

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mikrobielle und genetische Regulation der ILC2 - Aktivierung
Microbial and genetic regulation of ILC2 - activation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Richard Mertens

Datum der Promotion: 25. November 2022

Inhaltsverzeichnis

1. Tabellen - / Abbildungsverzeichnis	
a. Tabellen	Seite 4
b. Abbildungen	Seite 4 ff.
2. Abkürzungsverzeichnis	Seite 10 ff.
3. Zusammenfassung	
a. Zusammenfassung auf Deutsch	Seite 13 f.
b. Zusammenfassung auf Englisch	Seite 14 f.
4. Einleitung / Fragestellung	
a. Helminthen und Helminthiasis	Seite 16 ff.
b. <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Seite 20 f.
c. Typ 2 Immunität und ILC2	Seite 22 ff.
d. Gene / Konditionen der Studie und Ziele	
i. Wildlinge	Seite 43 ff.
ii. <i>Lgmn</i>	Seite 46 ff.
iii. <i>Kcnab2</i>	Seite 48 ff.
iv. <i>Ermn</i>	Seite 51 ff.
5. Materialien und Methoden	
a. Materialliste	Seite 55 ff.
b. Mäuse und Genotypisierung	Seite 78 ff.
c. RNS - Isolation	Seite 83 f.
d. NanoDrop™ - Messung der RNS - Konzentration und - Reinheit	Seite 84 f.
e. cDNS - Produktion	Seite 85
f. qPCR	Seite 85 f.
g. $2^{-\Delta CT}$ - Methode	Seite 86
h. Protein - Isolation	Seite 87
i. Bradford - Assay	Seite 87 f.
j. Western Blot	Seite 88 ff.
k. Gewebe - Isolierung, - Einbettung und - Schneiden	Seite 90 f.
l. Immunfluoreszenz	Seite 91 f.
m. Immunzell - Isolation	
i. Immunzell - Isolation aus der Lamina propria des Dünndarms	Seite 92 ff.

ii. Immunzell - Isolation aus der Lunge	Seite 94 f.
iii. Immunzell - Isolation aus den mesenterischen Lymphknoten	Seite 95 f.
iv. Immunzell - Isolation aus dem perigonadalen / epididymalen Fettgewebe	Seite 96 f.
v. Immunzell - Isolation aus der Milz	Seite 97
n. Zell - Zählung	Seite 97 f.
o. Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell Sortierung	Seite 98 ff.
p. <i>in vitro</i> Stimulation	Seite 100 f.
q. Apoptose - Assay	Seite 101 ff.
r. CPD ("cell proliferation dye")	Seite 103 ff.
s. Rubinrot Zellzyklus - Farbstoff	Seite 105 f.
t. Migrationsassay	Seite 106 ff.
u. Kombination aus Stimulation und Migration	Seite 108
v. <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> Lebenszyklus und Infektion	Seite 108 ff.
w. Blutentnahme und Serum - Gewinnung aus Mäusen	Seite 112 f.
x. Zytokin / Interleukin - Bestimmung	Seite 113 ff.
y. FlowJo - Analyse und Gating Strategien	Seite 116 ff.
z. Erklärungen zur Statistik	Seite 139
6. Ergebnisse	
a. Mikrobiotische Regulation der ILC2 (Wildlinge)	Seite 140 ff.
b. Genetische Regulation der ILC2 (<i>Kcnab2</i> , <i>Ermn</i> , <i>Lgmn</i>)	Seite 152 ff.
7. Diskussion	Seite 191 ff.
8. Literaturverzeichnis	
a. Internetquellen	Seite 201 ff.
b. Originalpublikationen / Artikel / Bücher	Seite 203 ff.
9. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung	Seite 231
10. Lebenslauf	Seite 232 ff.
11. Danksagung	Seite 236
12. Bescheinigung Statistik	Seite 237

1. Tabellen - / Abbildungsverzeichnis

a. Tabellen

Tabelle 1: Software.	Seite 55 f.
Tabelle 2: Geräte / Instrumente.	Seite 56 ff.
Tabelle 3: Plastik - / Glas - / Einweg - Materialien.	Seite 60 ff.
Tabelle 4: Lösungen / Puffer / Chemikalien / Peptide / Proteine.	Seite 64 ff.
Tabelle 5: Antikörper.	Seite 72 ff.
Tabelle 6: Assays.	Seite 74 f.
Tabelle 7: Oligonukleotide.	Seite 75 ff.
Tabelle 8: Mäuse / Organismen.	Seite 77 f.

b. Abbildungen

Abbildung 1: Die Transkription von <i>Kcnab2</i> wird in iILC2 heraufreguliert.	Seite 51
Abbildung 2: Einteilung der Zellen in lebendige, tote und apoptotische Populationen mit Hilfe des Apoptose - Assays.	Seite 102
Abbildung 3: Verfolgung von Zellteilung mit Hilfe des CPD.	Seite 105
Abbildung 4: Sorting von "Steady State" - ILC2 aus der L. p. des Dünndarms.	Seite 119
Abbildung 5: Sorting von iILC2 und nILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten.	Seite 120
Abbildung 6: Gating von Eosinophilen aus der Lamina propria des Dünndarms (inklusive Eosinophile (inflammatorisch)).	Seite 121
Abbildung 7: Gating von Eosinophilen aus den mesenterischen Lymphknoten (inklusive Eosinophile (inflammatorisch)).	Seite 122
Abbildung 8: Gating von Eosinophilen aus der Lunge.	Seite 123
Abbildung 9: Gating von Eosinophilen aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe.	Seite 124
Abbildung 10: Gating von "Steady State" - ILC2 aus der Lamina propria des Dünndarms (Option 1).	Seite 125
Abbildung 11: Gating von "Steady State" - ILC2 aus der Lamina propria des Dünndarms (Option 2).	Seite 126

Abbildung 12: Gating von “Steady State“ - ILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten.	Seite 127
Abbildung 13: Gating von „Steady State“ - ILC2 aus der Lunge (Option 1).	Seite 128
Abbildung 14: Gating von „Steady State“ - ILC2 aus der Lunge (Option 2).	Seite 129
Abbildung 15: Gating von “Steady State“ - ILC2 aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe.	Seite 130
Abbildung 16: Gating von Eosinophilen aus den mesenterischen Lymphknoten im Rahmen der <i>N. b.</i> Infektion.	Seite 131
Abbildung 17: Gating von Eosinophilen aus der Lunge im Rahmen der <i>N. b.</i> Infektion.	Seite 132
Abbildung 18: Gating von Eosinophilen aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe im Rahmen der <i>N. b.</i> Infektion.	Seite 133
Abbildung 19: Gating von iILC2 und nILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten im Rahmen der <i>N. b.</i> Infektion.	Seite 134
Abbildung 20: Gating von iILC2 und nILC2 aus der Lunge im Rahmen der <i>N. b.</i> Infektion.	Seite 135
Abbildung 21: Gating von iILC2 und nILC2 aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe im Rahmen der <i>N. b.</i> Infektion.	Seite 136
Abbildung 22: Gating von stimulierten Zellen im Rahmen einer <i>in vitro</i> Kultur (mit IL-7 + IL-25 + IL-33).	Seite 137
Abbildung 23: Gating von lebenden und toten Zellen im Rahmen einer <i>in vitro</i> Kultur (mit IL-7).	Seite 138
Abbildung 24: Wildlinge besitzen mehr iILC2 in ihren MLN.	Seite 142
Abbildung 25: Die iILC2 der MLN der Wildlinge exprimieren weniger CD25, sowie mehr KLRG1 auf ihrer Oberfläche.	Seite 142
Abbildung 26: Die iILC2 der MLN der Wildlinge sind größer.	Seite 143
Abbildung 27: Wildlinge weisen mehr nILC2 in ihren MLN auf.	Seite 143
Abbildung 28: Die nILC2 der MLN der Wildlinge exprimieren weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche und sind größer und komplexer.	Seite 144
Abbildung 29: Wildlinge weisen mehr Eosinophile in ihren MLN auf.	Seite 144
Abbildung 30: Die Eosinophilen der MLN der Wildlinge sind	

größer, sowie komplexer.	Seite 144
Abbildung 31: Wildlinge weisen mehr iILC2 in ihrem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe auf.	Seite 146 f.
Abbildung 32: Die iILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge exprimieren weniger CD25 auf ihrer Oberfläche.	Seite 147
Abbildung 33: Die iILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge exprimieren weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche.	Seite 147 f.
Abbildung 34: Die iILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge exprimieren weniger ST2 auf ihrer Oberfläche.	Seite 148
Abbildung 35: Die iILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind kleiner und weniger komplex.	Seite 148 f.
Abbildung 36: Wildlinge weisen weniger nILC2 in ihrem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe auf.	Seite 149
Abbildung 37: Die nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge exprimieren weniger CD25 und weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche.	Seite 149
Abbildung 38: Die nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind größer.	Seite 150
Abbildung 39: Die nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind weniger komplex.	Seite 150
Abbildung 40: Wildlinge weisen weniger Eosinophile in ihrem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe auf.	Seite 151
Abbildung 41: Die Eosinophilen des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind kleiner.	Seite 151
Abbildung 42: Die Eosinophilen des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind weniger komplex.	Seite 152
Abbildung 43: <i>Kcnab2</i> wird im "Steady State" in ILC2 exprimiert, und unter Stimulation heraufreguliert.	Seite 154
Abbildung 44: Die ILC2 der L. p. der <i>Kcnab2</i> - KO Mäuse exprimieren mehr KLRG1 auf ihrer Oberfläche.	Seite 156
Abbildung 45: Die ILC2 der <i>Kcnab2</i> - KO Mäusen nehmen nach	

Stimulation weniger stark in ihrer Zellzahl zu.	Seite 157
Abbildung 46: Die ILC2 der <i>Kcnab2</i> - KO Mäusen exprimieren nach Stimulation weniger CD25 auf ihrer Oberfläche.	Seite 157
Abbildung 47: Die ILC2 der <i>Kcnab2</i> - KO Mäusen sezernieren nach Stimulation weniger IL-5, IL-13 und IL-4.	Seite 158
Abbildung 48: <i>Ermn</i> wird im "Steady State" in ILC2 nicht exprimiert, und unter Stimulation heraufreguliert.	Seite 160
Abbildung 49: <i>Ermn</i> wird im "Steady State" in ILC2 nicht exprimiert, und unter Stimulation in iILC2, jedoch nicht in nILC2, heraufreguliert.	Seite 161
Abbildung 50: <i>Ermn</i> - KO Mäuse weisen im "Steady State" keine signifikanten Unterschiede in ihrer ILC2 - Anzahl auf.	Seite 161
Abbildung 51: <i>Ermn</i> - KO Mäuse weisen im "Steady State" keine signifikanten Unterschiede in ihrer ILC2 - Anzahl, in der Lamina propria des Dünndarms, auf.	Seite 162
Abbildung 52: Die ILC2 der <i>Ermn</i> - KO Mäusen exprimieren in der Lunge mehr CD25 auf ihrer Oberfläche und in der Lamina propria des Dünndarms weniger CD127.	Seite 162
Abbildung 53: Die ILC2 der <i>Ermn</i> - KO Mäusen nehmen nach kürzer andauernder Stimulation weniger stark in ihrer Zellzahl zu.	Seite 163 f.
Abbildung 54: Die ILC2 der <i>Ermn</i> - KO Mäusen nehmen nach länger andauernder Stimulation stärker in ihrer Zellzahl zu.	Seite 164
Abbildung 55: Die ILC2 der <i>Ermn</i> - KO Mäusen sind, wenn sie nach kürzerer Stimulation in geringerer Anzahl vorliegen, kleiner, und wenn sie nach längerer Stimulation vermehrt vorliegen, größer.	Seite 166
Abbildung 56: Die ILC2 der <i>Ermn</i> - KO Mäusen exprimieren nach 5 tägiger Stimulation, wenn sie vermehrt vorliegen, mehr CD127 und mehr ST2, auf ihrer Oberfläche.	Seite 166 f.
Abbildung 57: Die ILC2 der <i>Ermn</i> - KO Mäusen sezernieren nach Stimulation weniger IL-4, IL-5, IL-10 und mehr TNF-α.	Seite 167 f.
Abbildung 58: WT - ILC2 nehmen mit IL-25 stärker in ihrer Zellzahl, sowie Komplexität zu. <i>Ermn</i> - KO ILC2 verhalten sich identisch.	Seite 170

Abbildung 59: WT - ILC2 exprimieren mit IL-25 mehr KLRG1 und mehr CD25 auf ihrer Oberfläche. <i>Ermn</i> - KO ILC2 verhalten sich hinsichtlich CD25 identisch.	Seite 171
Abbildung 60: WT - ILC2 sezernieren mit IL-25 mehr IL-10. <i>Ermn</i> - KO ILC2 verhalten sich identisch.	Seite 172
Abbildung 61: WT - ILC2 sezernieren mit IL-25 mehr IL-5 und IL-13.	Seite 173
Abbildung 62: <i>Ermn</i> - KO Mäuse weisen im Rahmen einer <i>N. b.</i> Infektion keine signifikant höhere Wurmlast auf.	Seite 175
Abbildung 63: <i>Ermn</i> - KO Mäuse weisen im Rahmen einer <i>N. b.</i> Infektion mehr iILC2 in ihren Lungen auf.	Seite 175
Abbildung 64: <i>Ermn</i> - KO Mäuse weisen im Rahmen einer <i>N. b.</i> Infektion mehr iILC2 in ihren MLN auf.	Seite 176
Abbildung 65: Die iILC2 der MLN der <i>Ermn</i> - KO Mäuse exprimieren im Rahmen einer <i>N. b.</i> Infektion weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche.	Seite 176
Abbildung 66: <i>Ermn</i> - KO Mäuse weisen im Rahmen einer <i>N. b.</i> Infektion mehr Eosinophile in ihren MLN auf, welche größer und weniger komplex sind.	Seite 178
Abbildung 67: <i>Ermn</i> - KO Mäuse weisen im Rahmen einer <i>N. b.</i> Infektion weniger IL-5 und IL-4 in ihrem Blutserum auf.	Seite 178
Abbildung 68: <i>Ermn</i> - KO Mäuse weisen im Rahmen einer <i>N. b.</i> Infektion mehr nILC2 in ihren Lungen und ihren MLN auf.	Seite 179
Abbildung 69: Die nILC2 der Lunge der <i>Ermn</i> - KO Mäuse exprimieren im Rahmen einer <i>N. b.</i> Infektion weniger KLRG1 und CD25, und die nILC2 der MLN mehr CD127, auf ihrer Oberfläche.	Seite 180
Abbildung 70: Die ILC2 der <i>Ermn</i> - KO Mäusen sezernieren im Rahmen einer Kombination aus Stimulation und Migrationsassay weniger IL-5 und IL-13.	Seite 181 f.
Abbildung 71: <i>Lgmn</i> wird im "Steady State" in ILC2 exprimiert, und unter Stimulation heraufreguliert.	Seite 184
Abbildung 72: <i>Lgmn</i> - KO Mäuse weisen im "Steady State" weniger ILC2 in der L. p. des Dünndarms auf, und die ILC2 des epididymalen Fettgewebes exprimieren mehr KLRG1 auf ihrer Oberfläche.	Seite 185

Abbildung 73: *Lgmn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion eine nicht signifikant höhere Wurmlast auf. Seite 187

Abbildung 74: Die iILC2 der MLN der *Lgmn* - KO Mäuse exprimieren im Rahmen einer *N. b.* Infektion weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche, die iILC2 aus dem epididymalen Fettgewebe weniger KLRG1 und MHC-II, und sind darüber hinaus kleiner und weniger komplex und die iILC2 aus der Lunge exprimieren mehr MHC-II. Seite 188

Abbildung 75: *Lgmn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion mehr Eosinophile in ihren MLN auf, welche komplexer sind. Seite 189

Abbildung 76: WT - Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion im epididymalen Fettgewebe weniger iILC2 als in den MLN oder der Lunge auf. Seite 190

2. Abkürzungsverzeichnis

(m)RNS = (messenger) Ribonukleinsäure

ADCC = antibody dependent cellular cytotoxicity

AEP = Asparaginy Endopeptidase

AK = Antikörper

APC = antigenpräsentierende Zelle

AREG = Amphiregulin

cAMP = Cyclisches Adenosinmonophosphat

CBBG = Coomassie - Brillant - Blau G-250

CBF = Campus Benjamin Franklin

CD = Cluster of Differentiation

CGRP = calcitonin gene related peptide

COPD = chronisch obstruktive Lungenerkrankung

CpG - ODN = CpG Oligodeoxynukleotide

CT = cycle threshold

DALY = disability adjusted life years = krankheitskorrigierte Lebensjahre

DAPI = 4',6 - Diamidino - 2 - Phenylindole

DC = dendritische Zelle

DNS = Desoxyribonukleinsäure

DSS = dextran sulfate sodium

ECP = eosinophil cationic protein

EGF = epidermal growth factor

ES = exkretorische / sekretorische Antigene

FACS = fluorescence - activated cell sorting = Durchflusszytometrie

FALC = fat associated lymphoid cluster

FCS = fetal calf serum

FEM = Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin

GI = gastrointestinal

GIT = Gastrointestinaltrakt

HBSS = Hanks' balanced salt solution

HPRT = Hypoxanthin - Guanin - Phosphoribosyltransferase

ICOS = induzierbarer T - Zell Costimulator

IF = Immunfluoreszenz

Ig = Immunglobulin
iILC2 = inflammatorische ILC2
IKMC = international knock - out mouse consortium
Il = Interleukin
ILC2 = innate lymphoid cell 2 = angeborene / - er lymphoide Zelle 2 / Lymphozyt 2
ILF = isolated lymphoid follicle
IMPC = Internationales Maus Phänotypisierungs Konsortium
INF = Interferon
IVC = individual ventilated cages
KO = Knock - Out
L. p. = Lamina propria
LPS = Lipopolysaccharide
LTi = lymphoid tissue inducer
MBP = Myelin Basisches Protein
MBP1 = major basic protein 1
Met-Enk = Methionin - Enkephalin
MHC-II = Haupthistokompatibilitätskomplex II
MMRRC = Mutant Mouse Ressource & Research Centers
N. b. = *Nippostrongylus brasiliensis*
NCR = natural cytotoxicity receptor
NIH = national institute of health
nILC2 = natürliche ILC2
NK - Zellen = natürliche Killerzelle
NKT - Zelle = natürliche Killer - T - Zelle
NmU = Neuromedin U
OCT = optimal cutting temperature
PAMP = pathogen associated molecular pattern
PBS = phosphate buffered saline
PE = Phycoerythrin
PFA = Paraformaldehyd
PKA = Proteinkinase A
RAG = recombination - activating gene
S1P = Sphingosin 1 - Phosphat
SCFA = small chain fatty acids

SDG = sustainable development goals = nachhaltige Entwicklungsziele

SNP = Einzel - Nukleotid - Polymorphismus

SPF = specific pathogen free

TCR = T - Zell - Rezeptor

TLR = toll like receptor

Tph1 = Tryptophan Hydroxylase 1

TSLP = thymic stromal lymphopoietin

VIP = vasoactive intestinal peptide

WB = Western Blot

WT = Wildtyp

3. Zusammenfassung

a. Zusammenfassung auf Deutsch

Einleitung ILC2 sind angeborene Lymphozyten der Gruppe 2, und beteiligt an der Typ 2 Immunantwort. Diese richtet sich unter anderem gegen Helminthen, welche weltweit eine erhebliche gesundheitliche Belastung darstellen. Im Rahmen einer Helminthiasis - induzierten Aktivierung der ILC2 differenzieren sie sich zu inflammatorischen ILC2 und sind maßgeblich an der Bekämpfung der Helminthen beteiligt. Bisher ist wenig über iILC2 bekannt. Fraglich ist bisher ob iILC2 im "Steady State" in der freien Wildbahn zu finden sind. Des Weiteren wurden durch Transkriptomstudien Gene identifiziert, die in den ILC2 im Rahmen ihrer Aktivierung zu finden sind. Unter diesen befinden sich *Ernm*, welches für das Zytoskelett - Protein ERMIN kodiert, *Kcnab2* kodierend für die $\beta 2$ Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalium - Kanals sowie *Lgmn*, das Gen für die Asparaginylnyl Endopeptidase LEGUMAIN.

Ziel Das Ziel dieser Studie war es zu untersuchen wie sich die Population an ILC2 unter dem Einfluss diverser Mikrobiota präsentieren und den Einfluss von *Ernm*, *Kcnab2* und *Lgmn* auf die Physiologie und Pathophysiologie der ILC2 zu erfassen.

Methoden ILC2 aus genspezifischen KO - Mäusen oder Wildlingen wurden im "Steady State" und hinsichtlich Stimulierung, Proliferation, Apoptose, Überleben, Migration und Zytokin - Sekretion durch *in vitro* Kulturen unter Einsatz von Zytokinen, "Boyden Chamber Assays" und diversen Techniken der Durchflusszytometrie analysiert. *In vivo* wurde per Durchflusszytometer die Immunantwort gegen *Nippostrongylus brasiliensis* und die Wurmlast im Rahmen der Infektion in genspezifischen KO - Mäusen analysiert.

Ergebnisse und Diskussion In Mäusen mit einem Mikrobiom, welches der freien Wildbahn ähnelt, kommen iILC2 vor - ihre spezifischen Aufgaben in äußerlich gesunden Individuen sind jedoch unbekannt.

Ernm, *Kcnab2* und *Lgmn* werden im Rahmen der Aktivierung in ILC2 heraufreguliert. Durch das Fehlen von *Lgmn* resultiert eine veränderte Immunantwort gegen *N. b.* welche eventuell auf eine defiziente Reifung und abweichende Verarbeitung von Antigenen der iILC2 zurückzuführen ist. *Kcnab2* ist in Kulturen notwendig für eine suffiziente Sekretion von Typ 2 Zytokinen. ILC2 ohne *Ernm* zeigen nach kürzeren Stimulierungen eine

geringere Zellzahl, die im Verlauf jedoch die Kontrollen übersteigt. Im Rahmen einer *N. b.* Infektion zeigen *Ernm* - KO Tiere mehr Würmer obwohl eine verstärkte Immunantwort vorliegt, was mit abweichender Zytokin - Sekretion und gestörten intrazellulärem Transport der ILC2 zusammenhängen könnte.

Zusammenfassend scheinen somit *Ernm*, *Kcnab2* und auch *Lgmn* eine zumindest geringe Aufgabe in iILC2 zu besitzen, deren genaue Funktion es jedoch durch weiterführende Studien zu untersuchen gilt.

b. Zusammenfassung auf Englisch

Introduction ILC2 are innate lymphoid cells of group 2, involved in type 2 immunity. Type 2 immunity counteracts for instance helminths, which are a substantial global health burden. In context of a helminthiasis - induced activation of ILC2, they differentiate into inflammatory ILC2 and are essential part of the fight against the helminths. So far little is known about iILC2. It is so far still questionable if iILC2 are existing in “steady state“ in the wild world. Furthermore, due to transcriptome analysis, several genes, which can be found in ILC2 in context of their activation, were identified. Among them were *Ernm*, which encodes the cytoskeleton - protein ERMIN, *Kcnab2* encoding for the $\beta 2$ subunit of the voltage - gated potassium - channel, as well as *Lgmn*, the gene for the asparaginyl endopeptidase LEGUMAIN.

Aim The aim of this study was to examine how the population of ILC2 is represented under the influence of different microbiota and to capture and elucidate the influence of *Ernm*, *Kcnab2* and *Lgmn* in the physiology and pathophysiology of the ILC2.

Methods ILC2 from gene specific KO - mice or wildlings were analyzed in “steady state“ and regarding stimulation, proliferation, apoptosis, survival, migration and cytokine - secretion through *in vitro* cultures under the usage of cytokines, “boyden chamber assays“ and several techniques of flow cytometry. *In vivo* the worm burden upon *Nippostrongylus brasiliensis* infection in gene specific KO - mice was examined and furthermore the immune response against it was analyzed by flow cytometry.

Results and discussion In mice owning a microbiota, which resembles the one found in the wilderness, iILC2 occur - their specific functions in externally healthy individuals are still uncertain.

Ernm, *Kcnab2* and *Lgmn* are upregulated in ILC2 in the context of their activation. The absence of *Lgmn* results in an altering immune response against *N. b.*, which is eventually due to a deficient maturation and deviating processing of antigens by the iILC2. In culture *Kcnab2* is necessary for a sufficient secretion of type 2 cytokines. ILC2 without *Ernm* present a lower cell number after shorter times of stimulation, which exceeds the controls in the course. As part of a *N. b.* infection *Ernm* - KO animals show more worms despite the presence of an increased immune response, which could be related to a deviant cytokine secretion and impaired intracellular transport by the ILC2.

In summary *Ernm*, *Kcnab2* as well as *Lgmn* seem to own an at least minor duty in iILC2, but their exact function needs to be elucidated in further studies.

4. Einleitung / Fragestellung

a. Helminthen und Helminthiasis

Parasitologie und Reich der Parasiten / Helminthen

Helminthen gehören zu den Parasiten. Dies sind Lebewesen, welche einen eukaryotischen Zellaufbau besitzen und in ihrem Lebenszyklus von Wirten abhängig sind. Die Definition des Parasitismus (von griechisch *pará* = "neben", *sítos* = "Essen") besagt, dass lediglich der Parasit (Schmarotzer) einen Nutzen aus der Beziehung zum Wirt besitzt, dem Wirt jedoch durch den Parasiten Schaden zugefügt werden. Man unterscheidet in Abhängigkeit der Lokalisation des Parasiten dabei zwischen Ekto - (außen auf der Haut) oder Endoparasiten (innen, zum Beispiel im Darm, wie Fadenwürmer). Darüber hinaus dient die Besiedlung des Wirtes durch den Parasiten auch zu asexueller oder geschlechtlicher Vermehrung. Parasiten durchlaufen einen Lebenszyklus, teilweise mit Zwischen - / Fehl - und Endwirt, wobei diverse Reifestadien durchschritten werden. Diese Zyklen sind von einem Parasiten zum anderen Parasiten teilweise sehr unterschiedlich und der Lebenszyklus von *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. b.*), welcher für diese Studie relevant war wird später genauer betrachtet. Parasiten können anhand Ihrer Erscheinung und Physiologie in 3 Gruppen unterteilt werden: Protozoen, Arthropoden und Helminthen. Letztere sind für diese Studie relevant. Sie sind mehrzellig und zumeist hoch differenziert bzw. entwickelt. Die Gruppe der Helminthen wird anhand ihrer Makroskopie in 3 größere Untergruppen aufgeteilt. Man unterscheidet die Nematoden von den Trematoden und Cestoden. Cestoden sind Bandwürmer, sie sind Zwitter, befruchten sich also selbst. Sie bestehen aus Kopf (Skolex) und Gliedern (Proglottiden) und leben im Darm ihrer Wirte. Trematoden sind Saugwürmer bzw. Egel. Sie erhalten ihren Namen von den charakteristischen 2 Saugnäpfen am Kopf. Zu ihnen gehören zum Beispiel die Schistosomen. Wichtig zu wissen ist, dass in einigen Unterteilungen die Gruppen der Trematoden und Cestoden zur Gruppe der Platyhelminthen (Flachwürmer) zusammengefasst werden. Die dritte Untergruppe der Helminthen sind die Fadenwürmer, die Nematoden. *Nippostrongylus brasiliensis* ist ein Vertreter dieser Untergruppe. Sie durchlaufen 4 Larven Stadien, bevor sie sich dann zu weiblichen und männlichen Würmer entwickeln, welche sich im Darm der Wirte geschlechtlich weitervermehren. Darüber hinaus werden sie nach dem Fehlen oder Vorhandensein einer Lungenpassage unterteilt. Dies bedeutet, dass in einem Abschnitt des Lebenszyklus die Larven durch die Lunge des Wirtes wandern. Bekannte Vertreter

ohne Lungenpassage sind *Trichinella spiralis*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* (Madenwurm, der häufigste Wurm in Europa) oder Filarien wie *Onchocerca volvulus*, der Erreger der Flussblindheit oder *Wuchereria bancrofti*, der Erreger lymphatischen Filariose bzw. Elephantiasis.

Wichtiger für diese Studie sind jedoch Nematoden mit Lungenpassage. Zu Ihnen gehört beispielsweise *N. b.*, welcher jedoch in Nagetieren zu finden ist. Humane Vertreter sind *Ascaris lumbricoides* (Spulwurm und häufigster Wurm weltweit), *Toxocara canis* oder *mystax*, *Ancylostoma duodenale* (ein Hakenwurm, er besitzt große Ähnlichkeit mit dem Lebenszyklus von *N. b.* (siehe Seite 20 f.) oder *Strongyloides stercoralis* (der Zwergfadenwurm / Kot - Älchen auch er besitzt große Ähnlichkeit mit Lebenszyklus von *N. b.* (siehe Seite 20 f.) (Longmore et al., 2014, McKay et al., 2017, Hof and Schlüter, 2019, Karow and Lang-Roth, 2020, Groß, 2013)

Helminthen im Allgemeinen sind deutlich grösser als andere infektiöse Pathogene und erstrecken sich von wenigen μm bis 25 m, des Weiteren ist ihre Interaktion mit dem menschlichen Organismus häufig komplexer (Lustigman et al., 2012).

Klinik der Helminthiasis

Eine Infektion mit Helminthen wird als Helminthiasis bezeichnet. Nicht selten verlaufen Helminth - Infektionen asymptomatisch, jedoch kann es bei Dysregulation der Infektion oder der gegen sie gerichteten Immunantwort zu erheblichen Pathologien kommen, sowohl akut als auch chronisch (Maizels et al., 2009). Abhängig von Art des Wurmes, dem Ort und Zeitpunkt der Infektion können dabei sehr unterschiedliche Symptome auftreten. So beispielsweise kann es bei der Ancylostomatidose, welche durch *Ancylostoma duodenale* verursacht wird, zu lokalen und systemischen Symptomen kommen. An der Stelle des Hauteintrittes der Larven kommt es zu Juckreiz und Rötung, während der Lungenpassage zu Fieber, Reizhusten, blutigem Auswurf, starker Verschleimung und asthmatischen Anfällen, und sobald die Würmer im Darm angekommen sind zu Bauchschmerzen und Gewichtsverlust. Durch das Saugen von Blut aus den Zotten des Darms entsteht bei starkem Befall und langer Persistenz der Infektion eine Anämie. Diese in Kombination mit Gewichtsverlust und mangelnder Nährstoffresorption führt auch zu Einschränkungen der kognitiven Leistungsfähigkeit, insbesondere in Kindern (Crompton, 2000, Bundy and Cooper, 1989). Diagnostisch wegweisend ist eine Eosinophilie im Blut, wichtiger jedoch der direkte Erregernachweis aus der Stuhlprobe oder seltener per endoskopischer Untersuchung. Zur Therapie

werden sogenannte Anthelminthika eingesetzt, im Falle einer Ancylostomatidose sind dies Albendazol oder Mebendazol, welche die Mikrotubuli - Polymerisation der Helminthen hemmen und somit deren Glucose - Aufnahme als auch Zytoskelett - Aufbau stören (Longmore et al., 2014, McKay et al., 2017, Hof and Schlüter, 2019, Karow and Lang-Roth, 2020, Groß, 2013).

Epidemiologie, Inzidenz und Relevanz

Durch Tausende Jahre an gemeinsamer Coevolution ist es zahlreichen Parasiten gelungen sich außerordentlich gut an ihre Wirte anzupassen, in ihm die jeweils für sie optimale Nische zu bevölkern, und dabei möglichst effizient den immunologischen Antwortmechanismen des Wirtes auszuweichen. Das Resultat dieser Anpassung ist nicht selten eine asymptomatische Toleranz (Maizels et al., 2009), was über die Zeit zu einer massiven Verbreitung von Helminthen geführt hat, insbesondere in suszeptiblen Teilen der Welt.

Die Anzahl an Wurminfektionen ist sehr hoch - es wird davon ausgegangen, dass Boden - ständige / - übertragbare Helminthen für Infektionen in mehr als 1,5 Milliarden Menschen oder etwa 24 % der menschlichen Spezies verantwortlich sind (Motran et al., 2018). Zu diesen Boden - ständigen / - übertragbaren Helminthen gehören vor allem *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* sowie die Hakenwürmer *Ancylostoma duodenale* und *Necator americanus*. Die in 2016 durchgeführten Prävalenz Schätzungen im Rahmen des "Global Burden of Disease" (GBD) Projektes (H.King, 2019) besagen, dass 800 Millionen Fälle von Ascariasis, 450 Millionen Fälle von Hakenwürmern (vor allem *Ancylostoma duodenale* und *Necator americanus*), 435 Millionen Fälle von Trichuriasis und 190 Millionen Fälle durch Schistosomiasis, als auch etwa 75 Millionen Fälle durch Nahrungsmittel - übertragene Trematoden verursacht werden. Durch massive Anstrengungen in den letzten Jahrzehnten konnten die stark behindernden Erkrankungen der lymphatischen Filariose (29 Millionen) und Flussblindheit (Onchozerkose, 15 Millionen) eingeschränkt werden. Sie sind jedoch immer noch sehr häufig.

Betrachtet man den Globus in Hinblick auf das Auftreten von Wurminfektionen ist klar zu erkennen, dass insbesondere tropische und subtropische Regionen betroffen sind. Dies ist auf vorwiegend 2 Faktoren zurückzuführen. Einmal die lokalen Umweltverhältnisse, welche ein feucht - warmes Milieu der Umwelt bieten, das von Boden - übertragenen Helminthen benötigt wird, oder Vektoren (Moskitos) und Zwischenwirte beheimaten. Der

zweite Faktor ist jedoch die soziale Umgebung: Armut, schlechte hygienische Standards, Überbevölkerung und mangelnde medizinische Versorgung sind nur einige davon. Widerspiegeln tut sich dies in der großen Ähnlichkeit der Weltkarten für die Prävalenz der Helminth - Erkrankungen und derjenigen für die Prävalenz sozialer Armut. Nichtsdestotrotz können Helminth - Infektionen auf der gesamten Welt vorkommen, sobald begünstigende Faktoren (Armut, mangelnde sanitärische Einrichtungen usw.), anzutreffen sind (H.King, 2019). In Umgebungen, in welchen Umweltfaktoren die Wurmtransmission unterstützen, also vor allem feuchte tropische Regionen, kommt es vermehrt auch zu sehr intensiven Infektionen (welche besonders häufig in Kindern zu sehen sind) und Polyparasitismus, bei welchem in einem Individuum mehrere parasitäre Spezies gefunden werden (Bisanzio et al., 2014). Als endemische Regionen hervorzuheben sind Regionen wie Süd und Süd - West China, Süd Indien, Süd - Ost Asien, Sub - Sahara Afrika, Zentral und Süd Amerika (Savioli and Albonico, 2004). Insgesamt wird also deutlich was für eine massive weltweite Belastung durch Helminth - Infektionen verursacht wird. Versucht man dies in Zahlen auszudrücken eignen sich die DALYs (disability adjusted life years), also die Lebenszeit, welche jedes Jahr durch eine Erkrankung verloren geht. Weltweit gerechnet sind dies alleine für Boden - übertragene Helminthen (also vor allem *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* sowie die Hakenwürmer *Ancylostoma duodenale* und *Necator americanus*), 39,0 Millionen Jahre pro Jahr (Chan, 1997). Dies ist vergleichbar mit Malaria (35,7 Millionen) oder Tuberkulose (46,5 Millionen) (Mwangi et al., 2006, King, 2015, WHO-Expert-Committee, 2002). Die Reduktion dieser Krankheitslast lässt sich einerseits durch nachhaltige Entwicklung benachteiligter Regionen, Investition in Hygiene - und Wasserstandards, sowie Bildung und bessere Grundversorgung angehen. Die von der UN aufgestellten nachhaltigen Entwicklungsziele für 2030 (Sustainable Development Goals = SDG), beinhalten wirksame Mittel, von welchen eine Reduktion der Wurminfektionen zu erwarten ist, dazu gehören: Reduktion der Armut (Nr. 1), Gesundheit und Wohlbefinden (Nr. 3), sowie sauberes Wasser und Sanitation (Nr. 6) (H.King, 2019). Andererseits aber auch durch eine Verbesserung des Verständnisses, wie die Helminthen in den Wirt gelangen, sich in ihm entwickeln und vermehren und wie sie dabei mit dem Wirt interagieren. Um so neue Präventions - Strategien, aber auch neue medizinische Therapien und Medikamente zu entwickeln, welche entweder dem Parasiten selber schaden oder die Antwort des Wirtes auf den Parasiten unterstützen. Um diese Antwort suffizient zu unterstützen, ist es jedoch zunächst wichtig, sie genau zu studieren und zu verstehen. Wie unten (siehe Seite 22 ff.)

klar wird ist schon viel über die Immunantwort gegen Würmer bekannt, jedoch existiert an dieser Stelle bis heute noch viel Unwissenheit.

b. Nippostrongylus brasiliensis

Für die Experimente dieser Studie wurde das Tiermodell der *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. b.*) Infektion in Mäusen und Ratten gewählt. *N. b.* ist ein weit verbreiteter Parasit in der biomedizinischen Forschung, da er ein sehr potenter Aktivator der Typ 2 Immunität ist und somit ideal, um diese *in vivo* zu studieren. Das Modell ermöglicht die Untersuchung einer systemischen, in Mäusen etwa zweiwöchigen, Helminth - Infektion ausgehend von Haut über Lunge und Darm, in deren Verlauf alle Charakteristiken der Eosinophilie, Mastozytose, Mukusproduktion und CD4⁺ T - Zell abhängigen IgE Produktion auftreten.

N. b., welcher auch als *Heligmosomum muris* oder *Nippostrongylus muris* bezeichnet wird, gehört zur Untergruppe der Nematoden und ist ein gastrointestinaler Rundwurm. Sein bevorzugter Wirt ist die Ratte, jedoch befällt er auch zahlreiche andere Nagetiere wie Mäuse. In seinem Lebenszyklus besitzt *N. b.* große Ähnlichkeit zu den, den Menschen befallenden Hakenwürmern: *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale*, weshalb er teilweise als Hakenwurm der Ratte bezeichnet wird (Camberis et al., 2003, DeFranco et al., 2007) . Der Lebenszyklus von *N. b.* beinhaltet 4 Häutungen über die Larven Stadien L1 bis L4 zum sexuell reifen Wurm (L5).

Infizierte Tiere scheiden die elliptischen Eier aus, welche etwa 58 µm lang und 32,5 µm breit sind, und einen 16 bis 20 zelligen Embryo darstellen. In feuchten Böden oder fäkalen Kulturen liegende Eier entlassen nach etwa einem Tag bei Temperaturen um die Raumtemperatur bewegliche freilebende Larven, welche sich zweimal häuten um über die Stadien L1 (häutet sich nach 12 h bis einem Tag) und L2 (häutet sich innerhalb eines Tages) zum infektiösen Stadium L3 zu werden. Diese L3 Larven sind etwa 685 µm lang und 300 µm breit. Dieses L3 Stadium besitzt die Fähigkeit durch intakte Haut zu penetrieren (innerhalb von 5 min nach Hautkontakt), kann aber auch oral aufgenommen werden. Von der Epidermis kommend durch die Dermis dringend, erreichen die Larven die lockere Subkutis mit den dort befindlichen Blutgefäßen. Im Rahmen des Tiermodelles werden die Larven direkt subkutan in die dorsale Nackenfalte der Tiere gespritzt. Etwa einen halben Tag nach Invasion erhalten die Larven Anschluss an das Kapillarsystem, um per venösem Rückstrom über das rechte Herz in die Lunge transportiert zu werden. Im dortigen immer feiner werdenden Kapillarsystem bleiben sie hängen, häuten sich ein

drittes Mal und reifen so etwa einen Tag nach Infektion zum L4 Stadium. Dieses ist stärker pigmentiert und länger als das L3 Stadium. Während dieser Reifung zerstören die Würmer die Lungenkapillaren, und werden in die Alveolen freigesetzt. Hier verbleiben sie für bis zu 2 Tage nach Inokulation, um dann anschließend über die Kombination aus Hustenreflex und Schluckreflex in den Gastrointestinaltrakt zu gelangen. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion sind etwa 3 bis 4 Tage vergangen. Im Dünndarm reifen die Larven nun nach der finalen Häutung zu L5 Stadium, also zu erwachsenen geschlechtsfähigen Würmern heran (4 bis 4,5 Tage nach Infektion), und Beginnen, ab Tag 6 der Infektion, Eier zu legen. Diese werden aus dem Wirt ausgeschieden und stellen nun die Grundlage folgender Zyklen dar. Die erwachsenen Würmer finden sich vor allem im Anfangsteil des Dünndarms, wo sie lose an den Darmzotten adhären sind und pro Tag wenige μl an Blut aus diesen herausaugen. Durch das so aufgenommene Hämoglobin, erhalten erwachsenen Würmer ihre rote Farbe. Die männlichen Würmer messen 400 μm Länge und 100 μm Breite, wohingegen die weiblichen Würmer 100 μm länger sind. *N. b.* ist an Ratten adaptiert und kann hier zu längeren, Eier - produzierenden Infektionen führen. Die Immunantwort von Mäusen jedoch führt zur Reduktion der Eiablage, nachdem das Maximum an Tag 8 und 9 erreicht wird, und dem Verschwinden von adulten Würmern zwischen Tag 10 und 13 (Camberis et al., 2003, DeFranco et al., 2007, Gerbe et al., 2016, Allen and Maizels, 2011).

