/1-Hybridzellen als in den endogenen CD4⁺ T-Zellen auffinden müssen. Jedoch konnten zehn Tag nach dem Transfer und *H. polygyrus* Infektion eine deutlich ausgebildete Th2/1-Hybridzellpopulation ausgemacht werden. Dies spricht dafür, dass Th2/1-Hybridzellen vorrangig aus naiven T-Helferzellen entstehen und nicht aus bereits vorhandenen Th1-Zellen hervorgehen. Darüber hinaus weisen ein Großteil der Th2/1-Hybridzellen eine Reaktivität für *H. polygyrus* Antigene auf. Damit ist anzunehmen, dass diese Th2/1-Hybridzellen nach dem Erstkontakt mit Parasitenantigenen aus naiven T-Zellvorläufern differenzieren. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Verhältnisse von Th2/1- zu Th2-Zellen in parasiten-spezifischen und parasiten-unspezifischen, sogenannten ‚Bystander‘-Zellen in allen Organen gleicht. Wie zuvor erwähnt gibt es nur wenige Studien, die die Konversion von Th1- zu Th2/1-Zellen beschreiben. Eine Studie zeigt, dass durch das Bakterium *Listeria monocytogenes* induzierte Th1-Zellen einen IL-4⁺ Th2/1-Zellphänotyp annehmen [155]. Dazu wurde der komplette CD4⁺ T-Zellpool der *Listeria monocytogenes* infizierten Mäuse in einen kongenen Mausstamm transferiert. In den Empfängermäusen wurde daraufhin durch eine Immunisierung mit dendritischen Zellen, die zuvor mit den stark

- Diskussion -

Th2-induzierenden Schistosomen-Ei-Antigen stimuliert wurden, eine Th2-Antwort induziert. Da jedoch zuvor der komplette CD4⁺ T-Zellpool übertragen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Th2/1-Hybridzellen, anstatt aus Th1-Zellen zu konvertieren, aus naiven CD4⁺ T-Zellen während der Immunisierung entstanden sind. In einer weiteren Studie wurde die Stabilität von *in vivo* generierten Ovalbumin-spezifischen Th1-Zellen untersucht [137]. Dazu wurden die Ovalbumin-spezifischen Th1-Zellen in Mäuse transferiert, die anschließend mit *N. brasiliensis* infiziert und zusätzlich mit Ovalbumin immunisiert wurden. Dies hatte zur Folge, dass die Ovalbumin-spezifischen Th1-Zellen einen Th2/1- und überraschenderweise einen Th2-Zellphänotyp annahmen. *In vitro* Studien zur Differenzierung von T-Helferzellen zeigen jedoch, dass Th1-Zellen ihre Plastizität für einige Zeit nach der Differenzierung aufrechterhalten [110]. Die Isolation der *in vivo* generierten Ovalbumin-spezifischen Th1-Zellen für den Transfer erfolgte sechs Tage nach Th1-Zellinduktion, was einen sehr frühen Zeitpunkt der T-Zelldifferenzierung darstellt. Darin könnte begründet liegen, dass die Th1-Zellen zu Th2/1- und Th2-Zellen konvertiert sind. Hingegen sind Th1-Zellen mit stabilem Phänotyp, wie sie in naiven Mäusen vorkommen, wahrscheinlich schwieriger zur Konversion in Th2/1-Hybridzellen zu bewegen. Letztendlich kann diese Frage nur durch den Transfer hochreiner, *in vivo*-generierter Th1-Zellen bewiesen werden. Dazu würde sich ein GATA-3/T-bet/FoxP3-Triple-Reporterstamm, indem die Schlüsseltranskriptionsfaktoren für Th1-, Th2- und Treg-Zellen fluoreszenzmarkiert sind [156], anbieten. Mit diesem Mausstamm wäre es möglich sowohl Th1-Zellen aus naiven als auch Th2/1- und Th2-Zellen aus *H. polygyrus* infizierten Mäusen zu isolieren. Leider war der Zugriff auf den benötigten Mausstamm bis zum Ende der Arbeit nicht möglich.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit überprüft, ob mikrobielle Signale bei der Induktion von Th2/1-Hybridzellen in Nematodeninfektionen eine Rolle spielen. Nach oraler Aufnahme der infektiösen *H. polygyrus* Larve gelangt diese in den Dünndarm und ist dort umgeben von der Mikrobiota des Wirts. Für die erste Häutung innerhalb des Wirts und endgültige Entwicklung zum adulten Wurm dringen die Larven in die Submukosa des Dünndarmgewebes ein. Dabei könnten ebenso Bakterien, Viren und Pilze in das Gewebe des Dünndarms eindringen sowie in den Blutkreislauf gelangen und somit die Freisetzung von Th1-Zellfördernden Zytokinen zusammen mit der durch *H. polygyrus* Th2-Zellgerichteten Immunantwort auslösen. Diese verschiedenen Signale könnten dann zum Auftreten der Th2/1-Hybridzellen führen. Darüber hinaus spielt die Mikrobiota des Darms generell eine wichtige Rolle bei der Funktion sowie Homöostase des Immunsystems [157] und viele Studien konnten zudem den Einfluss von Nematodeninfektionen auf die Mikrobiota zeigen [157-161]. In einer weiteren Studie

- Diskussion -

konnte weiterhin gezeigt werden, dass der immunsupprimierende Einfluss einer *H. polygyrus* Infektion in einem murinen Asthmodell abhängig von der Mikrobiota ist [162]. Daher wurde der Einfluss der Mikrobiota auf die Ausbildung einer Th2/1-Hybridzellantwort in *H. polygyrus* Infektionen überprüft. Dazu wurde die T-Helferzellantwort gegen *H. polygyrus* in keimfreien Mäusen mit der einer Kontrollgruppe mit normaler Mikrobiota verglichen. Da es sowohl in *H. polygyrus* infizierten SPF als auch keimfreien C57BL/6 Mäusen zu einer Induktion von Th2/1-Hybridzellen kam, scheinen mikrobielle Signale keine Rolle bei deren Induktion zu spielen.

Sämtliche bisher durchgeführten Studien unserer und weiterer Arbeitsgruppen zur Differenzierung von Th2/1-Hybridzellen in Antwort auf Infektionserreger wurden in Infektionen mit den Helminthen *Nippostrongylus brasiliensis*, *Schistosoma mansoni*, *H. polygyrus* sowie *Strongyloides ratti* und *S. stercoralis* durchgeführt [119-122, 130, 137]. All diese aufgeführten Helmintheninfektionen führen zu starken Th2-Zellantworten und lösen starke Entzündungsreaktionen im mukosalen Gewebe aus. In der Darmmukosa finden sich zudem eine Vielzahl von CD4⁺ Th1- und CD8⁺ T-Zellen sowie andere potenzielle IFN- γ -Quellen [163], die zur Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen während einer Nematodeninfektion beitragen können. Damit stellte sich die Frage, ob auch Th2-Zellen induzierende Ektoparasiten wie die Zecke *Ixodes ricinus* zu einer Induktion von Th2/1-Hybridzellen führen. Ähnlich wie in Nematodeninfektionen löst die Zeckeninfestation eine starke Th2-Zellantwort aus [131, 164]. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Infestation von C57BL/6 Mäusen mit Zeckenlarven nicht nur zur Induktion einer starken Th2-Zellantwort, sondern auch zur Induktion von Th2/1-Hybridzellen in der Milz und Haut führte. Demnach scheint die Lokalisation des auslösenden Erregers keine Rollen bei der Th2- versus Th2/1-Zelldifferenzierung zu spielen. Jedoch scheint eine Induktion einer Th2-assoziierten Immunantwort von Bedeutung zu sein, da bisher keine Induktion von Th2/1-Hybridzellen in Th1-assoziierten Parasiteninfektionen wie *Toxoplasma gondii* beobachtet werden konnte [79]. Die Frage ist nun, ob die Induktion von Th2/1-Hybridzellen vorteilhaft für Nematodeninfektionen ist, da sie vermehrt dazu beitragen, dass IFN- γ anstatt Th2-Zytokinen gebildet werden. Aus Koinfektionsstudien und anderen experimentellen Modellen ist bekannt, dass die Ausbildung der Th2-Immunantwort in Nematodeninfektionen durch IFN- γ partiell bis komplett inhibiert werden kann [78-80]. Zudem stellt sich die Frage, ob die Th2/1-Hybridzellen gezielt von den Nematoden induziert werden, um der schützenden Immunantwort des Wirts zu entgehen. In Studien mit *H. polygyrus* sowie *Trichuris muris* konnte gezeigt werden, dass Helminthen in der

Lage sind extrazelluläre Vesikel, sogenannte Exosomen, abzugeben [165, 166]. Diese Exosomen enthalten hauptsächlich Proteine, die homolog zu Wirtproteinen sind, sowie microRNA, die in der Lage sind, die Genexpression von Zellen des Wirts zu beeinflussen. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Exosomen von *T. muris* NLRP3-Inflammasomen aktivieren können [167]. Inflammasomen sind zytosolische Proteinkomplexe in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, die nach Aktivierung die proinflammatorische Zytokine IL-1 β und IL-18 freisetzen. Die Inhibition der NLRP3-Inflammasomen sowie der IL-1 β -Freisetzung führte zu einer verstärkten Th2-Immunantwort und geringen Wurmlasten in *T. muris* sowie *H. polygyrus* infizierten Mäusen [167, 168]. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das von den Th2/1-Hybridzellen gebildete IFN- γ die *H. polygyrus* Infektion unterstützt und Effektormoleküle und -zellen der Th2-Immunantwort inhibiert.

4.2 IFN- γ ist wichtig für die Induktion von Th2/1-Hybridzellen und deren Einfluss auf die Empfänglichkeit zu *H. polygyrus*

Die Induktion von Th2-Zellen und die Produktion der damit verbundenen Effektorzytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sind wichtig für den Aufbau einer Immunität gegen Nematodeninfektionen wie *H. polygyrus* [27]. Dahingegen ist das Effektorzytokin von Th1-Zellen IFN- γ wichtig bei der Immunabwehr gegen Viren, Bakterien und Protozoen, indem es beispielsweise die Antigenpräsentation durch APCs verstärkt, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies erhöht sowie CD4⁺ Th1-Zellen sowie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen aktiviert. Weiterhin kann IFN- γ eine anti-proliferative Phase einleiten, die zur Inhibition von Krebszellen und letztendlich deren Apoptose führt [169, 170]. Darüber hinaus ist IFN- γ in der Lage, die Th2-assoziierte Effektorzytokine wie zum Beispiel IL-4 in Nematodeninfektionen zu inhibieren [127, 128]. Dabei scheint IFN- γ vor allem die posttranskriptionale Genexpression des IL-4 Rezeptors zu inhibieren, wodurch beispielsweise auch der Klassenwechsel der B-Zellen zu IgE und IgG1 in Mäusen gehemmt wird [149, 171].

Da Th2/1-Hybridzellen, wie in dieser und vorherigen Arbeiten gezeigt, in der Lage sind, IFN- γ zu exprimieren [120, 122], wurde untersucht, ob sich die Produktion von IFN- γ in der *H. polygyrus* Infektion verändert. Es zeigte sich, dass die IFN- γ -Produktion von *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 Mäusen in allen untersuchten Organen im Infektionsverlauf anstieg. Insbesondere Milzzellen setzen nach Stimulation mit *H. polygyrus* Antigen größere Mengen von IFN- γ frei, wohingegen Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten nur geringe Mengen des Zytokins produzieren. Auch im Gewebe des Dünndarms nahm die Expression von IFN- γ über den Infektionsverlauf zu.

- Diskussion -

Dies spiegelte den erhöhten Anteil von Th2/1-Hybridzellen in Milz und Dünndarm von Nematoden-infizierten Tieren wider. Um sicher zu gehen, dass das nachgewiesene IFN- γ nicht von vorhandenen Th1-Zellen stammt, wurde der Phänotyp parasiten-spezifischer IFN- γ Produzenten untersucht. Es zeigte sich, dass der Großteil der zu verschiedenen Infektionszeitpunkten nachgewiesenen parasiten-spezifischen CD40-L⁺IFN- γ ⁺ T-Helferzellen den Transkriptionsfaktor GATA-3 exprimierten und damit einen Th2/1-Hybridzellphänotyp aufwiesen. Einen Unterschied der IFN- γ -Produktion wurde in mehreren Studien von Helmintheninfektionen gezeigt [125, 172-174], jedoch wurde nun zum ersten Mal ein gradueller Anstieg von parasiten-spezifischen IFN- γ in einer akuten *H. polygyrus* Infektion gezeigt und vor allem konnte nun auch die Th2/1-Hybridzellen als eine parasiten-spezifische IFN- γ Quelle zugeordnet werden.

Es stellte sich damit die Frage, ob die Th2/1-Hybridzellen die Empfänglichkeit gegen Nematodeninfektionen über die Produktion von IFN- γ mit beeinflussen könnten. In einer *Trichuris muris* Infektion beispielsweise führte die IFN- γ Inhibition dazu, dass die sonst empfänglichen AKR Mäuse die Infektion besser kontrollieren konnten [175]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Applikation von IL-12, das wichtig für die Induktion von Th1-Zellen ist, die Empfänglichkeit von normalerweise resistenten BALB/c Mäusen gegenüber *Nippostrongylus brasiliensis* erhöht [176]. Der Effekt konnte durch die Gabe von Antikörpern gegen IFN- γ blockiert werden. Darüber hinaus konnte unsere und andere Gruppen zeigen, dass Koinfektionen mit Th1-induzierenden Pathogenen die Induktion einer Th2-Zellantwort während einer Helmintheninfektion stark inhibieren können, womit die Kontrolle der Helminthen erschwert wird [79, 80, 177]. In früheren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass IFN- γ die Kontrolle von Nematodeninfektionen, einschließlich chronischer *H. polygyrus* Infektionen, negativ beeinflusst [123, 127, 128, 139, 175]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine Verschiebung des Th2/1- zu Th2-Zellverhältnisses Einfluss auf die Kontrolle der Parasiteninfektion hat. Dazu wurde die Immunantwort und die Kontrolle der Parasitenfitness in IFN- γ kompetenten C57BL/6 Wildtyp-Tieren und IFN- γ R^{-/-} Tieren zwei Wochen nach Infektion verglichen. Eine zusätzliche Gruppe C57BL/6 WT Mäusen wurde mit rekombinanten IFN- γ behandelt, um zu prüfen, ob dies die Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen unterstützt und sich auf die Kontrolle der *H. polygyrus*-Infektion auswirkt. Da die Gabe hoher Mengen von IFN- γ die Ausbildung der Th2-Zellantwort gegen parasitische Nematoden blockieren kann [127], wurde in diesen Experimenten eine moderate Dosis von IFN- γ über fünf Tage beginnend mit dem Infektionszeitpunkt intraperitoneal appliziert. Damit wurde die IFN- γ -Behandlung auf die frühe Phase der

- Diskussion -

Immunantwort zur *H. polygyrus* Infektion und die damit verbundene Aktivierungsphase der T-Zellantwort beschränkt. Es konnte festgestellt werden, dass weder das Ausmaß der Differenzierung von GATA-3⁺ T-Helferzellen, welche Th2- und Th2/1-Zellen einschließen, noch die Reaktionen von Th1 und anderen potenziellen IFN- γ -Quellen durch die frühe IFN- γ -Gabe betroffen war. Die IFN- γ -Behandlung führte jedoch in allen untersuchten Organen zu erhöhten Frequenzen von Th2/1-Hybridzellen und damit einem höheren Th2/1- zu Th2-Zellverhältnis. Wie aus früheren Studien zu erwarten [120] bildeten IFN- γ R^{-/-} Mäuse einen größeren Anteil an Th2-Zellen und kaum Th2/1-Hybridzellen aus. Dies konnte nun auch erstmalig auf Zytokinbasis bestätigt werden, da die IFN- γ -Produktion von *H. polygyrus*-spezifischen T-Helferzellen in IFN- γ behandelten C57BL/6 WT Tieren erhöht beziehungsweise in IFN- γ R^{-/-} vermindert war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch nach IFN- γ -Gabe die parasiten-spezifische IFN- γ -Produktion vorrangig von Th2/1-Hybridzellen ausging. In den drei Gruppen konnte 14 Tage nach der Infektion kein Unterschied in der Anzahl adulter Würmer festgestellt werden. Die Quantifizierung der Eiproduktion durch weibliche Parasiten zeigte jedoch eine signifikant höhere Parasitenfitness in IFN- γ behandelten Tieren im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Darüber hinaus war die Fekundität von aus IFN- γ R^{-/-} Mäusen isolierten *H. polygyrus* Weibchen deutlich vermindert. Der Einfluss der Erhöhung von Th2/1-Hybridzellen als IFN- γ -Quelle durch die kurzzeitige IFN- γ -Gabe am Anfang der Infektion ließ sich auch noch fünf Woche nach Infektion nachweisen und führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl sowie Fitness der adulten Nematoden. Darüber hinaus kam es zu einem Anstieg des Th1-assoziiertem Effektormoleküls iNOS, das unter anderem von klassisch-aktivierten Makrophagen exprimiert wird und wichtig für die Abwehr von bakteriellen Infektionen ist. Weiterhin kam es zu einer Abnahme von Th2-assoziierten Effektormoleküle RELM- α und RELM- β , die von AAM beziehungsweise Becherzellen sezerniert werden und wichtig für die Parasitenabwehr sind. Das Verschieben des Verhältnisses von Th2/1- und Th2-Zellen innerhalb der GATA-3⁺ T-Helferzellpopulation zugunsten der Th2/1-Hybridzellen und der damit verbundenen erhöhten IFN- γ -Produktion beeinflusste demnach die Fitness der Nematoden positiv.

In vorherigen Studien konnte auch gezeigt werden, dass eine erhöhte IFN- γ -Produktion während einer *H. polygyrus* Infektion mit einer erhöhten Eiproduktion weiblicher Würmer assoziiert ist [79, 123, 178]. Darüber hinaus konnten mehrere Gruppen zeigen, dass sich die Resistenz gegenüber *H. polygyrus* Infektionen in verschiedenen Mausstämmen unterscheidet [125, 138, 139, 143]. C57BL/6 Mäuse werden beispielsweise als sehr empfänglich für die *H. polygyrus* Infektion beschrieben, da sie mehrere Monate andauernde, chronische Infektionen ausbilden. Währenddessen sind BALB/c Mäuse

- Diskussion -

deutlich resistenter und in der Lage, die Würmer innerhalb einiger Wochen auszutreiben [140-142]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Empfänglichkeit beider Mauslinien für verschiedene Infektionserreger mit der Ausbildung unterschiedlicher Immunantworten in Zusammenhang steht. C57BL/6 Mäuse neigen zur Ausbildung von starken IFN- γ -Antworten durch CD4⁺ T-Zellen, wohingegen BALB/c Mäuse wesentlich geringere IFN- γ -Antworten ausbilden [125, 143]. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob sich das Ausmaß der Th2/1-Zelldifferenzierung zwischen C57BL/6 Mäusen und BALB/c Mäusen unterscheidet. Interessanterweise reagierten beide Mauslinien auf die *H. polygyrus* Infektion mit einer ähnlich stark ausgeprägten Expansion von GATA-3⁺ T-Helferzellen, die sich aus den Th2- und Th2/1-Zellen zusammensetzten. Auffallend war jedoch, dass BALB/c Mäuse im infizierten Dünndarm die maximale Frequenz von GATA-3⁺ T-Effektorzellen deutlich früher aufwiesen als C57BL/6 Mäuse. Die GATA-3⁺ T-Helferzellpopulation von C57BL/6 Mäusen beinhaltet zu allen Analysezeitpunkten mehr GATA-3⁺T-bet⁺ und IFN- γ ⁺ Th2/1-Hybridzellen, wodurch sich höhere Verhältnisse von Th2/1- zu Th2-Zellen in C57BL/6 Mäusen ergaben. Dies könnte auch ein Grund für die verlangsamte Akkumulation von GATA-3⁺ T-Helferzellen in C57BL/6 Mäusen sein, da die Expression von T-bet die Proliferation von Zellen hemmen kann [179]. In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass der wachstumshemmende Effekt von T-bet⁺ T-Helferzellen unabhängig von der Inhibition der Produktion von IFN- γ sowie IL-2, ein wichtiger Faktor der T-Helferzellproliferation [180], war. In weiteren Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass IFN- γ die Proliferation von Th2-Zellen inhibieren kann [181, 182]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die IL-1 vermittelte Proliferationen durch IFN- γ inhibiert wird. Die entzündungsfördernden IL-1 Zytokine können unter anderem von Makrophagen sowie Endothelzellen gebildet werden und verstärken die Th2-Zellproliferation [183]. Die wachstumshemmenden Eigenschaften von T-bet und IFN- γ könnten auch dazu beitragen, dass BALB/c Mäuse im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen deutlich mehr parasiten-spezifische CD4⁺ T-Helferzellen in einer *H. polygyrus* Infektion induzieren. Darüber hinaus weisen Mausstämme verschiedene Haplotypen vom MHCII-Gen auf [139, 141, 184-186], die zu den unterschiedlichen Frequenzen von parasiten-spezifischen T-Helferzellen beitragen könnten. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Resistenz gegenüber Reinfektionen mit Nematoden abhängig vom Haplotyp ist. Demnach wiesen BALB/c und DBA/2 Mäuse, die beide den H-2d Haplotyp haben, nach zwei *H. polygyrus* Infektionen eine höhere Resistenz gegenüber einer weiteren Infektion als C57BL/6 mit dem H-2b sowie CBA und AKR Mäuse mit dem H-2k Haplotyp auf [141]. In *Trichuris muris* Infektionen sind jedoch Mäuse mit dem Haplotyp H-2b oder H-2q im Vergleich zu Mäusen mit H-2k beziehungsweise H-2d

- Diskussion -

besser in der Lage die Würmer auszutreiben [186-188]. Zudem waren nur Mäuse mit dem H-2b Allell in der Lage ein *T. muris* Antigen mit geringer Molekülmasse zu erkennen. Ob die unterschiedlich stark ausgeprägte Generierung von parasiten-spezifischen T-Helferzellen abhängig von den verschiedenen MHCII-Haplotypen ist, könnte demnach durch *H. polygyrus* Infektionen in weiteren Mausstämmen untersucht werden. Gleichzeitig könnte dann überprüft werden, ob die verstärkte Ausprägung von parasiten-spezifischen T-Helferzellen zur einer schützenden Antikörperantwort bei Reinfektionen führt und ob das Verhältnis von Th2/1-Hybridzellen einen Einfluss auf die Ausbildung einer effektiven B-Zellantwort hat, was näher im nächsten Kapitel diskutiert wird.