In der Lungenphase des Lebenszyklus stehen vor allem pulmonale Symptome im Vordergrund: Durch das Platzen der Kapillaren und Alveolarsepten kommt es zu pulmonaler Hämorrhagie, und Untergang von Gasaustauschfläche was eine respiratorische Belastung darstellen kann. Bei, hinsichtlich der Anzahl an gespritzten L3 Stadium Larven, zu starker Infektion, kann dieser Verlust von Lungenoberfläche auch den Tod der Tiere bedeuten. Langfristig führen die Schäden in der Lunge zu einer Entwicklung von Emphysemen, Verschlechterung der Lungenfunktion, und Atemwegs Hypersensitivität, die in Kombination mit den Emphysemen, dem Krankheitsbild einer COPD ähnlich ist. In der gastrointestinalen Phase führt die intestinale Wurmlast zu Symptomen, diese sind beispielsweise Verlust an Körpergewicht, und Hämatokrit durch mangelnde Nährstoff Resorption, sowie biphasische Anorexie.

Therapiert wird die Infektion mit dem Anthelminthikum Tetramisole, kombiniert mit Zeolite als Adjuvanz.

c. Typ 2 Immunität und ILC2

Typ 1 / 2 / 3 Immunität

Durch eine Infektion mit Helminthen, beispielsweise dem Nematoden *N. b.*, entstehen Schäden im Wirtsorganismus. Zur Erhaltung seiner Fitness und Limitation des Schadens durch eindringende Pathogene besitzt der Mensch, aber auch zahlreiche andere Tiere darunter auch Nagetiere, wie Mäuse und Ratten, ein Immunsystems. Die Funktionen des Immunsystems lassen sich in 3 große Gruppen einteilen: Typ 1, Typ 2 und Typ 3 Immunität. Typ 1 Immunität, welche vor allem die Aktivierung von Makrophagen und Zytotoxizität beinhaltet, wird durch Tumore sowie intrazelluläre Mikroben, wie Viren, Bakterien und intrazelluläre Parasiten induziert. Typ 2 Immunität wird durch große extrazelluläre Parasiten und Allergene stimuliert, und beinhaltet unter anderem die Aktivierung von alternativen Makrophagen, IgE Produktion, Eosinophilie sowie diverse Mechanismen zur Expulsion der Pathogene. Typ 3 Immunität wird durch extrazelluläre Mikroben, darunter Pilze und Bakterien angeregt, und beinhaltet die Sezernierung von antimikrobiellen Peptiden als auch Phagozytose von Pathogenen. Der Fokus dieser Studie liegt auf der durch Parasiten angestoßenen Typ 2 Immunität.

Angeborene / erworbene Immunität

Immunität lässt sich weiterhin in angeboren und erworbene Immunität unterteilen. Während erstere, bestehend aus zellulären, humoralen, physikalischen und chemischen Abwehrmechanismen Keimbahn - kodiert, und somit von Geburt an vorhanden ist, benötigt Letztere prägenden Kontakt mit den Antigenen des Erregers. Die erworbene Immunität entsteht erst nach diesem Kontakt durch die Rearrangierung von Rezeptoren und einer Affinitätsreifung, folglich also erst im Laufe des Lebens. Grundlage der erworbenen Immunität sind antigenspezifische Zellen, darunter beispielsweise T - Zellen (Herold, 2020).

Pathophysiologie der Helminthen im Situs

Um nun zu verstehen, wie das Immunsystem im Rahmen einer Helminthiasis aktiviert wird, damit nach Wechselwirkung eines komplexen Netzwerks aus Zellen und Mediatoren, eine effektive Immunantwort, mit ihren speziellen Effektormechanismen, gegen den Wurm initiiert wird, benötigt es Kenntnisse über die pathophysiologischen Vorgänge des Wurmes im Wirt. Für diese Überleitung von Erreger zu Immunsystem lassen sich im Allgemeinen zwei Wege unterscheiden. Einmal werden Antigene, also

diverse Bestandteile und Produkte, wie Proteasen und Gifte, der Würmer oder ihrer Eier direkt durch Zellen des Immunsystems erkannt aber auch aufgenommen und weiter prozessiert (Kim and Artis, 2015, Wiesner et al., 2015). Hervorzuheben sind hier die ES (exkretorische / sekretorische Antigene), was parasitische Moleküle sind, die an der Schnittstelle zwischen Parasiten und Zellen des Immunsystems durch diverse Mechanismen freigesetzt werden, wie beispielsweise aktive Sekretion oder Diffusion aus dem parasitischen Soma. Ihren Ursprung haben diese Moleküle im Darm der erwachsenen Würmer, oder im Uterinen Kompartiment der weiblichen Würmer und werden während Defäkation oder Ei / Larven Ablage freigesetzt (Motran et al., 2018). Darüber hinaus gibt es den Weg einer indirekten Stimulierung der Zellen des Immunsystems, ursprünglich ausgehend vom Parasiten, jedoch vermittelt über zwischengeschaltete Zellen und Mediatoren. So werden die Zellen des Immunsystems indirekt über Zytokine oder Alarmine stimuliert. Diese werden von unter anderem Epithelzellen als Antwort auf Zellschäden, Protease Aktivität und TLR - Liganden ("toll like receptor" - Liganden) freigesetzt (Hammad and Lambrecht, 2015, Hammad et al., 2009, Van Dyken et al., 2016). Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass der Wurm im Körper einmal direkt durch umgebende Immunzellen erkannt wird, darüber hinaus aber auch noch indirekt mit der Zwischenstelle von nicht dem Immunsystem angehörigen, gewebeeigenen, stromalen und parenchymatösen Zellen.

Zu den erwähnten Alarminen gehören beispielsweise IL-25, IL-33 und TSLP, welche auch im Rahmen einer Wurminfektion von entscheidender Bedeutung sind. IL-25 gehört zur IL-17 Familie an Zytokinen, wird auch IL-17E genannt, und besitzt die Fähigkeit Typ 2 Immunität zu propagieren (Fort et al., 2001). Bezüglich IL-25 dachte man, dass es durch eine Vielzahl von Zellen produziert wird, darunter Th2 - Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Eosinophile und Basophile. In den letzten Jahren wurde jedoch gezeigt, dass es fast ausschließlich durch die Tuft - Zellen produziert wird, welche besonders wichtig im Zusammenhang mit Helminth - Infektion sind (Fort et al., 2001, Ikeda et al., 2003, Kang et al., 2005, Wang et al., 2007, von Moltke et al., 2016, Gerbe et al., 2016).

Die erst in den letzten Jahren intensiv erforschten Tuft - Zellen sind chemosensorische Zellen im Epithel des Dünndarms (Hayakawa and Wang, 2018). Bereits im Ruhezustand exprimieren sie konstitutiv IL-25, um so die Homöostase der Zellen für Typ 2 Immunität aufrecht zu erhalten. Im Zuge einer parasitischen Infektion jedoch, kommt es zu einem massiven Anstieg der IL-25 Produktion und Tuft - Zellen werden zur Haupt - Quelle von IL-25 (von Moltke et al., 2016, Howitt et al., 2016, Gerbe et al., 2016). Im Rahmen der

Infektion "schmecken" diese Tuft - Zellen Parasiten - Bestandteile wie Succinat über den Succinat - Rezeptor GPR91 (Schneider et al., 2018) und SUCNR1 (Nadsombati et al., 2018) oder andere Stoffe durch unter dem anderen den TRPM5 (Howitt et al., 2016), und sezernieren daraufhin das Zytokin um die Information an unter anderem Immunzellen weiterzugeben. In der Lunge gibt es vergleichbare chemosensorische Zellen: die Brush - Zellen (Ualiyeva et al 2019, Krasteva et al 2012), welche im Rahmen der Initiierung der Typ 2 Immunität auch IL-25 produzieren können (Bankova et al 2018). IL-25 wirkt auf einen Komplex aus dem IL-17 - Rezeptor Alpha und Beta (IL-17RA und B), welcher auf diversen Zellen des Immunsystem, zum Beispiel CD4⁺ T - Zellen, oder dendritischen Zellen zu finden ist.

IL-33 ist ein Mitglied der IL-1 - Familie an Zytokinen, und wird konstitutiv auf hohem Level in den Nuclei von diversen Zelltypen exprimiert, wie beispielsweise Epithel -, Endothel - und Mesenchymzellen. Im Kontext der Aktivierung der Typ 2 Immunität, wird IL-33 im Rahmen von Gewebsschäden und - nekrose vorwiegend von sterbenden Stromazellen und Prä - Adipozyten freigesetzt (Rana et al., 2019). In diesen liegt es gebunden an Chromatin im Nukleus vor und wird im Rahmen von Zellschäden oder zellulärer Aktivierung freigesetzt (Liew et al., 2016, Carriere et al., 2007). Freigesetztes IL-33 wird durch Proteasen von Neutrophilen und Mastzellen oder direkt durch Allergene gespalten, wobei das Spaltprodukt etwa 30 - Fach potenter in der Zellaktivierung nachgeschalteter Zellen ist (Lefrancais et al., 2014, Cayrol et al., 2018). IL-33 wird durch einen Komplex aus ST2 und dem IL-1RAcP, den IL-33 - Rezeptor erkannt, welcher auf Th2 - Zellen des Immunsystem zu finden ist, um so Typ 2 Immunität einzuleiten (Schmitz et al., 2005).

TSLP, also "Thymic Stromal Lymphopoetin" besitzt große Ähnlichkeit mit IL-7, und vielfältige Effekte. Es wird durch Epithelzellen der Lunge, der Haut und des Darms exprimiert ((Ziegler et al., 2013, Ziegler, 2012, Omori-Miyake and Ziegler, 2012), darüber hinaus von Fibroblasten und Stromazellen, und wird vor allem im Rahmen von Zellschäden freigesetzt.

Th2 - Zellen

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Immunabwehr gegenüber extrazellulären Parasiten, also die Typ 2 Immunität vorwiegend durch T - Helferzellen der Gruppe 2 (Th2 - Zellen) propagiert wird.

Im Rahmen der T - Zell - Aktivierung allgemein, muss zunächst der T - Zell - Rezeptor erwähnt werden, welcher essentiell für die Aktivierung der meisten T - Zellen ist. Dabei

handelt es sich um einen Multi - Protein - Oberflächenrezeptor, welcher mit CD3 einen Komplex bildet und als TCR - CD3 vorliegt. Der TCR - CD3 Komplex setzt sich zusammen aus genetisch diversen Alpha Beta oder Gamma Delta TCR Heterodimeren, welche nicht - kovalent mit invarianten CD3 Dimeren verbunden sind (Mariuzza et al., 2020). Der TCR vermittelt die Erkennung von antigenen Peptidfragmenten auf antigenpräsentierenden Zellen (APC). Dies sind vorwiegend dendritische Zellen, Makrophagen, B - Zellen und Monozyten, sie nehmen die fremden Proteine (unter anderem auch von Parasiten) sowie körpereigene Proteine auf, prozessieren sie per proteolytischer Degradation und präsentieren sie gebunden an MHC - Komplexen auf ihrer Oberfläche. Man unterscheidet MHC Klasse I und II (Blum et al., 2013). Bindet der TCR - CD3 Komplex an ein passenden Peptid - MHC - Komplex, so kommt es zur Transduzierung eines aktivierenden Signales in die T - Zelle. Für eine vollständige Aktivierung benötigt es jedoch weitere costimulatorische Signale auf der APC, wie Notch - Liganden oder OX40L sowie CD40, CD80 und CD86 (Radtke et al., 2013, Nurieva et al., 2007, Smith-Garvin et al., 2009, Hwang et al., 2020).

Der Gedanke nach Polarisation der T - Zellen zu diversen Gruppen entstand bereits 1986 (Mosmann et al., 1986). Dabei differenziert sich eine naive T - Helferzellen zur Th1 - Zelle, zuständig für Typ 1 Immunität, oder Th2 - Zelle, für Typ 2 Immunität. Dies ist abhängig von dem während der T - Zell - Rezeptor - induzierten Aktivierung vorhandenen Zytokin Milieus. So entsteht aus naiven CD4⁺ T - (Helfer) Zellen in einer durch Interleukin 4 dominierten Umgebung eine starke Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT6 und insbesondere GATA3, deren Resultat eine Differenzierung zur Th2 - Zelle ist (Zhang et al., 2014, Kidd, 2003).

Neben den Th2 und Th1 - Zellen existieren noch weitere Gruppen von CD4⁺ T - Helferzellen, wie Th17 Zellen für Typ 3 Immunität, aber auch andere T - Zellen wie CD8⁺ zytotoxische T - Zellen.

Th2 - Zellen werden durch diverse Stimuli aktiviert und produzieren nach Aktivierung die sie kennzeichnenden Zytokine: IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, insgesamt bezeichnet als Typ 2 Zytokine.

Diese Zytokine initiieren eine Vielzahl von Prozessen, die für die Beseitigung der Helminthen oder die nachfolgende Gewebereparatur von entscheidender Bedeutung sind. Zu diesen gehören unter andere die Expansion von B - Zellen und deren Antikörper - Klassenwechsel zu IgE, Eosinophilie und Mastozytose, sowie die Polarisation von Makrophagen zu ihrer alternativ aktivierten Form (M2), sowie die Kontraktion von glatten

Muskelzellen und die Hyperplasie sowie Hypersekretion von Goblet - Zellen (Zhu et al., 2010, Zhu and Paul, 2008, Fallon et al., 2002, Paul and Zhu, 2010).

Die Schnittstelle zwischen Pathogen und Th2 - Zelle sind vor allem professionelle antigenpräsentierende Zellen. Zu Ihnen gehören dendritische Zellen (DC), welche vermehrt an Epithel - Barrieren ruhen. Durch die Bindung und Erkennung von Liganden an angeborene TLRs (Toll - like - Rezeptoren), wie LPS, CpG - ODNs und weitere (Reis e Sousa, 2006), kommt es zur Aktivierung der DCs. Diese Aktivierung bewirkt 2 wichtige Signale für T - Zellen: Erstens die Präsentation von Antigenen (in Form von Peptiden) gebunden an MHC - II - Moleküle, sowie Zweitens die Heraufregulation von costimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 (MacDonald and Maizels, 2008). Die durch die MHC - II - Molekülen präsentierten Antigene nehmen die DCs aus ihrer Umwelt auf, beispielsweise sogar durch das Epithel hindurch aus dem Lumen des Darms. Dann werden diese intrazellulär prozessiert und an MHC - II - Rezeptoren gebunden, zur Oberfläche der Zelle geschleust, um dann dort als fertige Peptid - MHC - II - Komplexe anderen Zellen des Immunsystems präsentiert zu werden ((Reis e Sousa, 2006, Banchereau et al., 2000).

DCs sind nicht in der Lage selbst IL-4, zur Th2 - Zell - Polarisation zu produzieren (MacDonald and Maizels, 2008), bewirken Dies jedoch über andere Wege. So exprimieren sie die costimulatorischen Moleküle OX40L und den Notch Liganden Jagged 1, welche Th2 - Zellen primen (Radtke et al., 2013, Webb and Tait Wojno, 2017, Webb et al., 2017). Beide Moleküle werden unter dem Einfluss von Alarminen heraufreguliert, und sind vermehrt auf CD11b⁺CD301b⁺PDL2⁺DCs, welche auf die Th2 - Zell - Prägung spezialisiert sind, zu finden (Kumamoto et al., 2013, Connor et al., 2017, Connor et al., 2014). Darüber hinaus gibt es weitere von DCs produzierte Stoffe, welche aktivierend auf Th2 - Zellen wirken, wie Dectin 2, was Cysteinyl - Leukotriene induziert (Barrett et al., 2009), welche Th2 - Zellen aktivieren (Kim et al., 2006). Des Weiteren können diverse Produkte von Pathogenen, wie Eier von Helminthen, modulierend auf DCs wirken, damit sie einen Th2 - Zell - prägenden Phänotyp annehmen (Everts et al., 2012). Wichtig zu erwähnen ist jedoch, dass die von DCs stammenden Signale für die Th2 - Zell - Stimulation teilweise sehr unterschiedlich und stark Kontext abhängig sind, und es gibt kein universelles Signal für eine Th2 - Zell - Aktivierung durch DCs.

Basophile stellen einen weiteren Spieler im Netzwerk der Th2 - Polarisation dar. Im Gegensatz zu DCs sind sie in der Lage große Mengen an IL-4 zu produzieren. Dies geschieht angestoßen durch eine IL-3 - Stimulation in Kombination mit einer FcεRI -

Quervernetzung, woraufhin sie zu den T - Zell Zonen des drainierenden Lymphknotens wandern, um Teil an der Typ 2 Immunantwort zu nehmen (Sokol et al., 2008, Kim et al., 2010). Darüber hinaus können Basophile, wenn auch teilweise kontrovers diskutiert, MHC - II Moleküle und Ihre costimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 an Ihrer Oberfläche exprimieren, welche im Rahmen der Trogozytose von DCs mit Peptiden beladen oder vollständig überliefert werden können (Otsuka et al., 2013, Perrigoue et al., 2009, Sokol et al., 2009, Yoshimoto et al., 2009, Miyake et al., 2017).

Auch Alarmine, welche eine indirekte Verbindung von Parasiten über stromale, mesenchymale und epitheliale Zellen zum Immunsystem sind, können Einfluss auf Th2 - Zellen haben. So besitzen naive CD4⁺ T - Helferzellen den Rezeptor für IL-25, den IL17-RB, und in Kombination mit IL-4 und STAT6 ("signal transducer and activator of transcription"), vermittelt IL-25 die Th2 - Zell Differenzierung und GATA3 - Expression (Walker and McKenzie, 2018). Und darüber hinaus besitzt IL-25 auch indirekte Effekte auf Th2 - Zellen durch die Unterstützung der Antigen - Präsentation durch TSLP - aktivierte dendritischen Zellen (Wang et al., 2007).

Auch IL-33 wirkt in einer dualen Weise auf Th2 - Zellen, so einmal direkt über den IL-33 - Rezeptor (ST2 / IL-1RAcP) (Schmitz et al., 2005, Xu et al., 1998), sowie vermutlich indirekt synergistisch mit TSLP, um die DC vermittelte Th2 - Zell - Prägung zu unterstützen (Murakami-Satsutani et al., 2014).

Zu guter Letzt kann auch TSLP, wenn auch indirekt über die Expression des costimulatorischen, und Typ 2 Immunität vermittelnden Rezeptor OX40L auf TSLP - aktivierten Zellen (z.B. DCs), Einfluss auf die Polarisation von Th2 - Zellen nehmen (Watanabe et al., 2004, Wang et al., 2006).

Im Rahmen der Aktivierung produzieren fertig differenzierte Th2 - Zellen auch selbst IL-4, um per positiven Feedback Loop ihre eigene Polarisation zu verstärken (Zhu, 2015). IL-4 ist das essentielle Signal für diese Polarisation und die folgenden transkriptionellen Veränderungen. IL-4 aktiviert durch Bindung an seinen Rezeptor, den IL-4R, den STAT6 (Maier et al., 2012), welcher dimerisiert, in den Zellkern gelangt und dort den essentiellen Transkriptionsfaktor: GATA3 heraufreguliert. Dieser ist letztendlich für die Veränderungen im Profil der Transkription der T - Zelle verantwortlich (Yagi et al., 2011, Zheng and Flavell, 1997). Das Ergebnis der Signalisierung über IL-2, IL-7 und TSLP ist die Aktivierung von STAT5, welcher synergistisch mit GATA3 die Expression des IL-4 - IL-13 Genlokus aktiviert.

Nach Ablauf einer Immunantwort verbleiben einige der Th2 - Effektorzellen als Gedächtnis - Zellen, entweder patrouillierend durch lymphoide oder periphere Gewebe oder ortsständig am Platz der ehemaligen Inflammation. Im Rahmen einer Re - Infektion sorgen diese Zellen dann für eine schnelle und robuste Immunantwort (Hondowicz et al., 2016, Endo et al., 2015, Endo et al., 2014). Durch einige Artikel kam es jedoch zu zunehmenden Zweifeln daran, dass Th2 - Zellen der einzige Schlüsselspieler in der Typ 2 Immunität sind. So wurde gezeigt, dass auch in Abwesenheit eines adaptiven Immunsystems und damit in Abwesenheit von reifen T - Zellen (RAG - Knockout) eine suffiziente Typ 2 Immunantwort induziert werden kann (Fallon et al., 2006, Fort et al., 2001).

Entdeckung der ILC2

Im Jahre 2010 jedoch erschienen dann 3 Artikel, welche das bis dahin bestehende, und oben beschriebene Wissen bezüglich der Typ 2 Immunität entscheidend ergänzen sollten.

So beschrieben Moro und Kollegen eine neue Art von angeborenen Lymphozyten, isoliert aus einer dem peritonealen Fettgewebe anhängenden lymphoiden Struktur (FALC für "fat associated lymphoid cluster"). Die beschriebenen Zellen exprimierten keine, für T - Zellen, Linien - definierenden Marker (wie CD3 und CD5), dafür jedoch c-Kit, Sca-1 (Ly6a), den IL-7R (CD127) und den IL-33R (ST2). Moro et al entdeckten, dass diese FALC Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺ - Zellen eine entscheidende Rolle in durchgeführten Wurminfektionen mit *N. b.* spielten. So proliferierten die Zellen durch einen IL-2 Stimulus und produzierten im Rahmen der Infektion große Mengen an Th2 - Zytokinen, um der Infektion entgegen zu wirken. Durch die starke Ähnlichkeit zu Th2 - Zellen gaben Moro et al diesen Zellen den Namen "natürliche Helferzellen" (Moro et al., 2010).

Im selben Jahr beschrieben Neill und Kollegen dieselbe Zelle, taufte Sie jedoch auf den Namen "Nuozyten". Mit Hilfe einer IL-13 - eGFP Reporter Maus entdeckten sie unter anderem im Rahmen einer *N. b.* Infektion, diese damals neuen und angeborenen Typ 2 Immunität - Effektorzellen, welche vor allem früh in der Infektion eine entscheidende Quelle für IL-13 waren (Neill et al., 2010).

Der dritte Artikel aus dem Jahre 2010, wurde von Price und Kollegen publiziert. Er beschreibt das Zytokin - oder Wurminfektion - stimulierte Vorhandensein der von Moro und Neill beschriebenen IL-4 und IL-13 produzierenden Zellen in einer systemischen Vielzahl von Geweben, insbesondere den mesenterische Lymphknoten, Milz und Leber.

Interessanter jedoch die beschriebene Fähigkeit dieser Zellen im Rahmen einer IL-25 Stimulation in der Lage zu sein die Helminthen zu beseitigen, auch bei fehlendem adaptiven Immunsystem der verwendeten RAG - KO - Mäuse. Die Arbeitsgruppe um Price gab den Zellen den Namen "Ih2" - Zellen für "innate type 2 helper cells" (angeborene Typ 2 Helferzellen) (Price et al., 2010).

Heute weiß man, dass die Namen "natürliche Helferzellen", "Nuozyten" bzw. "Ih2"-Zellen, alle dieselbe, die Typ 2 Zytokine: IL-4, IL-5 und IL-13 produzierende Zelle, beschreiben, und bezeichnet sie allgemein als ILC2 für "angeborene lymphoide Zelle 2 bzw. Gruppe 2" (Vivier et al., 2018).

Die Familie der ILC

ILC2 gehören zur Gruppe der ILC, der "innate lymphoid cells" bzw. "angeborenen lymphoiden Zellen". ILCs sind vergleichbar mit den T - Helferzellen, da sie durch dieselben Transkriptionsfaktoren und Effektormoleküle gekennzeichnet sind, und so ähnliche Aufgaben ausüben. So bilden sich Paare aus ILC1 und Th1, ILC2 und Th2, die ILC3 ähneln den Th17 - Zellen und natürliche Killerzellen (NK - Zellen) besitzen Gemeinsamkeiten mit den zytotoxischen CD8⁺ T - Zellen. Ein grundlegender Unterschied der ILC zu T - Zellen ist das Fehlen von rekombinierten Antigen - Rezeptoren zur Erkennung von körperfremden Antigenen, wie dem T - Zell - Rezeptor (Artis and Spits, 2015, Diefenbach et al., 2014, Eberl et al., 2015).

Die meisten Untergruppen der ILC findet man vor allem in parenchymatösen Organen und vermehrt an mukosalen Körper - Ober - und Grenzflächen. Diese Verteilungs - Besonderheit ist exzeptionell für Lymphozyten, insbesondere da die Familie der ILC im Vergleich zu herkömmlichen Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen unterrepräsentiert ist (Klose and Artis, 2016, Nussbaum et al., 2013). Ihre Aufgaben an mukosalen Grenzflächen, insbesondere der Lunge und des Darms, sind hervorzuheben. So scheinen ILCs dort wichtige Regulatoren der Epithel - Barrieren, welchen permanenten Kontakt mit Stoffen aus der Umwelt haben, zu sein (Klose and Artis, 2016). In den letzten Jahren viel erforscht, wurde die Wechselwirkungen zwischen Immunzellen, Epithelzellen, dem Mikrobiom und Metaboliten im Darm, und die in diesem Kontext permanent zu erhaltene und wiederherzustellende Epithel - Integrität zum Schutz vor eindringenden Pathogenen. ILCs scheinen hier eine bedeutende Rolle zu spielen (Vivier et al., 2018, Klose and Artis, 2016), prädestiniert durch Ihre strategisch wertvolle Lokalisierung direkt an den Grenzflächen. Des Weiteren durch ihre Eigenschaften schnell

auf Eindringlinge reagieren zu können, um so erste Effektormechanismen zu initiieren und eine suffiziente adaptive Immunantwort zu propagieren, bis zu deren Funktionsfähigkeit einige Tage vergehen. Im Verlauf der Immunantwort ist jedoch zu bedenken, dass ILC und T - Zellen gleichzeitig aktiv sind und miteinander interagieren (Vivier et al., 2018, Oliphant et al., 2014).

Das Gegenstück für zytotoxische CD8⁺ T - Zellen sind konventionelle natürliche Killerzellen (cNK). Beide exprimieren die Transkriptionsfaktoren Eomes und T-bet und besitzen ähnliche Funktionen, wie die Produktion von Interferon - Gamma (IFN- γ) und die Abtötung infizierter oder entarteter Zellen (Zytotoxizität) (Klose and Artis, 2016). Th1 - Zellen und die zugehörige angeborene lymphoide Zellgruppe, die ILC1 exprimieren den T-box Transkriptionsfaktor T-bet und produzieren IFN- γ um (ähnlich wie auch NK - Zellen) Typ 1 Immunität, also beispielsweise die Beseitigung intrazellulärer Mikroben oder Tumore, durch Zytotoxizität zu bewirken. ILC2 und ihr T - Helferzell Gegenstück, die Th2 - Zellen besitzen beide eine starke Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 und sezernieren die Typ 2 Zytokine, wie IL-5 und IL-13, aber auch Amphiregulin, ein Molekül sehr ähnlich dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF = "epidermal growth factor"), unter anderem um Helminth - Infektionen zu beseitigen (Hoyler et al., 2012, Mjosberg et al., 2012, Moro et al., 2010, Neill et al., 2010, Monticelli et al., 2011). Sie propagieren Typ 2 Immunität, reagieren also auf große extrazelluläre Parasiten und Allergene. Und die verbleibende Gruppe der ILC3 ist durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t gekennzeichnet, ähnelt somit den Th17 Zellen. Ihre Aufgabe ist die Sezernierung von IL-22 (Cella et al., 2009). In Mäusen werden die ILC3 durch die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 unterteilt (Sawa et al., 2010, Klose et al., 2013), und die CCR6⁺ ILC3s, von welchen einige auch als Lymphgewebe induzierende Zellen (LTi) bezeichnet wurden, sind durch die Sezernierung von IL-17 essentiell für die Abwehr gegenüber Pilzen, also für Typ 3 Immunität, verantwortlich (Eberl et al., 2004, Mebius et al., 1997, Gladiator et al., 2013). Zu dieser Typ 3 Immunität gehört auch die Abwehr extrazellulärer Bakterien. Heute werden die LTis jedoch von den anderen Gruppe 3 ILCs abgegrenzt (Vivier et al., 2018), sie sind während der Entwicklung für die Formation von lymphatischen Organen wichtig. CCR6⁻ ILC3s exprimieren T-bet und NKp46, und werden deshalb als NCR⁺ ("natural cytotoxicity receptor positive" = natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor positive) ILC3 bezeichnet. Während ILC1, ILC2 sowie CCR6⁻ ILC3 gleichmäßig zum Beispiel im Darm verteilt sind, so sind CCR6⁺ ILC3 (also LTis) in der erwachsenen Maus in lymphoiden

Strukturen kondensiert, den sogenannten Kryptopatches und “isolated lymphoid follicles“ (ILFs = isolierte lymphoide Follikel).

Des Weiteren gibt es eine gewisse Plastizität zwischen den einzelnen Subgruppen der ILC, so bewirkt die T-bet Induktion in ILC3 eine ROR γ t - Herunterregulierung und die Veränderung des Phänotyps der ILC3. Dieser gleicht sich mehr einer ILC1 - Zelle an, und so erhält die ehemalige ILC3 Zelle die Fähigkeit IFN- γ zu produzieren (Klose et al., 2013, Cella et al., 2009, Rankin et al., 2013, Bernink et al., 2013, Ishizuka et al., 2016).

Durch Untersuchung von Mäusen in experimenteller Parabiose wurde gezeigt, dass im “Steady State“ ILC1, ILC2 und ILC3 kaum durch Vorläufer aus dem Knochenmark ersetzt werden (Peng et al., 2013, Gasteiger et al., 2015, Moro et al., 2016), wohingegen cNK-Zellen und adaptive Lymphozyten permanent aus hämatogenen Quellen ersetzt werden. Die Selbsterneuerung der nicht - zytotoxischen ILCs (ILC1, 2 und 3) findet durch lokale Proliferation von gewebsständigen Vorläufern statt (Bando et al., 2015, Fan and Rudensky, 2016).

Maus - ILCs reagieren überwiegend indirekt auf Pathogene, in dem sie Alarmine, inflammatorische Mediatoren oder Zytokine von myeloiden oder epithelialen Zellen wahrnehmen (Klose and Diefenbach, 2014, Neill et al., 2010, Kim et al., 2013, Roediger et al., 2013, Motomura et al., 2014, Tait Wojno et al., 2015, Doherty et al., 2013, Meylan et al., 2014, Zheng et al., 2008, Longman et al., 2014, Hernandez et al., 2015, Kim et al., 2014, Hughes et al., 2010). Sie selbst besitzen im Gegensatz zu anderen Immunzellen kaum “pattern recognition receptors“, um Antigene bzw. Bestandteile von Eindringlingen, sogenannte PAMPs (“pathogen associated molecular pattern“) wahrzunehmen (Robinette et al., 2015).

ILC2 - Überblick

Wie bereits erwähnt sind ILC2 vorwiegend für Typ 2 Immunität verantwortlich, diese wird stimuliert durch Allergene und große extrazelluläre Parasiten, und mit Hilfe der Typ 2 (Effektor -) Zytokine, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, werden die Beseitigung der Pathogene und andere Mechanismen, wie die alternative Aktivierung von Makrophagen angestoßen (Moro et al., 2010, Neill et al., 2010, Price et al., 2010, Vivier et al., 2018). ILC2 sind vorwiegend gewebsständig (Gasteiger et al., 2015, Moro et al., 2016). Sie reagieren vorwiegend auf die Zytokine IL-25, IL-33 und TSLP, also Alarmine, und Ihre Integration in die Abwehr von Helminthen, beispielsweise *Nippostrongylus brasiliensis* ist gut erforscht. Im Rahmen dieser Abwehr scheinen vor allem die von ILC2 kommenden Typ

2 Zytokine eine entscheidende Rolle für die Elimination der Helminthen zu spielen (Moro et al., 2010, Neill et al., 2010, Price et al., 2010, Vivier et al., 2018).

Des Weiteren sind ILC2 auch in zahlreiche weitere Prozesse integriert, wie die Regulation und das "beiging" von weißem Fettgewebe sowie dessen Thermogenese (Brestoff et al., 2015, Brestoff and Artis, 2015, Molofsky et al., 2013, Hams et al., 2013, Lee et al., 2015) und die Reparatur von beschädigtem Gewebe durch die Produktion von Amphiregulin (Monticelli et al., 2011, Monticelli et al., 2015).

Ohne den Transkriptionsfaktor GATA3 können sie sich nicht Entwickeln bzw. Ihre vollständige Funktion ausüben (Hoyler et al., 2012, Klein Wolterink et al., 2013, Furusawa et al., 2013, Mjosberg et al., 2012). Des Weiteren sind ILC2 abhängig von der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Bcl11b, RORa, TCF-1, Id2 und Gfi (Serafini et al., 2014, Serafini et al., 2015, Walker et al., 2015).

In der Literatur vielfach erwähnte Oberflächenmarker von ILC2 sind unter anderem CD45, CD127 (der IL-7 - Rezeptor), ST2 (der IL-33 - Rezeptor), CD25 (der IL-2 - Rezeptor), sowie KLRG1 (Vivier et al., 2018). KLRG1 ist ein Reifungsmarker von ILC2 und deshalb in maturen ILC2 zu finden. ST2 und CD25 werden im Rahmen der ILC2 - Aktivierung herunterreguliert (Huang et al., 2015, Huang et al., 2018, Flamar et al., 2020).

Registrierung von stimulierenden und hemmenden Signalen durch ILC2

Um die Verbindungen der ILC2 zu anderen Mitspielern im Netzwerk der Typ 2 Immunität zu verstehen, ist es essentiell zunächst zu betrachten, wie sie eingehende Signale und Informationen aufnehmen und dann verarbeiten können. Hier bietet sich eine systematische Betrachtung der Oberflächenrezeptoren auf ILC2 und derjenigen Moleküle, welche von ILC2 registriert werden an, um so zu verstehen wie ILC2, in Funktion und Aktivität, reguliert werden. Bekannt ist, dass Sie selber keine "pattern recognition" - Rezeptoren für die Erkennung sogenannter PAMPs besitzen ("pathogen associated molecular pattern") (Robinette et al., 2015). Diese Informationen erhalten die ILC2 vorwiegend indirekt über die Wahrnehmung von Zytokinen, Alarminen und anderen inflammatorischen Mediatoren.

Grob kategorisieren lassen sich diese positiven oder negativen Regulatoren in einmal aktivierende Zytokine, costimulatorische Zytokine, transdifferenzierende Zytokine, suppressive Zytokine, Lipidmediatoren, Neuropeptide, Geschlechtshormone, Nährstoffe sowie über Zell - Zell - Kontakte medierte Regulation.

Zu den aktivierenden Zytokinen gehören, wie bereits erwähnt: IL-33 und IL-25. Beides sind die stärksten ILC2 Aktivatoren, und bewirken eine starke Proliferation und schnelle Produktion von Typ 2 Zytokinen. Nach der Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor, welcher auf ILC2 exprimiert wird, kommt es zur Transduktion eines aktivierenden Signals in die Zelle. Die Rezeptoren sind für IL-33, der IL-33 - Rezeptor, was ein Heterodimer aus T1 / ST2 und dem IL-1 - Rezeptor assoziierten Protein (IL-1RAcP) ist, und über welchen eine Signalkaskade, welche den NF- κ B und die MAPK beinhalten, angestoßen wird. Deren Resultat ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA3, welcher in ILC2s die IL-5 und IL-13 Promotor Regionen bindet und für Proliferation sorgt (Liew et al., 2016). Neben den massiven Mengen an IL-5 und IL-13 (bis μ g durch wenige Tausend Zellen in wenigen Tagen (Moro et al., 2010)), kommt es auch zur Induktion weiterer Zytokine wie IL-6, GM-CSF, sowie Amphiregulin, weiterer Chemokine, wie Eotaxin, und Peptide, wie Met-Enk. IL-33 gehört zu den Alarminen und wird vorwiegend durch geschädigte Stromazellen und Prä - Adipozyten freigesetzt (Rana et al., 2019). Der Rezeptor für IL-25 ist auch ein Heterodimer, bestehend aus dem IL17RA und IL17RB, welcher durch ILC2 exprimiert wird, und ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B und MAPK führt. *In vitro* besitzt IL-25 alleine nur begrenzten Effekt auf die ILC2 - Aktivierung und Zytokin Produktion und benötigt dafür noch beispielsweise die Kombination mit IL-2 (Moro et al., 2010). Jedoch *in vivo* kann die Applikation von IL-25, zum Beispiel nasal eine Typ 2 Inflammation bewirken (Barlow et al., 2012, Barlow et al., 2013), wobei bedacht werden muss, dass IL-2 *in vivo* eventuell durch assoziierte Zellen (z.B. T - Zellen produziert wird), und dass dieser Effekt schwächer als bei einer IL-33 - Applikation ist. Im Dünndarm wird durch permanente, aber niedrige IL-25 Sezernierung von Tuft - Zellen die ILC2 - Homöostase aufrechterhalten (von Moltke et al., 2016). Während eine Vielzahl von Zellen wie Th2 - Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Eosinophile und Basophile sowie Tuft - Zellen, prinzipiell die Fähigkeit besitzen IL-25 zu produzieren (Fort et al., 2001, Ikeda et al., 2003, Kang et al., 2005, Wang et al., 2007, von Moltke et al., 2016), so sind im Rahmen einer Helminth - Infektion vor allem die Tuft - Zellen von entscheidender Bedeutung (von Moltke et al., 2016, Howitt et al., 2016, Gerbe et al., 2016).

Abschließend zu den aktivierenden Zytokinen ist jedoch zu erwähnen, dass bis heute nicht klar zu sagen ist wie sie exakt auf die ILC2 wirken. So scheinen die ILC2 abhängig von der Spezies und dem sie beheimatenden Gewebe divers auf die Zytokine zu reagieren, und auch die diverse Kombination von IL-25 und IL-33 sowie costimulatorischen Zytokinen bestimmt die Effizienz der Zellaktivierung (Moro et al.,

2010, Halim et al., 2012, Mjosberg et al., 2011, Xue et al., 2014, Chang et al., 2014, Koga et al., 2018).

Zu den costimulatorischen Zytokinen gehören IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, TSLP, TNFSF15 und TNFSF18, sie haben gemein, dass sie alleine die ILC2 nicht ausreichend stimulieren können, sondern nur begleitend zu den aktivierenden Zytokinen (IL-33 und IL-25) eine Aktivierung der ILC2 vermitteln. Sie lassen sich in 2 Gruppen unterteilen: Einmal diejenigen, welche zur "common gamma chain" (γ) - Familie an Zytokinen gehören (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und indirekt auch TSLP) und diejenigen, welche zur TNF - Superfamilie gehören (TNFSF15 und TNFSF18). Die, der γ - Familie an Zytokinen zugehörigen Zytokine, für ILC2 - Costimulation (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9), teilen sich γ (CD132) in Ihren Rezeptoren (Lin et al 2017). TSLP ist mit ihnen verwandt, sein Rezeptor besteht aus der IL-7 - Rezeptor α Kette und der TSLPR Kette, was dazu führt, dass der Signalweg mit denen der γ - Familie an Zytokinen sehr ähnlich ist. Sie alle aktivieren den JAK / STAT Signalweg (Rochman et al., 2009). Sie spielen eine entscheidende Rolle beim Überleben, der Entwicklung und Erhaltung von ILC2. Bei einem Knock - Out von *Il2rg*, dem Gen welches für γ (CD132) kodiert fehlen ILC2. IL-2 wird vorwiegend von aktivierten CD4⁺ T - Zellen produziert und wirkt über seinen Rezeptor CD25 (Read et al., 2016). IL-4 ist wie bereits erwähnt essentiell für die Th2 - Zell - Differenzierung, es wird vor allem durch T - , NKT - , Mastzellen und Basophile produziert (Walford and Doherty, 2013). IL-7 wird von Stroma - und Epithelzellen, sowie Fibroblasten produziert (Read et al., 2016) und ist nochmals hervorzuheben, da es später in Stimulationsversuchen verwendet wird. Es ist relevant für die Entwicklung von ILC im Allgemeinen, alleine jedoch unfähig die Proliferation und Zytokin Produktion von ILC2 zu stimulieren, und benötigt dafür die Kombination mit einem aktivierenden Zytokin (Moro et al., 2016). IL-9 wird durch T - Zellen, Mastzellen, NKT - Zellen sowie ILC2 produziert (Rojas-Zuleta and Sanchez, 2017). Wichtig an IL-9 ist, dass es ein anti - apoptotisches Protein (BCL-3) (Turner et al., 2013), und die Zytokine IL-5 und IL-13 in ILC2 induziert (Wilhelm et al., 2011), dies ist wichtig im Kontext einer autokrinen Stimulation (Mohapatra et al., 2016). TSLP wird durch Epithel - und Stromazellen sowie Fibroblasten produziert (Ziegler, 2012). Die TNF - Superfamilie (TNFSF) setzt sich aus 19 Liganden und 29 Rezeptoren zusammen (Croft and Siegel, 2017, Ward-Kavanagh et al., 2016), welche verschiedene Effekte, darunter Proliferation, Differenzierung, Apoptose aber auch Überleben, in diversen Zellen, darunter T - und B - Zellen sowie DCs, vermitteln. Für ILC2s sind TNFSF15 (TL1A) und TNFSF18 (GITRL) relevant. TL1A wird von Makrophagen, DCs und Endothelzellen unter

inflammatorischen Bedingungen freigesetzt (Meylan et al., 2014). Es wirkt über den TL1A - Rezeptor DR3 (TNFRSF25) und bewirkt Typ 2 Zytokin Produktion in ILC2 (Yu et al., 2014, Meylan et al., 2014). GITRL wirkt über den GTR ("glucocorticoid - induced TNFR - related protein", TNFRSF18) und wird von DCs, Makrophagen, Endothelzellen und B - Zellen in Rahmen von Entzündungen freigesetzt (Clouthier and Watts, 2014). Es bewirkt in ILC2 die Produktion von IL-9, und ohne GTR resultieren geringere Entzündungszustände (Nagashima et al., 2018), bzw. mit Stimulation des GTR mit DTA-1 kommt es zu einer vermehrten Typ 2 Zytokin Produktion durch ILC2.

Zu den transdifferenzierenden Zytokinen gehören IL-1 β , IL-18 und IL-12. Sie machen sich die ILC2 - Plastizität zunutze, und verändern den Phänotyp der ILC2s zu einem ILC1 - ähnlichen Phänotyp, welcher T-bet exprimiert und IFN- γ produziert (Silver et al., 2016, Lim et al., 2016).

Zu den suppressiven Zytokinen gehören einmal Typ 1 und 2 Interferone, sowie IL-27, darüber hinaus IL-10, und auch TGF- β . Sie haben gemeinsam die Proliferation und Zytokin - Produktion von ILC2 zu drosseln, um so die entstehende Inflammation zu limitieren, um eine überschießende Immunantwort zu vermeiden, und nach Beseitigung des Pathogens diese zu beenden (Moro et al., 2016). Typ 1 Interferone (INF- α und - β) binden an den IFN- α / - β - Rezeptor, welcher aus einer IFNAR1 und IFNAR2 Kette besteht (Au-Yeung et al., 2013). Typ 2 Interferone (INF- γ) bindet an den IFNGR, bestehend aus IFNGR1 und IFNGR2 Ketten (Gough et al., 2008) und IL-27 an den IL-27 - Rezeptor (Hunter and Kastelein, 2012). All diese Ligand - Rezeptor Wechselwirkungen haben gemeinsam, dass sie zu einer Aktivierung mehrerer, teilweise verschiedener Signalkaskaden führen, darunter aber stets die STAT1 - Kaskade, um so die Proliferation und Typ 2 Zytokin Produktion von ILC2 zu unterdrücken (Moro et al., 2016, Molofsky et al., 2015, Duerr et al., 2016, McHedlidze et al., 2013, McHedlidze et al., 2016, Kudo et al., 2016, Bi et al., 2017). Interferone werden durch NK -, NKT -, dendritische, und T - Zellen im Rahmen von Inflammationen produziert (Moro et al., 2016, Kudo et al., 2016, Bi et al., 2017, Maazi et al., 2018), IL-27 wird vor allem durch dendritische Zellen sezerniert (McHedlidze et al., 2016). Ein weiteres suppressives Zytokin ist IL-10, welches vor allem von regulatorischen T - Zellen produziert wird und anti - inflammatorische Eigenschaften besitzt. Es bindet an ein Tetramer aus 2 IL10R α und 2 IL10R β Untereinheiten und vermittelt über die STAT3 und PI3K Signalwege eine Hemmung der ILC2 (Morita et al., 2015, Rigas et al., 2017, Ogasawara et al., 2018). Auch TGF- β hemmt ILC2, indem es nach Rezeptorbindung (Tetramer aus TGF- β R1 und 2) vor allem die

Smad2 und Smad3 Signalwege aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der IL-5 und IL-13 Produktion durch ILC2 (Rigas et al., 2017, Budi et al., 2017).

ILC2s reagieren auch auf die Anwesenheit von Lipidmediatoren, also den Metaboliten der Arachidonsäure, wie Leukotriene oder Prostaglandine, die durch Lipo- und Cyclooxygenasen gebildet werden. Dabei wurde gezeigt, dass LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄ und PGD₂ positive Regulatoren sind (Doherty et al., 2013, von Moltke et al., 2017, Lund et al., 2017, Salimi et al., 2017, Barnig et al., 2013, Tait Wojno et al., 2015), wohingegen LXA₄, PGE₂ und PGI₂ (Zhou et al., 2018, Zhou et al., 2016, Barnig et al., 2013) negative Regulatoren der ILC2 - Aktivität sind. ILC2 stimulierende Lipidmediatoren wirken über gesteigerte intrazelluläre Calcium - Spiegel, wohingegen die Hemmenden über die Aktivierung der Adenylatcyclase und den cAMP / PKA Signalweg wirken.

Bemerkenswert ist auch die Fähigkeit von ILC2 auf Neuropeptide von peripheren Nervenzellen zu reagieren, und somit sind ILC2 auch im Interessenfokus des Feldes der "Neuro - Immun - Interaktion", welches in den letzten Jahren intensiv erforscht wurde und zahlreiche zuvor unbekannte Wechselwirkungen aufzeigte. Zu diesen Neuropeptiden gehört Neuromedin U (NmU), welches ubiquitär verteilt im peripheren und zentralen Nervensystem zu finden ist (Brighton et al., 2004). ILC2s exprimieren den NmUR1, und über die Aktivierung der MAPK und Calcium - Influx kommt es zur Vermittlung einer ILC2 Proliferation und Produktion von IL-5, IL-9, IL-13 und AREG (Klose et al., 2017, Wallrapp et al., 2017, Cardoso et al., 2017). Auch "calcitonin gene related peptide" (CGRP) kann in Kombination mit anderen Zytokinen die ILC2 - Produktion von IL-5 und IL-6 steigern (Sui et al., 2018). CGRP wird in peripheren und zentralen Neuronen exprimiert, darüber hinaus aber auch von pulmonalen neuroendokrinen Zellen (Walker et al., 2010, Sui et al., 2018). Ein weiteres Neuropeptid ist das "vasoactive intestinal peptide" (VIP), welches von Neuronen des Darms und Pankreas sowie in Teilen des Gehirns exprimiert wird und zu den Sekretin - Neuropeptiden gehört (Dickson and Finlayson, 2009). ILC2 exprimieren einen der VIP - Rezeptoren: den VPAC2, und durch VIP wird ihre IL-5 Produktion unter IL-7 - Costimulus induziert. Interessant ist auch der Zusammenhang von VIP (welches in die Kontrolle zirkadianer Rhythmen eingebaut ist) mit der zirkadianen Veränderung von Blut - Eosinophilen und der Typ 2 Zytokin - Expression von ILC2 (Nussbaum et al., 2013). Des Weiteren können ILC2 auch auf die Neurotransmitter des Sympathikus (Katecholamine wie Nor - / Epinephrin und Dopamin) und Parasympathikus (Acetylcholin) reagieren. So erhöht der Sympathikus direkt (aber auch indirekt nach Kälteexposition) die IL-33 Level und damit die ILC2 im Fettgewebe (Ding et al., 2016) und ILC2

exprimieren den $\beta 2$ adrenergen - Rezeptor ($\beta 2AR$), welcher hemmende Effekte auf die ILC2 vermittelt (Moriyama et al., 2018). Der Parasympathikus hemmt die Typ 2 Zytokin Produktion durch ILC2 über den von ILC2 exprimierten $\alpha 7$ - nikotinergen Acetylcholin - Rezeptor ($\alpha 7nAChR$), welcher GATA3 und NF- κB hemmt.

Auch Sexualhormone also Androgene und Östrogene regulieren die Entwicklung und Funktion von Immunzellen, so auch von ILC2 (Trigunaita et al., 2015, Kovats, 2015). Endogene Androgene inhibieren die Differenzierung von ILC2s (Laffont et al., 2017, Kadel et al., 2018), sowie deren Zytokin - Produktion (Cephus et al., 2017). Östrogene hingegen scheinen lediglich die uterinen ILC2 zu regulieren, und haben dabei einen positiven Effekt auf die Anzahl an ILC2 im Uterus (Bartemes et al., 2018).

ILC2 besitzen weiterhin die Fähigkeit auf diverse über die Nahrung aufgenommene Stoffe zu reagieren. So kann die bioaktive Form von Vitamin A (Retinsäure), in Menschen die Typ 2 Zytokin Produktion von stimulierten ILC2 induzieren (Ruiter et al., 2015), in Mäusen vermittelt jedoch ein Fehlen von Retinsäure die ILC2 Proliferation und deren Zytokin Produktion (Spencer et al., 2014, Seehus et al., 2017). Es lassen sich also Spezies - spezifische Effekte finden. Aktives Vitamin D ($1,25D_3$) hemmt die Zytokin Produktion von ILC2 (Ruiter et al., 2015). Auch "small chain fatty acids" (SCFA), wie beispielsweise Butyrat, was Endprodukte von Nahrungsfasern im Rahmen der Fermentation, durch anaerobe Bakterien, sind, werden durch ILC2 registriert Thio und Kollegen konnten zeigen, dass Butyrat die ILC2 Zytokin Produktion, sowie die Proliferation und GATA3 - Expression hemmt (Thio et al., 2018) und so negativ im Rahmen der Typ 2 Entzündung eingreift.

Wie schon erwähnt reagieren ILC im Allgemeinen, und somit auch ILC2 vorwiegend auf lösliche Mediatoren wie Zytokine. Nichtsdestotrotz besitzen sie auch Zell - Zell - Kontakte und Interaktionen in ihrem lokalen Umfeld. Dazu gehören die Interaktion zwischen ICOSL und ICOS, welche beide auf ILC2 aber auch auf DCs der Lunge exprimiert sind (Kamachi et al., 2015). Die Signalgebung über diese Interaktion vermittelt, via der Aktivierung von STAT5 und dem anti - apoptotischen Bcl-2, das Überleben der Zellen (Maazi et al., 2015). Die Typ 2 Zytokin Produktion durch ILC2 wird stark durch die Wechselwirkung von Nkp30 (NCR3, CD337), welche auf ILC2 zu finden ist, und als aktivierender NK - Zell - Rezeptor bekannt ist, mit dem Liganden B7 - H6 stimuliert (Salimi et al., 2016). Diese Nkp30 - B7 - H6 - Wechselwirkung scheint auch im Rahmen der atopischen Dermatitis (Salimi et al., 2016) und akuten Leukämien (Trabanelli et al., 2017) von Bedeutung zu sein. Ein weiteres Beispiel der Zell - Zell Kontakte von ILC2 ist die Wechselwirkung von KLRG1

und E-Cadherin. KLRG1 ist ein Reifungsmarker von ILC2 und signalisiert nach Bindung mit E-Cadherin, einem Zell - Adhäsionsmolekül, die Hemmung von GATA3 und so die Hemmung der Typ 2 Zytokin Produktion. Diese Wechselwirkung ist ebenfalls von Bedeutung, wenn bei der atopischen Dermatitis die Cadherine der Keratinozyten, herunterreguliert werden und eine verstärkte Typ 2 Inflammation entsteht (Salimi et al., 2013). Die fortführende Erforschung dieses komplexen Netzwerks von erregenden und hemmenden Interaktionen ist relevant um deren Wechselwirkungen sowie Regulation vollständig zu verstehen, und in Zukunft eventuell dessen Beeinflussung zu ermöglichen, um so therapeutische Strategien abzuleiten.

Reaktion der ILC2 auf Signale

Nachdem dargelegt wurde welche Wirkung verschieden Moleküle auf ILC2 und ihre intrazellulären Prozesse haben, gilt es nun darzustellen, welche Signalstoffe als Reaktion darauf produziert werden, und wie diese wirken.

Die im Rahmen ihrer Aktivierung von ILC2 produzierten Moleküle wurden teilweise schon erwähnt, zusammenfassend ist hervorzuheben, dass die von ILC2 angestoßenen Reaktion vor allem durch lösliche Faktoren vermittelt werden, was der Lokalisation der ILC2 geschuldet ist. ILC2 sind stark in die Struktur von Geweben eingebettet, und ihre Signalleitung benötigt schnell diffusible Stoffe, wohingegen Zell - Zell - Kontakte, wie sie in lymphatischen Organen häufiger vorkommen, eher nicht zielführend sind. Die ILC2 Effektormoleküle lassen sich zusammenfassen als Zytokine (z. B. IL-5, IL-9, IL-13, teilweise IL-4), Wachstumsfaktoren (z. B. Amphiregulin), Proteine (z. B. Methionin - Enkephalin = Met-Enk) und Oberflächenrezeptoren (z. B. ICOS und MHC-II).

Zu den Zytokinen gehören vor allem die klassischen Typ 2 Zytokine: IL-5, IL-9 und IL-13 (Moro et al., 2010, Neill et al., 2010, Wilhelm et al., 2011). Wie erwähnt sind dies sehr ähnliche Effektormoleküle, wie diejenigen, welche von Th2 - Zellen produziert werden. Diese Ähnlichkeit, sowie die Zugehörigkeit zu angeborener oder adaptiver Immunität, lässt sich in Form einer spatio - temporalen Arbeitsteilung der Zellen interpretieren. Früh im Verlauf der Erkrankung reagieren schnell aktivierbare und an mukosalen Grenzflächen gelegene ILC2s während im Verlauf die T - Zellen, welche in sekundär lymphatischen Organen aktiviert werden und dann proliferieren, nach einigen Tagen hinzutreten und die Infektion zu einem späteren Zeitpunkt mit ähnlichen Mechanismen bekämpfen (Klose and Artis, 2016). Unter definierten Bedingungen können ILC2 auch IL-4 produzieren (Pelly et al., 2016). IL-9 ist hervorzuheben, denn im Rahmen ihrer Aktivierung können ILC2 dies

selber produzieren, und so in einem autokrinen Feedback - Loop auf sich selbst wirken (Mohapatra et al., 2016).

Neben diesen klassischen Typ 2 Zytokinen besitzen ILC2, wie erst kürzlich entdeckt, die Fähigkeit besondere Moleküle zu sezernieren. So produzieren ILC2 nach DSS - Colitis und Influenza Infektion als Antwort auf IL-33, das EGF - ähnliche Amphiregulin, welches die Reparatur des beschädigten Gewebes unterstützt (Monticelli et al., 2011, Monticelli et al., 2015).

Eine weitere Besonderheit ist die Sekretion von Methionin - Enkephalin (Met-Enk) durch ILC2 im Fettgewebe. Diese werden dort durch hohe Spiegel von IL-33 stimuliert und proliferieren. Das produzierte Met-Enk bewirkt das sogenannte "beiging" der Adipozyten. Dies beschreibt Veränderungen im Fettgewebe und die dortige Umwandlung von weißen Adipozyten zu braunen Adipozyten, welche durch die Entkopplung der Atmungskette Energie in Wärme umwandeln können (Brestoff et al., 2015, Brestoff and Artis, 2015).

Kommen wir zu den Oberflächenmolekülen, hier ist das costimulatorische Molekül ICOS (induzierbarer T - Zell Costimulator) zu erwähnen, was einer der wenigen Rezeptoren auf ILC2 ist, und im Rahmen der Aktivierung heraufreguliert wird. ICOS, als auch sein Ligand ICOSL sind beide auf ILC2 exprimiert, ihre Interaktion vermittelt Überleben und Proliferation der ILC2. So könnte diese Wechselwirkung eine Rolle in einer sich selbst amplifizierenden Kettenreaktion sein (Maazi et al., 2015, Paclik et al., 2015).

Ein weitere Oberflächenmolekül ist der Haupt - Gewebeverträglichkeits - Komplex II, also MHC-II. Mit dessen Hilfe antigene Peptide anderen Zellen des Immunsystems präsentiert werden können. Hier ist es nötig die ILC2 noch einmal im Kontext der Typ 2 Immunantwort zu betrachten, und nachträglich zu erwähnen, dass ILC2 regulatorischen Einfluss auf Th2 - Zellen besitzen. ILC2 exprimieren MHC-II - Moleküle, sowie die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie ICOS (Neill et al., 2010, Oliphant et al., 2014). Mit diesen interagieren sie mit dem TCR von Th2 - Zellen und propagieren durch wechselseitige Stimulation Typ 2 Immunantworten (Mirchandani et al., 2014, Oliphant et al., 2014). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das IL-13 von ILC2 die Migration von CCR7⁺ DCs zu drainierenden Lymphknoten stimuliert, wo Diese zusätzliche Th2 - Zellen prägen (Halim et al., 2014). Obwohl die primären Zytokine der ILC2 IL-5 und IL-13 sind, konnte gezeigt werden, dass sie auch IL-4 produzieren, und so direkt Th2 - Zell zu ihrer Polarisation führen (Pelly et al., 2016).

Auch berichtet wurde, dass ILC2 die Antikörper Produktion durch B - Zellen verstärken können (Magri et al., 2014).

Schlussendlich muss natürlich auch erwähnt werden, dass ILC2 im Rahmen von Allergien und der Gewebeumwandlung im Sinne einer Fibrose entscheidende Rollen spielen, was jedoch außerhalb des Fokus dieser Studie liegt (Klose and Artis, 2016).

ILC2 im Kontext der anti - Helminth - Immunantwort

Nun gilt es noch einmal hervorzuheben, welche von den ILC2 vermittelten Effektorfunktionen für die Beseitigung der Helminth - Infektion von entscheidender Bedeutung sind.

Klar ist, dass ILC2 eine essentielle Rolle in der Abwehr einer solchen Wurminfektion spielen. So kann auch in Abwesenheit von T - Zellen eine suffiziente Typ 2 Immunantwort (dann vermutlich vermittelt durch ILC2) induziert werden (Fallon et al., 2006, Fort et al., 2001). Insbesondere die Rolle der ILC2 im Rahmen der *N. b.* Infektion ist bereits intensiv erforscht (Hoyler et al., 2012, Moro et al., 2010, Neill et al., 2010).

Das von den ILC2 produzierte IL-13 wirkt auf die, Tuft - Zellen, welche im Rahmen der Infektion für IL-25 zuständig sind, und bewirkt eine Tuft - Zell - Hyperplasie (von Moltke et al., 2016, Howitt et al., 2016, Gerbe et al., 2016). Dies wiederum bewirkt, dass die nun vermehrt vorliegenden Tuft - Zellen vermehrt auf die Anwesenheit der Helminthen reagieren können, um so in einer positiven Feedback - Schlaufe, die ILC2 - Aktivierung potenzieren zu können. Diese Amplifizierung geschieht auch über einen autokrinen Feedback der ILC2, über IL-9, auf sich selbst (Wilhelm et al., 2011).

Das von den ILC2 produzierte IL-5 stimuliert Eosinophile, und ist wichtig für Ihre Funktionalität. Darüber hinaus werden Eosinophile vermehrt durch Eotaxin angelockt, was nach IL-13 Stimulation vermehrt sezerniert wird (Artis and Spits, 2015). Eosinophile bekämpfen die Helminthen auf verschiedene Wege. So sezernieren sie die in Ihren Granula gespeicherten, für Parasiten zytotoxische, Proteine, beispielsweise MBP1 ("major basic protein 1") oder ECP ("eosinophil cationic protein") (Shamri et al., 2011, Ravin and Loy, 2016). Diese Proteine werden beispielsweise im Rahmen der ADCC ("antibody dependent cellular cytotoxicity") freigesetzt, bei welcher die Eosinophilen durch Antikörper markierte Parasiten erkennen und attackieren (Gentil et al., 2013). Ähnliche Mechanismen existieren auch für durch das Komplementsystem markierte Parasiten (Klion and Nutman, 2004). Des Weiteren besitzen Eosinophile gegen Parasiten gerichtete phagozytische Funktionen (Shamri et al., 2011), und können auch in die adaptive Immunität eingreifen, indem sie Antigene prozessieren und dann via MHC-II - Komplexen den T - Zellen zur Initiierung einer adaptiven Immunantwort präsentieren

können (Akuthota et al., 2008, Spencer and Weller, 2010, Jacobsen et al., 2007) oder indem sie durch Interaktion mit B - Zellen humorale Antworten initiieren.

Zur Ausscheidung des Wurmes induzieren ILC2 eine sogenannte “weep and sweep“ (“Nässen und Wischen“) Reaktion, dies wird durch ihre IL-13 Sekretion vermittelt. IL-13 verursacht eine Kontraktion von glatten Muskelzellen, dies bewirkt eine Motilitätssteigerung im Darm und durch propulsive Bewegungen können so die Würmer aus dem Darm geschaffen werden. Unterstützt wird dies durch vermehrte Schleimproduktion (Mucus), durch Goblet - Zellen, welche ebenfalls durch IL-13 angeregt wird. IL-13 führt darüber hinaus auch zu einer Hyperplasie der Goblet - Zellen, was die vermehrte Mucusproduktion weiterhin verstärkt. Ebenfalls wichtig zu erwähnen ist, dass IL-13 auch für die Induktion alternativ aktivierter Makrophagen (M2) sorgt, welche die Wurm - und Gewebetrümmer im Rahmen der Infektion abräumen können (Moro et al., 2010, Neill et al., 2010).

Die Infektion durch Helminthen verursacht erhebliche Gewebeschäden, nicht nur im Rahmen der Gewebepenetration bei deren Wanderungen durch beispielsweise Lunge oder Haut, sondern auch durch das Saugen von Blut der erwachsenen Würmer aus dem Dünndarm. ILC2 sind im Verlauf der Infektion auch für die Gewebereparatur mitverantwortlich. So produzieren sie Amphiregulin (AREG), welches dem EGF (“epidermal growth factor“) sehr ähnlich ist und die Reparatur von Epithelzellen unterstützt (Zaiss et al., 2006).

Inflammatorische ILC2

Bisher wurde davon ausgegangen, dass ILC2 geweberesidente Zellen sind, welche in peripheren Geweben verbleiben, wo die lokale und gewebsspezifische Mikroumgebung für Ihre Funktionalität und ihren Phänotyp entscheidend ist (Gasteiger et al., 2015, Moro et al., 2016).

Im Jahre 2015 wurde durch Huang und Kollegen ein Artikel publiziert, welcher eine neue Population von ILC2s beschrieb, welche die Fähigkeit zur Wanderung zwischen einzelnen Geweben aufzeigten, und früh im Rahmen einer Wurminfektion in den mesenterischen Lymphknoten sowie der Lunge zu finden waren. Des Weiteren führte auch die intraperitoneale Applikation von IL-25 zur Entwicklung von diesen besonderen ILC2, welche Typ 2 Zytokine und darüber hinaus noch IL-17 produzieren können, für die *N. b.* Bekämpfung essentiell sind, und von ihrem Entdecker Huang auf den Namen “inflammatorische“ ILC2 (iILC2) getauft wurden. Diese ILC2 exprimieren viel KLRG1 und

IL17RB (Il25R), jedoch niedrige Level an ST2 (Huang et al., 2015). Die Entwicklung dieser iILC2 ist abhängig von Notch Signalgebung und ROR γ t - Expression (Zhang et al., 2017). Im Gegensatz zu (natürlichen / homöostatischen) ILC2s welche auf IL-33 reagieren und gewebständig sind (Gasteiger et al., 2015, Moro et al., 2016), sind diese auf IL-25 reagierenden iILC2 abstammend von intestinalen ILC2 (aus der Lamina propria) und werden auch durch eine Helminth - Infektion induziert (Huang et al., 2015, Neill et al., 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese iILC2 als Reaktion auf eine IL-33 - Gabe nicht proliferieren (Huang et al., 2015) und durch die nasale Applikation von IL-25 nicht entstehen, was darauf schließen lässt, dass in der Lunge keine iILC2 Vorläufer zu finden sind (Huang et al., 2018). Folgend ihrer Induktion gelangen diese IL-25 - responsiven iILC2 in den Blutfluss und migrieren zu peripheren Geweben, an welchen sie Effektorfunktionen ausüben und helfen den Körper und betroffenen Gewebe im Rahmen der Infektion zu beschützen (Huang et al., 2015). Diese Migration findet zunächst über lymphatische Gewebe und dann das Blut statt, und ist dabei abhängig von Sphingosin 1 - Phosphat (S1P) vermittelter Chemotaxis, wobei der S1P - Rezeptor erst in iILC2 exprimiert wird, nicht aber in natürlichen ILC2. Schlussendlich akkumulieren die iILC2 dann in den mesenterischen Lymphknoten, der Milz, Lunge und Leber (Huang et al., 2018). Bemerkenswert ist, dass diese iILC2 Expansion und Migration große Ähnlichkeit zur antigenvermittelten Proliferation und Migration adaptiver Lymphozyten zu den entsprechenden Effektororganen, besitzt, und indiziert, dass ILCs die adaptive Immunität komplettieren indem sie sowohl lokale als auch entfernte Gewebsverteidigung im Rahmen einer Infektion vermitteln. Fraglich bleibt jedoch, ob es sich bei diesen beiden ILC2 - Phänotypen um zwei verschiedene Unterklassen oder um verschiedene Aktivierungsstadien desselben plastischen Zelltyps handelt. Hinweisend dafür könnte sein, dass iILC2 eine gewisse Plastizität besitzen, und sich in den Zielgeweben dann zu typischen nILC2 differenzieren können. So wurde gezeigt, dass kurz nach der Wurmbeseitigung im Rahmen einer *N. b.* Infektion die iILC2 verschwinden, und zum Pool der nILC2 in der Lunge beitragen oder zurück in den Dünndarm wandern (mit Hilfe von Integrin $\alpha 4\beta 7$ und dem Gut - Homing - Rezeptor CCR9) (Huang et al., 2018). Währenddessen erlangen sie die Fähigkeit auf IL-33 zu reagieren, verlieren jedoch mit der Herunterregulation des Il17RB die Fähigkeit auf IL-25 zu reagieren (Huang et al., 2015). Inflammatorische ILC2 sind also als eine transiente Zellpopulation anzusehen, die eventuell nur im Rahmen der Infektion von Bedeutung ist, dies wird auch dadurch unterstrichen, dass sie mehr AREG exprimieren. Während der Infektion entsteht ein

intensiverer Gewebeschaden und der Bedarf anschließender Reparaturen ist gesteigert. Auch wichtig zu erwähnen ist, dass iILC2 ROR γ t in niedrigem Maßstab exprimieren und die Fähigkeit besitzen IL-17 gegen Pilz - Infektionen zu sezernieren (Huang et al., 2015). Im Jahre 2020 veröffentlichten Flamar und Klose einen weiteren Artikel über iILC2, in welchem sie zeigten, dass iILC2 auch durch eine IL-33 - Gabe induziert werden können (Flamar et al., 2020) (Weiter differenzierte iILC2 selber sind anschließend jedoch nicht mehr durch IL-33 stimulierbar (Huang et al., 2015)). Diese Induktion geschieht über Aktivierung des Enzyms Tph1 (Tryptophan Hydroxylase 1), das durchsatzlimitierende Enzym der Serotonin Biosynthese. Tph1 wird auch im Rahmen einer *N. b.* Infektion herauf reguliert (in einer IL-33 abhängige Weise), und ohne Tph1 resultiert eine insuffiziente Typ 2 Immunantwort der ILC2 gegen die Helminthen, und erhöhte Empfänglichkeit gegenüber der Infektion. Durch RNS - Sequenzierung konnte in den Tph1 - defizienten ILC2 ein abweichendes Expressionsmuster entdeckt werden, so exprimierten sie weniger ICOS aber auch weniger ERMIN und LEGUMAIN. Vieles Weitere über diese erst kürzlich entdeckten iILC2 ist jedoch noch unbekannt, so ist beispielsweise offen nach welcher exakten gewebespezifischen Reihenfolge die iILC2, nach ihrer Aktivierung im Darm, sich im Körper verteilen, und welche spezifischen Effektorfunktionen sie ausüben. Auch bisher nicht ausreichend geklärt ist, welche intrazellulären Moleküle und Transkriptionsfaktoren für die Entstehung der iILC2 relevant und notwendig sind.

d. Gene / Konditionen der Studie und Ziele

i. Wildlinge

Klassische Labormäuse, wie sie beispielsweise an der Charité durch die FEM (Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin) gehalten werden, und in den übrigen Versuchen dieser Studie verwendet wurden, besitzen in der Regel ein (teilweise) definiertes Mikrobiom. Das Mikrobiom ist ein großes, aus zahlreichen Bakterien, Pilzen, Protozoen, Viren und weiteren Mikroorganismen bestehendes Ökosystem, welches die Oberflächen des Körpers bevölkert (Nobs and Elinav, 2019). Das künstliche Mikrobiom der Labormäuse wird unter den speziellen Bedingungen einer Abschirmung der Tiere von der Außenwelt, darüber hinaus regelmäßigen Kontrollen auf unerwünschte Keime und entsprechenden Maßnahmen bei Nachweis dieser Keime, sowie dem Embryotransfer neuer Mauslinien oder aber der Quarantäne vor Transfer in die isolierte Einheit, aufrechterhalten. Für die moderne biologische Forschung sind diese etablierten

Labormäuse essentielle Grundlage und unerlässliches Hilfsmittel zum Verständnis basaler physiologischer und pathologischer Mechanismen (Masopust et al., 2017). Dennoch hat sich in den letzten Jahren vermehrt die Theorie verbreitet, und wurde durch experimentell erhobene Daten bekräftigt, dass das in den Labormäusen vorhandene, und vom Leben in der freien Wildbahn (wo der Mensch selbst lebt), abweichende Mikrobiom mit dafür verantwortlich ist, dass wissenschaftliche Ergebnisse in Abhängigkeit der Herkunft der Tiere stark voneinander abweichen können, und nicht selten auch im Mausmodell gesehene Tendenzen und Phänotypen, nicht oder nur in abgewandelter Form auf den Menschen übertragbar sind.

Mit dieser Tatsache beschäftigten sich die Wissenschaftler Rosshart und Rehermann in den letzten Jahren und veröffentlichten zwei wichtige Artikel zum Thema Mikrobiom. Eine zentrale Frage war mitunter warum Labormäuse (mit ihrem SPF ("specific pathogen free") Mikrobiom), häufig nicht in der Lage sind die komplexe menschliche Immunantwort oder aber in der freien Wildbahn auftretende murine sowie humane Erkrankungen genau, in all ihren Facetten wiederzugeben. Ihre Antwort auf diese Frage war ein abweichendes, in den Labormäusen fehlendes Mikrobiom der freien Wildbahn.

Im Jahre 2017 suchten Rosshart und Kollegen nach freien Mäusen, welche genetisch verwandt zu den im Labor häufig verwendeten Mauslinien (z. B. C57BL/6) sind. Nachdem sie diese gefunden hatten analysierten sie deren Mikrobiom und fanden ein dem vom unter SPF Bedingungen vorherrschenden Mikrobiom, völlig anderes Mikrobiom: mit diversen Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen, nicht speziell erwähnt, jedoch potentiell auch Parasiten. Nachdem in den Wildmäusen ileozökal vorhandenes Mikrobiom isoliert wurde, überführten sie das aus diesen Mäusen gewonnene natürliche Referenzmikrobiom in vorhandene Labormäuse. Anschließend stellten sie fest, dass unter den Bedingungen dieses neuen, natürlich Mikrobioms die Mäuse weniger intestinale Inflammation aufwiesen, besser eine Influenzavirus - Infektion überlebten, und auch im Rahmen mutagen - oder inflammation - induzierter kolorektaler Tumorgenese ein besseres Outcome zeigten. Insgesamt wiesen die Labormäuse mit dem Wildmaus - Mikrobiom folglich eine bessere Fitness und Krankheitsresistenz auf und somit zeigten sich die protektiven Effekte eines natürlichen Mikrobioms (Rosshart et al., 2017).

In einem folgenden Artikel aus dem Jahre 2019 gingen Rosshart und Kollegen noch weiter, indem sie per Embryotransfer eine C57BL/6 Maus (und damit die in diesen Tieren gut etablierten Möglichkeiten zur Genmanipulation) in eine, in freier Wildbahn gefangene Maus (mit wildem Mikrobiom) transferierten. Durch diesen Ansatz gelang es ihnen eine

Kolonie mit genetischer Grundlage der BL/6 Maus, jedoch durch Übertragung von Leihmutter auf Kind erhaltenes, natürliches (bzw. wildes) Mikrobiom zu erhalten, die Mäuse taufte sie auf den Namen Wildlinge. In diesen Mäusen charakterisierten sie das Immunsystem diverser Organe. Darüber hinaus zeigten sie jedoch, dass die Wildlinge diverse menschliche Immunphänomene besser widerspiegeln können. Dazu gehörten einmal die Behandlung mit dem CD28 - Super - Agonist (CD28SA). Dieser Wirkstoff hatte in Labormäusen positive Effekte im Rahmen der Behandlung von autoimmunen oder inflammatorischen Erkrankungen gezeigt. Bei der Anwendung am Menschen kam es jedoch zu lebensbedrohlicher T - Zell - Aktivierung und Zytokinstürmen. Diese in Menschen gesehene Dysregulation fand sich auch in den Wildlingen. Ein weiteres Beispiel war die Therapie mit einer anti - TNF α Strategie, welche in Labormäusen im Rahmen eines septischen Schocks therapeutischen Nutzen hatte, in Menschen und interessanterweise auch in den Wildlingen jedoch das Ziel verfehlte.

Durch diesen Ansatz gelang es ihnen folglich zu zeigen, dass durch die Wildlinge die menschliche Immunantwort, welche durch eine lange Coentwicklung mit der umgebenden mikrobiellen Welt und dem Erfordernis darin zu überleben, entstanden war, zumindest in mancher Hinsicht, besser erklärt und wiedergegeben werden kann als durch Labormäuse, die in einer komplett bzw. definiert sterilen Umgebung in etablierten Mäuseräumen leben (Rosshart et al., 2019).

Aus der Literatur, beispielsweise den Artikeln von Huang und Kollegen aus dem Jahre 2015 sowie 2018, oder dem Artikel von Flamar und Klose aus dem Jahre 2020 (Huang et al., 2015, Huang et al., 2018, Flamar et al., 2020), wissen wir, dass im Rahmen einer Helminth - Infektion, beispielsweise durch *N. b.*, in Organen wie der Lunge oder aber in den MLN eine Subpopulation von ILC2, die iILC2 erscheinen, welche zwar wie nILC2 KLRG1 stark exprimieren, dafür aber ST2 und CD25 herunterregulieren. In "Steady State" - Labormäusen (damit sind die für diese Studie verwendeten C57BL/6 Mäuse gemeint), ohne jegliche Infektion, lassen sich in den erwähnten Organen, aber auch im Fettgewebe iILC2 so gut wie gar nicht nachweisen. Zu klären galt es nun, basierend auf dem Wissen, dass die Wildlinge das natürlichere Mikrobiom, welches die Bedingungen der freien Umwelt besser darstellt, und vergleichsweise besser auch humane Bedingungen simulieren kann: ob in den Wildlingen, im Vergleich zu den normalen Labormäusen die Population von iILC2, nILC2 bzw. aber auch die Eosinophilen in ausgewählten ILC2 haltigen Organen (wie Fettgewebe oder MLN) in anderer Frequenz und mit anderen Eigenschaften vorkommen. All Dies hatte das Ziel, abschätzen zu

können, wie sich die Population an ILC2, unter Bedingungen der freien Wildbahn, präsentiert.

ii. Lgmn

Das Protein LEGUMAIN wird durch das Gen *Lgmn* (ENSMUSG00000021190), welches auf Chromosom 12 liegt, kodiert (Yates et al., 2020). Synonym für das Protein ist AEP, was für Asparaginyl Endopeptidase steht (gehört zur Gruppe der Cystein - Peptidasen, und ein weiteres Synonym ist Cystein - Protease 1) (Hoffmann et al., 2008), und was die Funktion beschreibt: es handelt sich um ein Protein spaltendes Enzym, welches eine strikte Spezifität für die hydrolytische Spaltung von Asparaginyl - Bindungen hat (Zhao et al., 2014).

Bisher bekannt über LEGUMAIN ist, dass es wichtig für die physiologische Funktion der Niere ist: in den proximalen Nierentubuli ist es für die lysosomale Degradation von filtrierten Proteinen von Bedeutung und verhindert so, dass die Nierentubuli durch nicht abgebautes Eiweiß verstopfen (Miller et al., 2011, Morita et al., 2007, Chen et al., 1998). Folglich sind beobachtete Phänotypen häufig renaler Genese: Abnormale Morphologie des Nieren - Interstitiums und des äußeren Markes, abnormale Nieren - Physiologie, Akkumulation von großen Lysosomen in der Niere, Albuminämie, (renale) Anämie, (renale) Osteoporose, Niereninsuffizienz (verringerte glomeruläre Filtrationsrate), Hydronephrose, Nierenatrophie sowie Nierenzysten (Yates et al., 2020).

Anzunehmen sind jedoch auch Funktionen in anderen Geweben, Dies lässt sich daran erahnen, da neben der Niere auch LEGUMAIN in anderen Geweben hoch exprimiert ist, darunter: Nebennieren, braunes Fettgewebe, Herz, Leber, Milz, Haut sowie in Teilen des Nervensystems und der Geschlechtsorgane (Yates et al., 2020) (Zeeuwen et al., 2004). Und auch in der Invasion und Metastasierung von Tumoren scheint eine LEGUMAIN - Überexpression eine Bedeutung zu besitzen (Liu et al., 2003).

LEGUMAIN ist in der extrazellulären Matrix, sowie in Lysosomen und Endosomen, als auch der perinukleären Region des Zytoplasmas zu finden (Yates et al., 2020) (Shirahama-Noda et al., 2003).

Für diese Studie von Interesse waren jedoch die berichteten Funktionen und Lokalisationen in Zusammenhang mit dem Immunsystem. LEGUMAIN ist in B - Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und scheint dort in Zusammenhang mit der endo - / lysosomalen Degradierung von Proteinen und deren anschließender Expression an MHC-II - Molekülen von Bedeutung zu sein (Manoury et

al., 2002, Manoury et al., 2003, Antoniou et al., 2000, Shirahama-Noda et al., 2003). So listet die Website ensembl.org bereits einige immunologische Phänotypen, wie abnormale Funktion des adaptiven Immunsystems oder abnormale Morphe von Makrophagen (Yates et al., 2020).