Darüber hinaus könnten auch Treg-Zellen zur Ausbildung der verschiedenen Th2/1- zu Th2-Zellverhältnissen in den unterschiedlichen Mausstämmen beitragen. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Treg-Zellpopulation in *H. polygyrus* infizierten Mäusen zunimmt und dass der Anteil FoxP3⁺ Treg-Zellen überraschenderweise in den resistenten SJL und BALB/c Mausstämmen im Vergleich zu empfänglichen C57BL/6 und CBA Mäusen deutlich höher ist [125, 150]. In einer weiteren Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die komplette Deletion von Treg-Zellen zu einem Anstieg der Wurmanzahl am Tag 28 nach Infektion führte [178]. In den Treg-Zell-depletierten Mäusen kam es zur IFN- γ vermittelten Inhibition von IL-4 sowie zur erhöhten Expression von IFN- γ und IL-6. IL-6 kann von unterschiedlichen Immun- sowie Gewebezellen exprimiert werden und erhöht die Empfänglichkeit gegenüber *H. polygyrus* Infektionen [189]. Die teilweise Deletion von Treg-Zellen durch anti-CD25 Antikörper in BALB/c Mäusen führte hingegen zu einer sehr geringen Wurmzahl am Tag 21 und 28 nach Infektion, wobei ein Großteil der behandelten Mäuse keine Würmer mehr aufwies. Dies war verbunden mit einem signifikanten Anstieg von parasiten-spezifischen IL-4 im Vergleich zu Tieren, die nicht mit anti-CD25 Antikörper behandelt wurden. Diese Studie zeigt somit, dass eine komplette Deletion der Treg-Zellen zu einer erhöhten Parasitenfitness führt. Dahingegen führt eine partielle Inhibierung der Treg-Zellen zu einer geringeren Parasitenfitness im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp Tieren. Demnach ist ein kleiner Teil an Treg-Zellen notwendig, um eine schützende Th2-zellvermittelte Immunantwort gegen *H. polygyrus* Infektionen auslösen zu können. Jedoch wurde in dieser Studie der Phänotyp der Treg-Zellen nicht weiter untersucht. Ein möglicher Treg-Zelltyp, der für die verstärkte Th2-Aktivität verantwortlich sein kann, sind ILT3⁺ (Immunglobulin-like transcript 3) Treg-Zellen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von ILT3 auf der Oberfläche von Treg-Zellen durch die Caseinkinase 2 (CK2) reguliert wird. Bei einer Deletion von CK2 in Treg-Zellen kam es dann zur Expression von ILT3 und damit verbunden zu einem signifikanten Anstieg von

- Diskussion -

GATA-3⁺ jedoch nicht T-bet⁺ T-Zellen [190]. Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass dieser Treg-Zelltyp die Manifestation von Asthma in C57BL/6 Mäusen begünstigt und vermehrt ILT3⁺ Treg-Zellen in *Litomosoides sigmodontis* infizierten BALB/c Mäusen im Vergleich zu naiven Kontrollen gefunden wurden. Inwieweit ILT3⁺ Treg-Zellen in *H. polygyrus* Infektionen und in der Ausbildung von Th2/1-Hybridzellen in verschiedenen Mausstämmen eine Rolle spielen wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte zudem in IFN- γ behandelten *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 Mäusen eine Abnahme von RELM- β im Dünndarmgewebe beobachtet werden. RELM- β wird von Becherzellen, die aus epithelialen Stammzellen entstehen [191], sezerniert. Die Expression von RELM- β wird in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Mukoviszidose sowie Helmintheninfektionen induziert [42, 43, 192-194]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass RELM- β die Fitness von *H. polygyrus* negativ beeinflussen kann, indem es die Nahrungsaufnahme und damit den Protein- und ATP-Gehalt der Nematoden senkt [42]. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 führen zur Zunahme von Becherzellen und zur erhöhten Produktion von RELM- β . Durch die Gabe von IFN- γ am Anfang der *H. polygyrus* Infektion konnte in dieser Arbeit das Verhältnis von Th2/1- zu Th2-Zellen in Richtung der Th2/1-Hybridzellausbildung begünstigt werden. Damit wurde auch die Aktivierung der Becherzellen inhibiert, was möglicherweise zu einer erhöhten Wurmlast in den behandelten Tieren beitrug. In vorherigen Studien [120, 122] und in der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass Th2/1-Hybridzellen weniger IL-4 und IL-13 als Th2-Zellen produzieren. Damit wurden lokal weniger Th2-Zytokine aufgrund der erhöhten Th2/1-Hybridzellpopulation im Dünndarm exprimiert, was zur verminderten Reaktion von RELM- β während der untersuchten *H. polygyrus* Infektion führte. In einer anderen Studie mit *Trichuris muris* infizierten C57BL/6 Mäusen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass RELM- β die IFN- γ -Produktion von CD4⁺ T-Helferzellen verstärken kann [195]. Dies könnte zusätzlich auch in *H. polygyrus* infizierten Mäusen zu einer verstärkten IFN- γ -Produktion von Th2/1-Hybridzellen führen.

Ein weiterer Zelltyp, der in Helmintheninfektionen eine wichtige Rolle spielt, sind Makrophagen. Abhängig von der Stimulation und Funktion unterscheidet man klassisch und alternativ aktivierte Makrophagen. Klassisch aktivierte Makrophagen werden durch LPS, TNF sowie IFN- γ aktiviert und töten intrazelluläre Pathogene durch die iNOS-abhängige NO-Produktion ab [47, 49]. Dahingegen wurden AAM vor allem in Bezug auf Heilungsprozessen sowie in der Abwehr von Helminthen beschrieben [50-53]. Bei der Wundheilung sezernieren AAM Kollagenasen und Elastasen, um beschädigtes Gewebe zu entfernen. Darüber hinaus exprimieren AAM Zytokine und Chemokine wie TNF- α

- Diskussion -

sowie dem Wachstumsfaktor bFGF (basic fibroblast growth factor), die die Angiogenese, Epithelisation und Einwanderung von Fibroblasten, Endothelzellen sowie Keratinozyten in die Wunde induzieren und damit den Wundverschluss einleiten [196]. In Studien mit *H. polygyrus* sowie *N. brasiliensis* infizierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die von AAM exprimierte Arginase-1 wichtig für die schützende Immunantwort gegen diese Nematoden ist. Die Inhibition von Arginase-1 führte dabei zur erhöhten Empfänglichkeit für *H. polygyrus* Reinfektionen [52]. RELM- α wird dahingegen als ein regulatives Molekül von AAM beschrieben und inhibiert die durch Th2-Zellen induzierte Pathologie in Nematodeninfektionen [54, 55]. RELM- α kann durch die Expression von YM-1 in Makrophagen induziert werden [50]. Darüber hinaus scheint YM-1 chemotaktische Aktivität aufzuweisen und führt zum Einwandern von T-Zellen, Knochenmarkszellen sowie eosinophilen Granulozyten [44, 56, 57]. AAM sind demnach in der Lage die Immunantwort gegen Helminthen effektiv zu unterstützen und gleichzeitig die immunpathologischen Folgen zu begrenzen sowie die Wundheilung einzuleiten. In dieser Arbeit konnte in IFN- γ behandelten *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 Mäusen ein Anstieg von iNOS und einer Abnahme von RELM- α im Dünndarmgewebe beobachtet werden. Dies weist daraufhin, dass die erhöhte IFN- γ -Produktion zu einer Zunahme von klassisch aktivierten Makrophagen und einer Abnahme von AAM führte. In einer früheren *in vitro* Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Th2/1-Hybridzellen in der Lage sind die NO-Produktion von Makrophagen zu induzieren [122]. Des Weiteren konnte in anderen Studien sowie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass BALB/c im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen verstärkt Marker von AAM in einer *H. polygyrus* Infektion exprimieren [125]. Daher wurde untersucht, ob die Erhöhung von Th2/1-Hybridzellen als IFN- γ -Quelle in C57BL/6 im Unterschied zu BALB/c Mäusen die Differenzierung von alternativ aktivierten Makrophagen inhibiert und stattdessen die Bildung klassisch-aktivierter Makrophagen begünstigt. In BALB/c und C57BL/6 Mäusen konnte kein Unterschied in der Frequenz peritonealer Makrophagen während einer *H. polygyrus* Infektion festgestellt werden. In Übereinstimmung mit einer Studie [125] wiesen infizierte BALB/c Mäuse im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen höhere Frequenzen alternativ aktivierter Makrophagen auf. Weiterhin zeigten Makrophagen von *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 im Gegensatz zu BALB/c Mäusen eine höhere Bereitschaft das freie Radikal NO, das von iNOS⁺ klassisch aktivierten Makrophagen produziert wird, freizusetzen. Eine Färbung von iNOS in Makrophagen für den durchflusszytometrischen Nachweis gelang in unserem Labor bis zum Verfassen dieser Arbeit leider nicht. Nichtsdestotrotz scheint die erhöhte IFN- γ -Produktion in *H. polygyrus* infizierten Tieren, die auf die Th2/1-Hybridzellen zurückzuführen ist, die Induktion von klassisch-aktivierten Makrophagen und damit die Empfänglichkeit zu *H. polygyrus* Infektion zu unterstützen.

Der Aktivierungszustand von Makrophagen scheint zudem eine gewisse Plastizität aufzuweisen [197]. In einer Studie wurden C57BL/6 Mäusen lebende adulte *Brugia malayi* in die Bauchhöhle transferiert. Nach drei Wochen wurden die peritonealen Makrophagen isoliert und *ex vivo* mit LPS und IFN- γ stimuliert. Während die isolierten Zellen YM-1, RELM- α sowie Arginase-1 exprimierten und damit einen AAM-Phänotyp aufwiesen bewirkte die 24-stündige Inkubation mit LPS und IFN- γ die Herabregulation von AAM-Molekülen, die Expression von iNOS und damit den Wechsel zum klassisch aktivierten Phänotyp. Dieser Wechsel war auch durch die alleinige Gabe von IFN- γ zu sehen, wurde jedoch durch die zusätzliche Gabe von LPS verstärkt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da durch die Migration von Helminthen auch bakterielle Koinfektionen auftreten können. Damit könnte die Produktion von IFN- γ durch Th2/1-Hybridzellen auch die Möglichkeit offen halten auf eine sekundäre mikrobielle Infektion zu reagieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte von unterschiedlich Th2/1-Hybridzellkompetenten Mäusen die Makrophagen isoliert werden und deren Fähigkeit zur Abtötung von Bakterien in *in vitro* Assays (z. B. Phagozytose-Assay) analysiert werden [198].

4.3 Mögliche Beeinträchtigung der Vakzinierungseffizienz durch Th2/1-Hybridzellinduktion

Bisher gibt es keine Impfstoffe gegen Nematoden für die Anwendung im Menschen und nur wenige wirksame Vakzine gegen Parasiteninfektionen wurden für Nutztiere entdeckt, von denen ein sehr kleiner Bruchteil auf dem Markt ist [20, 199-202]. *H. polygyrus* ist, wie zuvor erwähnt, nahe verwandt mit humanen Hakenwürmern einschließlich *Necator americanus* sowie *Ancylostoma duodenale*, sowie mit verschiedenen Magen- und Dünndarmnematoden mit veterinärmedizinischer Bedeutung, z. B. *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* sowie *Nematodirus battus* [14, 20, 203-206]. Er wird daher als Modellorganismus zur Entwicklung von Vakzinen gegen Nematodeninfektionen verwendet. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch Bestrahlung inaktivierte *H. polygyrus* Larven des vierten Stadiums (L4) zu einer effizienten Immunisierung in Mäusen führten [146]. In einer weiteren Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die Immunisierung von empfänglichen C57BL/6 Mäusen mit exkretorisch/sekretorischen Produkten von L4 und adulten *H. polygyrus* eine schützende Immunität induziert [148]. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich die Reaktivität der T-Helferzellen auf verschiedene Antigene von *H. polygyrus* Lebensstadien unterscheidet. Dabei zeigte sich unabhängig von den genutzten Mausstämmen eine deutlich höhere Reaktivität von T-Helferzellen gegenüber Antigenen des in der Submukosa des Dünndarms sitzenden L4-Stadiums von

- Diskussion -

H. polygyrus im Vergleich zu Antigenen des adulten und L3-Stadiums. Interessanterweise war kaum eine antigen-spezifische Aktivierung der T-Helferzellen durch L3-Antigen zu erkennen. Da T-Helferzellen wichtig für die Aktivierung und den Klassenwechsel von B-Zellen sind stellen Antigene von *H. polygyrus* L4-Stadium demnach eine sehr gute Option für die Isolation von Vakzinkandidaten dar. Zudem konnte in den letzten Jahren durch Proteomanalysen von Antigenen aus adulten und von L4 stammenden exkretorisch/sekretorischen Produkten von *H. polygyrus* Vakzinkandidaten, die eine schützende Th2-assoziierte IgG1 Antikörperantwort induzieren können, gewonnen werden [147, 148]. Die Aktivierung von B-Zellen erfolgt in den sekundären Lymphorganen wie der Milz und den Lymphknoten [207]. Nach der Bindung an den B-Zellrezeptor und der endozytose-vermittelten Aufnahme wird das Antigen schließlich in einem MHCII-Komplex an der Zelloberfläche der B-Zellen präsentiert. T-Helferzellen, die durch das gleiche Antigen aktiviert wurden, können den MHCII-Antigen-Komplex mit ihrem TZR binden und exprimieren daraufhin den CD40-Liganden (CD40-L) an ihrer Zelloberfläche. Durch die Interaktion von CD40 proliferieren und differenzieren B-Zellen zu Immunoglobulin-sezernierenden Plasmazellen. Dabei wird der Klassenwechsel der B-Zellen durch die Zytokinproduktion der aktivierenden T-Helferzellen bestimmt. Während IL-4 den Klassenwechsel zu IgG1 sowie IgE auslöst, führt IFN- γ zu IgG2a/c-sezernierenden B-Zellen [208]. IFN- γ kann zudem auch in Anwesenheit von IL-4 die Expression von T-bet in B-Zellen und damit den Klassenwechsel zu dem Th1-assoziierten IgG2a/c induzieren [209, 210]. Aus diesem Grund war es von Interesse zu untersuchen, ob die Applikation von HES allein ohne Zugabe jeglicher Adjuvantien, die je nach Art entweder die Th1- oder Th2-Zellantwort verstärken können, zu einer Induktion einer Th2-Zellantwort mit Th2/1-Hybridzellen führt. Die einmalige subkutane Applikation von HES adulter *H. polygyrus* ohne Nutzung von Adjuvantien führte in C57BL/6 Mäusen zu einer leichten, jedoch signifikanten Induktion von Th2-Zellen in der Milz und den Lymphknoten der Haut. Weiterhin konnte auch ein signifikanter Anstieg von Th2/1-Hybridzellen in der Milz beobachtet werden. In den chronisch mit *H. polygyrus* infizierten C57BL/6 Mäusen, die durch die IFN- γ Behandlung einen größeren Anteil an Th2/1-Hybridzellanteil aufwiesen, konnte in dieser Arbeit jedoch kein Hinweis auf das Senken der IgG1⁺ B-Zellen gefunden werden. Jedoch ist auch das Th2-Zytokin IL-5 in der Lage den Klassenwechsel von B-Zellen in Richtung IgG1 zu aktivieren [211]. In einer Studie konnte zudem gezeigt werden, dass IFN- γ zwar in der Lage ist, die Proliferation aber nicht die Differenzierung und den damit einhergehenden Klassenwechsel durch IL-5 aktivierte B-Zellen zu inhibieren [210]. Daher sollte in nachfolgenden Studien zusätzlich untersucht werden, ob ein Verschieben des Th2/1- zu Th2-Zellverhältnisses zugunsten von Th2-Zellen zu einer höheren

- Diskussion -

Immunität gegen den Parasiten bei vorheriger Applikation von Th2-induzierenden Parasitenantigenen führt, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein größerer Anteil von Th2/1-Hybridzellen zu einem Klassenwechsel in Richtung Th1-Antikörper führt. Falls dies der Fall ist, könnte eine Vakzinoptimierung durch die Blockade von IFN- γ erfolgen, wodurch die Expression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 durch die erhöhte GATA-3⁺Tbet^{neg} Th2-Zellpopulation verstärkt werden würde.

Darüber hinaus konnte in einer Studie gezeigt werden, dass sich der Aufbau einer schützenden Immunität gegen *H. polygyrus* in den unterschiedlichen Mausstämmen unterscheidet [212]. In einer weiteren Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl BALB/c als auch C57BL/6 Mäusen nach der Applikation von HES mit Aluminiumhaltigem Adjuvant eine schützende Immunität gegen *H. polygyrus* induzieren [213]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass man in HES-behandelten Tieren am Tag 14 und 28 nach *H. polygyrus* Infektion keine adulten Würmer im Lumen auffinden kann. Jedoch führte die HES-Vakzinierung zu keinem Unterschied der Larvenanzahl in der Dünndarmwand am Tag 7 nach der Infektion. Der Studie zufolge blockiert die HES-Vakzinierung die Entwicklung von adulten *H. polygyrus* und führt damit dazu, dass *H. polygyrus* zwar in die Submukosa eindringen, jedoch nicht mehr zurück in den Dünndarmlumen gelangen kann. Dies könnte vor allem bei Helminthen, die beispielsweise wie der humanpathogene Hakenwurm *Ancylostoma duodenale* durch den Körper (einschließlich Blutkreislauf und Lunge) migrieren bevor sie schlussendlich im Darm angelangen, aber zu einer erhöhten Immunpathologie führen. Große immunpathologische Folgen können auch in Menschen beobachtet werden, dessen Immunsystem zwar in der Lage ist, die Helminthen während der Infektion abzutöten, jedoch mit großen immunpathologischen Folgen aufgrund der Entzündungsreaktionen sowie zurückbleibenden toten Parasiten einhergeht [214-216]. Daher ist bei der Entwicklung darauf zu achten, dass die eindringenden Helminthen möglichst schnell immobilisiert und abgetötet werden und die ausgelöste Immunantwort keine schwerwiegende Pathologie verursacht. Interessanterweise konnte zudem in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass durch IFN- γ induzierte IgG2a/c Antikörper bei der durch Makrophagen-vermittelten Immunität gegen *H. polygyrus* eine Rolle spielen könnten, da Makrophagen, die IgG2a/c über ihre Fc-Rezeptoren gebunden hatten, die Mobilität der *H. polygyrus* Larven *in vitro* inhibierten [217]. Diese Schutzfunktion konnte aber bisher noch nicht *in vivo* gezeigt werden. Zur Entwicklung effektiver Impfstoffe gegen humanpathogene Helminthen mit wenig immunpathologischen Potenzial ist demnach noch weitere Forschung notwendig und es bleibt zu ergründen, ob Th2/1-Hybridzellen dabei eine Rolle spielen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Nicole Affinass

Danksagungen

Ich möchte mich zuallererst bei Prof. Susanne Hartmann für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit zu schreiben und die damit verbundene Aufnahme in das strukturierte Promotionsprogramm GRK2046 bedanken. Dies ermöglichte es mir, mein Thema auch außerhalb der Arbeitsgruppe im In- und Ausland vorzustellen und viele Ideen zur Weiterentwicklung des Projektes zu erhalten.

Ein besonderer Dank geht dabei auch an Sebastian, der mich über die ganze Zeit betreut hat und nicht müde wurde, mit mir die möglichen Funktionen von den Hybridzellen zu diskutieren, um immer wieder neue Strategien auszuarbeiten, um diesen Zellen auf den Grund zu gehen. Ich danke ihm auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich möchte auch unseren technischen Assistentinnen für ihre großartige Hilfe bei den Sektionen danken, ohne die es nicht möglich wäre, so viele Organe gleichzeitig zu bearbeiten und die auch immer für Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere möchte ich Yvonne für die Hilfe bei der Bearbeitung der vielen ELISA-Platten und qPCRs danken.

Ein großer Dank geht auch an die anderen Doktoranden, die jederzeit bereit waren, bei Sektionen einzuspringen, wenn Not am Mann war und mit denen man gerne bis spät in die Nacht und am Wochenende zusammengearbeitet hat, um sich gegenseitig zu unterstützen. Ein besonderer Dank geht dabei an: Cristin, die mich ins Labor eingewiesen hat und mit der ich oft zusammen bis Mitternacht am FACS-Gerät saß und philosophiert habe. Lisa, die immer bereit war, mich zu unterstützen und zur Seite stand, wenn es mal nicht so gut lief. Ankur, für all die liebenswürdig ironischen Unterhaltungen und der tiefgründigen Diskussionen bei einem Feierabendbier. Norus, für all den Spaß beim gemeinsamen Kot sammeln und zerstampfen.

Ich möchte auch unseren Koordinatoren von GRK2046 und ZIBI danken, die man jederzeit bei Fragen und Problemen ansprechen konnte und die für einen reibungslosen Ablauf bei unter anderem Retreats gesorgt haben.

Ich möchte mich insbesondere auch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich jederzeit unterstützt und für schöne Ablenkungen gesorgt haben. Ein großer Dank geht dabei an meine Eltern und Fabian, die sich viel um meinen Hund Sarow gekümmert haben, wenn ich es aufgrund der Arbeitszeiten nicht konnte, und auch an Sarow selbst, der mich jahrelang treu begleitet hat und mir immer wieder gezeigt hat, wie schön das Leben sein kann.

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. duodenale</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>
AAM	alternativ aktivierte Makrophagen
Ag	Antigen
APC	Antigen-präsentierende Zellen
bFGF	basic fibroblast growth factor
CD	Cluster of Differentiation; Unterscheidungsgruppen
CD40-L	CD40-Ligand
CK2	Caseinkinase 2
CLR	C-Typ Lektin-Rezeptoren
DC	dendritische Zellen
FACS	fluorescence-activated cell sorting
GATA-3	GATA-binding protein 3
GF	germ-free; keimfrei
H. p.	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>
<i>H. polygyrus</i>	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>
Haut LN	Lymphknoten der Haut
HES	<i>H. polygyrus</i> exkretorisch/sekretorischen Produkte
HpARI	<i>H. polygyrus</i> alarmin release inhibitor
Hp-TGM	<i>H. polygyrus</i> TGF- β mimic
IFN	Interferon
IFN- γ R ^{-/-}	IFN γ -Rezeptor-knock out
IL	Interleukine
ILC2	innate lymphoide Zellen vom Typ 2
ILT3	Immunglobulin-like transcript 3
iNOS	induzierbare NO-Synthase; induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
JAK	Janus-Tyrosin-Kinasen
L1/2/4	Larve im Stadium 1/2/4
L3	Larve im infektiösen Stadium 3
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitätskomplex

mLN	mesenterial lymph node; mesenterialen Lymphknoten
<i>N. americanus</i>	<i>Necator americanus</i>
<i>N. battus</i>	<i>Nematodirus battus</i>
<i>N. brasiliensis</i>	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
neg	negativ
NO	Stickstoffmonoxid
PRR	Pattern Recognition Receptors; Mustererkennungsrezeptoren
RELM- α / β	resistin-like molecule α / β
rIFN- γ	rekombinantes IFN- γ
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. ratti</i>	<i>Strongyloides ratti</i>
<i>S. stercoralis</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
SD	Standardabweichung
siLP	small intestinal lamina propria; Lamina Propria des Dünndarms
SPF	spezifisch Pathogen-frei
STAT4/6	signal transducer and activator of transcription 4/6
<i>T. colubriformis</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
<i>T. muris</i>	<i>Trichuris muris</i>
T-bet	T-box-containing protein expressed in T cells
Th	T-Helferzellen
TGF- β	transforming growth factor β
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TSLP	thymic stromal lymphopietin
TZR	T-Zellrezeptor
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
YM-1	Chitinase 3-like 3 protein

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Lebenszyklus von <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	3
Abb. 1.2 Immunantwort und Immunmodulation in einer <i>H. polygyrus</i> Infektion.....	7
Abb. 1.3 Charakteristika der Th2-, Th2/1- und Th1-Zellen	11
Abb. 3.1 Gatingstrategie für T-Helferzelltypen und deren Zytokinproduktion.....	27
Abb. 3.2 T-Helferzellantwort während verschiedener Phasen der <i>H. polygyrus</i> Infektion.....	28
Abb. 3.3 T-Helferzellantwort in Mäusen befallen mit der Zecke <i>Ixodes ricinus</i>	30
Abb. 3.4 Systemische und lokale IFN- γ Aktivität während <i>H. polygyrus</i> Infektion.....	31
Abb. 3.5 Nachweis der parasiten-spezifischen Produktion von IFN- γ durch Th2/1-Zellen	33
Abb. 3.6 Th2/1-Hybridzellen entstehen aus naiven T-Zellen während einer Nematodeninfektion.....	36
Abb. 3.7 T-Helferzellantwort in C57BL/6 mit und ohne Mikrobiota.....	38
Abb. 3.8 <i>H. polygyrus</i> Infektion in C57BL/6 und BALB/c Mäusen.....	39
Abb. 3.9 Expansion, Migration und Phänotyp von GATA-3 ⁺ T-Helferzellen in <i>H. polygyrus</i> -infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen.....	40
Abb. 3.10 Antigen-spezifische T-Zellantwort im empfänglichen Mausstamm C57BL/6 und eher resistenten Stamm BALB/c bei einer <i>H. polygyrus</i> Infektion.....	42
Abb. 3.11 Effekte der IFN- γ Applikation und fehlender IFN- γ -Signale auf die systemische T-Zellantwort von <i>H. polygyrus</i> -infizierten C57BL/6 Mäusen	44
Abb. 3.12 Effekte der IFN- γ Applikation und fehlender IFN- γ -Signale auf die intestinale T-Zellantwort sowie parasitologische Parameter.....	46
Abb. 3.13 Effekte der frühen IFN- γ Gabe auf immunologische und parasitologische Parameter in der chronischen Infektionsphase einer <i>H. polygyrus</i> Infektion	47
Abb. 3.14 Makrophagen-Polarisierung <i>H. polygyrus</i> infizierter C57BL/6 und BALB/c Mäuse	49
Abb. 3.15 Effekte der HES-Applikation auf die Th2- und Th2/1-Zellantwort in C57BL/6 Mäusen.....	51

Publikationen und Konferenzen

1.1 Publikationen

Affinass, N., Zhang, H., Löhning, M., Hartmann, S., und Rausch, S., *Manipulation of the balance between Th2 and Th2/1 hybrid cells affects parasite nematode fitness in mice*. European Journal of Immunology, 2018. 48(12): p. 1958-1964.