Für unsere Studie wurde *Lgmn* interessant, nachdem durch die Analyse der Sequenzierungs - Daten aus dem Artikel von Flamar und Klose aus dem Jahre 2020 (Flamar et al., 2020) ersichtlich war, dass *Lgmn* auch in ILC2 exprimiert wird. Im Gegensatz zu *Ernm*, welches im selben Datensatz als interessant erfunden wurde, zeigte sich für *Lgmn* jedoch, dass es, neben einer hohen Expression in inflammatorischen ILC2 aus einer *N. b.* Infektion bereits im "Steady State" in den naiven ILC2 (isoliert aus der Lamina propria ohne Stimulus) und den natürlichen ILC2 (isoliert am 7. Tage der *N. b.* Infektion) hoch exprimiert war. Des Weiteren zeigte sich auch, dass in den Tryptophan Hydroxylase 1 Knock - Out Mäusen *Lgmn* deutlich weniger exprimiert war. Da die Studie von Flamar und Klose zeigte, dass eine Defizienz in der Tryptophan Hydroxylase 1 zu einer insuffizienten Typ 2 Immunantwort durch ILC2 führt, und *Lgmn* in diesen Knock - Outs weniger exprimiert wird, war *Lgmn* ein Kandidat für ein Gen, welches "downstream" der Tryptophan Hydroxylase 1 in der ILC2 Aktivität von Bedeutung ist.

Betrachtet man Dies nun im Kontext der bereits publizierten Ergebnisse zu LEGUMAIN, welches einen Zusammenhang mit der Protein - Degradation in Zellen und der MHC-II abhängigen Antigen - Präsentation hat, und bedenkt dabei, dass auch ILC2 die Fähigkeit besitzen MHC-II zu exprimieren, um regulatorisch auf adaptive Immunzellen zu wirken (Neill et al., 2010, Oliphant et al., 2014), so wird LEGUMAIN zu einem interessanten Protein im Rahmen der Erforschung der ILC2 Physiologie.

Um die Funktion des *Lgmn* - Genes in ILC2 genauer zu untersuchen, wurde die C57BL/6N-*Lgmn*^{tm1a(NCOM)Mfgc>/Tcp} Maus vom CMMR (Canadian Mouse Mutant Repository) bestellt, bei welcher das Gen durch eine gerichtete Mutation ausgeknockt wurde. Dabei ist das tm1a Allel das originale Knock - Out Allel, welches vom IKMC (international knock - out mouse consortium) in die embryonale Stammzelle eingebracht wurde und stellt ein gezieltes "trap (Fallen) - Allel" da. Bei dieser Maus handelt es sich nicht um einen konditionellen Knock - Out, sondern um ein systemischen "full" - Knock - Out, der alle Körperzellen betrifft.

Für das Gen *Lgmn* wurde versucht in den Knock - Out Mäusen im Sinne eines "loss of function" - Zugangs die Funktion des Genes in den ILC2 zu untersuchen. Hierbei wurden zunächst im "Steady State" Analysen durchgeführt, um zu sehen ob ohne äußeren

Einfluss, Unterschiede in den Zellpopulationen bestehen. Nach diesen Screening Experimenten wollten wir sehen, ob *in vivo* im Rahmen einer *N. b.* Infektion eine defiziente Typ 2 Immunantwort auf den Wurm zu entdecken ist.

iii. Kcnab2

Das Gen *Kcnab2* (ENSMUSG00000028931) auf Chromosom 4 der Maus, kodiert für die Untereinheit Beta 2 ($\beta 2$) des spannungsgesteuerten Kalium - Kanals. Synonyme für das Gen sind *F5*, *I2rf5*, *Ckbeta2* oder *Kcnb3*, und für das Protein sind es Neuroimmun Protein F5, kv-beta-2 oder K (+) Kanal Untereinheit beta-2 (Yates et al., 2020, The UniProt Consortium., 2019). Das Gen ist hoch exprimiert im Gehirn, Auge, im Thymus, in der Milz, des Weiteren wenn auch auf niedrigerem Level im Herzmuskel, Skelettmuskel, den Nieren und in T - Lymphozyten (Fink et al., 1996, Cohen et al., 1992, McCormack et al., 2002, Vacher et al., 2011), (Yates et al., 2020).

Das zelluläre Kompartiment ist das Zytoplasma sowie die Zellmembran, beispielsweise am Axon von Nerven oder Zellverknüpfungen (The UniProt Consortium., 2019, Yates et al., 2020) darüber hinaus auch die juxta - para - nodalen Regionen der Ranvier'schen Knoten.

Bisher publizierte Studien über die Untereinheit Beta 2 berichten, dass die zytoplasmatisch vorzufindende Untereinheit wichtige Bedeutung für die Modulation der kanalformenden Alpha Untereinheiten, namens KCNA4 und KCNA5, besitzt (Uebele et al., 1996, Fink et al., 1996), so beispielsweise die Expression und den Transport zur Zellmembran positiv reguliert und darüber die Kanalaktivität mitbestimmt. Uebele und Kollegen berichteten weiterhin, dass auch der Schluss von Kalium - Kanälen, über alternative Wege (also ohne deren physikalische Obstruktion) durch die Beta 2 Untereinheit reguliert wird (Uebele et al., 1996). Ein weiterer Kanal dessen Aktivität durch *Kcnab2* beeinflusst wird ist der KCNB2 Kanal, welcher so in seiner Aktivität gesteigert wird (Fink et al., 1996). Des Weiteren spielt die Untereinheit Beta 2 des spannungsgesteuerten Kalium - Kanals in Nerven eine wichtige Rolle: In der Regulation der Nerven - Signalisierung und der Verhinderung von neuronaler Übererregbarkeit (McCormack et al., 2002, Perkowski and Murphy, 2011). Die dafür benötigte Energie bezieht der Kanal über die Oxidation von NADPH, und die damit durchgeführte Reaktion ist eine Aldoketoreduktion (McCormack et al., 2002, Perkowski and Murphy, 2011), in welcher diverse Substrate umgesetzt werden. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die spannungsgesteuerten Kalium - Kanal Untereinheit Beta 2 also eine Rolle im

Kalium - Ionen transport über die Plasmamembran hinweg spielt, somit das Gleichgewichtspotential mitbestimmt, und eine Rolle im Aktionspotential von beispielsweise Neuronen spielt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *Kcnab2* auch in der kardialen Elektrophysiologie von Bedeutung ist (Kilfoil et al., 2019). Das Neuroimmun Gen *I2rf5* scheint in T - Lymphozyten wichtig für Proliferation und Reifung zu sein (Autieri et al., 1995).

In homozygoten Knock - Out Mäusen wurden bereits einige Phänotypen entdeckt. So sind die Mäuse zwar fruchtbar und lebensfähig, und werden nach Mendel'scher Rate geboren, besitzen jedoch eine verkürzte Lebenszeit, mit nur etwa 138 (B6 - Hintergrund) statt 400 Tagen (Connor et al., 2005, McCormack et al., 2002). Darüber hinaus kommt es zu zufälligen epileptischen Anfällen (McCormack et al., 2002) und nach dem Schwimmen, in kaltem Wasser, kommt es zu Tremoren am gesamten Körper (McCormack et al., 2002), was scheinbar auf Unterschiede im Absinken der Körpertemperatur zurückzuführen ist. Des Weiteren weisen die Mäuse kognitive Einschränkungen auf (Perkowski and Murphy, 2011) und ebenfalls beobachtet wurde ein verringertes Körpergewicht, sowie Störungen der Thermoregulation (Connor et al., 2005). Auch wurde in *F5* - transgenen Mäusen ein immunologischer Phänotyp entdeckt. Eine *in vivo* Injektion von antigenen Peptiden führte zur Aktivierung der meisten peripheren CD8⁺ T - Zellen (Pihlgren et al., 1996) und dem Auftreten von apoptoseresistenten doppelt positiven Thymozyten (Tarazona et al., 1998).

Um nun den Bogen zu angeborenen Lymphozyten der Klasse 2 zu spannen, benötigt man den Einblick in online zugängliche Daten von Huang und Kollegen, welcher im Jahre 2015 zum ersten Mal von inflammatorischen ILC2 berichteten (Huang et al., 2015) und im Jahre 2018 weitere Eigenschaften dieser Zellen enthüllten (Huang et al., 2018). Im Artikel aus dem Jahre 2018 ist wurde das Transkriptom von diversen ILC2 - Populationen durch RNS - Sequenzierung untersucht. Unter diesen ILC2 - Populationen waren auch natürliche ILC2 aus der Lunge, intestinale ILC2 (ohne Stimulus also "Steady State"), sowie IL-25 - induzierte iILC2s aus der Lunge und iILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten. Die Daten des von Ihm online öffentlich publizierten Sequenzierens wurden auch von unserer Arbeitsgruppe analysiert (**Abb. 1**). Hier zeigte sich in den inflammatorischen ILC2 im Vergleich zu den natürlichen als auch "Steady State" - ILC2 (nicht aus einer Infektion gewonnen) eine Heraufregulation von *Kcnab2*. Bricht man die Informationen herunter, lässt sich sagen, dass *Kcnab2* eine Rolle in der Regulation von Kalium - Kanälen spielt, und auch im Immunsystem von Bedeutung zu sein scheint, und

des Weiteren in den für uns interessanten Zellen, den iILC2 zu finden ist. Darüber hinaus ist wichtig zu sagen, dass es in den iILC2 im Vergleich zu den nILC2 heraufreguliert wird, also im Rahmen ihrer Aktivierung vermehrt gebildet wird. An dieser Stelle kam uns die Frage nach den Mechanismen der Aktivierung von ILC2. Betrachtet man zum Beispiel das Herz und die darin befindlichen Kardiomyozyten, so wird deutlich was für eine entscheidende Rolle Ionenkanäle in der Zellaktivierung im Rahmen der De- und Repolarisation besitzen (Nerbonne and Kass, 2005). Und auch in anderen Organen, wie dem Gehirn (Vyklícky et al., 2014) spielen die durch Ionenkanäle erzeugten Potentialunterschiede und Ionenströme entscheidende Rollen, um physiologische Prozesse zu regulieren bzw. erst zu ermöglichen.

Wir wollten nun herausfinden, ob *Kcnab2* bzw. das davon kodierte Protein, die spannungsgesteuerten Kalium - Kanal Untereinheit Beta 2, im Rahmen der Aktivierung von inflammatorischen ILC2 aus "Steady State" - ILC2 eine Rolle spielen könnte.

Um dieser Frage näher zu kommen wurde die 57BL/6NCrl-*Kcnab2*^{em1(IMPC)Mbp}/Mmucd Maus, vom MMRRRC (Mutant Mouse Ressource & Research Centers unterstützt durch das NIH) bestellt. Die Maus wurde in Kooperation mit dem IMPC (Internationales Maus Phänotypisierung Konsortium) am UC Davies hergestellt, indem die 2 CRISPR - Leitsequenzen (TCTTGGCTCGAGCGCAACCTTGG und TGCGAACCAGAACCTCAGGACGG) in Verbindung mit dem CAS9 Protein in eine elektroporierte Zygote (mit dem genetischen Hintergrund einer C57BL/6N Maus) injiziert wurden, was zur Deletion eines Exons führte, und schlussendlich zum Verlust des funktionsfähigen Genproduktes. Der Begründer der Linie war Kent Lloyd (D.V.M, Universität von Kalifornien, Davis). Auch hierbei handelte es sich um einen "full" - Knock - Out, also waren sämtliche Zellen der Tiere permanent vom Knock - Out des *Kcnab2* - Genes betroffen.

Zunächst sollte per qPCR, Western Blot und Immunfluoreszenz bestätigt werden, dass der Knock - Out funktioniert hatte, und anschließend dann die ILC2 genauer betrachtet werden. Auch hier einmal im "Steady State" per Durchflusszytometrie, dann unter diversen Bedingungen von *in vitro* Stimulationen und im Rahmen einer Infektion mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis*.

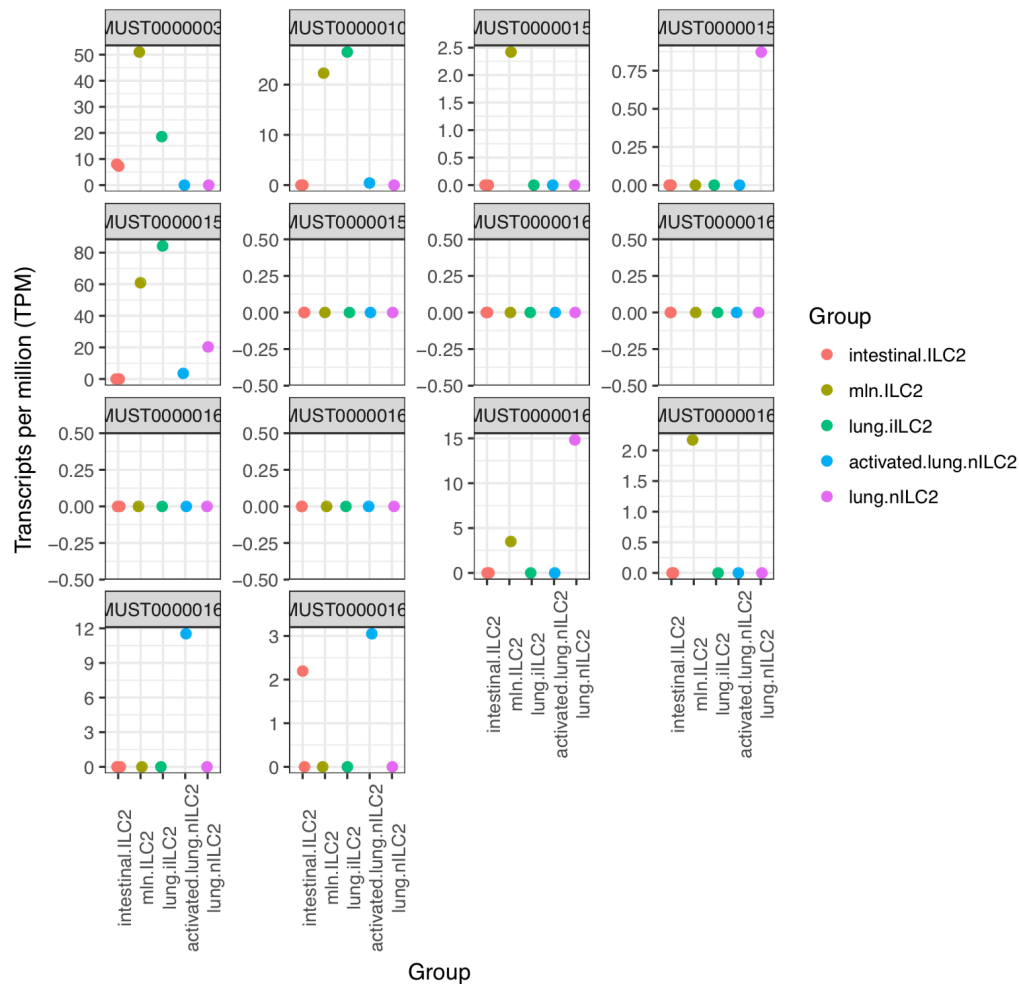


Abbildung 1: Die Transkription von *Kcnab2* wird in iILC2 heraufreguliert. Analyse der Sequenzierungsdaten von Huang et al 2018, es zeigt sich, dass in iILC2 die Transkription einiger *Kcnab2* - Transkripte herauf reguliert ist (hellgrüner Punkt).

iv. *Ermn*

ERMIN ist ein Protein, welches durch das Gen *Ermn* (ENSMUSG00000026830) auf Chromosom 2 der Maus kodiert wird. Alternativ wird es auch als ERM - ähnliches Protein oder JUXTANODIN (JN) bezeichnet (The UniProt Consortium., 2019). Eine hohe Expression von ERMIN findet sich laut der Website ensembl.org im Gehirn (besonders Zerebellum, Kortex, Medulla oblongata sowie Auge und Bulbus olfactorius), sowie im Herzen und Pankreas (Yates et al., 2020).

Betrachtet man das Gehirn genauer, so lässt sich die ERMIN - Expression vorwiegend auf Oligodendrozyten zurückführen (Linnarsson et al., 2020) und scheint hier vor allem in zunehmenden Reifestadien, mit zunehmend differenzierter Myelinscheide exprimiert

zu werden (Brockschnieder et al., 2006). Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des zentralen Nervensystems (Kuhn et al., 2019), mit ihren Ausläufern, Ihrer Eigenschaft Myelin zu produzieren, und sich schalenartig, um Axone herumzulegen, besitzen Sie die Fähigkeit eine Vielzahl von Axonen gleichzeitig zu isolieren, um so eine saltatorische Erregungsleitung zu ermöglichen. Dafür benötigen Oligodendrozyten ein aktives Zytoskelett (Michalski and Kothary, 2015).

Die Websites uniprot.org und ensembl.org geben vor allem das Zytoskelett als wichtigste subzelluläre Lokalisation an, betonen aber weiterhin, dass ERMIN auch im Zellkortex, Zytoplasma und den Filopodien zu finden ist, darüber hinaus auch in der internodalen sowie paranodalen Region der Axone, der Myelinscheide sowie dem neuronalen Zellkörper (The UniProt Consortium., 2019, Yates et al., 2020).

Eine der bisher wichtigsten Studien zu ERMIN wurde durch Brockschnieder und Kollegen im Jahre 2006 veröffentlicht. Hierbei wurde entdeckt, dass ERMIN ein (fast exklusiv) von Oligodendrozyten exprimiertes Zytoskelett - Molekül ist. Es erscheint erst spät im Prozess der Myelinisierung (in gut differenzierten Myelin Basischen Protein (MBP) positiven Zellen), in hoher Konzentration besonders an den sogenannten "ERMIN spikes", was F-Aktin reiche Fortsätze sind, an welche ERMIN gebunden ist (Brockschnieder et al., 2006). Hier also der molekulare Prozess die Bindung an Aktin (Yates et al., 2020). Darüber hinaus ist ERMIN wichtig für die Entstehung und Veränderung von Zellfortsätzen und der Zellmorphologie (Brockschnieder et al., 2006). Zusammengefasst werden die biologischen Prozesse sehr gut von der Website ensembl.org: 1 = Morphogenese der Verzweigungsstruktur, 2 = Aktin - Filament Organisation, 3 = Regulation der Zellform und 4 = Regulation der Organisation von Zellfortsätzen (Yates et al., 2020). Damit wurde gezeigt, dass ERMIN ein wichtiger Marker für myelinisierende Oligodendrozyten ist und ließ vermuten, dass es eine wichtige Rolle in der Rearrangierung des Zytoskelettes spielt, hier vor allem in Oligodendrozyten, denkbar jedoch auch in anderen Zellen, welche ERMIN exprimieren.

Weitere Studien zu ERMIN zeigen, seine Involvierung in Multipler Sklerose (Salek Esfahani et al., 2019) und der Entstehung von Myelinisierungsdefiziten durch einen gestörten Folatmetabolismus bei der Applikation von Inhalationsanästhetika (Zhang et al., 2019) oder Autismus - Spektrum - Störungen (Homs et al., 2016).

An dieser Stelle gilt es die Verbindung von ERMIN zu angeborenen Lymphozyten dazulegen. Um diese Verbindung zu verstehen ist ein genauer Blick in die Ergebnisse der RNS - Sequenzierung von Flamar, Klose und Kollegen, publiziert in Ihrem Immunity

- Artikel aus dem Jahre 2020 (Flamar et al., 2020). Hierbei wurden einmal ILC2 im "Steady State", welche aus der Lamina propria des Dünndarms isoliert wurden, sowie natürliche und inflammatorische ILC2, welche am 7. Tage einer *N. b.* Infektion aus den mesenterischen Lymphknoten isoliert wurden untersucht. Dies wurde einmal in Wildtyp - Mäusen durchgeführt, und verglichen mit den Zellen von Tryptophan Hydroxylase 1 - defizienten Mäusen. Hierbei zeigten sich einige Gene, welche in den Wildtyp - ILC2 hoch exprimiert waren, aber im Gegensatz dazu in den ILC2, welche keine Tryptophan Hydroxylase 1 besaßen, und dadurch schlechter aktiviert wurden und nur eine insuffiziente Immunantwort gegen die Helminthen induzierten, vergleichsweise niedrig exprimiert waren. Insgesamt kann man also vermuten, dass diese Gene potentiell eine Rolle in der Regulierung der ILC2 - Aktivität, "downstream" der Tryptophan Hydroxylase 1 besitzen.

Unter diesen Genen befand sich *Ernm*. *Ernm* war dabei exprimiert (jedoch auf niedrigem Niveau) in den "Steady State" (nicht aus einer Infektion gewonnenen) - ILC2 aus der Lamina propria des Dünndarms. Diese ILC2 besitzen die Fähigkeit zu iILC2 aktiviert zu werden, um dann in die Zirkulation einzutreten. In den inflammatorischen ILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten infizierter Tiere, von welchen man ausgeht, dass Sie aus dem Dünndarm in die drainierenden Lymphbahnen eintreten (per S1P vermittelt) und dann zu den Lymphknoten gelangen, zeigte sich eine hohe *Ernm* - Expression.

Die Frage, welche nun ERMIN mit iILC2 verbindet ist folgende: Wie wird die Bewegung von iILC2 aus dem Darm zu den Lymphknoten bewerkstelligt?

Wenn man von Zellbewegung spricht, meint man in der Regel eine Umorganisation des Aktin - Gerüsts der Zellen, also dem Zytoskelett (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007). Und so wird klar, dass ein Protein, welches in der Literatur beschrieben ist, als ein Organisator des Zytoskeletts, und gleichzeitig, in den von uns betrachteten Zellen, hoch exprimiert wird, ein guter Kandidat für eine potentielle Schlüsselstelle in der Zellaktivierung und Migration dieser Zellen ist.

Um den Einfluss von ERMIN auf den ILC2 - Phänotyp einer Maus zu untersuchen, wurden die C57BL/6NTac-*Ernm*^{em1(IMPC)}/H Mäuse (Alternativer Name = ERMN-INS1-EM1-B6N) vom MRC Harwell bestellt. Hierbei handelt es sich um eine CRISPR / Cas induzierte Mutation, bei welcher ein Nukleotid in Exon ENSMUSE00000163259 eingefügt wurde und dabei der Leserahmen der DNS verändert wurde. Dies führt letztendlich zu einem Vorzeitigen Stopp - Codon, und der Entstehung eines Null - Allels, also dem Fehlen des Protein - Produktes.

Wichtig zu wissen ist, dass es sich dabei um einen "full" - Knock - Out handelt, also alle Körperzellen von Beginn an betroffen sind, nicht nur einzelne Zellen, wie die zu untersuchenden ILC2 oder ab einem induzierbaren Zeitpunkt.

Die Mäuse sollten nun, vergleichbar mit den anderen Mäusen, auf diversen Wegen analysiert werden: einmal Bestätigung des Knock - Outs per qPCR und Immunfluoreszenz, als auch Western Blot. Anschließend weiterreichende Analysen mit Fokus auf die ILC2 und Typ 2 Immunität, mit dem Gedanken einer vom Normalen abweichenden Immunantwort, sowohl im "Steady State", dann unter stimulierenden Bedingungen *in vitro* als auch *in vivo*.

5. Materialien und Methoden

a. Materialliste

<u>Ressource</u>	<u>Quelle</u>	<u>Identifikation</u>
Tabelle 1: Software.		
BD FACSDiva Software	BD Biosciences	N / A
FlowJo™ V10 Software	TreeStar	https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads
GraphPad Prism 8 Software	GraphPad	https://www.graphpad.com
i-control™ 2.0 Software	Tecan Group	N / A
LEGENDplex™ Data Analysis Software	BioLegend®	https://www.biolegend.com/legendplex
Microsoft Excel	Microsoft Corporation	N / A
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation	N / A
Microsoft Word	Microsoft Corporation	N / A
NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer V1.6 Software	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/ch/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/ultraviolet-visible-visible-spectrophotometry-uv-vis-vis/uv-vis-vis-instruments/nanodrop-microvolume-spectrophotometers/nanodrop-software-download.html

QuantStudio Real - Time PCR V1.0 Software	Thermo Fisher Scientific	N / A
--	-----------------------------	-------

Tabelle 2: Geräte / Instrumente.		
- 20 °C Kühlschrank	Liebherr - Hausgeräte GmbH	GN 4375 Premium NoFrost
- 80 °C Kühlschrank (Thermo Scientific™ TSC Serie Ultratiefkühgeräte)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # HLE50086V
4 °C Kühlschrank	Liebherr - Hausgeräte GmbH	KPef 4350 Index 20B / 001
Anästhesie - Kammer (Veterinärnästhesie - Induktionskammer)	Stoelting Company	Cat # 50238
Baermann - Apparat: - Plastiktrichter - Laborständer - 30 cm langer durchsichtiger Plastikschlauch - Metallklemme - Metallsieb	Divers	N / A
BD FACSAria™ III Zell Sortierer	BD Biosciences	N / A
BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer	BD Biosciences	N / A
befeuchtete Dunkelkammer (Färbekammer StainTray™)	Simport (vertrieben durch Carl Roth GmbH und Co. KG)	Cat # HA51.1
Bio-Rad - ChemiDoc™	Bio-Rad Laboratories GmbH	N / A
Bio-Rad - Elektrophorese Kammer (Mini-PROTEAN®)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Cat # 1658004

Teta Vertical Electrophoresis Cell for Mini Precast Gels, 4-gel)		
Bio-Rad - Gel - Guss - Vorrichtung (Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Module)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Cat # 1658018
Bio-Rad - Trans-Blot® Turbo™ - Transfer System (Blotting Maschine)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Cat # 1704150
Block - Boxen (Western Blot Box)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # Z742099
dicker wasserdichten Edding - Stift (edding 3000 Permanentmarker)	edding Vertrieb GmbH	N / A
Eppendorf® 5430 R Zentrifuge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # EP022620603
Fluoreszenz - Mikroskop (Axio Observer)	Carl Zeiss Microscopy	N / A
Hand - Zählmaschine	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Assistent)	Cat # 40344010
hydrophober Stift (ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen)	Vector Laboratories	Cat # H-4000
Inkubierer / Shaker (INFORS HAT Minitron)	Infors AG	N / A
Lineal	Corporate Express	Cat # 74633415
LUNA™ - Gerät (LUNA™ automatischer Zellzähler)	Logos Biosystems	Cat # L10001
Mikrowelle (Moulinex MICRO - CHEF FM A 935 Q)	Groupe SEB GmbH	N / A

MP - FastPrep [®] -24 (MP Biomedicals [™] FastPrep-24 Instrument)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # 12079310
NanoDrop [™] 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Cat # ND-2000
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Assistent)	Cat # 40441001
PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences AG	N / A
Pipetten (diverse)	Eppendorf AG / Gilson Incorporated	divers
Platten - Schüttler (Corning [®] LSE [™] Digital Microplate Shaker, 230V, EU Plug)	Corning Incorporated	Cat # 6781-4
QuantStudio [™] 5 Real - Time PCR System	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems [™])	Cat # A28140
Laborbedarf: - Sektions - Instrumente (Scheren, Pinzetten) - Glas - Stößel - geknickten flachen Pinzette für Blots - Rolle für Blots - 500 ml Becherglas - Löffel	Carl Roth GmbH + Co. KG	divers
Skalpelle	AESCULAP [®] (B. Braun Melsungen AG)	Cat # BA810SU
Stereomikroskop (SteREO Discovery.V20)	Carl Zeiss Microscopy	N / A

Stromversorgung (Bio-Rad PowerPac™ 300 / 3000)	Bio-Rad Laboratories GmbH	N / A
Tecan Infinite® M Plex	Tecan Trading AG	Cat # TEC006418I
Thermo - Cyclor (ProFlex™ 3 x 32-well PCR System)	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems™)	Cat # 4484073
Thermo Fisher - Elektrophorese - Kammer mit Plastik - Vorrichtung (Owl™ A1 Large Gel System)	Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™)	Cat # A1
Ultraschall - Bad (Elma® GE - PROBE®)	Elma Schmidbauer GmbH	Cat # T460/H
UV - Kammer (VWR® GenoSmart - Geldokumentationssystem)	VWR International, LLC	Cat # 730-3000
Vortexer (Reax top)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Cat # 541-10000-00
Waage 1 fein (Sartorius Research R160P)	Sartorius AG	Cat # R160P
Waage 2 grob (KERN 822)	Ascuero AG (Gottl. Kern & Sohn)	Cat # 822 - 33
Wasserbad (Thermo Scientific Precision GP 10)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # TSGP10
Western Blot - Shaker (stuart® See - saw rocker - SSL4)	Cole-Parmer	N / A
Zell - Inkubator (Panasonic CO ₂ Incubator MCO - 230AICUV)	PHC Corporation	Cat # MCO-230AICUV-PE
Zentrifuge - groß (Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge X3R Centrifuge)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # 10325804

Zentrifuge - klein (Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ 21 Centrifuge)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # 10651805
Zentrifuge - mini (VWR® Mikrozentrifuge, MiniStar whiteline)	VWR International, LLC	Cat # 521-2161P

Tabelle 3: Plastik - / Glas - / Einweg - Materialien.		
1,5 ml Eppendorf® - Gefäß mit geringer Oberflächenhaftung (Reagiergefäß 1,5 ml DNA LowBind)	SARSTEDT AG & Co. KG	Cat # 72.706.700
1,5 ml Eppendorf® - Gefäße (Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal)	SARSTEDT AG & Co. KG	Cat # 72.706.400
15 ml Falcon® - Tube (15 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube)	Corning Science México S.A. de C.V.	Cat # 352096
1 ml - Insulinspritze (1 ml U-40 Insulin)	BD Plastipak™	Cat # 303173
2,5 ml Pasteur - Pipette (Serum Pipette, 153 mm lang, graduiert)	Greiner Bio - One GmbH	Cat # 612301
20 G - Kanüle	Sterican® (B. Braun Melsungen AG)	Cat # 4657519
26 G - Kanüle	Sterican® (B. Braun Melsungen AG)	Cat # 4665457
384 - Loch Platte (MicroAmp™ Optical 384 - Well Reaction Plate with Barcode)	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems™)	Cat # 4309849

48 - Loch Platte mit flachem Boden (Nunc™ Cell - Culture Treated Multidishes)	Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™)	Cat # 150687
5 ml Eppendorf - Gefäß (Reaktionsgefäße 5,0 ml, farblos)	Biozym Scientific GmbH	Cat # 710440
5 ml Spritze (Injekt® LL 5 ml, Lock - Ansatz, zentrisch)	B. Braun Melsungen AG	4606710V
50 µl Mini - Eppendorf® Reihen (Multiply® -µStrip Pro 8er Kette)	SARSTEDT AG & Co. KG	Cat # 72.991.002
50 ml Falcon® - Tube (50 ml Polypropylene Conical Tube)	Corning Science México S.A. de C.V.	Cat # 352070
50 ml Spritze (BD Plastipak™ Syringe 50 ml)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # 10636531
6 - Loch Platten (CELLSTAR® 6 Well Cell Culture Plate)	Greiner Bio - One GmbH	Cat # 657160
70 µm Zellsieb (Falcon™ Zellsiebe 70 µm)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # 352350
96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte (Microplate, 96 Well, PP, V - Bottom)	Greiner Bio - One GmbH	Cat # 651201
Alufolie	N / A	N / A
BD Microtainer® SST™ Tube	BD Biosciences (Becton, Dickinson and Company)	Cat # 365968
Butterfly - Kanüle (Venofix® Safety 21G 0,80 x 19 mm grün)	B. Braun Melsungen AG	Cat # 4056504-01

Corning® HTS Transwell® 96 - Loch Platte mit well permeable supports (5 µm Porengröße)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # CLS3388-2EA
Deckgläschen (24 x 50 mm, Glasdicke 0,13 - 0,16)	R. Langenbrinck GmbH	Cat # 01 - 2450/x
Einweg - Vinyl - Probenform (Tissue - Tek® Cryomold® Intermediate)	Sakura Finete Europe B.V.	Cat # 4566
Einweg - Zählkammer des Herstellers (LUNA - Gerät)	Logos Biosystems	Cat # L12001
FACS - Tube (Falcon® 5 ml Polystyrene Round - Bottom Tube)	Corning Science México S.A. de C.V.	Cat # 352052 / 352054
FACS - Tube mit 70 µm - Sieb (Falcon® 5 ml Polystyrene Round - Bottom Tube with Cell - Strainer Cap)	Corning Science México S.A. de C.V.	Cat # 352235
Filterpapier (N. b.) (GE Healthcare Life Sciences Whatman™ Filter Papers)	GE Healthcare UK Limited	Cat # 1001-110
Filterpapier (WB) (Whatman™ Chromatography Paper, Grade: 3 mm Chr)	GE Healthcare UK Limited	Cat # 3030-861
Frischhaltefolie (RUBIN)	Dirk Rossmann GmbH	N / A
Keramik Kugeln (1 / 4 " Ceramic Sphere)	MP Biomedicals	Cat # 6540-422
Kimtech - Präzisionstücher (KIMTECH Science®)	Kimberly-Clark Europe Limited/Professional Sector	Cat # 05511

MP - FastPrep®-24 - Gefäße (Mikro - Schraubröhre 2 ml, PP)	SARSTEDT AG & Co. KG	Cat # 72.693.005
Nitrozellulose - Membran (Whatman® Grade 3 mm Chr Cellulose Western Blotting Membranes)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # WHA3030861
Petrischale groß (Petrischale, PS, 94 / 16 mm, mit Nocken, steril)	Greiner Bio - One GmbH	Cat # 633181
Petrischale klein (Petrischale, PS, 60 / 15 mm, mit Nocken, steril)	Greiner Bio - One GmbH	Cat # 628161
Phase Lock Tubes (5PRIME Phase Lock Gel™, 2 ml, Heavy)	QIAGEN Beverly Inc.	Cat # 2302830
Pipetboy - Aufsätze - 5 ml (CELLSTAR® Serological Pipette, sterile) - 10 ml (Sarstedt Serological Pipette, sterile) - 25 ml (Falcon® Serological Pipette, sterile)	- Greiner Bio - One GmbH - Sarstedt AG & Co. KG - Corning Incorporated - Life Sciences	- Cat # 606 180 - Cat # 86.1254.001 - Cat # 357525
Pipetten - Aufsätze (TipOne® Pipettenspitzen) - 10 µl (Graduated Tip) - 200 µl (Yellow Bevelled Tip) - 1000 µl (Blue Graduated Tip)	STARLAB GmbH	- Cat # S1111-3700 - Cat # S1111-1706 - Cat # S1111-6701
Stopfen aus 2 ml Spritzen (Injekt® LL 2 ml, Lock - Ansatz, zentrisch)	B. Braun Melsungen AG	Cat # 4606701V

U - Boden - Zell - Kultur - 96 - Loch - Platte (96 Well Round (U) Bottom Plate, TC Surface, Pack of 1)	Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™)	Cat # 163320
Zähl - Petrischale (Würmer)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Cat # AEL9.1
Zellstoff / Papier (grün) (Tork Advanced H3, Green Hand Towel)	Essity Hygiene and Health AB	Cat # 290179 / 290289

Tabelle 4: Lösungen / Puffer / Chemikalien / Peptide / Proteine.		
“mounting medium“ (Eindeckmedium) (ProLong™ Diamond Antifade Mountant)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)	Cat # P36961
“Trypan Blue Stain 0,4 %“ (zugehörig zum LUNA - Gerät)	Logos Biosystems	Cat # T13001
(0,5 %) Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # 47036-50G-F
(30 %ige) Sucrose (Saccharose)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # 84097-1KG
(4 %iges) Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG	Cat # 0335.1
(50 mM) Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG	Cat # 0079.3
(75 %) Ethanol (und Alkohol zur Desinfektion)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # 32205-M
10 %iges / 5 %iges Tris - Glycin - SDS - Polyacrylamid -		

Resolving (10 %) / Stacking (5 %) - Gel: - steriles H ₂ O - 30 % Acrylamid Mix (ROTIPHORESE® Gel A-40) - 1,5 M Tris - HCL (pH 8,8) - 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat) - 10 % Ammonium Persulfat - TEMED	- Siehe dort - Carl Roth GmbH + Co. KG - Carl Roth GmbH + Co. KG - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Carl Roth GmbH + Co. KG	- Siehe dort - Cat # 7748.2 - Cat # 5429.1 - Cat # 75746 - Cat # A3678-25G - Cat # 2367.3
100 % Percoll - 1 / 10 PBS (10x), pH 7,4 - 9 / 10 Percoll® Density Gradient Media	- Thermo Fisher Scientific (Gibco™) - Cytiva	- Cat # 70011036 - Cat # 17089101
2x PCR Mix (GoTaq® Master Mixes)	Promega Corporation	Cat # M7123
40 % Percoll - 4 / 10 100 % Percoll - 6 / 10 DMEM	- Siehe dort - Siehe dort	- Siehe dort - Siehe dort
80 % Percoll - 8 / 10 100 % Percoll - 2 / 10 DMEM	- Siehe dort - Siehe dort	- Siehe dort - Siehe dort
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # 1000141011
Agarose (universal)	VWR International GmbH	Cat # 732-2789

Block - Puffer - 3 % Milch in PBS	- Siehe dort	- Siehe dort
Bradford - Reagenz (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Cat # 5000205
CES DNS Enhancer	Eigenherstellung	N / A
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # 288306-100ML
D10+ Medium - DMEM high glucose (500 ml) - 10 % FCS (50 ml) - 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin (5 ml) (Gibco™) - 2 mM L - Glutamin (5 ml) (Gibco™) - 80 µM 2 - Mercaptoethanol (0,8 ml) - 10 mM HEPES (5 ml) (Gibco™) - 1 mM Sodium Pyruvate (5 ml) - Non - essential amino acids (5 ml) (Gibco™)	- Siehe dort - Siehe dort - Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH) - Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Thermo Fisher Scientific (Gibco™) - Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™) - Thermo Fisher Scientific (Gibco™)	- Siehe dort - Siehe dort - Cat # 15-140-122 - Cat # 25-030-081 - Cat # M3148-100ML - Cat # 15630122 - Cat # 11360039 - Cat # 11140035
DAPI (4',6 - Diamidino - 2 - Phenylindole, Dilactate)	BioLegend®	Cat # 422801
Deionisiertes / steriles H ₂ O (UltraPure™ DNase / RNase - Free Distilled Water)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)	Cat # 10977035

DMEM (high glucose)	Thermo Fisher Scientific (Gibco™)	Cat # 41965039
DNS - Leiter (GeneRuler DNA Ladder Mix)	Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™)	Cat # SM0331
DTT (DTT solution 1 mol/l (1 M) for molecular biology)	AppliChem GmbH	Cat # A3668,0050
ECL Reagenzien (ECL™ Western Blotting Detection Reagents)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # GERPN2209
Erythrozyten - Lyse - Puffer - 150 mM NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid) - 10 mM KHCO ₃ (Kaliumbicarbonat) - 0,1 mM EDTA (pH 8,0)	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Roboklon GmbH	- Cat # 09718-1KG - Cat # 60339-1KG - Cat # E0240-02
Esel - Serum (Donkey - Serum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # S30-100ML
Fc - Block	Eigenherstellung	N / A
FCS (Foetal Bovine Serum, sterile filtered, Orogin South Africa)	PAN-Biotech GmbH	Cat # 1502-P121511
flüssiger Stickstoff	Eigenherstellung	N / A
gemörserte Kohle (Ebonex Bone Char, 5 x 8)	Ebonex Corporation	N / A
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # H8264-500ML

Hypochlorit (Na - Hypochlorit - Lösung, 1 l, 12 % Cl, stabilisiert, Biocide Grade)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Cat # 0078.1
IL-25 (Recombinant Mouse IL-25 (IL-17E) (insect expressed, carrier - free))	BioLegend®	Cat # 587302
IL-33 (Recombinant Mouse IL-33 (carrier - free))	BioLegend®	Cat # 580502
IL-7 (Recombinant Mouse IL-7 (carrier - free))	BioLegend®	Cat # 577802
Isofluran	Baxter Deutschland	Cat # HDG9623
Isopropanol (2 - Propanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # 59300-1L-M
Laemmli - 2x - Puffer / Lade - Puffer - 125 mM Tris - HCl (pH 6,8) - 20 % Glycerin (Glycerol) - 4 % SDS - 0,02 % Bromophenolblau - 10 % 2 - Mercaptoethanol	- Siehe dort - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Siehe dort - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Siehe dort	- Siehe dort - Cat # G5516-100ML - Siehe dort - Cat # B0126-25G - Siehe dort
Lauf - Puffer - 25 mM Tris - HCl (pH 8,3) - 190 mM Glycine - 0,1 % SDS	- Siehe dort - Carl Roth GmbH + Co. KG - Siehe dort	- Siehe dort - Cat # 0079.3 - Siehe dort
LPA (GenElute™ - LPA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # 56575-1ML