Rausch, S., Midha, A., Kuhring, M., **Affinass, N.**, Radonic, A., Köhl, A. A., Bleich, A., Renard, B. Y., und Hartmann, S., *Parasitic Nematodes Exert Antimicrobial Activity and Benefit From Microbiota-Driven Support for Host Immune Regulation*. Frontiers in Immunology, 2018. 9(2282).

Ahmed, N., Heitlinger, E., **Affinass, N.**, Köhl, A. A., Xenophontos, N., Jarquin, V. H., Jost, J., Steinfelder, S., und Hartmann, S., *A Novel Non-invasive Method to Detect RELM Beta Transcript in Gut Barrier Related Changes During a Gastrointestinal Nematode Infection*. Frontiers in Immunology, 2019. 10(445).

1.2 Konferenzen

Affinass, N., Löhning, M., Hartmann, S., und Rausch, S., *Manipulation of the Th2/1 to Th2 ratio affects the fitness of parasitic nematodes*, 5th European Congress of Immunology, September 2018, Amsterdam, Niederlande

Affinass, N., Hartmann, S., und Rausch, S., *Host age and background affect the phenotype of GATA-3 expressing CD4+ T cell in nematode infection*, 28th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, März 2018, Berlin, Deutschland

Affinass, N., Hartmann, S., und Rausch, S., *Bifunctional Th2/1 hybrid cells induced in helminth infection might play a role in the protection against reinfection*, April 2017, 21th Annual Woods Hole Immunoparasitology Meeting, Woods Hole, USA

Affinass, N., Bock, C., Rausch, S., und Hartmann, S., *Induction of Th2/1 hybrid CD4+ T cells in parasite infections*, September 2016, 46th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), Hamburg, Deutschland

Affinass, N., Hartmann, S., *Th2/1 hybrid cells arise during parasite infections*, 19th Meeting on T Cells Subsets and Functions, Juni 2016, Marburg, Deutschland

Affinass, N., Bock, C., Rausch, S., und Hartmann, S., *Functional characterisation of Th2/1 hybrid CD4+ T cells induced in parasite infections*, 27th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, März 2016, Göttingen, Deutschland

Literaturverzeichnis

1. Cox, F. E. G., *History of Human Parasitology*. Clinical Microbiology Reviews, 2002. 15(4): p. 595-612.
2. Ambroise-Thomas, P., *Parasitic diseases and immunodeficiencies*. Parasitology, 2001. 122 Suppl: p. S65-71.
3. Jourdan, P. M., Lamberton, P. H. L., Fenwick, A., and Addiss, D. G., *Soil-transmitted helminth infections*. Lancet, 2018. 391(10117): p. 252-265.
4. Steelman, C. D., *Effects of external and internal arthropod parasites on domestic livestock production*. Annu Rev Entomol, 1976. 21: p. 155-78.
5. Hopla, C. E., Durden, L. A., and Keirans, J. E., *Ectoparasites and classification*. Rev Sci Tech, 1994. 13(4): p. 985-1017.
6. Jongejans, F. and Uilenberg, G., *Ticks and control methods*. Rev Sci Tech, 1994. 13(4): p. 1201-26.
7. de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., and Sonenshine, D. E., *Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals*. Front Biosci, 2008. 13: p. 6938-46.
8. Aspöck, H., Auer, H., and Walochnik, J., *Parasiten und parasitäre Erkrankungen des Menschen in Mitteleuropa im Überblick*. Denisia, 2002.
9. Craig, P., *Echinococcus multilocularis*. Curr Opin Infect Dis, 2003. 16(5): p. 437-44.
10. Wu, G. Y. and Halim, M. H., *Schistosomiasis: progress and problems*. World journal of gastroenterology, 2000. 6(1): p. 12-19.
11. Cunin, P., Tchuem Tchuente, L. A., Poste, B., Djibrilla, K., and Martin, P. M., *Interactions between Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni in humans in north Cameroon*. Trop Med Int Health, 2003. 8(12): p. 1110-7.
12. Hall, A., Hewitt, G., Tuffrey, V., and de Silva, N., *A review and meta-analysis of the impact of intestinal worms on child growth and nutrition*. Matern Child Nutr, 2008. 4 Suppl 1: p. 118-236.
13. Stepek, G., Buttle, D. J., Duce, I. R., and Behnke, J. M., *Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required?* International journal of experimental pathology, 2006. 87(5): p. 325-341.
14. Lustigman, S., Prichard, R. K., Gazzinelli, A., Grant, W. N., Boatman, B. A., McCarthy, J. S., and Basáñez, M.-G., *A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis*. PLoS neglected tropical diseases, 2012. 6(4): p. e1582-e1582.
15. Jia, T. W., Melville, S., Utzinger, J., King, C. H., and Zhou, X. N., *Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. 6(5): p. e1621.
16. 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 Vercruyse, J., *Assessment of anthelmintic efficacy of mebendazole in school children in six countries where soil-transmitted helminths are endemic*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. 8(10): p. e3204.
17. Geerts, S. and Gryseels, B., *Anthelmintic resistance in human helminths: a review*. Trop Med Int Health, 2001. 6(11): p. 915-21.
18. Vercruyse, J., Albonico, M., Behnke, J. M., Kotze, A. C., Prichard, R. K., McCarthy, J. S., Montresor, A., and Levecke, B., *Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths?* International journal for parasitology. Drugs and drug resistance, 2011. 1(1): p. 14-27.
19. Guo, Z., González, J. F., Hernandez, J. N., McNeilly, T. N., Corripio-Miyar, Y., Frew, D., Morrison, T., Yu, P., and Li, R. W., *Possible mechanisms of host resistance to Haemonchus contortus infection in sheep breeds native to the Canary Islands*. Scientific Reports, 2016. 6: p. 26200.
20. Hewitson, J. P. and Maizels, R. M., *Vaccination against helminth parasite infections*. Expert Rev Vaccines, 2014. 13(4): p. 473-87.

21. Noon, J. B. and Aroian, R. V., *Recombinant subunit vaccines for soil-transmitted helminths*. *Parasitology*, 2017. 144(14): p. 1845-1870.
22. Stutzer, C., Richards, S. A., Ferreira, M., Baron, S., and Maritz-Olivier, C., *Metazoan Parasite Vaccines: Present Status and Future Prospects*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018. 8(67).
23. Gregory, R. D., Keymer, A. E., and Clarke, J. R., *Genetics, Sex and Exposure: The Ecology of Heligmosomoides polygyrus (Nematoda) in the Wood Mouse*. *Journal of Animal Ecology*, 1990. 59(1): p. 363-378.
24. al-Bassel, D. A., Stietieh, F. M., and Farrag, A. M., *On the morphology of Heligmosomoides polygyrus (Nematoda-Trichostrongylidae) from the field mouse apodemus sylvaticus*. *J Egypt Soc Parasitol*, 2000. 30(1): p. 43-9.
25. Bansemir, A. D. and Sukhdeo, M. V., *The food resource of adult Heligmosomoides polygyrus in the small intestine*. *J Parasitol*, 1994. 80(1): p. 24-8.
26. Svetic, A., Madden, K. B., Zhou, X. D., Lu, P., Katona, I. M., Finkelman, F. D., Urban, J. F., Jr., and Gause, W. C., *A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3*. *J Immunol*, 1993. 150(8 Pt 1): p. 3434-41.
27. Urban, J. F., Jr., Katona, I. M., Paul, W. E., and Finkelman, F. D., *Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(13): p. 5513-7.
28. Oppenheim, J. J. and Yang, D., *Alarmins: chemotactic activators of immune responses*. *Curr Opin Immunol*, 2005. 17(4): p. 359-65.
29. Hepworth, M. R., Danilowicz-Luebert, E., Rausch, S., Metz, M., Klotz, C., Maurer, M., and Hartmann, S., *Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(17): p. 6644-9.
30. Schweitzer, A. N. and Sharpe, A. H., *Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production*. *J Immunol*, 1998. 161(6): p. 2762-71.
31. Gudmundsdottir, H., Wells, A. D., and Turka, L. A., *Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity*. *J Immunol*, 1999. 162(9): p. 5212-23.
32. London, C. A., Lodge, M. P., and Abbas, A. K., *Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells*. *J Immunol*, 2000. 164(1): p. 265-72.
33. Jenkins, S. J., Perona-Wright, G., Worsley, A. G., Ishii, N., and MacDonald, A. S., *Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo*. *J Immunol*, 2007. 179(6): p. 3515-23.
34. Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W., and Hansbro, P. M., *Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?* *Immunology*, 2008. 123(3): p. 326-38.
35. Mohrs, M., Shinkai, K., Mohrs, K., and Locksley, R. M., *Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter*. *Immunity*, 2001. 15(2): p. 303-11.
36. Grecis, R. K., *Immunity to Helminths: Resistance, Regulation, and Susceptibility to Gastrointestinal Nematodes*. *Annual Review of Immunology*, 2015. 33(1): p. 201-225.
37. Allen, J. E. and Maizels, R. M., *Diversity and dialogue in immunity to helminths*. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(6): p. 375-88.
38. Allen, J. E. and Sutherland, T. E., *Host protective roles of type 2 immunity: parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin*. *Semin Immunol*, 2014. 26(4): p. 329-40.
39. Akiho, H., Blennerhassett, P., Deng, Y., and Collins, S. M., *Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. 282(2): p. G226-32.
40. Cliffe, L. J., Humphreys, N. E., Lane, T. E., Potten, C. S., Booth, C., and Grecis, R. K., *Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion*. *Science*, 2005. 308(5727): p. 1463-5.

41. 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., Grecnis, R. K., and Thornton, D. J., *Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes*. J Exp Med, 2011. 208(5): p. 893-900.
42. 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., Schad, G. A., Scott, P., and Wu, G. D., *RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(37): p. 13596-600.
43. 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., Jr., Rothenberg, M. E., and Finkelman, F. D., *Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection*. J Exp Med, 2009. 206(13): p. 2947-57.
44. Raes, G., De Baetselier, P., Noel, W., Beschin, A., Brombacher, F., and Hassanzadeh Gh, G., *Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages*. J Leukoc Biol, 2002. 71(4): p. 597-602.
45. 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., *Alternatively activated macrophage-derived RELM-alpha is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung*. J Exp Med, 2009. 206(4): p. 937-52.
46. Gordon, S. and Martinez, F. O., *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. 32(5): p. 593-604.
47. Mosser, D. M. and Edwards, J. P., *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nature reviews. Immunology, 2008. 8(12): p. 958-969.
48. Mosser, D. M. and Zhang, X., *Activation of murine macrophages*. Current protocols in immunology, 2008. Chapter 14: p. Unit-14.2.
49. Martinez, F. O. and Gordon, S., *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000prime reports, 2014. 6: p. 13-13.
50. Sutherland, T. E., Ruckerl, D., Logan, N., Duncan, S., Wynn, T. A., and Allen, J. E., *Ym1 induces RELMalpha and rescues IL-4Ralpha deficiency in lung repair during nematode infection*. PLoS Pathog, 2018. 14(11): p. e1007423.
51. Murray, P. J. and Wynn, T. A., *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nature reviews. Immunology, 2011. 11(11): p. 723-737.
52. Anthony, R. M., Urban, J. F., Jr., Alem, F., Hamed, H. A., Rozo, C. T., Boucher, J. L., Van Rooijen, N., and Gause, W. C., *Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites*. Nat Med, 2006. 12(8): p. 955-60.
53. Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Rozo, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., Urban, J. F., Jr., Wynn, T. A., and Gause, W. C., *An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection*. Nat Med, 2012. 18(2): p. 260-6.
54. Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Wilson, M. S., Mentink-Kane, M. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Urban, J. F., Jr., and Wynn, T. A., *Retnla (relmalphafizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity*. PLoS pathogens, 2009. 5(4): p. e1000393-e1000393.
55. Chen, G., Wang, S. H., Jang, J. C., Odegaard, J. I., and Nair, M. G., *Comparison of RELMalpha and RELMbeta Single- and Double-Gene-Deficient Mice Reveals that RELMalpha Expression Dictates Inflammation and Worm Expulsion in Hookworm Infection*. Infect Immun, 2016. 84(4): p. 1100-1111.
56. Chang, N. C., Hung, S. I., Hwa, K. Y., Kato, I., Chen, J. E., Liu, C. H., and Chang, A. C., *A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin*. J Biol Chem, 2001. 276(20): p. 17497-506.
57. Roszer, T., *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. Mediators Inflamm, 2015. 2015: p. 816460.
58. Harris, N. and Gause, W. C., *To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths*. Trends Immunol, 2011. 32(2): p. 80-8.
59. Satoguina, J. S., Weyand, E., Larbi, J., and Hoerauf, A., *T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10*. J Immunol, 2005. 174(8): p. 4718-26.

60. 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., *Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection*. Cell Host Microbe, 2008. 4(4): p. 362-73.
61. Wojciechowski, W., Harris, D. P., Sprague, F., Mousseau, B., Makris, M., Kusser, K., Honjo, T., Mohrs, K., Mohrs, M., Randall, T., and Lund, F. E., *Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to H. polygyrus*. Immunity, 2009. 30(3): p. 421-33.
62. Strandmark, J., Steinfelder, S., Berek, C., Kuhl, A. A., Rausch, S., and Hartmann, S., *Eosinophils are required to suppress Th2 responses in Peyer's patches during intestinal infection by nematodes*. Mucosal Immunol, 2017. 10(3): p. 661-672.
63. Abraham, D., Leon, O., Schnyder-Candrian, S., Wang, C. C., Galioto, A. M., Kerepesi, L. A., Lee, J. J., and Lustigman, S., *Immunoglobulin E and eosinophil-dependent protective immunity to larval Onchocerca volvulus in mice immunized with irradiated larvae*. Infect Immun, 2004. 72(2): p. 810-7.
64. Takeda, K. and Akira, S., *Toll-like receptors*. Curr Protoc Immunol, 2015. 109: p. 14.12.1-10.
65. van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J. F., Kruize, Y. C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E. A., Espevik, T., de Jong, E. C., Kapsenberg, M. L., Golenbock, D. T., Tielens, A. G., and Yazdanbakhsh, M., *A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization*. J Biol Chem, 2002. 277(50): p. 48122-9.
66. 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., *Double-stranded RNAs from the helminth parasite Schistosoma activate TLR3 in dendritic cells*. J Biol Chem, 2005. 280(1): p. 277-83.
67. van Die, I. and Cummings, R. D., *The Mannose Receptor in Regulation of Helminth-Mediated Host Immunity*. Front Immunol, 2017. 8: p. 1677.
68. 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., *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 IFNgamma production*. Int J Parasitol, 2011. 41(13-14): p. 1335-45.
69. McSorley, H. J. and Maizels, R. M., *Helminth infections and host immune regulation*. Clin Microbiol Rev, 2012. 25(4): p. 585-608.
70. Maizels, R. M., Smits, H. H., and McSorley, H. J., *Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules*. Immunity, 2018. 49(5): p. 801-818.
71. Marques, R. E., Marques, P. E., Guabiraba, R., and Teixeira, M. M., *Exploring the Homeostatic and Sensory Roles of the Immune System*. Front Immunol, 2016. 7: p. 125.
72. Hewitson, J. P., Grainger, J. R., and Maizels, R. M., *Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity*. Mol Biochem Parasitol, 2009. 167(1): p. 1-11.
73. Coakley, G., Buck, A. H., and Maizels, R. M., *Host parasite communications-Messages from helminths for the immune system: Parasite communication and cell-cell interactions*. Mol Biochem Parasitol, 2016. 208(1): p. 33-40.
74. Zakeri, A., Hansen, E. P., Andersen, S. D., Williams, A. R., and Nejsum, P., *Immunomodulation by Helminths: Intracellular Pathways and Extracellular Vesicles*. Front Immunol, 2018. 9: p. 2349.
75. McSorley, H. J., Blair, N. F., Smith, K. A., McKenzie, A. N., and Maizels, R. M., *Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy*. Mucosal Immunol, 2014. 7(5): p. 1068-78.
76. Osbourn, M., Soares, D. C., Vacca, F., Cohen, E. S., Scott, I. C., Gregory, W. F., Smyth, D. J., Toivakka, M., Kemter, A. M., le Bihan, T., Wear, M., Hoving, D., Filbey, K. J., Hewitson, J. P., Henderson, H., Gonzalez-Ciscar, A., Errington, C., Vermeren,

- S., Astier, A. L., Wallace, W. A., Schwarze, J., Ivens, A. C., Maizels, R. M., and McSorley, H. J., *HpARI Protein Secreted by a Helminth Parasite Suppresses Interleukin-33*. *Immunity*, 2017. 47(4): p. 739-751.e5.
77. Johnston, C. J. C., Smyth, D. J., Kodali, R. B., White, M. P. J., 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., *A structurally distinct TGF- β mimic from an intestinal helminth parasite potently induces regulatory T cells*. *Nature Communications*, 2017. 8(1): p. 1741.
 78. La Flamme, A. C., Patton, E. A., and Pearce, E. J., *Role of gamma interferon in the pathogenesis of severe schistosomiasis in interleukin-4-deficient mice*. *Infection and immunity*, 2001. 69(12): p. 7445-7452.
 79. Ahmed, N., French, T., Rausch, S., Kuhl, A., Hemminger, K., Dunay, I. R., Steinfeldt, S., and Hartmann, S., *Toxoplasma Co-infection Prevents Th2 Differentiation and Leads to a Helminth-Specific Th1 Response*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. 7: p. 341.
 80. Coomes, S. M., Pelly, V. S., Kannan, Y., Okoye, I. S., Czieso, S., Entwistle, L. J., Perez-Lloret, J., Nikolov, N., Potocnik, A. J., Biro, J., Langhorne, J., and Wilson, M. S., *IFN γ and IL-12 Restrict Th2 Responses during Helminth/Plasmodium Co-Infection and Promote IFN γ from Th2 Cells*. *PLoS Pathog*, 2015. 11(7): p. e1004994.
 81. Hogquist, K. A., Baldwin, T. A., and Jameson, S. C., *Central tolerance: learning self-control in the thymus*. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(10): p. 772-82.
 82. Hogquist, K. A. and Jameson, S. C., *The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function*. *Nat Immunol*, 2014. 15(9): p. 815-23.
 83. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. 1986. *J Immunol*, 2005. 175(1): p. 5-14.
 84. Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M., and Romagnani, S., *Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production*. *J Clin Invest*, 1991. 88(1): p. 346-50.
 85. Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A., *Functional diversity of helper T lymphocytes*. *Nature*, 1996. 383(6603): p. 787-93.
 86. Wing, J. B. and Sakaguchi, S., *Multiple treg suppressive modules and their adaptability*. *Front Immunol*, 2012. 3: p. 178.
 87. Crotty, S., *T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease*. *Immunity*, 2014. 41(4): p. 529-42.
 88. Schmitt, E., Klein, M., and Bopp, T., *Th9 cells, new players in adaptive immunity*. *Trends Immunol*, 2014. 35(2): p. 61-8.
 89. Burkett, P. R., Meyer zu Horste, G., and Kuchroo, V. K., *Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity*. *J Clin Invest*, 2015. 125(6): p. 2211-9.
 90. DuPage, M. and Bluestone, J. A., *Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease*. *Nat Rev Immunol*, 2016. 16(3): p. 149-63.
 91. Openshaw, P., Murphy, E. E., Hosken, N. A., Maino, V., Davis, K., Murphy, K., and O'Garra, A., *Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations*. *J Exp Med*, 1995. 182(5): p. 1357-67.
 92. Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P., and Bottomly, K., *Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation*. *J Immunol*, 1997. 159(12): p. 5956-63.
 93. Tao, X., Grant, C., Constant, S., and Bottomly, K., *Induction of IL-4-producing CD4+ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding*. *J Immunol*, 1997. 158(9): p. 4237-44.

94. Delespesse, G., Ohshima, Y., Shu, U., Yang, L.-P., Demeure, C., Wu, C.-Y., Byun, D.-G., and Sarfati, M., *Differentiation of naive human CD4 T cells into TH2/TH1 effectors*. Allergology International, 1997. 46(2): p. 63-72.
95. Glimcher, L. H. and Murphy, K. M., *Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up*. Genes Dev, 2000. 14(14): p. 1693-711.
96. Murphy, K. M. and Reiner, S. L., *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(12): p. 933-44.
97. Wilson, C. B., Rowell, E., and Sekimata, M., *Epigenetic control of T-helper-cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(2): p. 91-105.
98. Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. 100(6): p. 655-69.
99. Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., and Ray, A., *Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene*. J Biol Chem, 1997. 272(34): p. 21597-603.
100. Zheng, W. and Flavell, R. A., *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. 89(4): p. 587-96.
101. Naoe, Y., Setoguchi, R., Akiyama, K., Muroi, S., Kuroda, M., Hatam, F., Littman, D. R., and Taniuchi, I., *Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbfbeta binding to the Il4 silencer*. J Exp Med, 2007. 204(8): p. 1749-55.
102. Djuretic, I. M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K. M., *Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells*. Nat Immunol, 2007. 8(2): p. 145-53.
103. Jenner, R. G., Townsend, M. J., Jackson, I., Sun, K., Bouwman, R. D., Young, R. A., Glimcher, L. H., and Lord, G. M., *The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(42): p. 17876-81.
104. Kanhere, A., Hertweck, A., Bhatia, U., Gokmen, M. R., Perucha, E., Jackson, I., Lord, G. M., and Jenner, R. G., *T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements*. Nat Commun, 2012. 3: p. 1268.
105. Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L., and Glimcher, L. H., *T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3*. Science, 2005. 307(5708): p. 430-3.
106. Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M., *Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells*. J Exp Med, 1997. 185(5): p. 817-24.
107. Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W., *GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet*. Immunity, 2003. 18(3): p. 415-28.
108. Kelso, A. and Gough, N. M., *Coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, gamma interferon, and interleukins 3 and 4 is random in murine alloreactive T-lymphocyte clones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(23): p. 9189-93.
109. Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, I., Abrams, J., de Vries, J., and Spits, H., *Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones*. J Immunol, 1988. 141(3): p. 849-55.
110. Murphy, E., Shibuya, K., Hosken, N., Openshaw, P., Maino, V., Davis, K., Murphy, K., and O'Garra, A., *Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation*. J Exp Med, 1996. 183(3): p. 901-13.
111. Abehsira-Amar, O., Gibert, M., Jolij, M., Theze, J., and Jankovic, D. L., *IL-4 plays a dominant role in the differential development of Tho into Th1 and Th2 cells*. J Immunol, 1992. 148(12): p. 3820-9.
112. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. 1(4): p. 311-6.

113. Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R., *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. *Immunity*, 2009. 30(5): p. 646-55.
114. O'Shea, J. J. and Paul, W. E., *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. *Science*, 2010. 327(5969): p. 1098-102.
115. Murphy, K. M. and Stockinger, B., *Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances*. *Nat Immunol*, 2010. 11(8): p. 674-80.
116. Wacleche, V. S., Landay, A., Routy, J.-P., and Ancuta, P., *The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis*. *Viruses*, 2017. 9(10): p. 303.
117. Hegazy, A. N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Frohlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D. D., Radbruch, A., and Lohning, M., *Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions*. *Immunity*, 2010. 32(1): p. 116-28.
118. Oestreich, K. J. and Weinmann, A. S., *Master regulators or lineage-specifying? Changing views on CD4+ T cell transcription factors*. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(11): p. 799-804.
119. Adachi, K., Osada, Y., Nakamura, R., Tamada, K., and Hamano, S., *Unique T cells with unconventional cytokine profiles induced in the livers of mice during Schistosoma mansoni infection*. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e82698.
120. Peine, M., Rausch, S., Helmstetter, C., Frohlich, A., Hegazy, A. N., Kuhl, A. A., Grevelding, C. G., Hofer, T., Hartmann, S., and Lohning, M., *Stable T-bet(+)GATA-3(+) Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation*. *PLoS Biol*, 2013. 11(8): p. e1001633.
121. Deaton, A. M., Cook, P. C., De Sousa, D., Phythian-Adams, A. T., Bird, A., and MacDonald, A. S., *A unique DNA methylation signature defines a population of IFN-gamma/IL-4 double-positive T cells during helminth infection*. *Eur J Immunol*, 2014. 44(6): p. 1835-41.
122. Bock, C. N., Babu, S., Breloer, M., Rajamanickam, A., Boothra, Y., Brunn, M. L., Kuhl, A. A., Merle, R., Lohning, M., Hartmann, S., and Rausch, S., *Th2/1 Hybrid Cells Occurring in Murine and Human Strongyloidiasis Share Effector Functions of Th1 Cells*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. 7: p. 261.
123. Reynolds, L. A. and Maizels, R. M., *Cutting edge: in the absence of TGF-beta signaling in T cells, fewer CD103+ regulatory T cells develop, but exuberant IFN-gamma production renders mice more susceptible to helminth infection*. *J Immunol*, 2012. 189(3): p. 1113-7.
124. Reynolds, L. A., Smith, K. A., Filbey, K. J., Harcus, Y., Hewitson, J. P., Redpath, S. A., Valdez, Y., Yebra, M. J., Finlay, B. B., and Maizels, R. M., *Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract: lactobacilli promote infection with, and are promoted by, helminth parasites*. *Gut Microbes*, 2014. 5(4): p. 522-32.
125. Filbey, K. J., Grainger, J. R., Smith, K. A., Boon, L., van Rooijen, N., Harcus, Y., Jenkins, S., Hewitson, J. P., and Maizels, R. M., *Innate and adaptive type 2 immune cell responses in genetically controlled resistance to intestinal helminth infection*. *Immunol Cell Biol*, 2014. 92(5): p. 436-48.
126. Grecis, R. K., *Cytokine regulation of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection - from host to parasite*. *Vet Parasitol*, 2001. 100(1-2): p. 45-50.
127. Urban, J. F., Jr., Madden, K. B., Cheever, A. W., Trotta, P. P., Katona, I. M., and Finkelman, F. D., *IFN inhibits inflammatory responses and protective immunity in mice infected with the nematode parasite, Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol*, 1993. 151(12): p. 7086-94.
128. Urban, J. F., Jr., Fayer, R., Sullivan, C., Goldhill, J., Shea-Donohue, T., Madden, K., Morris, S. C., Katona, I., Gause, W., Ruff, M., Mansfield, L. S., and Finkelman, F. D., *Local TH1 and TH2 responses to parasitic infection in the intestine: regulation by IFN-gamma and IL-4*. *Vet Immunol Immunopathol*, 1996. 54(1-4): p. 337-44.
129. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R., *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids*. *Anal Biochem*, 1982. 126(1): p. 131-8.
130. Adachi, K., Nakamura, R., Osada, Y., Senba, M., Tamada, K., and Hamano, S., *Involvement of IL-18 in the expansion of unique hepatic T cells with unconventional*

- cytokine profiles during Schistosoma mansoni infection*. PLoS One, 2014. 9(5): p. e96042.
131. Maaz, D., Rausch, S., Richter, D., Krucken, J., Kuhl, A. A., Demeler, J., Blumke, J., Matuschka, F. R., von Samson-Himmelstjerna, G., and Hartmann, S., *Susceptibility to Ticks and Lyme Disease Spirochetes Is Not Affected in Mice Coinfected with Nematodes*. Infect Immun, 2016. 84(5): p. 1274-1286.
 132. Lederman, S., Yellin, M. J., Krichevsky, A., Belko, J., Lee, J. J., and Chess, L., *Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help)*. J Exp Med, 1992. 175(4): p. 1091-101.
 133. van Kooten, C. and Banchereau, J., *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. 67(1): p. 2-17.
 134. Blair, P. J., Riley, J. L., Harlan, D. M., Abe, R., Tadaki, D. K., Hoffmann, S. C., White, L., Francomano, T., Perfetto, S. J., Kirk, A. D., and June, C. H., *CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis*. J Exp Med, 2000. 191(4): p. 651-60.
 135. Chattopadhyay, P. K., Yu, J., and Roederer, M., *A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles*. Nat Med, 2005. 11(10): p. 1113-7.
 136. Guo, L., Huang, Y., Chen, X., Hu-Li, J., Urban, J. F., Jr., and Paul, W. E., *Innate immunological function of TH2 cells in vivo*. Nat Immunol, 2015. 16(10): p. 1051-9.
 137. Panzer, M., Sitte, S., Wirth, S., Drexler, I., Sparwasser, T., and Voehringer, D., *Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection*. J Immunol, 2012. 188(2): p. 615-23.
 138. Hayes, K. S., Bancroft, A. J., and Grencis, R. K., *Immune-mediated regulation of chronic intestinal nematode infection*. Immunol Rev, 2004. 201: p. 75-88.
 139. Reynolds, L. A., Filbey, K. J., and Maizels, R. M., *Immunity to the model intestinal helminth parasite Heligmosomoides polygyrus*. Semin Immunopathol, 2012. 34(6): p. 829-46.
 140. Prowse, S. J. and Mitchell, G. F., *On the choice of mice for dissection of strain variations in the development of resistance to infection with Nematospiroides dubius*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1980. 58(6): p. 603-5.
 141. Enriquez, F. J., Zidian, J. L., and Cypess, R. H., *Nematospiroides dubius: genetic control of immunity to infections of mice*. Exp Parasitol, 1988. 67(1): p. 12-9.
 142. Behnke, J. M., Menge, D. M., and Noyes, H., *Heligmosomoides bakeri: a model for exploring the biology and genetics of resistance to chronic gastrointestinal nematode infections*. Parasitology, 2009. 136(12): p. 1565-80.
 143. Ben-Smith, A., Lammas, D. A., and Behnke, J. M., *The relative involvement of Th1 and Th2 associated immune responses in the expulsion of a primary infection of Heligmosomoides polygyrus in mice of differing response phenotype*. J Helminthol, 2003. 77(2): p. 133-46.
 144. Munder, M., Eichmann, K., Moran, J. M., Centeno, F., Soler, G., and Modolell, M., *Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells*. J Immunol, 1999. 163(7): p. 3771-7.
 145. Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M., *Macrophage polarization comes of age*. Immunity, 2005. 23(4): p. 344-6.
 146. Hagan, P., Behnke, J. M., and Parish, H. A., *Stimulation of immunity to Nematospiroides dubius in mice using larvae attenuated by cobalt 60 irradiation*. Parasite Immunol, 1981. 3(2): p. 149-56.
 147. 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., *Proteomic analysis of secretory products from the model gastrointestinal nematode Heligmosomoides polygyrus reveals dominance of venom allergen-like (VAL) proteins*. J Proteomics, 2011. 74(9): p. 1573-94.
 148. Hewitson, J. P., Ivens, A. C., Harcus, Y., Filbey, K. J., McSorley, H. J., Murray, J., Bridgett, S., Ashford, D., Dowle, A. A., and Maizels, R. M., *Secretion of protective*

- antigens by tissue-stage nematode larvae revealed by proteomic analysis and vaccination-induced sterile immunity.* PLoS Pathog, 2013. 9(8): p. e1003492.
149. Deenick, E. K., Hasbold, J., and Hodgkin, P. D., *Decision criteria for resolving isotype switching conflicts by B cells.* Eur J Immunol, 2005. 35(10): p. 2949-55.
 150. Rausch, S., Huehn, J., Kirchhoff, D., Rzepecka, J., Schnoeller, C., Pillai, S., Loddenkemper, C., Scheffold, A., Hamann, A., Lucius, R., and Hartmann, S., *Functional analysis of effector and regulatory T cells in a parasitic nematode infection.* Infect Immun, 2008. 76(5): p. 1908-19.
 151. Finney, C. A., Taylor, M. D., Wilson, M. S., and Maizels, R. M., *Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Heligmosomoides polygyrus infection.* Eur J Immunol, 2007. 37(7): p. 1874-86.
 152. Bronte, V. and Pittet, M. J., *The spleen in local and systemic regulation of immunity.* Immunity, 2013. 39(5): p. 806-18.
 153. Mebius, R. E. and Kraal, G., *Structure and function of the spleen.* Nat Rev Immunol, 2005. 5(8): p. 606-16.
 154. Pabst, O. and Mowat, A. M., *Oral tolerance to food protein.* Mucosal Immunol, 2012. 5(3): p. 232-9.
 155. Krawczyk, C. M., Shen, H., and Pearce, E. J., *Functional plasticity in memory T helper cell responses.* J Immunol, 2007. 178(7): p. 4080-8.
 156. Yu, F., Sharma, S., Edwards, J., Feigenbaum, L., and Zhu, J., *Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance.* Nat Immunol, 2015. 16(2): p. 197-206.
 157. Belkaid, Y. and Hand, T. W., *Role of the microbiota in immunity and inflammation.* Cell, 2014. 157(1): p. 121-141.
 158. Zaiss, M. M. and Harris, N. L., *Interactions between the intestinal microbiome and helminth parasites.* Parasite immunology, 2016. 38(1): p. 5-11.
 159. Wegener Parfrey, L., Jirků, M., Šíma, R., Jalovecká, M., Sak, B., Grigore, K., and Jirků Pomajbíková, K., *A benign helminth alters the host immune system and the gut microbiota in a rat model system.* PloS one, 2017. 12(8): p. e0182205-e0182205.
 160. Gause, W. C. and Maizels, R. M., *Macrobioota - helminths as active participants and partners of the microbiota in host intestinal homeostasis.* Curr Opin Microbiol, 2016. 32: p. 14-18.
 161. Midha, A., Schlosser, J., and Hartmann, S., *Reciprocal Interactions between Nematodes and Their Microbial Environments.* Front Cell Infect Microbiol, 2017. 7: p. 144.
 162. 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., *The Intestinal Microbiota Contributes to the Ability of Helminths to Modulate Allergic Inflammation.* Immunity, 2015. 43(5): p. 998-1010.
 163. van Wijk, F. and Cheroutre, H., *Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation.* Expert review of clinical immunology, 2010. 6(4): p. 559-566.
 164. Christie, M., Rutti, B., and Brossard, M., *Susceptibility of BALB/c mice to nymphs and larvae of Ixodes ricinus after modulation of IgE production with anti-interleukin-4 or anti-interferon-gamma monoclonal antibodies.* Parasitol Res, 1998. 84(5): p. 388-93.
 165. 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., *Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity.* Nat Commun, 2014. 5: p. 5488.
 166. Eichenberger, R. M., Talukder, M. H., Field, M. A., Wangchuk, P., Giacomini, P., Loukas, A., and Sotillo, J., *Characterization of Trichuris muris secreted proteins and extracellular vesicles provides new insights into host-parasite communication.* J Extracell Vesicles, 2018. 7(1): p. 1428004.
 167. Alhallaf, R., Agha, Z., Miller, C. M., Robertson, A. A. B., Sotillo, J., Croese, J., Cooper, M. A., Masters, S. L., Kupz, A., Smith, N. C., Loukas, A., and Giacomini, P. R., *The NLRP3 Inflammasome Suppresses Protective Immunity to Gastrointestinal Helminth Infection.* Cell Rep, 2018. 23(4): p. 1085-1098.