Midori Green (MIDORI ^{Green} Advance DNA / RNA Farbstoff)	NIPPON Genetics Europe	Cat # MG04
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG	Cat # T145.2
Moos (Lucky Reptile Sphagnum Moos Ziegel)	Lucky Reptile	Cat # RK1523
OCT (optimal cutting temperature) - Verbindung (O.C.T. TM Compound, Tissue - Tek [®])	Sakura Finetek Europe B.V.	Cat # 4583
Ohr - Stanzen - Puffer - 10 mM Tris - HCl (pH 8,0) - 50 mM KCl (Kaliumchlorid) - 0,5 % NP-40 - 0,5 % TWEEN [®]	- Siehe dort - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Siehe dort - Siehe dort	- Siehe dort - Cat # P9333-1KG - Siehe dort - Siehe dort
PBS (pH 7,4 flow cytometry grade)	Thermo Fisher Scientific (Gibco TM)	Cat # A1286301
PBST - PBS - TWEEN [®]	- Siehe dort - Siehe dort	- Siehe dort - Siehe dort
Power SYBR TM Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems TM)	Cat # 4368708
Protein - Leiter (Thermo Scientific TM PageRuler TM Prestained Protein Ladder)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # PI26616
Protein Homogenisations Puffer (Lysis buffer: Radio - Immuno - Precipitation - Assay buffer (RIPA buffer)) - 50 mM Tris - HCl (pH 8,0)	- Siehe dort	- Siehe dort

<ul style="list-style-type: none"> - 150 mM NaCl - 1 % Nonidet P-40 (NP-40) (P-40 Surfact-Amps™ Detergent Solution) - 0,5 % Sodium Deoxycholate - 0,1 % SDS - 1 mM Sodium - / Natrium - Orthovanadate - 1 mM NaF - Protease Inhibitor (Proteasehemmer - Cocktail) 	<ul style="list-style-type: none"> - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™) - Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™) - Siehe dort - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) 	<ul style="list-style-type: none"> - Cat # S7653-1KG - Cat # 85124 - Cat # 89905 - Siehe dort - Cat # 450243-10G -Cat # S25547 - Cat # P8340-5ML
<p>Proteinase K</p>	<p>Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)</p>	<p>Cat # 3115828001</p>
<p>Sauerstoff (CONOXIA® GO2X, 50l [200bar])</p>	<p>Linde GmbH</p>	<p>Cat # 2020152</p>
<p>TAE (50x TAE Buffer - Verdünnen mit H₂O)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml 0,5 M EDTA - 242 g Tris - HCl (pH 8,0) - 800 ml H₂O - 57,1 ml Essigsäure (Acetic acid) 	<ul style="list-style-type: none"> - Siehe dort - Siehe dort - Siehe dort - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) 	<ul style="list-style-type: none"> - Siehe dort - Siehe dort - Siehe dort - Cat # W200603-1KG-K

TaqMan™ Universal Master Mix II (with UNG)	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems™)	Cat # 4440039
Transfer - Puffer - 25 mM Tris - HCl (pH 8,3) - 190 mM Glycine - 20 % Methanol	- Siehe dort - Siehe dort - Carl Roth GmbH + Co. KG	- Siehe dort - Siehe dort - Cat # 0082.3
TRizol™ (Invitrogen™ TRizol™ Reagent)	Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH)	Cat # 15-596-018
Trypanblau (Trypan Blue Solution, 0,4 %)	Thermo Fisher Scientific (Gibco™)	Cat # 15250061
TWEEN® 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	Cat # P4780-100ML
Verdauungs - Lösung (A) - HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) (mit Ca und Mg) - 4 % FCS - 0,4 U/ml Dispase (Corning®) - 1 mg/ml Collagenase D - 20 µg/ml DNase I	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Siehe dort - Thermo Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA) - Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™)	- Cat # H8264-500ML - Siehe dort - Cat # 354235 - Cat # 11088882001 - Cat # EN0521
Verdauungs - Lösung (B) - DMEM	- Siehe dort	- Siehe dort

- 1 % BSA	- New England Biolabs	- Cat # B9000S
- 1 mg/ml Collagenase II (Collagenase aus Clostridium histolyticum)	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	- Cat # C6885-5G
- 100 µg/ml DNase I	- Siehe dort	- Siehe dort
Zell - Dissoziations - Lösung		
- HBSS (ohne Ca und Mg)	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	- Cat # H9394-500ML
- 5 mM EDTA	- Siehe dort	- Siehe dort
- 10 mM HEPES	- Siehe dort	- Siehe dort

Tabelle 5: Antikörper.		
<u>WB/IF:</u>		
anti - Hase - HRP (Western Blot) (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody)	Cell Signaling Technology	Cat # 7074S
anti - Maus - HRP (Western Blot) (Goat IgG anti-Mouse IgG (H+L)-HRPO, MinX none)	Dianova GmbH	Cat # 115-035-003
ERMIN - AK (anti - Ermin, clone 160, Monoclonal Antibody)	EMD Millipore Corporation	Cat # MABN323
Esel - anti - Hase - AF488 (IF) (Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat # A-21206
Esel - anti - Hase - AF647 (IF) (Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat # A-31573

Secondary Antibody, Alexa Fluor 647)		
Esel - anti - Maus - AF488 (IF) (Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat # A-21202
Esel - anti - Maus - AF647 (IF) (Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat # A-31571
Kcnab2 - AK (KCNAB2 Rabbit Polyclonal antibody)	Proteintech Group	Cat # 17890-1-AP
<u>FACS:</u>		
CD11b (M1/70) - AlexaFluor488	eBioscience™	Cat # 53-0112-82
CD11b (M1/70) - SB645	eBioscience™	Cat # 64-0112-82
CD127 (IL-7R α) - APC	BioLegend®	Cat # 135011
CD127 (IL-7R α) - BV421	BioLegend®	Cat # 135024
CD127 (IL-7R α) - PECy7	BioLegend®	Cat # 135014
CD19 - Biotin	BioLegend®	Cat # 115504
CD19 - PECy7	BioLegend®	Cat # 115520
CD19 - PerCP-Cy5.5	eBioscience™	Cat # 45-0193-82
CD25 - AlexaFluor488	eBioscience™	Cat # 53-0251-82
CD25 - APC	eBioscience™	Cat # 17-0251-82
CD25 - BUV395	BD Biosciences	Cat # 564022
CD3 - Biotin	BioLegend®	Cat # 100304
CD3 - PECy7	BioLegend®	Cat # 152314
CD3 - PerCP-Cy5.5	eBioscience™	Cat # 45-0031-82

CD45 - BUV395	BD Biosciences	Cat # 564279
CD45.2 - APC-eFluor780	eBioscience™	Cat # 47-0454-82
CD5 - Biotin	BioLegend®	Cat # 100604
CD5 - PECy7	BioLegend®	Cat # 100622
CD5 - PerCP-Cy5.5	eBioscience™	Cat # 45-0051-82
FcεRIα - Biotin	BioLegend®	Cat # 134304
FcεRIα - PECy7	BioLegend®	Cat # 134318
FcεRIα - PerCP-eFluor710	eBioscience™	Cat # 46-5898-82
GATA3 - PerCP-eFluor710	eBioscience™	Cat # 46-9966-42
Ki67 - PE	BD Biosciences	Cat # 556027
KLRG1 - APC	eBioscience™	Cat # 17-5893-82
KLRG1 - eF450	eBioscience™	Cat # 48-5893-82
KLRG1 - FITC	eBioscience™	Cat # 11-5893-82
KLRG1 - PE	BioLegend®	Cat # 138408
Ly6G - Biotin	BioLegend®	Cat # 127604
Ly6G - PECy7	BioLegend®	Cat # 127618
Ly6G - PerCP-eFluor710	eBioscience™	Cat # 46-9668-82
MHCII (I-A/I-E) - BV650	BioLegend®	Cat # 107641
NK1.1 - AlexaFluor700	eBioscience	Cat # 56-5941-82
NK1.1 - BV605	BioLegend®	Cat # 108740
SiglecF - BV605	BD Biosciences	Cat # 740388
ST2 (IL-33R) - Biotin	eBioscience™	Cat # 13-9333-82
ST2 (IL-33R) - SB600	eBioscience™	Cat # 63-9335-82
Streptavidin - BV421	BioLegend®	Cat # 405225
Streptavidin - BV650	BioLegend®	Cat # 405232

Tabelle 6: Assays.		
Apotracker™ Green	BioLegend®	Cat # 427401
eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 450	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)	Cat # 65-0842-85

LEGENDplex™ Mouse Th2 Panel - Assay (6-plex) w / VbP V03	BioLegend®	Cat # 741052
LIVE/DEAD™ Fixierbarer Aqua Totzellen - Farbstoff	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)	Cat # L34966
SYTOX™ Blauer Totzellen - Farbstoff	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)	Cat # S34857
SYTOX™ Grüner Totzellen - Farbstoff	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)	Cat # S34860
Thermo Fisher cDNS Produktions Kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems™)	Cat # 4368813
Vybrant™ DyeCycle™ Rubinrot Färbemittel	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™)	Cat # V10309

Tabelle 7: Oligonukleotide.		
<i>Ernm</i> - CK - Primer Rückwärts (qPCR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': CAA CCT TGT AGT ATG CCT GGG
<i>Ernm</i> - CK - Primer Vorwärts (qPCR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': CTG AGA CAC TGA GCG GGA C
<i>Ernm</i> - Primer Rückwärts (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': TCT CGG AAA GCC ATG TCT TCT G
<i>Ernm</i> - Primer Vorwärts (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': ACA TTG CTT GTG TTT CTC CCT A

<i>Ermn</i> - RM - Primer Rückwärts (qPCR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': ATG GCC TGG TGA ACA ACG AAG
<i>Ermn</i> - RM - Primer Vorwärts (qPCR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': ACT ACA AGG TTG AAC CCA GTC T
<i>Ermn</i> - Taqman (qPCR) (Mm01331072_m1)	Thermo Fisher Scientific	Cat # 4331182
<i>Ermn</i> - Taqman Probe - mutiertes Allel - FAM (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': TCG TTG TTC CAC CAG G
<i>Ermn</i> - Taqman Probe - Wildtyp Allel TET (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': TCT TCG TTG TT* CAC CAG
<i>Hprt</i> - Primer Rückwärts (qPCR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': CAA CAG GAC TCC TCG TAT TTG C
<i>Hprt</i> - Primer Vorwärts (qPCR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': GAT ACA GGC CAG ACT TTG TTG G
<i>Hprt</i> - Taqman (qPCR) (Mm00446968_m1)	Thermo Fisher Scientific	Cat # 4331182
<i>Kcnab2</i> - Primer Rückwärts - mutR (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': GCA TAA TTG AGT TGG AAA GTT CAT TGT C
<i>Kcnab2</i> - Primer Rückwärts - wtR (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': GGT CAT TAG GTG CTC TGC CAT CTG A
<i>Kcnab2</i> - Primer Vorwärts (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': TAG GGA GTC TGA AGG TTT GGT CAG G

<i>Kcnab2</i> - Taqman (qPCR) (Mm01260260_m1)	Thermo Fisher Scientific	Cat # 4448892
<i>Lgmn</i> - Primer Rückwärts - Tg (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': ACG GAA ACA CAC ACG AAC GTG GAG C
<i>Lgmn</i> - Primer Rückwärts - WT (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3':ACA TCC CAC TAA GCT ACA ACC CTG GC
<i>Lgmn</i> - Primer Vorwärts - Tg (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3':CAG CGC ATC GCC TTC TAT CGC CTT C
<i>Lgmn</i> - Primer Vorwärts - WT (Genotypisierung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)	5' -> 3': GCA TAA TTG AGT TGG AAA GTT CAT TGT C
<i>Lgmn</i> - Taqman (qPCR) (Mm01325350_m1)	Thermo Fisher Scientific	Cat # 4331182

Tabelle 8: Mäuse / Organismen.		
C57BL/6Ncr- <i>Kcnab2</i> ^{em1(IMPC)Mbp} /Mmucd	MMRRC (Mutant Mouse Ressource & Research Centers unterstützt durch das NIH)	N / A
C57BL/6N- <i>Lgmn</i> <tm1a(NCOM)Mfgc>/Tcp	CMMR (Canadian Mouse Mutant Repository)	N / A
C57BL/6NTac-Ermn ^{em1(IMPC)H} /H	MRC Harwell Institut	N / A
Kontrollen: C57BL/6 - NCrI	- FEM (Charité -	- N / A

- NRj - Ntac	Universitätsmedizin Berlin) - Janvier Labs - Taconic Biosciences GmbH	- N / A - N / A
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Prof. Dr. rer. nat. David Vöhringer (david.voehringer@uk- erlangen.de)	N / A
weibliche Lewis Ratten	Janvier Labs	N / A
Wildling - Mäuse	Dr. med. Stephan Rosshart (Medical Center - University of Freiburg)	N / A

b. Mäuse und Genotypisierung

Für die Untersuchung der in dieser Studie relevanten Gene wurden entsprechende Knock - Out Mäuse bestellt, in welchen das jeweilige Gen, also *Ermn*, *Kcnab2* oder *Lgmn* ausgeschaltet wurde. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen (FEM - Charité Berlin) hinsichtlich Futter und Unterkunft gehalten.

Die Genotypisierung der Mäuse war notwendig, um sicherzugehen, dass die verwendeten Mäuse den erwünschten Genotyp besaßen (also das Gen erfolgreich ausgeschaltet war).

In den ersten Lebenswochen einer Maus, findet an der Charité die Ohr - Markierung der Tiere zu eindeutigen Identifikation, nach einem definierten Code statt.

Das dabei anfallende überschüssige Gewebe wird zu Genotypisierung verwendet. Die Ohr - Stanzen wurden in 1,5 ml Eppendorf® - Gefäße überführt, und dann 50 µl Ohr - Stanzen - Puffer hinzugegeben. Danach wurden die Gefäße für 5 min auf 95 °C erhitzt, um dann bei Raumtemperatur abzukühlen, bis der Puffer wieder klar war. Anschließend wurde pro Eppendorf® - Gefäß 50 µl Ohr - Stanzen - Puffer gegeben, welche 1 µl Proteinase K, zum Verdau des Gewebes, enthielten, und dann bei 55 °C und 750 rpm über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Gefäße kurz gevortext, wobei das Gewebe vollständig zerfiel, danach erneut für 5 min auf 95 °C erhitzt und bis zur Klarheit

des Puffers bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden die Gefäße für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit (14.800 rpm) zentrifugiert. Der klare Überstand in den Tubes, welcher die DNS enthielt, wurde dann in ein neues 1,5 ml Eppendorf® - Gefäß überführt. Davon konnten dann 2 µl oder 2,5 µl für eine PCR verwendet werden, oder die DNS bei -20 °C, für spätere Verfahren, eingefroren werden.

Ermn

Die C57BL/6NTac-Ermn^{em1(IMPC)^H} /H Mäuse erhielten wir vom MRC Harwell Institut, welche diese Mäuse im Auftrag des Europäischen Maus Mutant Archives (www.infrafrontier.eu) verteilt. Das MRC Harwell Institut ist auch ein Mitglied des Internationalen Maus Phänotypisierung Konsortium (IMPC) und erhielt eine Förderung durch das Nationale Gesundheits - Institut zur Generierung und / oder Phänotypisierung [5UM1HG006348-08] der C57BL/6NTac-Ermn^{em1(IMPC)^H} /H Mäuse. Die Forschung, über welche in dieser Promotion berichtet wird, ist allein die Verantwortlichkeit des Autors, und repräsentiert nicht notwendigerweise die offiziellen Ansichten des Nationalen Gesundheits - Institutes. Finanzierung und assoziierte primäre phänotypische Informationen können auf www.mousephenotype.org gefunden werden. Die Mäuse wurden in einem heterozygoten Genotyp geliefert und anschließend auf Homozygotie gezüchtet. Die Genotypisierung erfolgte zunächst, da es sich beim Unterschied zwischen WT und Knock - Out lediglich um ein sogenanntes Indel, also eine kleine Insertion / Deletion (in unserem Fall Insertion), die zu einem Verlust des Genproduktes führt, per qPCR mit Hilfe eines "Allelic Discrimination Assays" (mit welchem man auch beispielsweise einen Einzel - Nukleotid - Polymorphismus (SNP) erkennen kann), dabei werden 2 diverse fluoreszenzmarkierte Proben zugefügt, wobei nur eine der beiden an die spezifische Länge des komplementären DNS Stranges binden kann (bedenke, durch die Insertion eines Nukleotids ist die mutierte DNS Sequenz minimal länger) und durch die Bindung den fluoreszierenden Farbstoff freisetzt, welcher dann registriert wird, und so anhand der Menge zwischen den diversen Genotypen unterschieden werden kann.

Dieser Assay bestand aus zwei TaqMan™ Proben, welche Fluoreszenz markierte Detektoren enthielten, einer passte genau an das mutierte Allel (FAM™ - markiert), und einer an das Wildtyp - Allel (TET™ - markiert). Zur Durchführung des Assays wurde zunächst ein qPCR Master Mix hergestellt, dieser enthielt pro Probe / Maus / Ansatz 5 µl

TaqMan™ Universal Master Mix, 0,5 µl steriles H₂O und 2 µl der 20 µM Assay Substanz (bestehend aus jeweils 5 µM der beiden TaqMan™ Proben und 15 µM der beiden Primer (Vorwärts - und Rückwärts - Primer)). Von diesem Master Mix wurden in einer 384 - Loch Platte 7,5 µl mit 2,5 µl der DNS der zu untersuchenden Tiere gemischt. Anschließend wurde die Platte abgeklebt, und im QuantStudio™ 5 Real - Time PCR System eine qPCR mit dem Programm eines Allelic Discrimination Assays durchgeführt, was als Resultat einen Allelic Discrimination Plot besaß, anhand welchem man dann zwischen heterozygoten oder homozygoten (für das WT / mutierte Allel) Tieren unterscheiden konnte.

Nachdem die Mäuse auf einen homozygoten Knock - Out gezüchtet wurden, wurden DNS Proben zur 100 %igen Verifizierung des Knock - Outs zur Sanger - Sequenzierung, zu LGC Genomics (Ostendstraße 25, 12459 Berlin, Deutschland) eingeschickt, und auf diesen sicheren Knock - Out Mäusen wurde die Kolonie begründet.

Zur Kontrolle der Experimente wurden stets passende alters -, und geschlechts - gleiche (für die Experimente wurden stets 6 - 10 Wochen alte Tiere verwendet) C57BL/6N Mäuse, von Janvier Labs (Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bestellt.

Kcnab2

Die C57BL/6NCrl-*Kcnab2*^{em1(IMPC)Mbp}/Mmucd Maus erhielten wir vom MMRRRC (Mutant Mouse Ressource & Research Centers unterstützt durch das NIH). Die Maus wurde in Kooperation mit dem IMPC (Internationales Maus Phänotypisierungs Konsortium) am UC Davies hergestellt, indem die 2 CRISPR - Leitsequenzen (TCTTGGCTCGAGCGCAACCTTGG und TGCGAACCAGAACCTCAGGACGG) in Verbindung mit dem CAS9 Protein in eine elektroporierte Zygote (mit dem genetischen Hintergrund einer C57BL/6N Maus) injiziert wurden, was zur Deletion eines Exons führte, und schlussendlich zum Verlust des funktionsfähigen Genproduktes. Der Begründer der Linie war Kent Lloyd (D.V.M, Universität von Kalifornien, Davis https://www.mmrrc.org/catalog/sds.php?mmrrc_id=46311).

Die Mäuse wurden in einem heterozygoten Genotyp geliefert und anschließend auf Homozygotie gezüchtet. Die Genotypisierung erfolgte per PCR, und anschließenden Gel - Elektrophorese.

Hierfür wurde jeweils eine getrennte PCR - Reaktion für das Wildtyp - Allel (Wildtyp - Reaktion (wtR)) und eine für das mutierte Allel (Mutanten - Reaktion (mutR)) durchgeführt.

Für beide Reaktionen wurde erst ein Master Mix angesetzt, welcher pro Probe / Maus / Ansatz 10 µl 2x PCR Mix, 4 µl CES DNS Enhancer, 2 µl steriles H₂O, sowie 1 µl des gemeinsamen Forwärts Primers, als auch 1 µl des sich zwischen den beiden Reaktionen unterscheidenden Rückwärts Primers (wtR vs. mutR). Von diesem Master Mix wurden 18 µl zusammen mit 2 µl der DNS der einzelnen Tiere in 50 µl Mini - Eppendorf® Reihen gegeben, und dann im Thermo - Cyclor amplifiziert. Das Programm bestand aus 6 Schritten, im Ersten wurde 5 min auf 94 °C erhitzt, dann im Zweiten diese 94 °C für 30 sec gehalten, bevor im Dritten für 45 sec auf 60 °C abgekühlt wurde und im 4. Für 70 sec auf 72 °C erhitzt wurde. Die Schritte 2 bis 4 (30 sec 94 °C, 45 sec 60 °C, 70 sec 72 °C) wurden für 40 Zyklen wiederholt. Im Anschluss folgte der 5. Schritt mit 5 min 72 °C, bevor im 6. Und letzten Schritt dauerhaft auf 4 °C herabgekühlt wurde. Anschließend erfolgte die Gel - Elektrophorese.

Für ein 3 %iges Agarose - Gel wurde 7,5 g Agarose in 250 ml TAE gegeben und im Becherglas für 3 min bei 900 Watt erhitzt, bis die Flüssigkeit klar war, dann wurde 20 µl Midori Green (8 µl pro 100 ml) hinzugegeben, gut geschüttelt, und die entstandene Flüssigkeit in die Thermo Fisher - Elektrophorese - Plastik - Vorrichtungen (der Thermo Fisher - Elektrophorese - Kammer) gegossen. Dort wurde das Gel für mind. 15 min aushärten gelassen, bevor dann die Plastik Platten an den kurzen Seiten des Gels entfernt und das Gel in das Bad aus TAE gegeben wurde. In der Flüssigkeit wurden dann die Kämme der Taschen entfernt. In die erste freie Tasche wurde 5 µl der DNS - Leiter (zur Erkennung der Länge der DNS - Banden) gegeben, in die folgenden Taschen dann 15 µl der amplifizierten DNS - Proben, welche zuvor im Thermo - Cyclor amplifiziert wurden. Nun wurde die Stromversorgung an die Kammer angeschlossen und das Gel für 90 min bei 120 V laufen gelassen.

Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel in einer UV - Kammer betrachtet, und anhand der Banden in der Wildtyp - Reaktion und der Mutanten - Reaktion konnte man dann den Genotyp einteilen (beispielsweise: Keine Bande in der Wildtyp - Reaktion und deutliche Bande in der Mutanten - Reaktion = homozygoter Knock - Out). Vom Zulieferer der Mäuse erhielten wir die Information, dass die zu erwartende Bande in der Mutanten - Reaktion

etwa 443 bp lang sei, und die Wildtyp - Bande 567 bp, womit man die Ergebnisse (anhand der Mitlaufenden DNS - Leiter) bestätigen konnte.

Zur Kontrolle der Experimente wurden stets passende alters -, und geschlechts - gleiche (für die Experimente wurden stets 6 - 10 Wochen alte Tiere verwendet) C57BL/6N Mäuse, von Janvier Labs (Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bestellt.

Lgmn

Die C57BL/6N-*Lgmn*^{tm1a(NCOM)Mfgc}/Tcp Maus erhielten wir vom CMMR (Canadian Mouse Mutant Repository). Bei dieser Maus wurde das Gen durch eine gerichtete Mutation ausgeknockt. Dabei ist das tm1a Allel das originale Knock - Out Allel, welches vom IKMC (international knock - out mouse consortium) in die embryonale Stammzelle eingebracht wurde. Dabei handelt es sich um ein gezieltes "Trap Allel".

Die Mäuse wurden in einem heterozygoten Genotyp geliefert und anschließend auf Homozygotie gezüchtet. Die Genotypisierung erfolgte sehr ähnlich wie bei *Kcnab2* per normaler PCR, und anschließenden Gel - Elektrophorese.

Auch hier wurden 2 getrennte PCR - Reaktionen (Wildtyp (WT) - und Transgen (Tg) - Reaktion) angesetzt und im Thermo - Cycler amplifiziert. Das Ansetzen der Master Mixe war fast identisch wie bei *Kcnab2*, nur teilten sich die Reaktionen keinen gemeinsamen Vorwärts - Primer, sondern besaßen diverse Primer für die Wildtyp - Reaktion (WT - Forward und WT - Reverse), sowie für die Mutanten - Reaktion (Transgene - Forward und Transgene - Reverse). Das PCR - Programm bestand aus 6 Schritten, im Ersten wurde 5 min auf 94 °C erhitzt, dann im Zweiten diese 94 °C für 30 sec gehalten, bevor im Dritten für 30 sec auf 60 °C abgekühlt wurde und im 4. Für 60 sec auf 72 °C erhitzt wurde. Die Schritte 2 bis 4 (30 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 60 sec 72 °C) wurden für 30 Zyklen wiederholt. Im Anschluss folgte der 5. Schritt mit 5 min 72 °C, bevor im 6. und letzten Schritt dauerhaft auf 4 °C herabgekühlt wurde. Anschließend erfolgte die Elektrophorese, deren Set - Up zu *Kcnab2* identisch war.

Die Interpretation erfolgte, vergleichbar wie bei *Kcnab2*, an den in der Wildtyp - und Mutanten - Reaktion vorhandenen Banden (Beispielsweise deutliche Bande in Wildtyp - Reaktion und deutliche Bande in Mutanten - Reaktion bedeutet das das Tier heterozygot ist). Kontrolliert wurde anhand der Länge der Banden, welche vom Repositorium angegeben wurden: 500 - 600 bp für die WT - Bande, 854 bp für die Knock - Out - Bande.

Zur Kontrolle der Experimente wurden stets passende alters -, und geschlechts - gleiche (für die Experimente wurden stets 6 - 10 Wochen alte Tiere verwendet) C57BL/6N Mäuse, von Janvier Labs (Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bestellt.

Wildlinge

Die Wildling Mäuse erhielt unser Labor von Dr. med. Stephan Rosshart (Medical Center - University of Freiburg, Department of Medicine II, Gastroenterology Hepatology, Endocrinology, and Infectious Diseases, Hugstetter Straße 55, 79106 Freiburg). Die Tiere waren bei den Experimenten 12 Wochen alt. Die Mäuse erhielten das in Freiburg vorhanden Futter auch weiterhin in den Einrichtungen der FEM der Charité (Kliba NAFAG, Rinaustrasse 380, CH - 4303 Kaiseraugst, Schweiz), und wurden darüber hinaus per IVC - Haltung gehalten ("individual ventilated cages"). Zur Kontrolle der Experimente wurden stets passende alters -, und geschlechts - gleiche C57BL/6NTac Mäuse, von Taconic Biosciences GmbH (Marie - Curie - Strasse 10, 51377 Leverkusen, Deutschland) bestellt.

Behördliche Genehmigung der Tierversuche

Aktenzeichen (Datum) = T0017/18 (2018), T0032/19 (2019), G0158/19 (2019), T-CH 006/20 (2020).

c. RNS - Isolation

RNS - Isolation ohne Phase Lock Tubes

Die Mäuse wurden per Isofluran anästhesiert, und darauffolgend per zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die Mäuse zur Entfernung des Blutes perfundiert. Dies geschah nach longitudinaler Eröffnung des Thorax, welcher zuvor mit Alkohol desinfiziert wurde, mit Hilfe einer Butterfly - Kanüle und einer 50 ml Spritze, indem über den linken Ventrikel PBS durch die systemische Perfusion gegeben wurde, bis die Leber vollständig entfärbt war. Nun folgte die Organentnahme, und die Zwischenlagerung in flüssigem Stickstoff.

Zur weiteren Verarbeitung wurden etwa 50 mg Gewebe zusammen mit 500 µl TRIzol™ durch eine sterile Keramik Kugel in einem MP - FastPrep®-24 - Gefäß mit einem MP - FastPrep®-24 zerkleinert. Und anschließend für etwa 1 h bei -80 °C gelagert. Falls mit sortierten Zellen gearbeitet wurde, so wurden diese nach Zell - Markierung mit

Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung für mindestens 1 h direkt bei -80 °C gelagert.

Nach dem Auftauen wurde die nun entstandene Suspension in ein neues 1,5 ml Eppendorf® - Gefäß überführt und mit TRIzol™ auf 500 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde mindestens 20 mal invertiert und bei 15.000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die sich bildende wässrige Interphase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf® - Gefäß mit geringer Oberflächenhaftung überführt. Nachdem 2 µl LPA hinzugegeben wurde kurz gevortext, dann 350 µl Isopropanol beigefügt, und die gesamte Suspension für eine Stunde zur Präzipitation bei -80 °C gelagert. Nach Ablauf der Stunde wurde für 20 min mit 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert, das Isopropanol vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne das entstandene Pellet zu verlieren, und dann 500 µl eiskaltes 75 % Ethanol hinzugegeben. Darauf erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (15 min, 10.000 g, 4 °C) und das Ethanol wurde vorsichtig mit Pipette, um das Pellet nicht zu verlieren, entfernt. Um den Rest Ethanol verdampfen zu lassen wurde das Eppendorf® - Gefäß für einige Minuten (unter optischer Kontrolle) steril gelagert. Das Pellet (mit der enthaltenen RNS) wurde mit 13 µl sterilem Wasser resuspendiert.

RNS - Isolation mit Phase Lock Tubes

Diese Prozedur gleicht der oben beschriebenen Prozedur, beinhaltet nur zusätzlich die Verwendung von Phase Lock Tubes, welche ein Gel zur besseren Separation der wässrigen Interphase (Trennung von festen und flüssigen Bestandteilen) enthalten. Die Phase Lock Tubes wurden vorab bei 4 °C für 5 min bei 15.000 g zentrifugiert (damit das Gel am Boden des Gefäßes ankommt). Dann wurden 500 µl der TRIzol™ Suspension hinzugefügt und gleich wie oben verfahren.

d. NanoDrop™ - Messung der RNS - Konzentration und - Reinheit

Zur Messung der RNS - Konzentration und - Reinheit wurde ein NanoDrop™ Spektrophotometer verwendet. Hierbei wurde zunächst 1 µl des zur Lösung der RNS verwendeten sterilen H₂O als Null - Abgleich verwendet und darauffolgend jeweils 1 µl RNS (der 13 µl Suspension aus RNS in sterilem H₂O) auf den Messpunkt der Spektrophotometers pipettiert. Anschließend wurde die Absorption unter anderem bei 260 nm und 280 nm gemessen und der 260 / 280 - Quotient gebildet. Eine Ratio ab nahe 1,8 und somit hoher Reinheit der RNS wurde akzeptiert. Von der Messung bei 260 nm

wurde die Konzentration abgeleitet. Um eine hohe Genauigkeit zu erzielen wurden Proben so lange verdünnt bis die Konzentration bei 100 bis 150 ng / μ l lag, um Messungenauigkeiten des NanoDrop™ Spektrophotometers im hoch konzentrierten Bereich zu vermeiden.

e. cDNS - Produktion

Um aus der isolierten RNS anschließend cDNS zu gewinnen, welche per qPCR detektiert werden kann, wurde das Thermo Fisher cDNS Produktions Kit verwendet.

Hierfür wurden 10 μ l der isolierten RNS verwendet, welche insgesamt nicht mehr als 1 bis 1,5 μ g RNS enthalten sollten (Sättigungsgrenze der im Kit verwendeten Enzyme). Zu jedem Ansatz wurde dann 2 μ l 10x RT Buffer, 0,8 μ l 25x dNTP Mix, 2 μ l 10x RT Random Primers, 1 μ l MultiScribe Reverse Transkriptase, 1 μ l RNase Inhibitor und 3,2 μ l Nuklease freies Wasser hinzugegeben.

Die Ansätze wurden dabei in 50 μ l Mini - Eppendorf® Reihen angesetzt, damit Sie in den Thermo - Cycler passten. Dieser wurde anschließend wie folgt betrieben: 10 min 25 °C, dann 120 min 37 °C zur Amplifizierung und abschließend 85 °C für 5 sec, bevor dann bis zur Weiterverarbeitung auf 4 °C herabgekühlt wurde.

f. qPCR

Um die relative Expression der diversen Gene in Bezug auf ein stetig gleichbleibendes Haushaltsgen zu quantifizieren wurde die Methode der quantitativen Polymerase Kettenreaktion verwendet.

Hierbei wurde entweder mit SYBR™ Green Reagenzien oder mit TaqMan™ - Assays gearbeitet.

Dabei wurden 2 μ l der cDNS, welche etwa 50 ng / μ l an cDNS enthielten zusammen mit 8 μ l des fertig gemischten Master Mixes (entweder SYBR™ Green oder TaqMan™) in einer 384 - Loch Platte zusammengeführt. Der gemischte SYBR™ Green Master Mix enthielt dabei pro Ansatz 0,5 μ l der Forwärts - und 0,5 μ l der Rückwärts - Primer, sowie 5 μ l der Power SYBR™ Green Master Mix Reagenz und 2 μ l steriles H₂O. Der gemischte TaqMan™ Master Mix enthielt 0,5 μ l des jeweiligen genspezifischen TaqMan™ - Assays, 5 μ l des TaqMan™ Universal Master Mix II und 2,5 μ l an sterilem H₂O. Die benutzten Primer Sequenzen, sowie die verwendeten TaqMan™ - Assays sind den Materialien zu entnehmen. Zur Durchführung der qPCR wurde das QuantStudio™ 5 Real - Time PCR

System benutzt, die durchgeführten Programme waren wie folgt: Für TaqMan™ = eine "Hold Stage" von 2 min bei 50 °C und folgend 10 min bei 95 °C, sowie eine sich anschließende "PCR Stage" von 15 sec bei 95 °C und dann 1 min bei 60 °C, während welcher die Signalstärke der Fluoreszenz registriert wurde, diese "PCR Stage" wurde 40 - Fach wiederholt. Für SYBR™ Green war das Programm identisch, jedoch schloss sich an die "PCR Stage" noch die "Melt Curve Stage" an, welche mit 15 sec 95 °C begann, dann 1 min auf 60 °C abkühlte und dann erneut 15 sec auf 95 °C erhitze. Die resultierende Schmelzkurve (nur bei SYBR™ Green) wurde zur Beurteilung der Spezifität der Primer herangezogen (ob nur ein Produkt elongiert wurde). Die ermittelten CT Werte (cycle threshold = Zyklusschwelle, also der Zykluswert, an welchem die vordefinierte Fluoreszenzstärke überschritten wurde), wurden zur weiteren Analyse der Expression mithilfe der 2^{-ΔCT}-Methode verwendet. CT Werte sollten dabei zwischen 22 und 30 liegen, waren Sie weit über 30, so war dies ein Hinweis für schlechte RNS / cDNS - Qualität, und der Wert wurde für weitere Analysen nicht verwendet.

g. 2^{-ΔCT} - Methode

Die Expressionslevel der einzelnen Gene wurden mithilfe der 2^{-ΔCT} - Methode errechnet. Dabei normalisiert man den CT - Wert des zu untersuchenden Genes mit Hilfe eines permanent gleich exprimierten Haushaltsgenes. Man bestimmt folglich per qPCR aus der vorliegenden cDNS den CT - Wert des zu untersuchenden Genes, und den CT - Wert des Haushaltsgenes, welches unter diversen Konditionen in seiner Expression nicht verändert wird. Wir wählten *Hprt* (kodierend für HPRT = Hypoxanthin - Guanin - Phosphoribosyltransferase) als nahezu konstantes Haushaltsgen, welches breite Anwendung in der Wissenschaft findet. Bei der 2^{-ΔCT} - Methode bildet man erst die Differenz der CT Werte der Gene (CT_{Gen} - CT_{Hprt}), welche dann das ΔCT darstellt, und rechnet anschließend 2^{-ΔCT}. Es resultiert ein Wert, welcher entweder größer als 1 (stärkere Expression als das *Hprt*), gleich (gleiche Expression) oder kleiner als 1 ist (geringere Expression als das *Hprt*). Wichtiger ist jedoch die Vergleichbarkeit dieser Werte untereinander, also mit Expressionsmustern zwischen einzelnen Konditionen ("Steady State" vs. "stimuliert" vs. "infiziert"). Um Unterschiede in der Expression zu visualisieren und zu testen, wurde das GraphPad Prism 8 Programm verwendet.

h. Protein - Isolation

Es wurde wie in RNS - Isolation ohne Phase Lock Tubes verfahren, bis die Organe in 1,5 ml Eppendorf® - Gefäßen in flüssigem Stickstoff lagerten.

Zunächst wurden 30 µl Protein Homogenisations Puffer in 1,5 ml Eppendorf® - Gefäße (A) gegeben. Dann wurden etwa 10 - 50 mg flüssig - gefrorenes Gewebe in andere 1,5 ml Eppendorf® - Gefäße (B) gegeben und mit einem Glas - Stößel (der davor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde) homogenisiert, bis ein Knacken zu hören war, woraufhin die Gefäße auf Eis gelagert wurden. Nachdem 40 µl an Protein Homogenisations Puffer hinzugefügt wurden, wurde kurz gewartet bis der sofort frierende Puffer wieder aufgetaut war. Dann wurde erneut auf Eis vorsichtig homogenisiert und anschließend der Stößel mit 20 µl Protein Homogenisations Puffer abgewaschen. Danach wurde für 15 sec gevortext und kurz zentrifugiert, woraufhin die 60 µl aus den Tubes B (mit dem homogenisierten Gewebe) in die 30 µl in Tubes A überführt wurden. Diese wurden dann für 60 min auf Eis inkubiert. anschließend wurde bei 4° C für 30 min mit 14.800 rpm zentrifugiert und der Überstand (welcher die Proteine enthielt) vorsichtig in ein neues 1,5 ml Eppendorf® - Gefäß überführt. Diese Tubes wurden auf Eis gelagert bis sie entweder eingefroren wurden oder für Weiteres verwendet wurden (Bradford - Assay oder Western Blot).

i. Bradford - Assay

Dieser Assay wurde verwendet, um die Protein Konzentrationen der in Protein - Isolation erhaltenen Lysate zu bestimmen, damit später eine definierte Menge an Proteinen in die Taschen des Gels für den Western Blot geladen werden konnten.

Dafür wurde in einer 48 - Loch Platte mit flachem Boden, pro Loch eine Reaktion für ein Protein - Lysat angesetzt. Hierfür wurde zunächst 1 µl des Protein - Lysates mit 4 µl PBS vermischt, in der negativen Kontrolle wurde 1 µl des Protein Homogenisations Puffers, anstatt der 1 µl des Protein - Lysates, verwendet. Die entstehenden 5 µl wurden dann mit 250 µl Bradford - Reagenz vermischt. Unter Abschirmung von Licht wurde die ablaufende Reaktion dann bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Dabei kommt es zu einer Komplexbildung der Proteine mit dem Triphenylmethan - Farbstoff Coomassie - Brillant - Blau G-250 (CBBG), und dessen Stabilisation in einem Zustand mit dem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Nach den 10 min wurde noch einmal durch Pipettieren homogenisiert und Luftblasen entfernt, bevor die Absorption bei 595 nm am

Photospektrometer: Tecan Infinite M Plex (Mikroplatten - Lesegerät), mit Hilfe der i-control™ 2.0 Software, gemessen wurde. Um aus diesen Messwerten nun Konzentrationen zu errechnen, wurde zunächst eine Standardkurve mit klar definierten Protein Konzentrationen angefertigt. Aus dieser Kurve wurde eine Formel errechnet, mit deren Hilfe man wiederum, ausgehend von der Absorptionsstärke der jeweiligen Protein - Lysate, auf Ihre Konzentration rückrechnen konnte.

j. Western Blot

Die Methode des Western Blots wurde verwendet, um Proteine Ihrer Länge / Größe nach aufzutrennen, sie dann auf eine Membran zu übertragen und sichtbar zu machen. Hierfür wurden zunächst Gele angefertigt. Für das molekulare Gewicht der untersuchten Proteine (ERMIN kodiert durch *Ernm* = 42 kDa beobachtet und 32 kDa kalkuliert, sowie die β 2 Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalium - Kanals, kodiert durch *Kcnab2* = 38 kDa beobachtet und 39,544 kDa kalkuliert) wählten wir ein 10 %iges Tris - Glycin - SDS - Polyacrylamid - Resolving - Gel für die Elektrophorese (siehe Materialien und Methoden), welches mit einem 5 %igen Tris - Glycin - SDS - Polyacrylamid - Stacking - Gel (welches die Taschen enthielt) überschichtet wurde. Diese wurden in Vorrichtungen der Firma Bio - Rad gegossen und ausgehärtet.