168. Zaiss, M. M., Maslowski, K. M., Mosconi, I., Guenat, N., Marsland, B. J., and Harris, N. L., *IL-1beta suppresses innate IL-25 and IL-33 production and maintains helminth chronicity*. PLoS Pathog, 2013. 9(8): p. e1003531.
169. Kak, G., Raza, M., and Tiwari, B. K., *Interferon-gamma (IFN-gamma): Exploring its implications in infectious diseases*. Biomol Concepts, 2018. 9(1): p. 64-79.
170. Shtrichman, R. and Samuel, C. E., *The role of gamma interferon in antimicrobial immunity*. Curr Opin Microbiol, 2001. 4(3): p. 251-9.
171. So, E.-Y., Park, H.-H., and Lee, C.-E., *IFN- γ and IFN- α Posttranscriptionally Down-Regulate the IL-4-Induced IL-4 Receptor Gene Expression*. The Journal of Immunology, 2000. 165(10): p. 5472-5479.
172. Rausch, S., Huehn, J., Loddenkemper, C., Hepworth, M. R., Klotz, C., Sparwasser, T., Hamann, A., Lucius, R., and Hartmann, S., *Establishment of nematode infection despite increased Th2 responses and immunopathology after selective depletion of Foxp3+ cells*. Eur J Immunol, 2009. 39(11): p. 3066-77.
173. Rausch, S., Held, J., Fischer, A., Heimesaat, M. M., Kuhl, A. A., Bereswill, S., and Hartmann, S., *Small intestinal nematode infection of mice is associated with increased enterobacterial loads alongside the intestinal tract*. PLoS One, 2013. 8(9): p. e74026.
174. Helmbj, H., *Gastrointestinal nematode infection exacerbates malaria-induced liver pathology*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2009. 182(9): p. 5663-5671.
175. Else, K. J., Finkelman, F. D., Maliszewski, C. R., and Grencis, R. K., *Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection*. J Exp Med, 1994. 179(1): p. 347-51.
176. Finkelman, F. D., Madden, K. B., Cheever, A. W., Katona, I. M., Morris, S. C., Gately, M. K., Hubbard, B. R., Gause, W. C., and Urban, J. F., Jr., *Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites*. J Exp Med, 1994. 179(5): p. 1563-72.
177. Liesenfeld, O., Dunay, I. R., and Erb, K. J., *Infection with Toxoplasma gondii reduces established and developing Th2 responses induced by Nippostrongylus brasiliensis infection*. Infect Immun, 2004. 72(7): p. 3812-22.
178. Smith, K. A., Filbey, K. J., Reynolds, L. A., Hewitson, J. P., Harcus, Y., Boon, L., Sparwasser, T., Hammerling, G., and Maizels, R. M., *Low-level regulatory T-cell activity is essential for functional type-2 effector immunity to expel gastrointestinal helminths*. Mucosal Immunol, 2016. 9(2): p. 428-43.
179. Oh, Y. J., Shin, J. H., Won, H. Y., and Hwang, E. S., *Anti-proliferative Activity of T-bet*. Immune network, 2015. 15(4): p. 199-205.
180. Schimpl, A., Berberich, I., Kneitz, B., Kramer, S., Santner-Nanan, B., Wagner, S., Wolf, M., and Hunig, T., *IL-2 and autoimmune disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. 13(4-5): p. 369-78.
181. Oriss, T. B., McCarthy, S. A., Morel, B. F., Campana, M. A., and Morel, P. A., *Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1*. J Immunol, 1997. 158(8): p. 3666-72.
182. Gajewski, T. F., Goldwasser, E., and Fitch, F. W., *Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol, 1988. 141(8): p. 2635-42.
183. Dinarello, C. A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. Blood, 2011. 117(14): p. 3720-32.
184. Behnke, J. M. and Wahid, F. N., *Immunological relationships during primary infection with Heligmosomoides polygyrus (Nematospiroides dubius): H-2 linked genes determine worm survival*. Parasitology, 1991. 103 Pt 1: p. 157-64.
185. Smith, P. M., Sproule, T. J., Philip, V. M., Roopenian, D. C., and Stadecker, M. J., *Minor genomic differences between related B6 and B10 mice affect severity of schistosome infection by governing the mode of dendritic cell activation*. European journal of immunology, 2015. 45(8): p. 2312-2323.
186. Else, K. and Wakelin, D., *Genetic variation in the humoral immune responses of mice to the nematode Trichuris muris*. Parasite Immunol, 1989. 11(1): p. 77-90.

187. Else, K. and Wakelin, D., *The effects of H-2 and non-H-2 genes on the expulsion of the nematode Trichuris muris from inbred and congenic mice*. Parasitology, 1988. 96 (Pt 3): p. 543-50.
188. Klementowicz, J. E., Travis, M. A., and Grecis, R. K., *Trichuris muris: a model of gastrointestinal parasite infection*. Seminars in immunopathology, 2012. 34(6): p. 815-828.
189. Smith, K. A. and Maizels, R. M., *IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo*. Eur J Immunol, 2014. 44(1): p. 150-61.
190. Ulges, A., Klein, M., Reuter, S., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Grebe, N., Staudt, V., Stergiou, N., Bohn, T., Brühl, T.-J., Muth, S., Yurugi, H., Rajalingam, K., Bellinghausen, I., Tuettenberg, A., Hahn, S., Reißig, S., Haben, I., Zipp, F., Waisman, A., Probst, H.-C., Beilhack, A., Buchou, T., Filhol-Cochet, O., Boldyreff, B., Breloer, M., Jonuleit, H., Schild, H., Schmitt, E., and Bopp, T., *Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo*. Nature Immunology, 2015. 16: p. 267.
191. van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., and Clevers, H., *Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells*. Nature, 2005. 435(7044): p. 959-63.
192. Hogan, S. P., Seidu, L., Blanchard, C., Groschwitz, K., Mishra, A., Karow, M. L., Ahrens, R., Artis, D., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., and Rothenberg, M. E., *Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 118(1): p. 257-68.
193. Barnes, S. L., Vidrich, A., Wang, M. L., Wu, G. D., Cominelli, F., Rivera-Nieves, J., Bamias, G., and Cohn, S. M., *Resistin-like molecule beta (RELMbeta/FIZZ2) is highly expressed in the ileum of SAMP1/YitFc mice and is associated with initiation of ileitis*. J Immunol, 2007. 179(10): p. 7012-20.
194. Wang, M. L., Shin, M. E., Knight, P. A., Artis, D., Silberg, D. G., Suh, E., and Wu, G. D., *Regulation of RELM/FIZZ isoform expression by Cdx2 in response to innate and adaptive immune stimulation in the intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. 288(5): p. G1074-83.
195. Nair, M. G., Guild, K. J., Du, Y., Zaph, C., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A., Stevens, S., Karow, M., and Artis, D., *Goblet cell-derived resistin-like molecule beta augments CD4+ T cell production of IFN-gamma and infection-induced intestinal inflammation*. J Immunol, 2008. 181(7): p. 4709-15.
196. Qing, C., *The molecular biology in wound healing & non-healing wound*. Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi, 2017. 20(4): p. 189-193.
197. Mylonas, K. J., Nair, M. G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D., and Allen, J. E., *Alternatively Activated Macrophages Elicited by Helminth Infection Can Be Reprogrammed to Enable Microbial Killing*. The Journal of Immunology, 2009. 182(5): p. 3084-3094.
198. Drevets, D. A., Canono, B. P., and Campbell, P. A., *Measurement of bacterial ingestion and killing by macrophages*. Curr Protoc Immunol, 2015. 109: p. 14.6.1-17.
199. Kebede, B., Sori, T., and Kumssa, B., *Review on Current Status of Vaccines against Parasitic Diseases of Animals*. Journal of Veterinary Science & Technology, 2015. 07(03).
200. McManus, D. P. and Loukas, A., *Current status of vaccines for schistosomiasis*. Clin Microbiol Rev, 2008. 21(1): p. 225-42.
201. Pourseif, M. M., Moghaddam, G., Saeedi, N., Barzegari, A., Dehghani, J., and Omid, Y., *Current status and future prospective of vaccine development against Echinococcus granulosus*. Biologicals, 2018. 51: p. 1-11.
202. Gauci, C., Jayashi, C., and Lightowers, M. W., *Vaccine development against the Taenia solium parasite: the role of recombinant protein expression in Escherichia coli*. Bioengineered, 2013. 4(5): p. 343-347.
203. Gilleard, J. S., *Haemonchus contortus as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance*. Parasitology, 2013. 140(12): p. 1506-22.

204. Venturina, V. M., Gossner, A. G., and Hopkins, J., *The immunology and genetics of resistance of sheep to Teladorsagia circumcincta*. Vet Res Commun, 2013. 37(2): p. 171-81.
205. Gholami, S., Babamahmoodi, F., Abedian, R., Sharif, M., Shahbazi, A., Pagheh, A., and Fakhar, M., *Trichostrongylus colubriformis: Possible Most Common Cause of Human Infection in Mazandaran Province, North of Iran*. Iranian journal of parasitology, 2015. 10(1): p. 110-115.
206. McMahon, C., Edgar, H. W. J., Barley, J. P., Hanna, R. E. B., Brennan, G. P., and Fairweather, I., *Control of Nematodirus spp. infection by sheep flock owners in Northern Ireland*. Irish veterinary journal, 2017. 70: p. 31-31.
207. Crotty, S., *A brief history of T cell help to B cells*. Nature reviews. Immunology, 2015. 15(3): p. 185-189.
208. Hasbold, J., Hong, J. S.-Y., Kehry, M. R., and Hodgkin, P. D., *Integrating Signals from IFN- γ and IL-4 by B Cells: Positive and Negative Effects on CD40 Ligand-Induced Proliferation, Survival, and Division-Linked Isotype Switching to IgG1, IgE, and IgG2a*. The Journal of Immunology, 1999. 163(8): p. 4175-4181.
209. Naradikian, M. S., Myles, A., Beiting, D. P., Roberts, K. J., Dawson, L., Herati, R. S., Bengsch, B., Linderman, S. L., Stelekati, E., Spolski, R., Wherry, E. J., Hunter, C., Hensley, S. E., Leonard, W. J., and Cancro, M. P., *Cutting Edge: IL-4, IL-21, and IFN-gamma Interact To Govern T-bet and CD11c Expression in TLR-Activated B Cells*. J Immunol, 2016. 197(4): p. 1023-8.
210. Hitoshi, Y., Mita, S., Tominaga, A., Kikuchi, Y., Sonoda, E., Takatsu, K., and Watanabe, Y., *Interferon-gamma inhibits the proliferation but not the differentiation of murine B cells in response to IL-5*. Int Immunol, 1989. 1(2): p. 185-90.
211. Horikawa, K. and Takatsu, K., *Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation*. Immunology, 2006. 118(4): p. 497-508.
212. Brailsford, T. J. and Behnke, J. M., *The dynamics of trickle infections with Heligmosomoides polygyrus in syngeneic strains of mice*. Int J Parasitol, 1992. 22(3): p. 351-9.
213. Hewitson, J. P., Filbey, K. J., Esser-von Bieren, J., Camberis, M., Schwartz, C., Murray, J., Reynolds, L. A., Blair, N., Robertson, E., Harcus, Y., Boon, L., Huang, S. C.-C., Yang, L., Tu, Y., Miller, M. J., Voehringer, D., Le Gros, G., Harris, N., and Maizels, R. M., *Concerted activity of IgG1 antibodies and IL-4/IL-25-dependent effector cells trap helminth larvae in the tissues following vaccination with defined secreted antigens, providing sterile immunity to challenge infection*. PLoS pathogens, 2015. 11(3): p. e1004676-e1004676.
214. D'Elia, R., Behnke, J. M., Bradley, J. E., and Else, K. J., *Regulatory T cells: a role in the control of helminth-driven intestinal pathology and worm survival*. J Immunol, 2009. 182(4): p. 2340-8.
215. Babu, S., Bhat, S. Q., Pavan Kumar, N., Lipira, A. B., Kumar, S., Karthik, C., Kumaraswami, V., and Nutman, T. B., *Filarial lymphedema is characterized by antigen-specific Th1 and th17 proinflammatory responses and a lack of regulatory T cells*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. 3(4): p. e420.
216. Metenou, S., Dembele, B., Konate, S., Dolo, H., Coulibaly, S. Y., Coulibaly, Y. I., Diallo, A. A., Soumaoro, L., Coulibaly, M. E., Sanogo, D., Doumbia, S. S., Traore, S. F., Mahanty, S., Klion, A., and Nutman, T. B., *At homeostasis filarial infections have expanded adaptive T regulatory but not classical Th2 cells*. J Immunol, 2010. 184(9): p. 5375-82.
217. Esser-von Bieren, J., Volpe, B., Kulagin, M., Sutherland, D. B., Guet, R., Seitz, A., Marsland, B. J., Verbeek, J. S., and Harris, N. L., *Antibody-mediated trapping of helminth larvae requires CD11b and Fc γ receptor I*. J Immunol, 2015. 194(3): p. 1154-63.