Anschließend wurde errechnet wieviel μ l der Protein - Lysate für 30 μ g Proteine benötigt wurden (mit Hilfe der Konzentration aus dem Bradford - Assay). Dazu wurde 1 μ l DTT gegeben, und auf 10 μ l mit PBS aufgefüllt. Zu diesen 10 μ l wurde dann 10 μ l Laemmli - 2x - Puffer / Lade - Puffer gegeben, so dass 20 μ l pro Probe resultierten, welche für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt wurden.

Danach wurden die Elektrophorese - Kammern vorbereitet, diese waren von Bio - Rad. Die selbst angefertigten Gele wurden dafür zunächst, aus der Guss - Vorrichtung, ausgepackt und in die Vorrichtungen der Elektrophorese - Kammer eingespannt, welche dann mit 500 ml Lauf - Puffer gefüllt wurden.

Nun wurden die Taschen des Gels beladen. In die erste Tasche von einer Proben - Reihe wurden dabei 7 μ l der Protein - Leiter geladen, in die folgenden Taschen die 20 μ l jeder Probe. Anschließend wurde die Kammer geschlossen, und an die Maschine der Stromversorgung angeschlossen. Folgend wurden 120 V eingestellt und das Gel für etwa 45 min bis 1 h laufen gelassen, bis der Farbstoff des Laemmli - 2x - Puffers durch das Gel gelaufen war.

Im folgenden Schritt wurden dann die aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen ("Blotting"). Dafür wurden 3 (an die Größe des Gels angepasste) Whattmann Filterpapiere auf die herausnehmbare Unterseite (hier befindet sich die Kathode) der Blotting Maschine gelegt und mit Transfer - Puffer getränkt. Danach wurde die Nitrozellulose - Membran, welche ebenfalls an die Größe des Gels angepasst wurde, aufgelegt, und ebenfalls mit Transfer - Puffer befeuchtet. Nun wurde das Gel aufgelegt, und von oben erneut mit 3, mit Transfer - Puffer getränkten, Whattmann Filter Papieren bedeckt. Dann wurde der Stapel aus Papier - Membran - Gel - Papier mit einer Rolle ausgerollt, um Luftblasen zu beseitigen, bevor die ebenfalls herausnehmbar Anode aufgelegt wurde. Die nun fertig (insgesamt herausnehmbare) Vorrichtung wurde abgedichtet, überschüssiger Puffer herausgepresst, und im Trans-Blot® Turbo™ - Gerät (Blotting Maschine) per Bio - Rad - StandardSD - Programm übertragen. Danach sollten die Banden der Leiter auf die Membran übertragen worden sein (und analog dazu die nicht - sichtbaren Proteine). Dabei sollten die Banden der Leiter bzw. die Proteine nicht zu weit (in die Filterpapiere) oder zu kurz (noch im Gel) gewandert sein.

Als nächster Schritt folgte das Blocken der Membran. Hierfür wurde spezielle schwarze Block - Boxen verwendet. In diesen Boxen wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 ml Block - Puffer inkubiert.

Dieser wurde dann verworfen und es wurde 3 mal für 15 min mit PBST gewaschen. Dann wurde der primäre Antikörper, welcher das zu detektierende Protein markiert, hinzugegeben. Dieser primäre Antikörper war in einer Lösung von 1 % Milch in PBS in einer Konzentration von 1:1000 gelöst (sowohl für ERMIN als auch für die $\beta 2$ Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalium - Kanals). Es wurde zunächst 1 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4° C, jeweils auf einem Shaker inkubiert.

Am zweiten Tag des Protokolls wurde nachdem die AK - Lösung entfernt wurde 3 mal für 15 min mit PBST gewaschen, und dann für eine Stunde der sekundäre Antikörper, welcher den primären Antikörper markiert, hinzugeben. Dieser war in 1 % Milch in PBS gelöst. Für den ERMIN - AK, welcher murinen Ursprungs war wurde 1:10.000 anti - Maus - HRP, für den Kcnab2 - AK, welcher aus dem Hasen stammt, 1:10.000 anti - Hase - HRP gewählt. Dies wurde nun 90 min bei Raumtemperatur auf einem Shaker inkubiert, bevor noch einmal 3 mal mit PBST für 15 min gewaschen wurde. Dann wurde im ChemiDoc™ entwickelt.

Die Arbeitsplatte des ChemiDoc™ wurde dabei zunächst sorgfältig gesäubert und dann Frischhaltefolie darauf ausgebreitet. Danach wurden die ECL Reagenzien A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und kurz gevortext, wobei für einen Blot 1 ml genommen wurden. Mit einer geknickten flachen Pinzette wurden dann die Blots genommen, mit Tüchern an der Ecke überschüssiges PBST vorsichtig aufgesaugt, und auf die Frischhaltefolie, welche auf der Arbeitsplatte des ChemiDocs™ lag, platziert. Anschließend wurde die gemischte ECL - Flüssigkeit zugegeben und der ablaufenden Reaktion 2 min gegeben. Nun wurde die Frischhaltefolie geschlossen, und die Arbeitsplatte in den ChemiDoc™ geschoben. Der ChemiDoc™ wurde eingeschaltet, und ein manuelles Programm eingestellt, welches für 10 min alle 15 sec ein Bild macht. Im Anschluss wurden dann diejenigen Bilder, welche den Blot am besten zur Darstellung brachten, ausgewählt.

k. Gewebe - Isolierung, - Einbettung und - Schneiden

Histologie per Immunfluoreszenz wurde in dieser Studie verwendet, um den Knock - Out der Proteine in den verwendeten Mäusen zu bestätigen. Zum Nachweis des Knock - Outs wurden zunächst auf <https://www.ensembl.org/index.html> diejenigen Gewebe herausgesucht, in welchen die Expression der jeweiligen Gene bereits nachgewiesen wurde bzw. stark war, da dies ein guter Hinweis für eine nachweisbare Konzentration des Proteins und damit ein sichtbares Signal in der Immunfluoreszenz war.

Für die *Ernm* Knock - Out - Mäuse wählten wir das Gehirn, für die *Kcnab2* Knock - Out Mäuse auch das Gehirn, zusätzlich aber noch das Herz.

Die Mäuse wurden per Isofluran Überdosis und anschließender zervikaler Dislokation euthanasiert. Anschließend wurden die Mäuse wie in RNS - Isolation ohne Phase Lock Tubes perfundiert, um das Blut aus den Geweben zu entfernen. Für die Entnahme des Gehirns wurden die Mäuse auf das Abdomen gelegt, dann die Haut hinter dem Schädelknochen quer eröffnet und mit Zug nach rostral, begleitet durch lockernde Inzisionen in die Subkutis das Fell über den Kopf gesteuert. Nun lag der Schädelknochen frei, zunächst wurde der Hals durchtrennt und dann am Foramen magnum von okzipital nach frontal der Schädel entlang der Sagittalebene mit Präparierschere eröffnet. Dabei war stets wichtig möglichst nah am Knochen zu bleiben, um das unten unmittelbar anliegende Gehirn nicht zu beschädigen. Die nun in der Mitte durchtrennten Schädelplatten wurden nach lateral weggeklappt, und so lag das Gehirn frei.

Verbleibende Verbindungen zum Schädelknochen (v. a. Sehnerv und Hörnerv) wurden sorgfältig gelöst und dann das Gehirn mit Teilen der Medulla oblongata vorsichtig

entnommen. Für die Entnahme des Herzens wurden nach der Perfusion die anhängenden Gefäße abgetrennt (Aorta, Arteria pulmonalis, Venae pulmonales sowie die beiden Venae cavae).

Das entnommene Gewebe wurde dann für 24 h in 2 ml 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) in einem 15 ml Falcon Tube bei 4 °C gelagert. Danach kurz in PBS in einer großen Petrischale gewaschen und in neue 15 ml Falcon Tubes mit 4 ml 30%iger Sucrose überführt und dort bei 4 °C belassen bis das Gewebe abgesunken war. Anschließend wurde das Gewebe so geschnitten, und dann eingebettet, dass nach dem Schneiden dann die gewünschte Schnittebene auf dem Objektträger platziert werden konnte. Hierfür wurde das Gewebe mit Skalpell zurechtgeschnitten und dann in Einweg - Vinyl - Probenform platziert, mit OCT (optimal cutting temperature) - Verbindung eingebettet und danach bei -20 °C gelagert bis die OCT - Verbindung fest geworden war. Die gefüllten Probenformen wurden anschließend auf Trockeneis zu iPATH.Berlin (Charité - Campus Benjamin Franklin, Haus 5011, Raum E812, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin) gebracht, und dort per Mikrotom auf 10 µm geschnitten und auf Objektträger platziert. Die Schnitte auf den Trägern wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

I. Immunfluoreszenz

Hierfür wurden die von iPATH.Berlin angefertigten 10 µm dicken Schnitte, welche dort bereits auf Objektträger aufgebracht worden waren aus dem -20 °C Tiefkühler genommen und für 2 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach erfolgte die Fixierung für 10 min in -20 °C kaltes Aceton. Dabei kam es zur Keton - Querverbindung der Peptide und damit der Fixierung der Antigene. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet, und in eine befeuchtete Dunkelkammer überführt (alle weiteren Schritte erfolgten dann stets im Dunkeln). Danach erfolgte eine zweimalige 5 - minütige Inkubation in 50 mM Glycin (verdünnt in deionisiertem H₂O), bevor 3 mal für 5 min mit PBS gewaschen wurde. Nun folgte eine 30 - minütige Inkubation in 0,5 % Saponin, welches für ein Aufbrechen der Zellmembranen sorgte, um so intrazelluläre Antigene einer Färbung zugänglich zu machen. Anschließend wurde erneut 3 mal für 5 min mit PBS gewaschen, bevor mit dem Blocken begonnen wurde. Damit nun die auf den Schnitten verteilten Flüssigkeiten nicht nach lateral abfließen konnten, wurde der Gewebeschnitt auf dem Objektträger mit hydrophobem Stift umrandet. Für das Blocken von unspezifischen Bindungen, wurde Esel - Serum in 0,2 %igem PBST verdünnt, so dass eine Serum - Konzentration von 10 % resultierte, welche für 1 h auf die Schnitte

gegeben wurde. Nun wurde der primäre Antikörper (AK), welcher das gesuchte Antigen / Protein bindet hinzugegeben. Dieser wurde in 10 %igem Esel - Serum verdünnt, und pro Schnitt wurden 150 µl verwendet. Für den ERMIN - AK wurde eine Konzentration von 1:1000, für den Kcnab2 - AK ebenfalls eine Konzentration von 1:1000 verwendet. Nun wurde erst für 1 h bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert.

An Tag 2 wurde zunächst 3 mal mit PBST für 10 min gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper hinzugegeben, dieser war mit einem Fluorochrom, welches im Fluoreszenz - Mikroskop sichtbar gemacht werden konnte, markiert, und band spezifisch an den primären AK. Der ERMIN - AK war murinen Ursprungs, der Kcnab2 - AK aus dem Hasen, weshalb anti - Maus - bzw. anti - Hase - sekundäre - AK verwendet wurden. Des Weiteren wurden sekundäre AK verwendet, welche aus dem Tier gewonnen wurden, dessen Serum zum Blocken benutzt wurde (in dieser Studie Esel). Diese waren in einer Konzentration von 1:500 in 10 % Esel - Serum verdünnt und pro Schnitt wurden 150 µl verwendet und für 1 h inkubiert. Danach wurde 3 mal für 5 min mit PBST und folgend 3 mal für 5 min mit PBS gewaschen, bevor die Zellkernfärbung stattfand. Diese erfolgte für 5 min mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS, wobei pro Schnitt 500 µl verwendet wurden. Nach Ablauf dieser 5 min wurde einmal für 5 min mit PBS gewaschen, dann für 2 min deionisiertes H₂O hinzugefügt. Nun wurden die seitlichen Ränder des Objektträgers leicht abgetrocknet, auf den Schnitt ein Tropfen "mounting medium" (Eindeckmedium) gegeben, und dann ein Deckgläschen aufgebracht. Die fertigen Objektträger wurden an der Luft für etwa 15 min getrocknet, bevor dann die Darstellung unter dem Fluoreszenz - Mikroskop erfolgte.

m. Immunzell - Isolation

i. Immunzell - Isolation aus der Lamina propria des Dünndarms

Die Mäuse wurden per Isofluran Überdosierung und zervikaler Dislokation euthanasiert. Zur Entnahme des Dünndarms wurde das Fell über dem Abdomen mit Alkohol desinfiziert, die abdominal Höhle longitudinal eröffnet und der Zugang nach lateral erweitert. Zur Entnahme des Dünndarms wurde kurz hinter dem Magen (etwa auf Höhe des Pylorus) abgeschnitten. Anschließend wurde unter leichtem Zug, gehalten an einer Pinzette, der Dünndarm von proximal nach distal entwickelt. Mit einer zweiten Pinzette wurde dabei das mesenterische Fettgewebe zurückgehalten, und ließ sich dabei gut vom Darm ablösen. Kurz vor dem Zäkum wurde der Dünndarm dann abgesetzt.

In 6 - Loch Platten, gefüllt mit eiskaltem PBS, gelagert auf Eis, wurden die Därme gesammelt. Zur weiteren Verarbeitung wurde überbleibendes Fett mit Pinzetten abgezupft, und mit einer Sezierschere die Peyer - Patches ausgeschnitten. Danach wurde der Darm auf Zellstoff / Papier gelegt, in 3 Stücke unterteilt und mit abgeknickter Sezierschere longitudinal aufgeschnitten, und leicht im zugehörigen Loch der 6 - Loch Platte ausgewaschen.

Die resultierenden Stücke wurden jeweils in 50 ml Falcon - Tubes mit 20 ml eiskaltem PBS gesammelt, und mehrmals invertiert (um überbleibenden Stuhl zu entfernen). Danach wurden die Stücke pro Maus in neuen 50 ml Falcon - Tubes, welche jeweils 10 ml Zell - Dissoziations - Lösung enthielten überführt und für 15 min bei 37 °C und 180 rpm 45 ° schräg im Shaker inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde für mindestens 15 sec stark gevortext. Die alte Zell - Dissoziations - Lösung wurde entfernt, und erneut 10 ml neue Zell - Dissoziations - Lösung hinzugegeben sowie für 15 min bei 37 °C und 180 rpm 45 ° schräg im Shaker inkubiert. Danach wurde erneut stark gevortext, der Überstand verworfen, und die Stücke Dünndarm in eine Petrischale überführt, in welcher sie zunächst mit einer Sezierschere klein geschnitten wurden und dann mit Skalpell kleingehackt, um so die Angriffsfläche für die Enzyme zur Digestion / Verdauung zu maximieren. Danach folgte die Verdauung, hierfür wurde der nun klein gehackte Darm mit 5 ml Verdauungs - Lösung (A) in einem neuen 50 ml Falcon - Tube zusammengeführt. Dies wurde für 20 min bei 37 °C und 180 rpm 45 ° schräg im Shaker inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde für mindestens 15 sec stark gevortext, und der Überstand gesammelt, indem er durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert wurde, und in einem neuen 50 ml Falcon - Tube auf Eis aufgefangen und zwischengelagert wurde. Die oben im Sieb zurückbleibenden Dünndarm - Gewebefragmente wurden erneut in das 50 ml Falcon - Tube (der Verdauung) gegeben und erneut mit neuen 5 ml der Verdauungs - Lösung (A) für 20 min bei identischen Bedingungen im Shaker inkubiert. Danach wurde wie zuvor verfahren (Vortexen, Filtern). Diese Verdauung wurde insgesamt 3 mal durchgeführt. Nach Abschluss des letzten Verdauungsschrittes, wurden die Zellen bei 1500 rpm und 4 °C für 5 min in der Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml 40 % Percoll resuspendiert. In neuen 15 ml Falcon Tubes wurde unten 5 ml 80 % Percoll eingegeben, und dann diese 80 % Percoll mit der Mischung aus Zellen und 40 % Percoll sehr vorsichtig überschichtet. Diese 15 ml Falcon - Tubes, gefüllt mit den beiden Schichten wurden für 20 min bei 2500 rpm (ohne Bremse) und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das oben aufschwimmende Fett und der Debris vorsichtig

mit einer 2,5 ml Pasteur - Pipette abgenommen. Anschließend wurde mit einer neuen 2,5 ml Pasteur - Pipette der Leukozyten - (Immunzell -) Ring, welcher sich in der Interphase zwischen dem 80 %igem und 40 %igem Percoll angereichert hatte, vorsichtig gewonnen. Diese Leukozyten wurden nun in neue 15 ml Falcon - Tubes, gefüllt mit 10 ml PBS, zum Auswaschen des Percolls gegeben, und für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet im Rest - PBS, welches im Tube nach dem Abgießen zurückgeblieben war auf eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt. Dort wurden die einzelnen Zellen der unterschiedlichen Mäuse in eigenen Löchern gesammelt, bis wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung verfahren wurde.

ii. Immunzell - Isolation aus der Lunge

In Experimenten, in welchen die Lunge untersucht wurde, wurden stets zuvor Organe, wie beispielsweise der Dünndarm aus der Abdominalhöhle entfernt, weshalb die ersten Schritte vergleichbar mit Immunzell - Isolation aus der Lamina propria des Dünndarms sind. Nachdem nun der Dünndarm, bzw. die mesenterischen Lymphknoten (wie in Immunzell - Isolation aus den mesenterischen Lymphknoten) entfernt wurden, wurde von abdominal her der Thorax, beginnend vom Processus xiphoideus nach Lateral zum Schultergelenk auf beiden Seiten, mit Hilfe einer Sezierschere eröffnet. Dies wurde gemacht, damit auf der Rückfläche des resultierenden medialen 3 - Eck - förmigen Thorax - Stückes der Thymus unversehrt zum Liegen kommt, eindeutig identifiziert werden kann und so keinesfalls mit in das Resektat der Lunge gelangt, da die massive Leukozytenzahl im Thymus die weiteren Analysen verfälschen würde. Nun wurde von kaudal das Zwerchfell weiter ab präpariert, damit die Thoraxhöhle von kaudal gut einsehbar war, das Herz wurde entfernt, und mit Hilfe von Zellstoff für Blustille gesorgt. Anschließend wurde die Lunge entnommen, hierfür wurde einmal kaudal die Vena cava inferior und umgebendes Bindegewebe durchtrennt und folgend kranial die Trachea und die Vena cava superior, als auch das Umgebungsgewebe.

Daraufhin wurde die Lunge in einer 6 - Loch Platte oder einem 50 ml Falcon - Tube, gefüllt mit eiskaltem PBS zwischengelagert, bis alle Mäuse seziert waren. Durch leichtes Agieren der Lungen wurde Blut abgewaschen und mit Hilfe von Pinzetten und Sezierschere überschüssiges Gewebe entfernt.

Die Lungen wurden dann in Petrischalen überführt und mit Hilfe von Sezierschere in sehr kleine Stücke geschnitten. Diese wurde nun in ein 50 ml Falcon - Tube, gefüllt mit

10 ml Verdauungs - Lösung (A) überführt und für 45 min bei 37 °C und 180 rpm 45 ° schräg im Shaker inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurde sehr gut gevortext, und der Inhalt der Tubes in ein 70 µm Zellsieb, welches auf einem neuen 50 ml Falcon -Tube platziert war, gegeben. Im Sieb blieben die einzelnen, größeren, angedauten Lungenfragmente hängen, welche mit Hilfe von Stopfen aus 2 ml Spritzen, durch das Sieb gepresst wurden, durch mehrmaliges Nachspülen mit PBS wurde möglichst alles Gewebe durch das Sieb gebracht. Anschließend wurde wie bei Immunezell - Isolation aus der Lamina propria des Dünndarms, ab dem Punkt, bei welchem das dritte und letzte Mal die Verdauungs - Lösung nach dem Verdauungsschritt durch das Sieb gegeben wurde, verfahren (ebenfalls Konzentrierung der Immunezellen mit Percoll).

iii. Immunezell - Isolation aus den mesenterischen Lymphknoten

In Experimenten, in welchen die mesenterischen Lymphknoten untersucht wurden, wurden stets zuvor Organe, wie beispielsweise der Dünndarm aus der Abdominalhöhle entfernt, weshalb die ersten Schritte vergleichbar mit Immunezell - Isolation aus der Lamina propria des Dünndarms sind. Nachdem nun der Dünndarm entfernt wurde, wurde ausgehend vom Zäkum das dort anheftende mesenterische Gewebe mit einer Pinzette gefasst, und weiter nach distal vom Dickdarm durch leichten Zug ab präpariert, durch weiteren Zug und die Hilfe einer zweiten Pinzette wurden dann noch die Verbindungen zum Retroperitoneum, als auch zum Magen gelöst, so dass der Block bestehend aus mesenterischem Gewebe (inklusive Lymphknoten), Milz und Pankreas en toto entnommen werden konnte. Hier wurden unter optischer (opal - weiße Kapsel der Lymphknoten), sowie taktile (harte Kapsel) Kontrolle die mesenterischen Lymphknoten identifiziert, anschließend mit einer Pinzette präpariert und in eine 6 - Loch Platte oder ein 50 ml Falcon - Tube mit eiskaltem PBS überführt. Dort wurde leicht gewaschen und kontaminierendes Gewebe mit Pinzetten entfernt. Danach wurden die Lymphknoten in kleine Petrischalen überführt und mit Skalpell mehrmals die Kapsel eingeschnitten, so dass die Enzyme der Verdauung in die Lymphknoten eindringen können (die intakte Kapsel kann kaum verdaut werden). Das Gewebe wurde nun mit 5 ml Verdauungs - Lösung (B) in einem 15 ml Falcon - Tube zusammengegeben und für 30 min bei 37 °C und 180 rpm 45 ° schräg im Shaker inkubiert. Danach wurde für mindestens 15 sec stark gevortext und mit einer 2,5 ml Pasteur - Pipette 40 mal hoch und runter pipettiert. Danach wurde durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert, und 5 min bei 4 °C und 1500 rpm die Zellen

pelletiert. Dann wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und bei 4 °C für 5 min mit 1500 rpm erneut zentrifugiert und so die Zellen gewaschen. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, wovon 250 µl auf eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt wurden. Dort wurden die einzelnen Zellen der unterschiedlichen Mäuse in eigenen Löchern gesammelt, bis wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung verfahren wurde. Des Weiteren wurden die Zellen nach der Resuspension in 1 ml PBS wie in Zell - Zählung gezählt.

iv. Immunzell - Isolation aus dem perigonadalen / epididymalen Fettgewebe

In Experimenten, in welchen das Fettgewebe untersucht wurden, wurden stets zuvor Organe, wie beispielsweise der Dünndarm und die mesenterischen Lymphknoten aus der Abdominalhöhle entfernt, weshalb die ersten Schritte vergleichbar mit Immunzell - Isolation aus der Lamina propria des Dünndarms und Immunzell - Isolation aus den mesenterischen Lymphknoten sind. Nachdem nun Dünndarm und Mesenterium mit den Lymphknoten entfernt wurden, wurde bei männlichen Tieren aus dem kaudalen Teil der Bauchhöhle mit einer Pinzette die Hoden und Nebenhoden gegriffen und nach kranial verlagert. Nun konnte das, die inneren Geschlechtsorgane umgebende, Fettgewebe vorsichtig abgezupft werden. Bei weiblichen Tieren wurden der Uterus und die Eileiter identifiziert und das, zwischen ihnen befindliche, Fettgewebe vorsichtig gewonnen. Das entnommene Fettgewebe wurde in eiskaltes PBS in eine 6 - Loch Platte oder 50 ml Falcon - Tubes mit eiskaltem PBS überführt. Dort wurde leicht gewaschen und kontaminierendes Gewebe mit Pinzetten entfernt. Das Gewebe wurde dann mit 5 ml Verdauungs - Lösung (B) in einem 15 ml Falcon - Tube zusammengegeben und für 45 min bei 37 °C und 180 rpm 45 ° schräg im Shaker inkubiert. Danach wurde für mindestens 15 sec stark gevortext und mit einer 2,5 ml Pasteur - Pipette 40 mal hoch und runter pipettiert. Danach wurde durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert, dabei war es wichtig, dass verdaute Gewebe nicht mechanisch durch das Sieb zu drücken, um so im Fettgewebe enthaltene Lymphknoten durch das Sieb herauszufiltern. Folgend wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C und 1500 rpm pelletiert. Dann wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und bei 4 °C für 5 min mit 1500 rpm erneut zentrifugiert und so die Zellen gewaschen. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 250 µl

PBS resuspendiert, und auf eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt. Dort wurden die einzelnen Zellen der unterschiedlichen Mäuse in eigenen Löchern gesammelt, bis wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell Sortierung verfahren wurde.

v. Immunzell - Isolation aus der Milz

Die Milz der Mäuse wurde für die Experimente dieser Studie lediglich zur Kompensation von Farben für die Durchflusszytometrie verwendet.

Dabei wurden zunächst die relevanten Organe entnommen (siehe Immunzell - Isolation aus der Lamina propria des Dünndarms, Immunzell - Isolation aus der Lunge, Immunzell - Isolation aus den mesenterischen Lymphknoten und Immunzell - Isolation aus dem perigonadalen / epididymalen Fettgewebe), und anschließend die Milz. Diese wurde zumeist bis die anderen Organe weiter prozessiert wurden in einem 50 ml Falcon - Tube in eiskaltem PBS gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurde dann die Milz in ein 70 µm Zellsieb auf einem 50 ml Falcon - Tube gelegt und mit einem Stopfen aus 2 ml Spritzen, durch das Sieb gepresst. Dabei wurde mehrmals mit PBS nachgespült, bis die meisten Immunzellen das Sieb passiert hatten, und lediglich das retikuläre Bindegewebe im Sieb verblieb. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 1500 rpm und 4 °C pelletiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 1 ml Erythrozyten - Lyse - Puffer gelöst, und für 3 min inkubiert. Durch die Zugabe von 9 ml PBS wurde die Lyse beendet, und folgend die verbleibenden Zellen (darunter sehr viele Leukozyten) pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 3 ml PBS gelöst. Pro Milz enthielt eine derartige Suspension etwa 50×10^6 Zellen. Davon wurden je nach Bedarf etwa 200 µL pro Loch auf eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt. Dort wurden die einzelnen Zellen der unterschiedlichen Mäuse in eigenen Löchern gesammelt, bis wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung verfahren wurde.

n. Zell - Zählung

Zell - Zählungen wurden lediglich nach der Immunzell - Isolation aus den mesenterischen Lymphknoten angewandt, da hier die resultierende Zellzahl zu groß war, um die gesamte Probe per Durchflusszytometer zu analysieren.

Für die Immunzell - Isolation aus anderen Organen wurde nicht gezählt, sondern die gesamte Probe in entsprechender Verdünnung durch das Durchflusszytometer laufen lassen (wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell -

Sortierung). Und dann mit entsprechendem Vorwärts - und Seitwärts - Scatter die (Immun -) Zellen ausgegattet, und mit einem Live / Dead - Farbstoff überprüft, ob sie lebendig waren.

Für die Zählung wurden aus der nach der Immunzell - Isolation resultierenden Suspension 10 µl entnommen, und diese mit 90 µl PBS vermischt (1:10 Verdünnung), diese 100 µl wurden dann mit 100 µl Trypanblau vermischt (1:2 Verdünnung insgesamt dann also 1:20). Trypanblau kann dabei nur die Zellmembran von toten Zellen durchdringen, sie stellen sich unter dem Lichtmikroskop blau da. Von der resultierenden Mischung aus 200 µl wurden dann 10 µl genommen und in eine Neubauer Zählkammer überführt. Mit Hilfe einer Hand - Zählmaschine wurden dann die Zellen in mindestens 2 Großquadraten ausgezählt und dann der Mittelwert pro Großquadrat errechnet. Die Zellkonzentration ergab sich danach aus der Multiplikation von Verdünnungsfaktor (hier 20), dem Kammerfaktor (10^4) und der gezählten Zahl (Mittelwert für ein Großquadrat). Darüber hinaus wurde gezählt wie viele der Zellen sich blau darstellen, also durch Trypanblau gefärbt wurden, und somit Tod waren. Die Anzahl lebender Zellen geteilt durch die Anzahl aller Zellen stellte die Vitalität der Probe dar.

Um die gezählte Zahl zu verifizieren wurde in einigen Experimenten erneut mit Hilfe des LUNA - Gerätes, einem automatisierten Zellzähler, kontrolliert. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 80 µl PBS und 10 µl "Trypan Blue Stain 0,4 %" (zugehörig zum LUNA - Gerät) vermischt und dann in eine Einweg - Zählkammer des Herstellers gegeben, welche in das Gerät, zur automatischen Auszählung, eingeführt wurde.

o. Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung

Der Ausgangspunkt waren die Immunzellen, isoliert wie in Immunzell - Isolation, welche auf eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt worden waren, oder aber Zellen nach in vitro Stimulation in einer U - Boden - Zell - Kultur - 96 - Loch - Platte. Möglichst alle Schritte wurden auf Eis, und Alle, bei welchen Fluorochrom - bestückte Antikörper in der Platte waren wurden unter Abschirmung von Licht durchgeführt. Zunächst wurden die Antikörper - Mischungen vorbereitet. Hierfür wurden die Antikörper in vom Hersteller angegebenen Konzentrationen (vgl. Materialien) in PBS gelöst und bei 4 °C im dunklen gelagert, falls eine sekundäre Färbung mit Streptavidin nötig war, so wurde diese ebenfalls vorbereitet, der Fc - Block (gegen unspezifische AK - Bindungen) wurde dabei

stets in die primäre AK - Mischung gegeben. Dann wurden die Zellen herunter zentrifugiert (5 min 1500 rpm bei 4 °C) und in 100 µl AK - Mischung resuspendiert, und bei 4 °C für 45 min inkubiert. Nun erfolgte ein Waschschrift, dabei wurden die Zellen herunter zentrifugiert (5 min 1500 rpm bei 4 °C), anschließend der Überstand verworfen, und die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert, bevor direkt erneut mit denselben Einstellungen zentrifugiert wurde. Danach wurde erneut der Überstand verworfen und die Zellen entweder in 100 µl PBS resuspendiert, oder wenn eine sekundäre AK - Mischung mit Streptavidin nötig war in 100 µl dieser Mischung resuspendiert und unter gleichen Bedingungen wie zuvor, diesmal aber nur 15 min inkubiert. Dann wurde erneut erst gewaschen (zentrifugiert, Überstand verworfen, in 100 µl resuspendiert und erneut zentrifugiert, Überstand verworfen) bevor die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert wurden. Mit den in 100 µl PBS resuspendiert Zellen wurde dann weiter verfahren.

Zur reinen Analyse der Zellen wurde das BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer verwendet, und die Daten mit der BD FACSDiva Software aufgenommen und gespeichert. Zur Kompensation wurden Splenozyten (wie in Immunzell - Isolation aus der Milz) benutzt, welche entweder nicht markiert (zur Einstellung des Vorwärts - und Seitwärts - Scatters, sowie zur Abgleichung der unmarkierten Probe), oder mit nur einzelnen sehr gut funktionierenden Fluorochrom - AK (vorzugsweise CD4 (Klon = GK1.5 oder RM4-5) markiert waren. Für die Analyse der Zellen wurden die 100 µl Zellsuspension in den jeweiligen Löchern der Platte in ein FACS - Tube überführt und dann das Loch in der Platte mit 100 µl PBS nachgespült, und diese 100 µl ebenfalls in das Tube gegeben (um alle Zellen aus dem Loch zu übertragen). Das Durchflusszytometer wurde, um eine gute Qualität der Aufnahme zu garantieren, möglichst mit einer langsamen oder mittleren Durchflussgeschwindigkeit betrieben. In der Regel wurde die gesamte Probe aufgenommen, womit Rückschlüsse auf die gesamte Zellzahl in der Probe gewonnen werden konnten, nur bei den mesenterischen Lymphknoten, bei welchen die Zellzahl zu groß war, um alles aufzunehmen wurden in der Regel lediglich 1,0 oder 2,5 Mio. Events aufgenommen, und zusätzlich die Zellzahl wie in (Zell - Zählung) ausgezählt.

Falls die Zellen anhand der AK - Markierung spezifischen Fluorochrome sortiert werden sollten, so wurde der BD FACSAria™ III Zell Sortierer benutzt und die Daten mit der BD FACSDiva Software aufgenommen und gespeichert. Vorab musste hier die Probe aus der Platte durch ein 70 µm - Sieb in ein FACS - Tube gefiltert werden, und ebenfalls das

Loch der Platte dann mit 100 µl PBS nachgespült werden. Anschließend wurden die Zellen sortiert und abhängig vom weiteren Vorhaben dann divers weiterverarbeitet. Falls die Zellen für eine Kultur verwendet wurden, so wurden sie in 500 µl D10+ Medium aufgefangen und dann weiter wie in in vitro Stimulation verfahren, oder falls lediglich die RNS benötigt wurde, so wurden die sortierten Zellen in 500 µl TRIzol™ aufgefangen und dann wie in RNS - Isolation ohne / mit Phase Lock Tubes verfahren.

Die mit der BD FACSDiva Software aufgenommenen Daten (FCS - Dateien) wurden mit Hilfe der FlowJo™ Software dargestellt und analysiert (siehe FlowJo - Analyse und Gating Strategien).

p. *in vitro* Stimulation

Nachdem die Zellen wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung mit dem BD FACSAria™ III Zell Sortierer sortiert und in 500 µl D10+ Medium aufgefangen wurden, wurde zunächst anhand der Zellzahl kalkuliert, wieviel Medium nötig war, um eine Suspension zu erhalten, bei der dann pro 100 µl D10+ Medium je nach Experiment 5000, 10.000, 15.000 oder 25.000 Zellen enthalten waren. Anschließend wurde an einer Eppendorf® 5430 R Zentrifuge die 1,5 ml Eppendorf® - Gefäße mit den Zellen in 500 µl D10+ Medium bei 400 rcf für 5 min und 4 °C herunter zentrifugiert, das überschüssige Volumen mit Pipetten vorsichtig abgenommen, so dass das zuvor kalkulierte Volumen erreicht wurde. Danach wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und 100 µl in eine sterile U - Boden - Zell - Kultur - 96 - Loch - Platte überführt und weitere 100 µl D10+ Medium zugegeben. Diese weiteren 100 µl D10+ Medium enthielten unterschiedliche Zytokine (IL-7 oder IL-7 und IL-33 oder IL-7 und IL-25 und IL-33), in doppelter Konzentration, damit nach Vermischung mit den 100 µl der Zellen in D10+ Medium eine Ziel - Konzentration von 20 ng pro ml erreicht wurde. Die Platte wurde dann für 4 Tage (oder in manchen Experimenten wie dort erwähnt) im Zell - Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der 4 Tage wurde die Platte bei 4 °C für 5 min und 15.000 rpm zentrifugiert. Von den 200 µl D10+ Medium wurden vorsichtig 100 µl mit einer Pipette abgenommen und für weitere Analysen (Zytokin / Interleukin - Bestimmung im Kultur - Überstand) bei -20 °C weggefroren. Der Rest des Kultur Mediums wurde verworfen und danach die Zellen in einer AK - Mischung resuspendiert und weiter verfahren wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung, um die Zellen dann am Durchflusszytometer

zu analysieren oder im Sorter zu sortieren. Falls die Zellen für RNS - Isolation verwendet wurden, so wurde nach Abnehmen der 100 µl Medium für die Zytokin / Interleukin - Bestimmung und Verwerfung des restlichen Mediums, die Zellen in 250 µl TRIzol™ resuspendiert, welches dann in ein 1,5 ml Eppendorf® - Gefäß überführt wurde, das Loch der Platte erneut mit 250 µl TRIzol™ gefüllt (um alle Zellen zu erhalten) und dann erneut in das Eppendorf® - Gefäß übertragen. Dann wurden die Gefäße für mindestens 1 h bei -80 °C gelagert und wie bei RNS - Isolation verfahren. Falls lediglich das Medium gewechselt wurde, so wurden die U - Boden - Platte lediglich zentrifugiert, das Medium für weitere Analysen abgenommen und eingefroren, und dann das Rest Medium verworfen, sowie die Zellen erneut in D10+ Medium (mit Zytokinen) resuspendiert und weiter kultiviert, bis dann die Zellen für RNS - Analysen abgeerntet wurden.

q. Apoptose - Assay

Zur Durchführung des Apoptose - Assays wurde der Apotracker™ Green der Firma BioLegend® verwendet. Im Rahmen der Apoptose, dem kontrollierten Zelltode, kommt es zu einer Umorganisation der Phospholipid - Zellmembran. Dabei kommt es zur Translokation von Phosphatidylserin - Resten an die Zelloberfläche, was in intakten Zellen nicht passiert. Diese Reste können detektiert werden, üblicherweise mit einem Annexin V enthaltenden Farbstoffen. Diese Bindung ist jedoch Calcium abhängig ist, was häufig einen speziellen Puffer zu Färbung nötig macht, dessen hohe Calcium Konzentrationen auch nachteilige Effekte zeigen. Der Apotracker™ Green bzw. das relevante Apo - 15 Peptid stellt eine Calcium - unabhängige Möglichkeit zur Detektierung von Phosphatidylserinen, also apoptotischer Zellen, dar.

Der große Vorteil von Apotracker™ Green ist die Möglichkeit ihn in einer AK - Mischung mit anderen Antikörpern oder Farbstoffen, ohne einen speziellen Puffer zu kombinieren. Der verwendete Apoptose - Assay richtete sich also ebenfalls gegen Annexin V auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen, welche ihre Zellmembran bereits umorganisieren, jedoch noch nicht für einen DNS - Farbstoff, zur Färbung toter Zellen permeabel sind. Somit gelang es durch die Kombination des Apoptose Farbstoffes mit einem DNS - Farbstoff ein Diagramm zu erzeugen, in welchem zwischen lebendigen Zellen (für Beides negativ) apoptotischen Zellen (, welche nur durch den Annexin V - Apoptose - Farbstoff gefärbt werden) und toten Zellen (, welche sowohl durch den DNS - Farbstoff als auch

den Apoptose - Farbstoff gefärbt werden), unterschieden werden kann (St. Michael's. 2020) (**Abb. 2**).

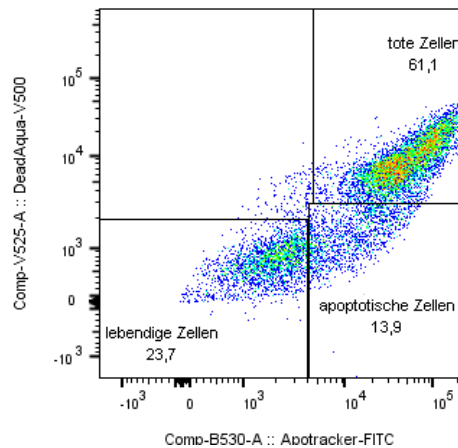


Abbildung 2: Einteilung der Zellen in lebendige, tote und apoptotische Populationen mit Hilfe des Apoptose - Assays. Beispielhafte Darstellung der Einteilung der Zellen der stimulierten Kultur in lebendige Zellen (negativ für DeadAqua und den Apotracker™), apoptotische Zellen (noch negativ für DeadAqua, jedoch schon positiv für den Apotracker™ und tote Zellen (positiv für DeadAqua und positiv für den Apotracker™).

Die Zellen wurden hierbei, wie in in vitro Stimulation vorbereitet, bis der Schritt der Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung erreicht wurde, in welcher die 100 μ l AK - Mischung in PBS hinzugegeben wurde. Diese Mischung enthielt neben den sonst verwendeten Antikörpern den Apotracker™ Green in einer Konzentration von 400 nM. Danach wurde weiter wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung Verfahren. Am Durchflusszytometer wurde wie folgt analysiert: der Apotracker™ Green wurde durch den blauen Laser (488 nm) des Durchflusszytometers angeregt, und durch den Detektor B530, ausgestattet mit einem 525 / 50 Filter detektiert, was die maximale Emission des Apotracker™ Greens bei 520 nm gut abdeckte (das Emissions Spektrum des Apotracker™ Green ist also sehr ähnlich wie das von FITC oder Alexa Fluor 488).

In den AK - Mischungen enthalten war auch stets ein Totzellen - Farbstoff, wie SYTOX™ Blauer Totzellen - Farbstoff oder LIVE/DEAD™ Fixierbarer Aqua Totzellen - Farbstoff, welche Nukleinsäuren mit hoher Affinität anfärben. Diese Farbstoffe gelangen jedoch nur

durch die Zellmembranen von vollständig abgestorbenen Zellen, deren Zellmembran völlig desintegriert sind. Intakte Zellen, oder Zellen, die gerade die Apoptose durchlaufen, sind durch diese Nukleinsäuren - Farbstoffe nicht penetrierbar, so dass sie kein Kontakt zu den Nukleinsäuren erhalten, also die Zellen im Endeffekt nicht gefärbt werden. Durch die Positivität / Negativität für den Apotracker™ Green in Kombination mit der Positivität / Negativität für dem Nukleinsäure - Farbstoff, kann man die Zellen nach folgendem Schema einteilen: negativ für beide Farbstoffe sind lebendige Zellen, positiv für Apotracker™ Green (Phosphatidylserin - Reste) aber noch negativ für einen Nukleinsäure - Farbstoff sind Zellen die sich gerade in Apoptose befinden und positiv für beide Farbstoffe sind völlig abgestorbene Zellen.

r. CPD ("cell proliferation dye")

Zur Visualisierung der Zellteilung bzw. Zellproliferation wurde der eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 450 verwendet. Dieser Farbstoff kann zur Überwachung von Zellteilungen verwendet werden. Dabei werden in einem Färbeschritt die Ursprungszellen markiert, indem der Fluoreszenzfarbstoff an alle zellulären Proteine bindet, welche primäre Amine enthalten. Teilt sich die Ursprungszelle nun, so wird der Farbstoff gleichmäßig auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt. Das sich pro Teilung halbierte Fluoreszenzsignal kann dann gemessen werden, und einzelne "Peaks" im Histogramm stellen einzelne Populationen der Tochterzellen da.

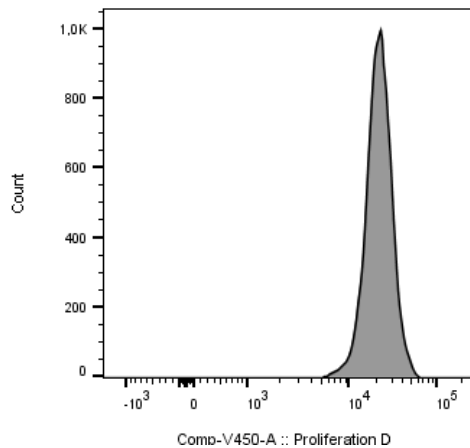
Der CPD wurde dabei im Rahmen von Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung und in vitro Stimulation verwendet. Bevor die Zellen mit Antikörpern gefärbt und am BD FACSAria™ III Zell Sortierer sortiert wurden, wurde das Protokoll der Zellmarkierung mit CPD durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach der Immunzell - Isolation (bevor die Zellen vom 15 ml Falcon - Tube in die 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt wurden) und vor der Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung 2 mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm und 4 °C für 5 min, Überstand verworfen, Resuspension in 100 µl PBS). Nach erneuter Zentrifugation, bei identischen Einstellungen, in 1000 µl PBS (vorgewärmt auf Raumtemperatur) resuspendiert, bevor dann 1000 µl 20 µM Cell Proliferation Dye eFluor™ 450 (gelöst in PBS vorgewärmt auf Raumtemperatur) zugegeben wurden. Es resultierte eine Konzentration von 10 µM des CPD. Dann wurden die Zellsuspensionen im 15 ml Falcon - Tube gevortext und für 10 min bei 37 °C im

dunklen inkubiert. Die Markierung mit dem CPD wurde dann durch die Zugabe von 10 ml 20 % FCS in PBS gestoppt, wobei die zahlreichen freien primären Amine des FCS den überschüssigen CPD abfingen, und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde 5 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert, in 5 ml 20 % FCS in PBS gewaschen, dann erneut zentrifugiert (identische Einstellungen wie zuvor), bevor der Überstand verworfen wurde und die Zellen in eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt wurden, um anschließend weiter wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung zu verfahren.

Darauffolgend wurden die Zellen im BD FACSAria™ III Zell Sortierer sortiert, der eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ wurde durch den violetten Laser (405 nm) angeregt und durch den V450 Detektor mit einem 450 / 50 Bandbreitenfilter registriert. Nach Ablauf, der in vitro Stimulation wurde, die Verteilung des Farbstoffes und die abnehmende Intensität der Fluoreszenz der Tochterzellen, mit identischem Laser und Detektor, mit dem BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte durch Darstellung der CPD - Fluoreszenz der Zellen im Histogramm mit Hilfe der FlowJo™ Software.

Zunächst wurde während der Sortierung gezeigt, dass auch alle sortierten ILC2 ein starkes Signal der Markierung hatten, welches sich zwischen 10^4 und 10^5 belief (**Abb. 3 A**). Die resultierenden Histogramme nach Ablauf der Kultur waren nicht so eindeutig, wie im Datenblatt des Herstellers, jedoch gelang eine pragmatische Einteilung in Zellen die für den Zellteilungs - Farbstoff positiv waren (CPD+), als auch diejenigen, welche dafür negativ waren (CPD-) Zellen. Diejenigen Zellen, welche noch für den Farbstoff positiv waren, hatten sich nicht oder kaum geteilt, also noch viele angefärbte Amine auf der Oberfläche. Die Zellen, welche sich geteilt hatten, hatten nur noch wenige gefärbte Amine auf der Oberfläche, da die gefärbten Amine schon auf die vielen Tochterzellen verteilt wurden, und sich somit die Intensität der Färbung stark verdünnt hatte (**Abb. 3 B**).

A:



B:

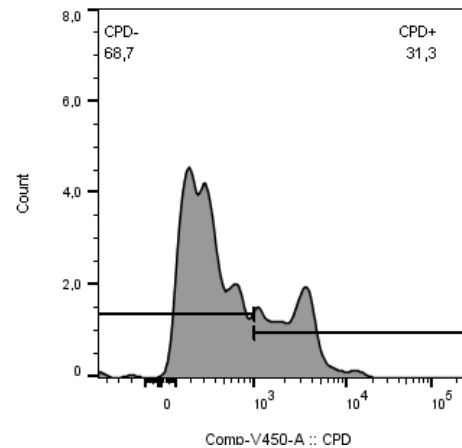


Abbildung 3: Verfolgung von Zellteilung mit Hilfe des CPD. Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzintensität für den CPD, der aus der L. p. des Dünndarms sortierten ILC2, nach vorangegangener Markierung mit dem CPD. In **A** zu sehen ist die Intensität unmittelbar bei der Sortierung (noch keine Teilungen), und in **B** dann die (mit dem Auftreten von Zellteilungen) abnehmende Intensität nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33. Einteilung der Population in Zellen die für den Zellteilungs - Farbstoff positiv sind (CPD+ = keine Zellteilung) als auch diejenigen, welche dafür negativ sind (CPD- = erfolgte Zellteilung) Zellen (**B**).

s. Rubinrot Zellzyklus - Farbstoff

Um den Zellzyklus der kultivierten Zellen darzustellen und zu messen, wurde das Vybrant™ DyeCycle™ Rubinrot Färbemittel verwendet. Hierbei handelt es sich um ein nicht - toxisches Färbemittel, welches die Membran intakter Zellen durchdringen kann, um dann selektiv an die DNS innerhalb der Zelle zu bindet, dabei ist es jedoch bis zur Entstehung der Bindung nicht fluoreszierend. Die nach Bindung entstehende Intensität der Fluoreszenz ist proportional zum DNS - Gehalt der Zelle. Dieser variiert je nach Phase des Zellzyklus zwischen G0 / G1 Phase (ein Paar an Chromosomen), S Phase (DNS - Verdopplung und variabler DNS - Gehalt) und G2 / M Phase (zwei Paare an Chromosomen). Die Zellteilung oder Mitose, setzt voraus, dass zuvor die DNS verdoppelt wurde, um dann auf die beiden Tochterzellen verteilt zu werden.

Das Vybrant™ DyeCycle™ Rubinrot Färbemittel wurde dabei im Rahmen der *in vitro* Stimulation angewandt. Nach Ablauf der Stimulation und nach dem Schritt der Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung, wurde die

Markierung mit Vybrant™ DyeCycle™ Rubinrot Färbemittel vorgenommen. Der Hersteller empfiehlt die Färbung in HBSS (nicht in Phosphat - Puffern wie PBS oder FACS - Puffer). Die in 100 µl PBS resuspendierten Zellen (nach der Färbung wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung) wurden erneut zentrifugiert (4 °C, 5 min, 1500 rpm), danach das PBS verworfen, und die Zellen in der U - Boden - Zell - Kultur - 96 - Loch - Platte in 200 µL HBSS, welches das Vybrant™ DyeCycle™ Rubinrot Färbemittel in einer Konzentration von 1:500 enthielten (dies entspricht 5 µM), resuspendiert. Nun wurde für 20 min bei 37 °C, unter Lichtschutz inkubiert. Danach konnten die Zellen ohne zwischengeschalteten Waschschrift am Durchflusszytometer analysiert werden.

Wichtig zu erwähnen ist, dass in der voran gegangenen Färbung mit der AK - Mischung stets ein Farbstoff zum Ausschluss toter Zellen verwendet wurde, beispielsweise SYTOX™ Blauer Totzellen - Farbstoff oder LIVE/DEAD™ Fixierbarer Aqua Totzellen - Farbstoff. Diese färben auch Nukleinsäuren mit hoher Affinität an, können jedoch nur die Membran von toten Zellen durchdringen, nicht jedoch die von intakten und proliferierenden Zellen, weshalb diese nicht gefärbt werden (im Gegensatz zu Vybrant™ DyeCycle™ Rubinrot Färbemittel).

Die Intensität des Vybrant™ DyeCycle™ Rubinrot Färbemittel wurde dann, mit dem roten Laser (640 nm) und dem R670 Detektor ausgestattet mit einem 670 / 30 Filter, mit dem BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer registriert. Die Auswertung erfolgte durch Darstellung Vybrant™ DyeCycle™ Rubinrot Färbemittel - Fluoreszenzintensität der Zellen im Histogramm (nach Ausschluss toter Zellen) mit Hilfe der FlowJo™ Software.

t. Migrationsassay

Um die Migration der Zellen durch eine feinporige Membran, angezogen durch ein Zytokin (Chemotaxis) zu messen, wurden die “Corning® HTS Transwell® 96 well permeable supports“ mit einer Membran mit 5 µm Porengröße verwendet. Der Migrationsassay wurde dabei wie in einem “Boyden Chamber Assay“ aufgebaut (Falasca et al., 2011, Chen, 2005). Das bedeutet in einer speziellen 96 - Loch Platte wird ein Medium mit dem passenden Chemotaxis - induzierenden Zytokin in unserem Fall IL-33 (Xue et al., 2014, Li et al., 2019) gegeben, und dann in dieses Medium ein sogenanntes Transwell - Inserat eingesetzt. Dies ist eine in das Loch passende, und mit dem Medium in Kontakt kommende Vertiefung, welche an Ihrer Unterseite eine Membran mit

definierter Porengröße besitzt (in unserem Fall waren dies 5 μm , da von der Firma Thermo Fisher Scientific für Chemotaxis - Studien von Immunzellen 3 bis 8 μm empfohlen werden (Thermo Fisher Scientific Inc., 2021). In die Vertiefung des Transwell - Inserates wird dann Medium, welches die zu untersuchenden Zellen enthält, gegeben. Das Medium mit den Zellen (aber ohne Chemotaxis - induzierendes Zytokin), welches sich oben befindet, hat nun Kontakt mit dem Medium mit dem Chemotaxis - induzierenden Zytokin (aber ohne Zellen), welches sich unten befindet. Beide sind jedoch getrennt durch die poröse Membran. Im Rahmen der Chemotaxis, angezogen durch das Zytokin, wandern nun die Zellen durch die Membran in das unten befindliche Loch der Platte.

Wir gingen dabei zunächst wie bei in vitro Stimulation vor, um durch die Stimulation der ILC2 eine Art artifizielle iILC2 zu erhalten, welche wir untersuchen wollten, und welche für die Studie mit der Frage ihrer Wanderung aus der Lamina propria des Darms zu beispielsweise den mesenterischen Lymphknoten relevant war. Nach 6 Tagen in vitro Stimulation wurden die Zellen zunächst wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung sortiert. In der AK - Mischung befanden sich 2 Farbstoffe, um tote Zellen zu diskriminieren (SYTOX™ Grüner Totzellen - Farbstoff und LIVE/DEAD™ Fixierbarer Aqua Totzellen - Farbstoff). Es wurden lediglich die deutlich "geblasteten" (FSC / SSC - Profil), also stark aktivierten, und lebendigen Zellen genommen. Nach dem Sortieren wurden die Zellen zunächst für 5 h bei 4 °C in D10+ Medium gelagert, damit sie sich vom Stress der Sortierung erholen konnten. Nun wurde der Migrationsassay aufgebaut: in die Corning® HTS Transwell® 96 - Loch Platte wurde unten in das Loch 235 μl an D10+ Medium gegeben, welches IL-33 in einer Konzentration von 60 ng / ml (optimale Konzentration für die ILC2 Migration (Xue et al., 2014, Li et al., 2019) gegeben. Die Zellen befanden sich nun noch im 1,5 ml Eppendorf® - Gefäß gelöst in 500 μl D10+ Medium, welche nun an einer Eppendorf® 5430 R Zentrifuge bei 400 rcf für 5 min und 4 °C herunter zentrifugiert wurden. Dann wurde 420 μl Volumen mit Pipetten vorsichtig abgenommen, so dass das vom Hersteller vorgegebene Volumen von 80 μl für das Transwell - Inserat erreicht wurde. Nun wurde das Transwell - Inserat in die Corning® HTS Transwell® 96 - Loch Platte eingesetzt, und alle sortierten Zellen gelöst in 80 μl D10+ Medium hinzugegeben.

Der entstandene Migrationsassay wurde nun für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Transwell - Inserat entnommen, und das Medium im Loch der Platte (in welchem sich nun die migrierten Zellen befanden) in eine 96 - Loch - V -

Boden - FACS - Platte überführt und danach das Loch der Platte nochmals mit 100 µl PBS ausgespült, welche dann auch in die FACS - Platte überführt wurden (um alle Zellen zu übertragen). Nun wurde wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung weiter verfahren. Zur Auswertung wurde ermittelt welcher Prozentsatz der ursprünglich in den Assay eingesetzten Zellen nach Ablauf der 3 h von oben (Inserat) nach unten (Loch der Platte) migriert waren.

u. Kombination aus Stimulation und Migration

Zur gleichzeitigen Überprüfung der Migrations - und Proliferationseigenschaften der Zellen wurden die Methoden der in vitro Stimulation und des Migrationsassays kombiniert. Hierfür wurden nach der Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung 5000 sortierte ILC2 in 80 µl D10+ Medium in das Transwell - Inserat (also die obere Kammer des "Boyden Chamber Assays" gegeben) und in der unteren Kammer, also dem Loch der Corning® HTS Transwell® 96 - Loch Platte befanden sich 235 µl D10+ Medium mit 20 ng / ml IL-7, IL-25 und IL-33. Von diesem Ansatz wurden 2 technische Replikate produziert, welche dann bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Ein Replikat wurde nach 3 Tagen analysiert, das andere nach 7 Tagen. Nach Ablauf der Zeit wurde zunächst das Transwell - Inserat mit dem dort befindlichen Medium entnommen. Das Medium wurde aus diesem Inserat heraus - pipettiert und in eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt und danach das Inserat nochmals mit 80 µl PBS ausgespült, welche dann auch in die FACS - Platte überführt wurden (um alle Zellen zu übertragen). Unten in der Corning® HTS Transwell® 96 - Loch Platte, befand sich nun noch das Medium, mit den migrierten Zellen, mit diesem wurde wie in Migrationsassay verfahren. Das Resultat waren dann beide Kompartimente des "Boyden Chamber Assays" übertragen in eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte, und es wurde dann wie in Zell - Markierung mit Antikörpern und Durchflusszytometrie oder Zell - Sortierung weiter verfahren, um die Zellen am Durchflusszytometer zu analysieren.

v. *Nippostrongylus brasiliensis* Lebenszyklus und Infektion

Die infektiösen *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. b.*) Stadium 3 (L3) Larven wurden unserem Labor von Prof. Dr. rer. nat. David Vöhringer (david.voehringer@uk-erlangen.de) aus der infektionsbiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Erlangen (Wasserturmstraße 3 / 5, 91054 Erlangen) geschickt. Aus dem gesendeten

Material bzw. später aus dem laboreigenen Vorrat (fäkale Kulturen) wurden dann L3 Larven mit der modifizierten Baermann Methode geerntet (Camberis et al., 2003). Dafür wurde der Baermann - Apparat wie folgt aufgebaut: ein Plastiktrichter wurde an einem Laborständer mithilfe eines Armes und einer Klemme befestigt. An das dünne Ende des Trichters unten angebracht war ein etwa 30 cm langer durchsichtiger Plastikschlauch. Dieser war etwa in der Mitte mit einer Metallklemme verschlossen. Unten an einem Ende des Schlauches war ein 50 ml Falcon - Tube zum Auffangen platziert worden. Oben in die breite Öffnung des Trichters wurde ein Metallsieb gelegt. Nun wurde steriles PBS im Wasserbad auf 37 °C erhitzt und dieses dann in den Trichter gegossen, bis der Schlauch von der Klemme an bis hinein in den Trichter, wenige mm über das Metallsieb reichend, gefüllt war. In die Mulde des Siebes wurde nun ein gefaltetes Kimtech - Präzisionstuch gelegt, so dass es leicht im PBS lag, und das Sieb bedeckte. Auf dieses Tuch wurden dann einige Löffel / Spatel der fäkalen Kulturen gelegt, vorsichtig zerstoßen und etwas PBS nachgegossen, sodass das Sieb leicht mit Wasser gefüllt war. Anschließend wurde eine Stunde gewartet. In dieser Zeit fraßen sich Larven mit ihren lytischen Enzymen durch das Tuch, und trieben durch das Sieb und den Trichter den Schlauch hinunter, um sich oberhalb der Klemme zu sammeln. Durch den durchsichtigen Schlauch konnte man dann kontrollieren, ob sich bereits ausreichend Larven angesammelt hatten. War dies der Fall wurde die Klemme sehr kurz geöffnet, und so die Larven mit etwas PBS in das 50 ml Falcon - Tube gespült. Nun wurde gewartet bis sich die Larven im Tube abgesetzt hatten, das überstehende PBS wurde vorsichtig mit dem Pipetboy abgenommen und neues PBS zum Waschen hinzu gegeben. Insgesamt wurde 3 mal gewaschen. Danach wurde wieder PBS nachgefüllt und die Konzentration ausgezählt. Hierfür war es sehr wichtig durch leichtes Schütteln eine möglichst homogene Verteilung der Larven im PBS zu erhalten und dann 50 µl mit einer vorne minimal abgeschnittenen Pipette zu entnehmen und auf 10 etwa 5 µl messende Tropfen auf einen Objektträger zu verteilen. Unter dem Lichtmikroskop, mit Hand - Zählmaschine, wurden dann die Larven ausgezählt. Dabei wurde auch die Vitalität der Larven abgeschätzt, und darauf geachtet, dass mindesten 80 - 90 % der Larven sich bewegten, also noch sicher vital waren. Die erhaltene Zahl wurde mit 20 multipliziert, um die Konzentration pro ml zu erhalten, was wiederum dann mit dem insgesamt nach dem Waschen verfügbaren Volumen multipliziert wurde, um die Gesamtzahl der Würmer zu erhalten. Nun mussten 2 Sachen kalkuliert werden - einmal die insgesamt benötigte Anzahl an Larven, und die Konzentration der Larven. Pro Maus benötigten wir 500 Larven

und pro Ratte 5000, woraus sich die benötigte Zahl errechnete. Des Weiteren war das Ziel eine Konzentration von 2000 Larven pro ml zu erhalten, was bedeutet eine Maus benötigt, für 500 Larven, 250 μ l (was $\frac{1}{4}$ einer Insulinspritze war) und eine Ratte, für 5000 Larven, dann 2,5 ml. Um diese Konzentration zu erreichen musste durch Zugabe oder Abnahme von PBS und wiederholendes Auszählen das Volumen vergrößert oder verkleinert werden. Eine exakte Konzentration ist dabei stets sehr wichtig gewesen, da eine zu hohe Konzentration (ab etwa 1000 Larven pro Maus) zu einer erhöhten Mortalität der Tiere führen würde.

Die vergleichsweise hohe Sicherheit des Tiermodells der *N. b.* Infektion, ist ein wichtiger Faktor der Methode. Zwar können L3 Larven von *N. b.* die menschliche Haut penetrieren, jedoch keine richtige Infektion etablieren. Durch das Tragen von Laborkitteln und Handschuhen, sowie regelmäßiger Dekontamination von Arbeitsflächen und Instrumenten mit Lösungen bestehend aus Ethanol und Hypochlorit ist ein sichereres Arbeiten möglich.

Für die Infektion selber wurden die Mäuse in einer Anästhesie Kammer, welche gleichzeitig Isofluran und Sauerstoff zuführt, betäubt. Folgend wurden die betäubten Mäuse nacheinander entnommen, bei Bedarf markiert (mit dickem wasserdichten Edding - Stift) und in die dorsale Nackenfalte mit einer 1 ml - Insulinspritze (Mäuse), oder 5 ml Spritze (Ratte) über eine 26 G - (Mäuse) oder 20 G - (Ratte) Kanüle die benötigte Anzahl Larven subkutan injiziert. Um Rückfluss zu vermeiden wurde kurz gewartet und der Stichkanal leicht zugeedrückt, während die Kanüle herausgezogen wurde. Wichtig war, dass für jedes Tier eine neue Spritze mit neuer Kanüle benutzt wurde, um die Todraumvolumina identisch zu halten. Vor jedem Aufziehen der Spritzen wurden die Suspension der Larven mehrmals geschüttelt, um eine sehr homogene Verteilung zu erhalten, dann die Spritze aufgezogen, die Kanüle aufgesetzt und etwas der Suspension herausgedrückt bis die ersten Tropfen oben an der Kanüle erschienen, anschließend wurde das benötigte Volumen verifiziert, und dann injiziert. Dies war Tag 0 der Infektion. An den Tagen 1 bis 6 mussten die Tiere dann nach Ihrem Wohlbefinden beurteilt werden, und wurden dabei nach einem Score bewertet, besonders die Tage 3 und 4 waren wichtig, da hier zum Hochpunkt der Lungenphase potentiell Komplikationen auftreten konnten, was in den Experimenten dieser Studie nicht passierte. An Tag 7 erfolgte die Organentnahme.

Die Infektion der Ratte diente der Aufrechterhaltung des laboreigenen Vorrates, um aus diesem neue Larven zu gewinnen womit dann Mäuse oder erneut eine Ratte infiziert

werden konnte. Das optimale Alter einer Ratte für die Infektion waren 4 Monate, und unser Labor verwendete dabei stets weibliche Lewis Ratten. Nach Ablauf der 7 Tage wurde die Ratte per Isofluran anästhesiert, dann der Thorax eröffnet, um per Pneumothorax die Ratte zu euthanasieren. Anschließend wurde die Abdominalhöhle longitudinal aufgeschnitten, nach lateral erweitert, und mit Hilfe von Pinzetten und Sezierschere das Colon inklusive Zäkum entnommen (diese enthalten Stuhl, in welchem Eier zu finden sind, die von erwachsenen Würmern, welche im Dünndarm leben, produziert werden). Des Weiteren wurde sämtlicher, der infizierten Ratte zugehöriger frischer Kot (abgesetzt beispielsweise in der Narkose Kammer) eingesammelt. Gesammelter Kot und Darm wurde dann in 37 °C warmen sterilen H₂O, für die weitere Verarbeitung zwischengelagert. Für die Ansetzung der Kulturen wurde dann der entnommene Darm eröffnet. Zusammen mit dem warmen sterilen Wasser, in welchem er gesammelt wurde, wurde der Darminhalt, sowie das Gewebe und der gesammelte Kot in ein 500 ml Becherglas gegeben, mit einem Löffel leicht zerstoßen, und gut umgerührt. Wenn das Gewebe einigermaßen gereinigt war, also der meiste Stuhl im Becherglas verblieb, so wurde der Darm entfernt, und dann sehr klein gemörserte Kohle, als auch Moos hinzugegeben, bis eine relativ stabile, aber dennoch feuchte Masse entstanden war. Diese wurde auf mehrere verschließbaren Petrischalen, deren Boden mit Filterpapier bedeckt war verteilt, noch etwas befeuchtet und dann verschlossen, um bei Raumtemperatur zu lagern. Nun wurde eine Woche gewartet, bis sich aus den Eiern in diesen fäkalen Kulturen infektiöse Larven entwickelt hatten, welche dann für neue Infektionen aufgereinigt werden konnten. In diesem laboreigenen Vorrat erhielten sich die L3 Larven, unter wöchentlicher Befeuchtung, für 6-8 Wochen, und nach Ablauf dieser Zeit, musste ein neuer Zyklus begonnen werden, also erneut eine Ratte infiziert werden, um dann eine neue Kultur anzulegen.

Die Infektion der Mäuse diente um die Th2 - Antwort, insbesondere die ILC2, in den beschriebenen Knock - Out - Linien zu untersuchen. Hierfür wurden stets Kohorten von 4 - 6 Mäusen infiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Tiere etwa 6 - 8 Wochen alt waren, sowie die Wildtyp - Kontrolltiere dasselbe Alter und Geschlecht besaßen. Um Effekte des Mikrobioms zu minimieren, wurde die Taktik des "Co - Housings" oder "Bedding - Exchanges" verwendet, was dazu führen sollte, dass sich die Mikrobiota der Mäuse angleichen. Falls es sich um weibliche Tiere handelte, wurden diese zusammen in einen Käfig gesetzt. Im Falle männliche Tiere wurden die Käfige einige Tage nicht gewechselt, und dann die Knock - Out - Mäuse in den Käfig der Wildtyp - Mäuse gesetzt

und umgekehrt. Dies hatte den Gedanken, dass durch den Kontakt mit der Umwelt der anderen Tiere, bzw. auch über die Koprophagie sich die Mikrobiota ebenfalls angleichen. An Tag 7 der Infektion wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert, anschließend per zervikaler Dislokation euthanasiert, danach folgte die Organentnahme und deren Aufarbeitung. Hier wurde wie bei Immunzell - Isolation verfahren.

Um den Read - Out der Wurmlast im Dünndarm der infizierten Tiere zu erhalten, wurden im Rahmen der Sektion ähnlich wie in Immunzell - Isolation aus der Lamina propria des Dünndarms, der Dünndarm entfernt. Dieser wurde in 37 °C warmen PBS transportiert. Zur weiteren Verarbeitung wurde der Darm auf Zellstoff gelagert, und das Stück zwischen 8 und 10 cm (mit Lineal gemessen) ab dem Pylorus für die Histologie (die jedoch nicht Bestandteil dieser Studie wurde) herausgeschnitten. Das herausgeschnittene Stück wurde in eine Zähl - Petrischale mit PBS überführt und der Inhalt herausgepresst. Danach wurde das Stück Darm in 4 % PFA zur weiteren Verarbeitung eingelegt. Der restliche Darm wurde dann longitudinal aufgeschnitten, und zurück in ein 50 ml Falcon - Tube mit PBS gegeben. Diese wurden dann bei 37 °C für 1 h im Wasserbad gelagert, in welcher Zeit die Würmer aus dem Darm herauswanderten. Nach Ablauf der Zeit wurde der Inhalt der Tubes wieder in die Zähl - Petrischalen gekippt. Und die Anzahl der reifen L5 *N. b.* Würmer unter einem Stereomikroskop mit Hand - Zählmaschine ausgezählt.

w. Blutentnahme und Serum - Gewinnung aus Mäusen

Zunächst wurden die Mäuse euthanasiert und präpariert, so dass die Organe in der Abdominalhöhle offen lagen. Die nun frei liegenden Bauchorgane wurden wie folgt verlagert: die Leber mit ihren Lappen möglichst nach kranial leicht fächerförmig geklappt, Magen sowie Dünndarm - Konvolut nach links aus der Bauchhöhle ausgelagert. Nun hatte man freie Sicht auf die Vena portae, sowie ihren Eintritt im Leberhilus. Mit einer 20 G - Kanüle auf einer 1 ml - Insulinspritze wurde dann der Leberhilus punktiert, und unter leichtem Zug möglichst viel Blut entnommen. Das gewonnene Blut wurde in ein BD Microtainer® SST™ Tube überführt, dieses wurde verschlossen, 5 mal invertiert und dann für 30 min belassen. In dieser Zeit gerann das Blut. In einem nächsten Schritt wurden dann die feste Phase (Blutgerinnsel) von der flüssigen Phase (gewünschtes Blutserum) getrennt. Hierfür war in den Tubes ein spezielles Gel vorhanden. Durch 90 sec Zentrifugieren bei 15.000 g und Raumtemperatur, trennte sich dann die feste Phase unter dem Gel ab, so dass man dann leicht die flüssige Phase über dem Gel ab - pipettieren konnte, und in ein neues 1,5 ml Eppendorf® - Gefäß überführen konnte. Nun wurde das

Blutserum bei -20 °C zwischengelagert, bis es für weitere Analysen, wie die Zytokin / Interleukin - Bestimmung verwendet wurde.

x. Zytokin / Interleukin - Bestimmung

Zur Bestimmung der Zytokine bzw. Interleukine, welche durch die ILC2 in den Kulturen sezerniert wurden, oder aber im Rahmen der *N. b.* Infektion im Blutserum der Mäuse zirkulierten, wählten wir den LEGENDplex™ Mouse Th2 Panel - Assay. Dieser ist in der Lage die Typ 2 Zytokine: IL-4, IL-5 und IL-13 sowie darüber hinaus IL-10, IL-6 und TNF- α , zu bestimmen. Dabei handelt es sich um einen "Bead" - basierten Immunoassay, welcher in seiner Funktion einem Sandwich - Immunoassay ähnelt. Die einzelnen Beads unterscheiden sich dabei in ihrer Größe und Komplexität (FSC-A / SSC-A), und darüber hinaus in ihrer internalen Fluoreszenzintensität. Jede Entität an Beads besitzt an ihrer Oberfläche einen spezifischen Antikörper für ein Zytokin. So werden die im zu analysierenden Material enthaltenen Zytokine von den jeweils für sie spezifischen Beads gebunden. In einem späteren Schritt werden biotinylierte Detektions - Antikörper hinzugegeben. So entsteht ein Komplex bzw. Sandwich aus Bead - Zytokin - Detektions - Antikörper, welcher dann durch die Hinzugabe und somit gleichzeitige Amplifikation von Streptavidin - Phycoerythrin (Streptavidin - PE), fluoreszierend gemacht wird, um dann per Durchflusszytometer analysiert zu werden. Dabei ist die Intensität der PE - Fluoreszenz proportional zur Menge an Zytokinen. Durch gleichzeitige Generierung einer Standardkurve kann auf die genaue Menge an Zytokinen rückgeschlossen werden.

Vor Beginn des Assays ist es notwendig die verschiedenen Reagenzien vorzubereiten. Für die Beads - Mischungen wurden dabei die einzelnen Beads für die 6 Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und TNF- α) zusammengemischt. Bevor dies geschehen konnte galt es die Beads in ihrem Gefäß jedoch möglichst gut zu vermischen und in Lösung zu bringen. Dafür wurde jedes Bead - Gefäß erst für 1 min gevortext und dann für 1 min in einem Ultraschall - Bad beschallt. Für 3 ml der alle Zytokine enthaltenen Bead - Mischung wurden 230 μ l jedes individuellen Beads in einem 5 ml Eppendorf® - Gefäß gemischt (zusammen 1380 μ l). Dazu wurden dann 1620 μ l Assay - Puffer (mitgeliefert) hinzugegeben, um auf 3 ml zu kommen. Darüber hinaus musste aus dem 20x Wasch - Puffer (nach Erwärmung auf Raumtemperatur und guter Durchmischung) ein 1x Wasch - Puffer hergestellt werden. Hierfür wurde 5 ml des Wasch - Puffers mit 95 ml deionisiertem Wasser verdünnt. Die Matrix B Lösung wurde durch Lösung der

lyophilisierten Matrix B in 5 ml Assay - Puffer hergestellt und dann per vortexen gut durchmischt.

Um später von den Fluoreszenzintensitäten auf die genaue Menge an Zytokinen rückschließen zu können, wurde eine Standardreihe vorbereitet. Dafür wurde vorab der lyophilisierte Mouse Th Panel Standard - Cocktail in 250 µl Assay - Puffer rekonstituiert. Nun wurde der Standard Cocktail gut durchmischt und für 10 min ruhen gelassen. In der Spalte 12 der 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte wurde die Standard Reihe angelegt. Dabei war das Loch A12 der Standard C7, B12 der Standard C6, C12 der Standard C5 usw. bis H12 der Standard C0. In das Loch für den puren Standard C7 wurden 75 µl des rekonstituierten Standard Cocktails gegeben. In die Löcher der Standards C6 bis C0 wurden 75 µl Assay - Puffer gegeben. Nun wurden vom Standard C7 25 µl in die 75 µl Assay - Puffer im Loch des Standards C6 überführt und gut gemischt. Dadurch entstand eine 1:4 Verdünnung im Vergleich von Standard C7 zu C6. Von diesem Standard C6 wurden dann 25 µl in die 75 µl Assay - Puffer im Loch des Standards C5 überführt und gut durchmischt, um den Standard C5 herzustellen, welcher eine 1:16 Verdünnung des Standards C7 darstellt. Dies wurde so fortgeführt bis der Standard C1 (1:4096) hergestellt war. Der Standard C0 enthielt nichts vom Standard C1, stellte also einen Nullabgleich ohne Anteile an Standard - Cocktail dar. Von diesen Standards C7 bis C0 wurden dann 25 µl in die korrespondierenden Löcher der im Assay verwendeten 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt.

Nun galt es die Proben vorzubereiten. Die Serum - Proben der mit *N. b.* infizierten Mäuse wurden wie in Blutserum Entnahme entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C zwischengelagert. Für den Assay wurden zunächst 30 µl des Serums der Mäuse in eine 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt. Zu diesen 30 µl wurden dann 30 µl (also 1:1 Verdünnung) Assay - Puffer hinzugegeben. Von den entstandenen Verdünnungen wurden dann 25 µl in die im Assay verwendete 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt. Die Medien der ILC2 Kulturen wurden wie in in vitro Stimulation entnommen und ebenfalls bei -20 °C zwischengelagert. Eine Verdünnung, wie bei den Blutseren war nicht nötig, und es konnten direkt 25 µl in die im Assay verwendete 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte überführt werden.

Vor Beginn des Assays musste sichergestellt werden, dass alle Reagenzien bei Raumtemperatur waren und während allen Inkubations - Schritten sollte die Platte mit Alufolie bedeckt werden, um die lichtsensiblen Fluorochrome nicht in Ihrer Intensität zu

schwächen. Nun wurde zu den 25 µl an Serum - Verdünnung oder Zellkultur - Medium oder Standard 25 µl an Assay - Puffer hinzugegeben. Dann wurde die Bead - Mischung gut gevortext und zu den nun 50 µl (25 µl an Probe / Standard + 25 µl Assay - Puffer) in der 96 - Loch - V - Boden - FACS - Platte 25 µl der Bead - Mischung gegeben, so dass insgesamt 75 µl erreicht wurden. Die Platte wurde nun dicht abgeklebt, mit Alufolie bedeckt und für 2 h bei 800 rpm auf einem Platten - Schüttler platziert. Nach Ablauf der Zeit sollte nun das zu detektierende Zytokin an die Antikörper auf den Oberflächen des jeweils spezifischen Beads gebunden haben. Nun wurde für 5 min bei 250 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 200 µl 1x Wasch - Puffer gewaschen, 1 min inkubiert und erneut zentrifugiert (identische Einstellungen wie zuvor). Nach Verwerfen des Wasch - Puffers wurden die noch in der Platte verbleibenden Beads (mit gebundenen Zytokinen) in 25 µl an Detektions - Antikörper - Mischung resuspendiert. Die Platte wurde erneut fest abgeklebt, in Alufolie vor Licht geschützt und nun für 1 h bei erneut 800 rpm auf den Platten - Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der 1 h war nun der Komplex aus Bead - Zytokin - Detektions - Antikörper entstanden, und ohne zwischengeschalteten Wasch - Schritt nun 25 µl an Streptavidin - PE - Lösung hinzugegeben. Die Platte wurde erneut abgeklebt, mit Alufolie bedeckt und noch einmal für 30 min bei 800 rpm auf den Platten - Schüttler gestellt. Nun wurde zentrifugiert (identische Einstellungen wie zuvor), der Überstand verworfen und wie zuvor mit 200 µl an Wasch - Puffer gewaschen, 1 min gewartet und erneut zentrifugiert (identische Einstellungen wie zuvor). Dann wurde der Wasch - Puffer verworfen und folgend die Beads in 150 µl Wasch - Puffer durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Nun wurden die Samples aus der Platte in FACS - Tubes überführt und am BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer (unter denen von BioLegend® vorgeschriebenen Einstellungen) analysiert, die Daten wurden mit der BD FACSDiva Software aufgenommen und gespeichert. Diese Daten (FCS - Dateien) wurden mit Hilfe der von BioLegend® zur Verfügung gestellten LEGENDplex™ Data Analysis Software analysiert. Diese errechnet nach Registrierung der Standardreihe aus der Fluoreszenzintensität für PE (der einzelnen Beads, welche spezifisch für ein Zytokin sind) die genaue Konzentration der jeweiligen Zytokine in der Probe. Im Anschluss wurden diese Konzentrationen in GraphPad Prism 8 dargestellt und ausgewertet.

y. FlowJo - Analyse und Gating Strategien

Die mit dem BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer bzw. dem BD FACSAria™ III Zell Sortierer, jeweils in Kombination mit der BD FACSDiva Software erstellten FCS - Dateien, wurden, wenn nicht anders erwähnt mit der FlowJo™ Software analysiert, dabei wurden für diverse Zellpopulationen folgende Gating Strategien angewandt:

-Sorting von "Steady State" - ILC2 aus der L. p. des Dünndarms (**Abb. 4**) = nach CD45.2⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] CD127⁺ KLRG1⁺.

-Sorting von iILC2 und nILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten (**Abb. 5**) - iILC2 = nach CD45.2⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] CD127⁺ KLRG1⁺ CD25^{low}; nILC2 = nach CD45.2⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] CD127⁺ KLRG1⁺ CD25^{high}

-Gating von Eosinophilen aus der Lamina propria des Dünndarms (inklusive Eosinophile (inflammatorisch)) (**Abb. 6**) = nach SSC^{high} CD45⁺ DeadAqua⁻ CD11b⁺ Siglec-F^{high / very high}

-Gating von Eosinophilen aus den mesenterischen Lymphknoten (inklusive Eosinophile (inflammatorisch)) (**Abb. 7**) = nach SSC^{high} CD45⁺ DeadAqua⁻ CD11b⁺ Siglec-F^{high / very high}

-Gating von Eosinophilen aus der Lunge (**Abb. 8**) = nach SSC^{high} CD45⁺ DeadAqua⁻ CD11b⁺ Siglec-F^{high}

-Gating von Eosinophilen aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe (**Abb. 9**) = nach SSC^{high} CD45⁺ DeadAqua⁻ CD11b⁺ Siglec-F^{high}

-Gating von "Steady State" - ILC2 aus der Lamina propria des Dünndarms (Option 1) (**Abb. 10**) = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] CD25⁺ KLRG1⁺

-Gating von "Steady State" - ILC2 aus der Lamina propria des Dünndarms (Option 2) (**Abb. 11**) = nach CD45.2⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] GATA3⁺ KLRG1⁺

-Gating von "Steady State" - ILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten (**Abb. 12**) = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] CD25⁺ KLRG1⁺

-Gating von "Steady State" - ILC2 aus der Lunge (Option 1) (**Abb. 13**) = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] CD25⁺ KLRG1⁺

-Gating von "Steady State" - ILC2 aus der Lunge (Option 2) (**Abb. 14**) = nach CD45.2⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] GATA3⁺ CD25⁺

-Gating von "Steady State" - ILC2 aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe (**Abb. 15**) = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] CD25⁺ KLRG1⁺

-Gating von Eosinophilen aus den mesenterischen Lymphknoten im Rahmen der *N. b.* Infektion (**Abb. 16**) = nach SSC^{high} CD45⁺ DeadAqua⁻ CD11b⁺ Siglec-F^{high}

-Gating von Eosinophilen aus der Lunge im Rahmen der *N. b.* Infektion (**Abb. 17**) = nach SSC^{high} CD45⁺ DeadAqua⁻ CD11b⁺ Siglec-F^{high}

-Gating von Eosinophilen aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe im Rahmen der *N. b.* Infektion (**Abb. 18**) = nach SSC^{high} CD45⁺ DeadAqua⁻ CD11b⁺ Siglec-F^{high}

-Gating von iILC2 und nILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten im Rahmen der *N. b.* Infektion (**Abb. 19**) - iILC2 = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] KLRG1⁺ CD25^{low}; nILC2 = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] KLRG1⁺ CD25^{high}

-Gating von iILC2 und nILC2 aus der Lunge im Rahmen der *N. b.* Infektion (**Abb. 20**) - iILC2 = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] KLRG1⁺ CD25^{low}; nILC2 = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] KLRG1⁺ CD25^{high}

-Gating von iILC2 und nILC2 aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe im Rahmen der *N. b.* Infektion (**Abb. 21**) - iILC2 = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] KLRG1⁺ CD25^{low}; nILC2 = nach CD45⁺ DeadAqua⁻ Lin⁻ [Lin = CD3, CD5, CD19, FcεRIα, Ly6G, NK1.1] KLRG1⁺ CD25^{high}

-Gating von stimulierten Zellen im Rahmen einer *in vitro* Kultur (mit IL-7 + IL-25 + IL-33) - dazu analog ist das Gating bei einer Stimulation mit lediglich IL-7 und IL-33 (**Abb. 22**) = FSC-A und SSC-A auf geblastete Zellgröße CD45⁺ DeadAqua⁻

-Gating von lebenden und toten Zellen im Rahmen einer *in vitro* Kultur (mit IL-7) (**Abb. 23**) = FSC-A und SSC-A auf Zellgröße CD45⁺ DeadAqua^{-/+}

Aus den gateden Populationen wurde dann mithilfe des "Geometric Mean" die MFI für die physikalischen Parameter (FSC-A, SSC-A) oder aber für die diversen Oberflächenmarker bzw. Transkriptionsfaktoren errechnet. Oder aber die Populationen wurden dargestellt bzw. ausgewertet wie in den Experimenten mit Apoptose - Assay / CPD / Zellzyklus - Farbstoff notwendig (siehe dort). Die errechneten Werte wurden anschließend in GraphPad Prism 8 übertragen, dargestellt und mit Hilfe dieses Programmes ungepaarte t - Tests durchgeführt, bei welchen das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ lag.

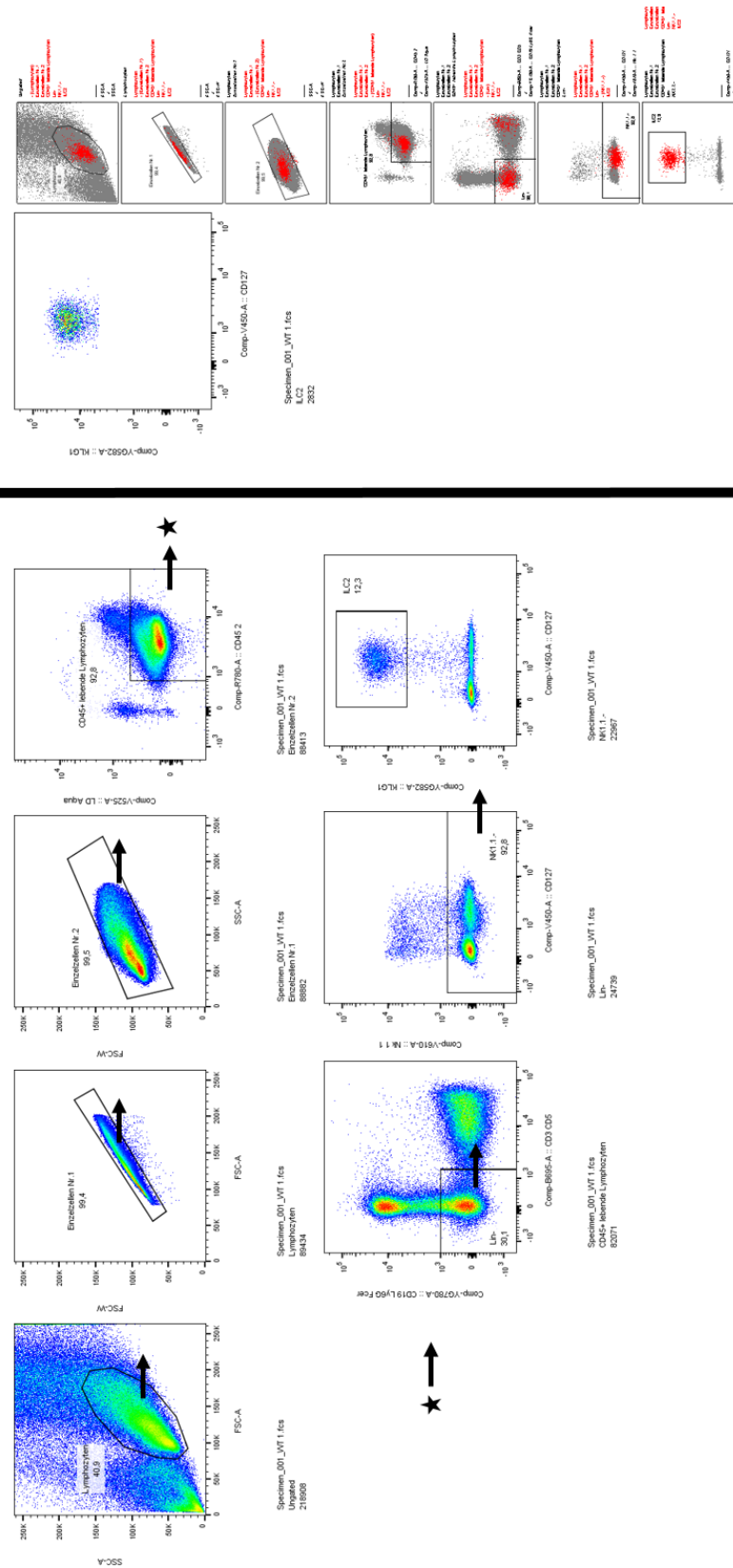


Abbildung 4: Sorting von "Steady State" - ILC2 aus der L. p. des Dünndarms. Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das "Backgating".

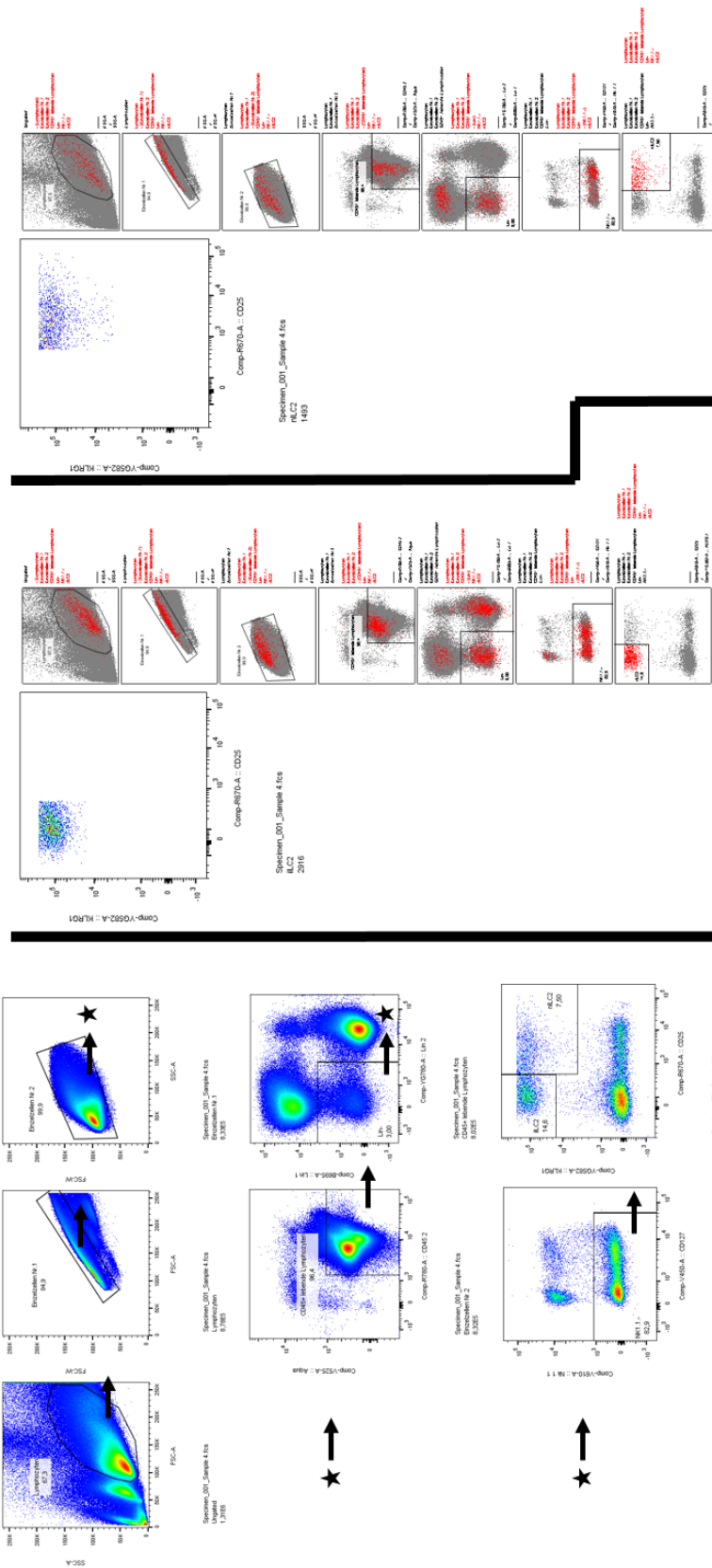


Abbildung 5: Sorting von iILC2 und nILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten. Auf der linken Seite die Gating - Strategie, das "Backgating" befindet sich mittig (iILC2) und auf der rechten Seite (nILC2).

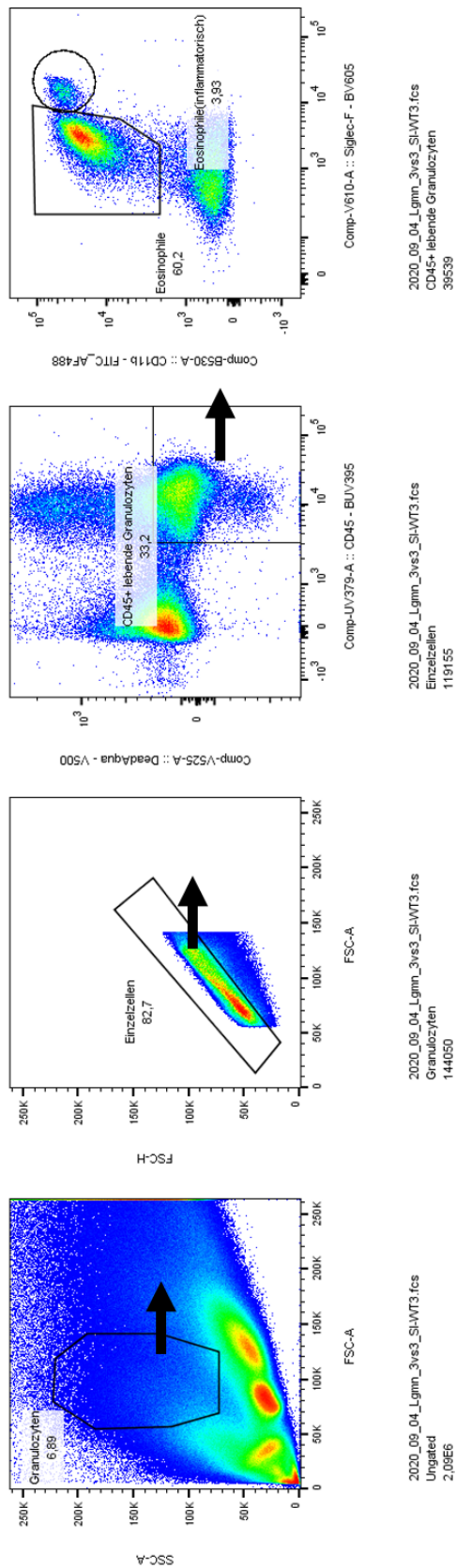
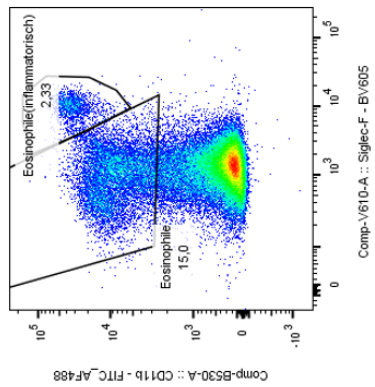
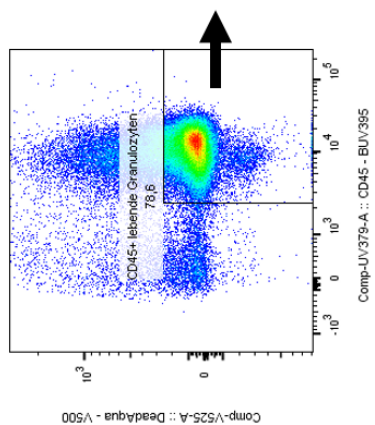


Abbildung 6: Gating von Eosinophilen aus der Lamina propria des Dünndarms (inklusive Eosinophile (inflammatorisch)).



2020_09_04_Lgmn_3vs3_MLN-VT2.fcs
 CD45+ lebende Granulozyten
 71452



2020_09_04_Lgmn_3vs3_MLN-VT2.fcs
 Einzelzellen
 90862

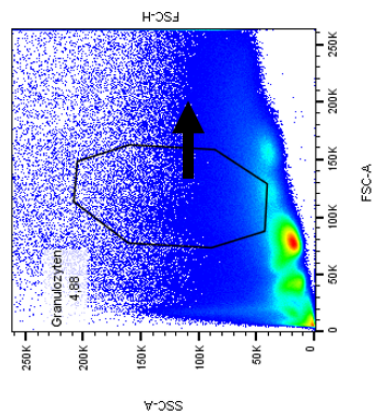
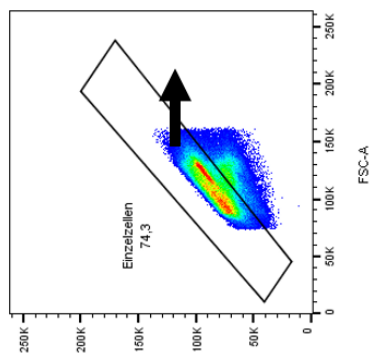


Abbildung 7: Gating von Eosinophilen aus den mesenterischen Lymphknoten (inklusive Eosinophile (inflammatorisch)).

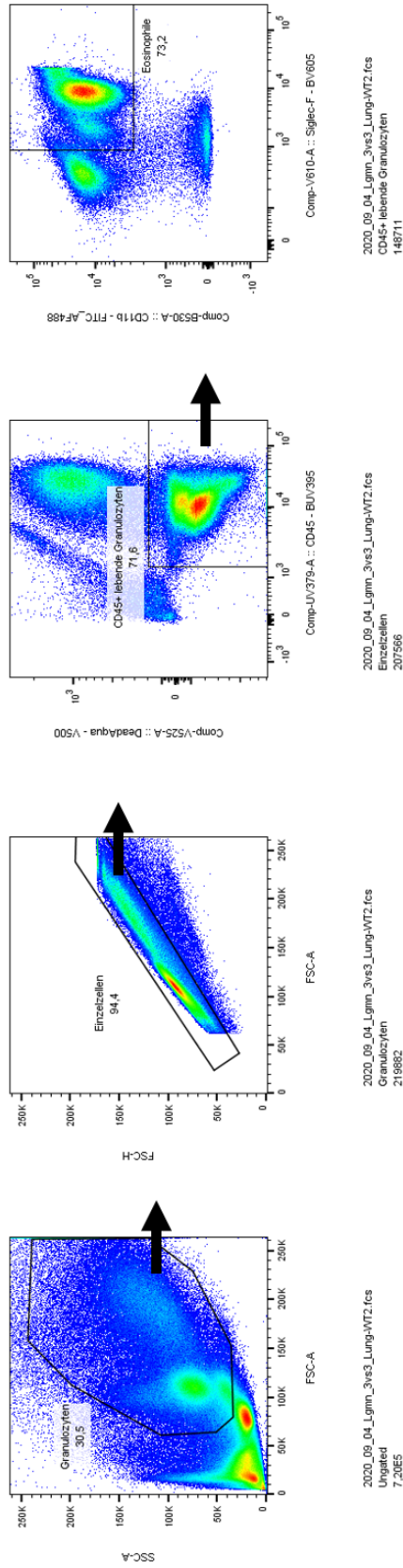


Abbildung 8: Gating von Eosinophilen aus der Lunge.

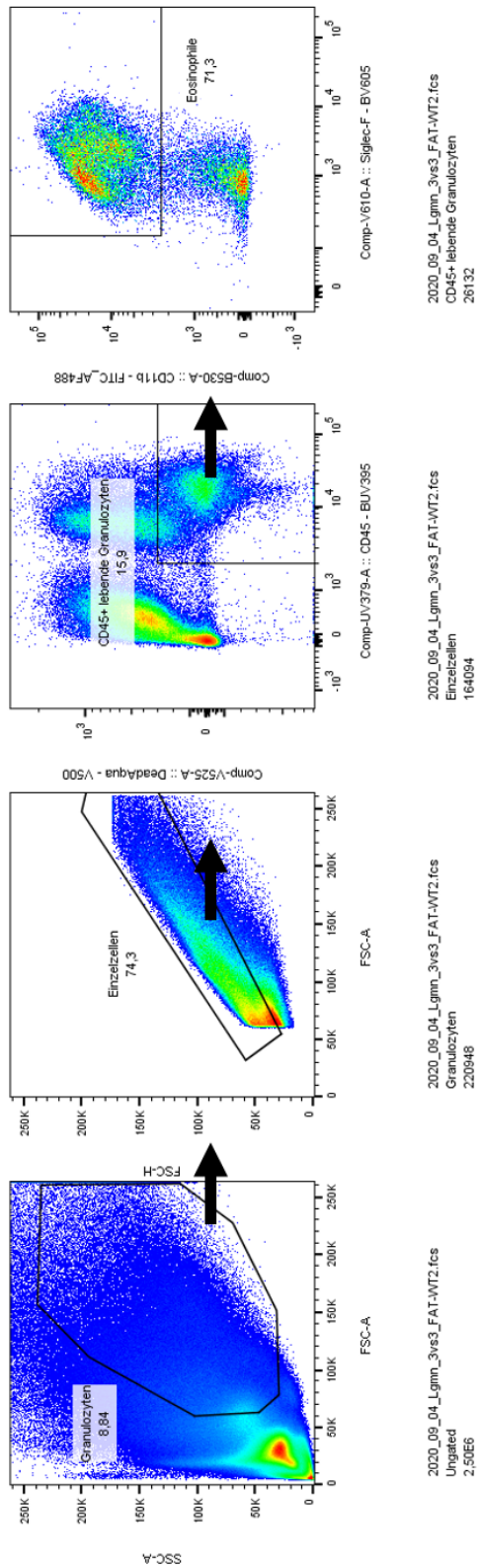


Abbildung 9: Gating von Eosinophilen aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe.

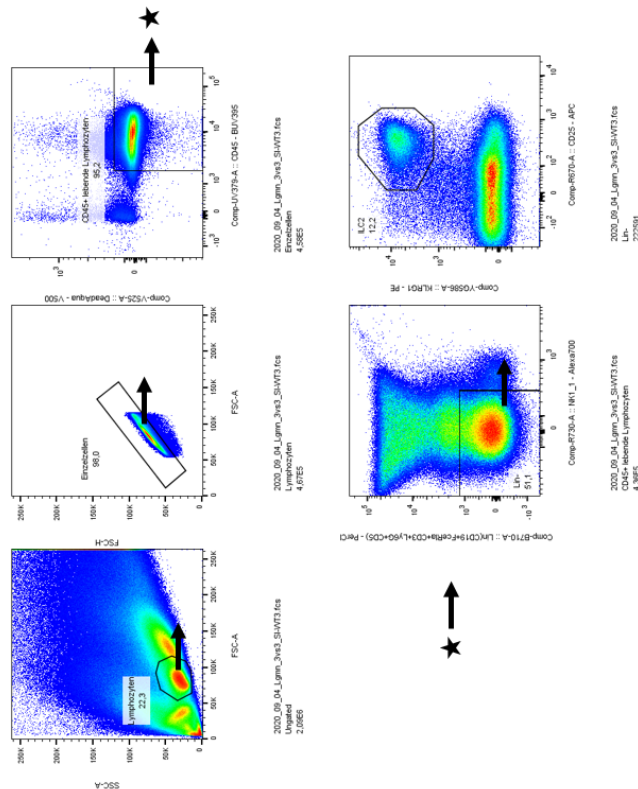
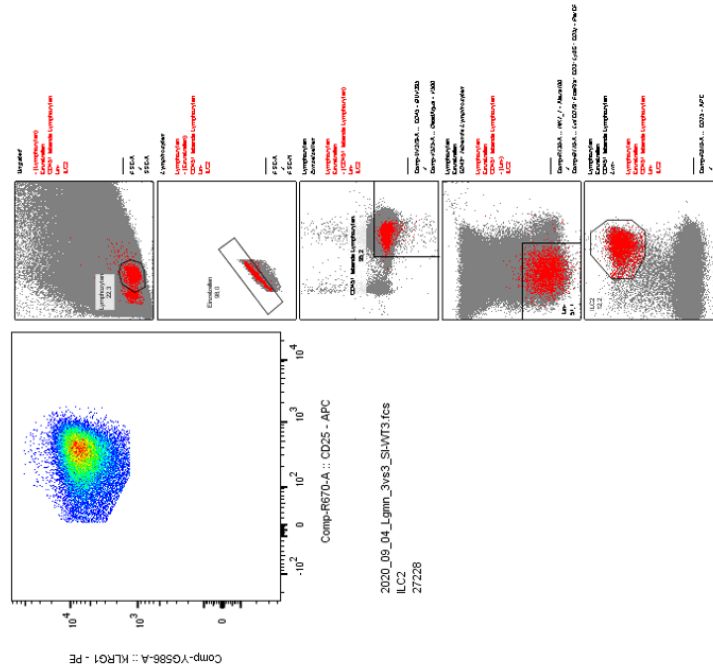


Abbildung 10: Gating von “Steady State“ - ILC2 aus der Lamina propria des Dünndarms (Option 1). Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das “Backgating“.

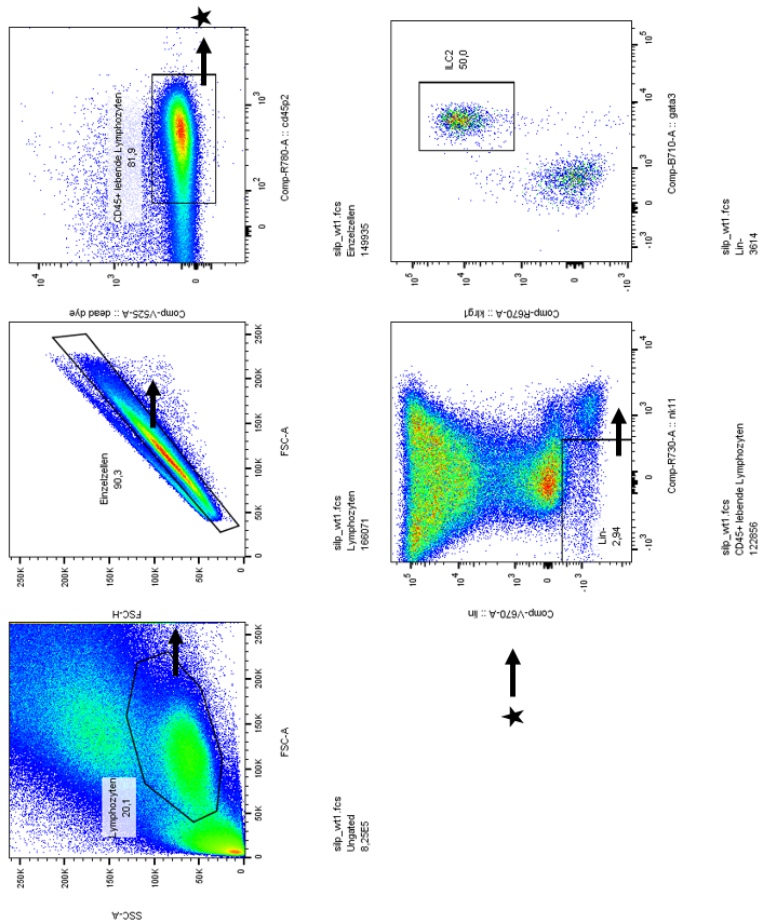
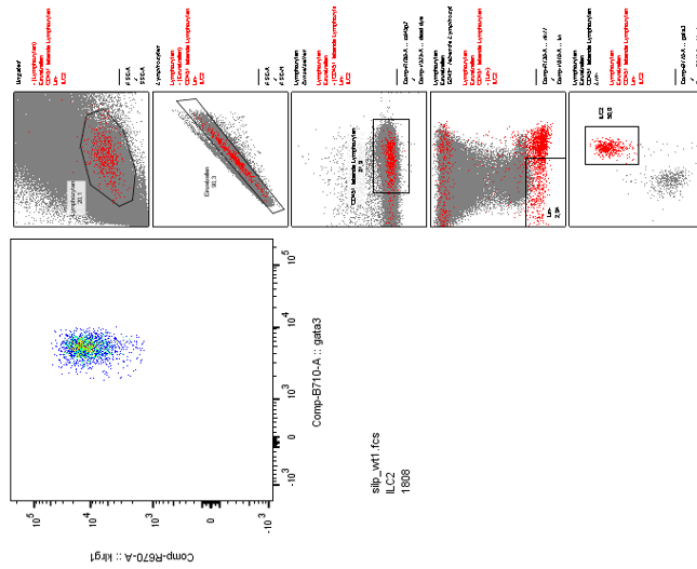


Abbildung 11: Gating von “Steady State“ - ILC2 aus der Lamina propria des Dünndarms (Option 2). Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das “Backgating“.

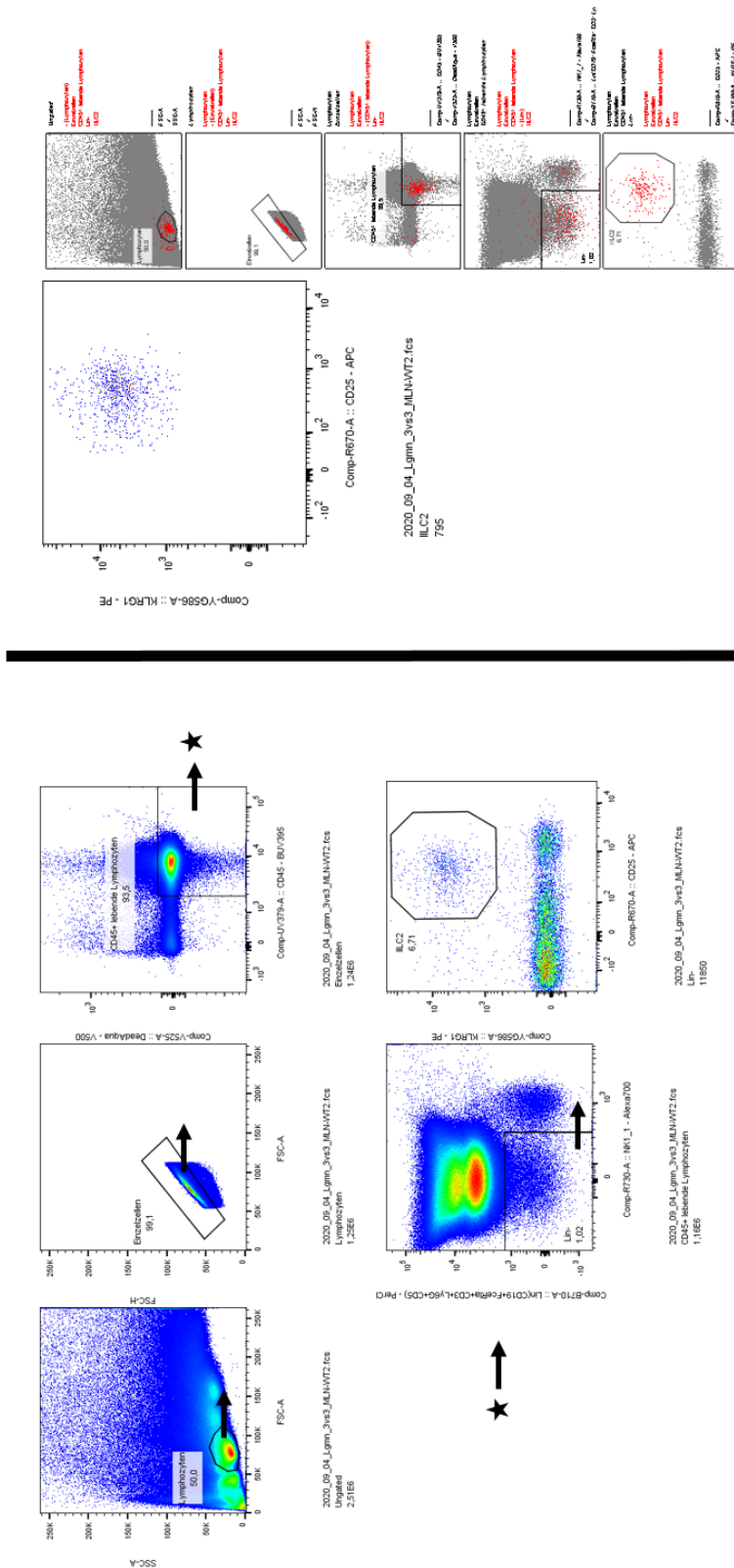


Abbildung 12: Gating von “Steady State“ - ILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten. Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das “Backgating“.

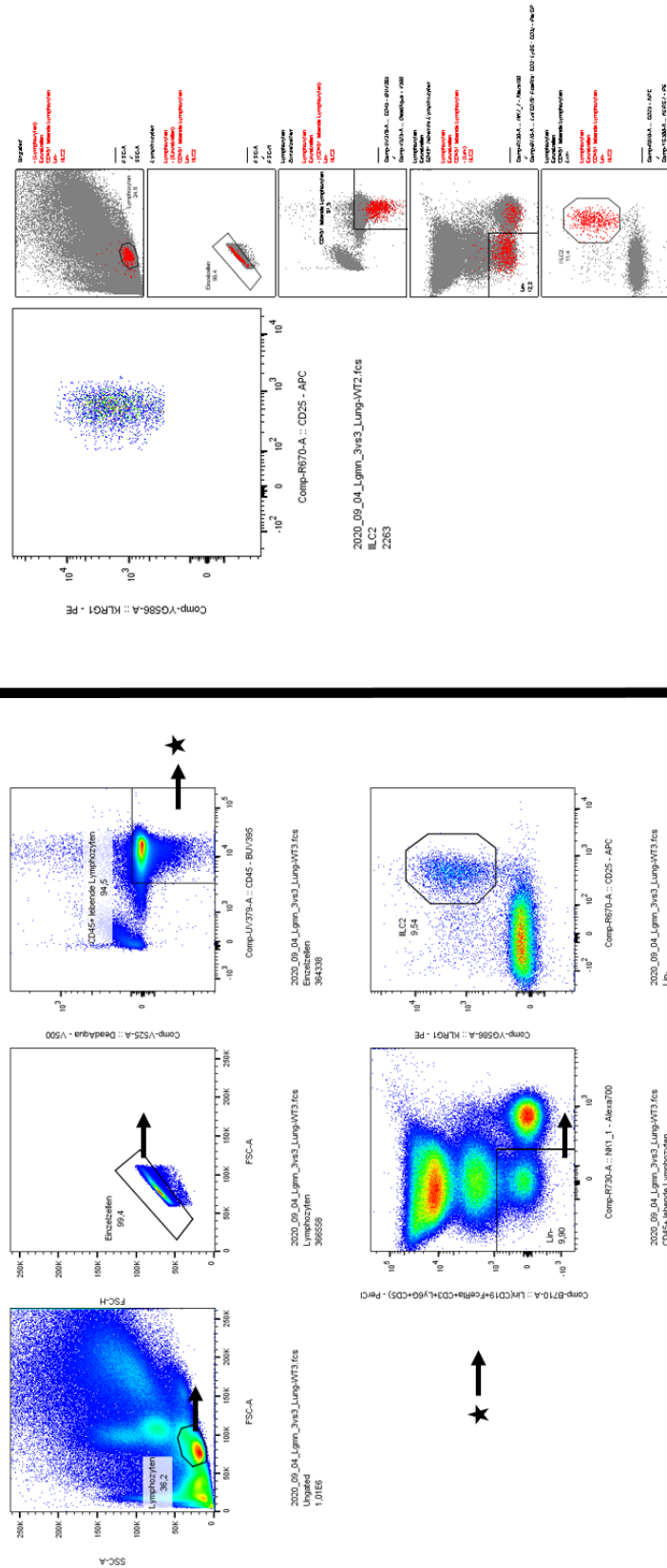


Abbildung 13: Gating von „Steady State“ - ILC2 aus der Lunge (Option 1). Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das “Backgating“.

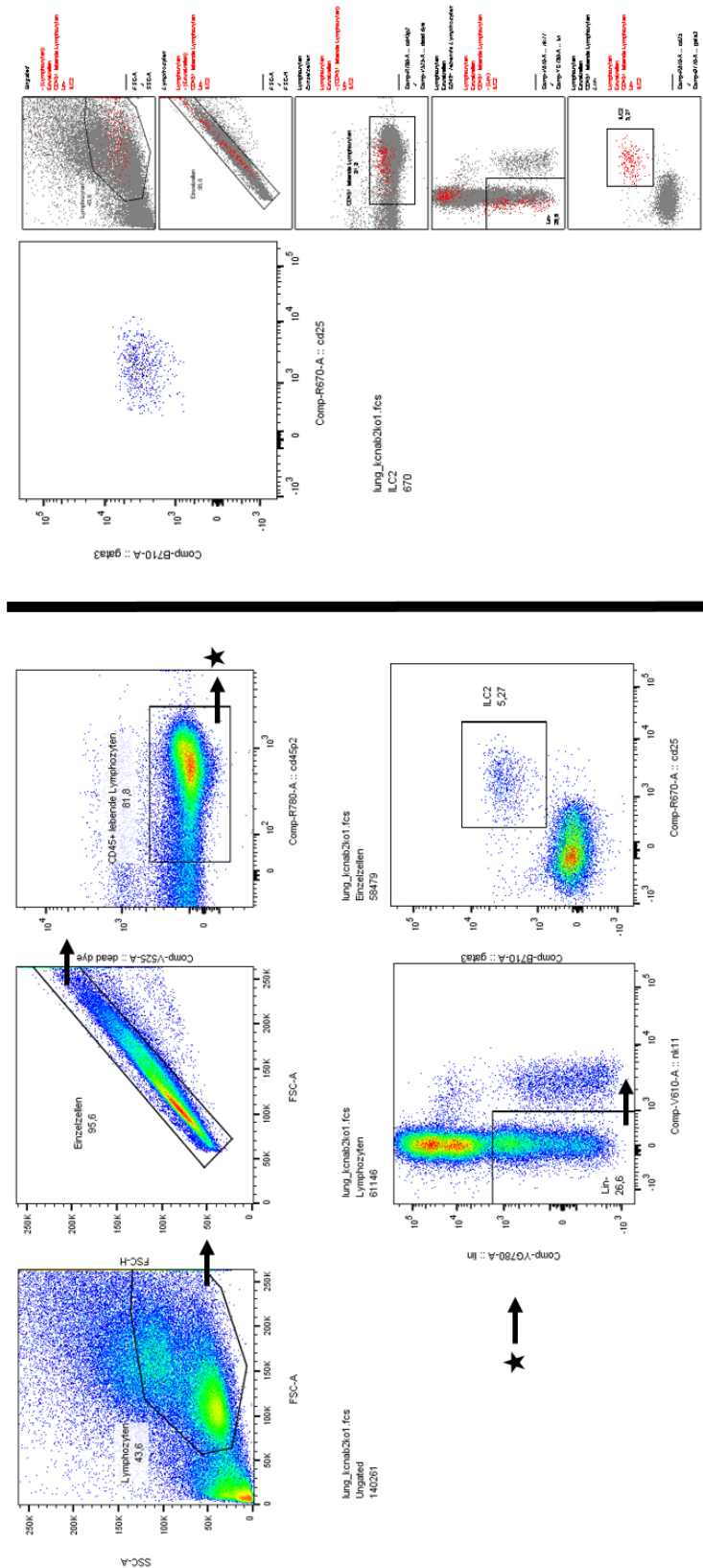


Abbildung 14: Gating von „Steady State“ - ILC2 aus der Lunge (Option 2). Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das “Backgating“.

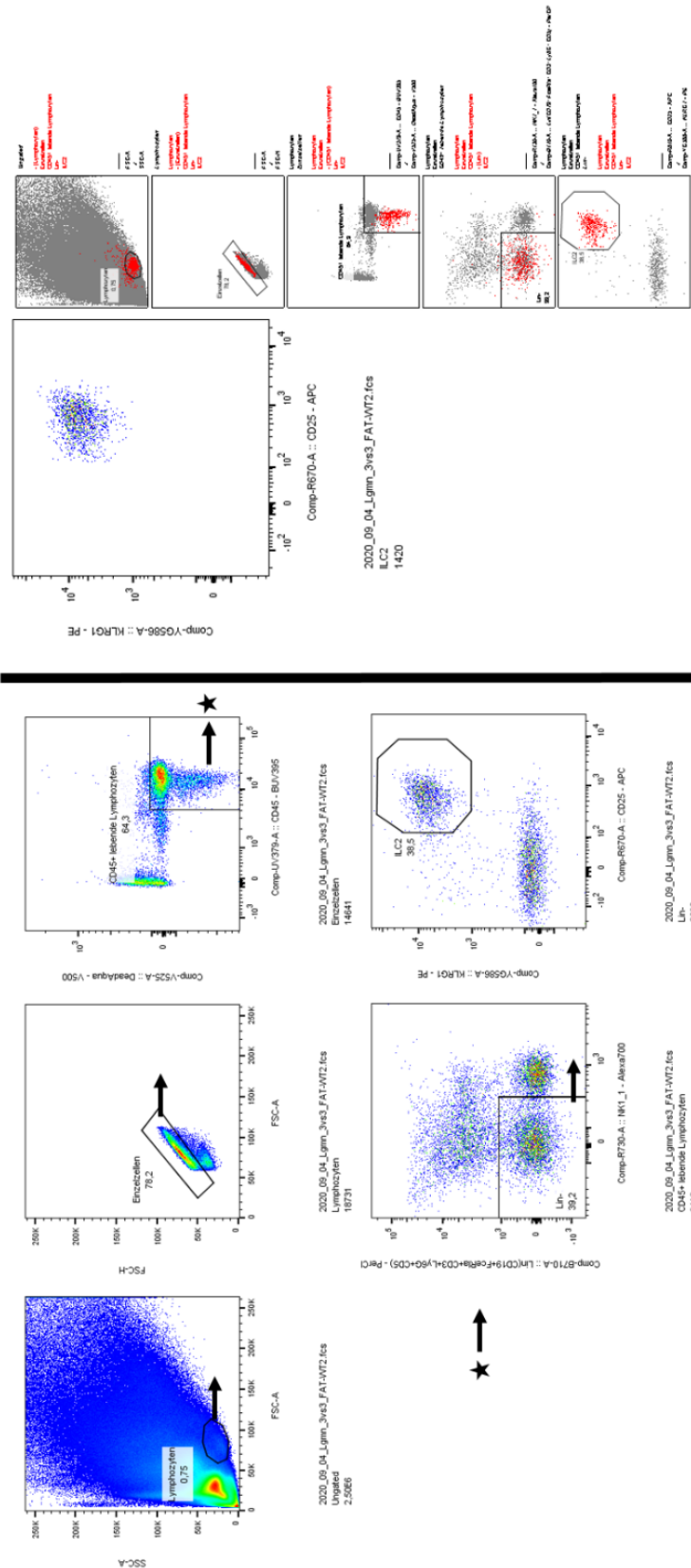
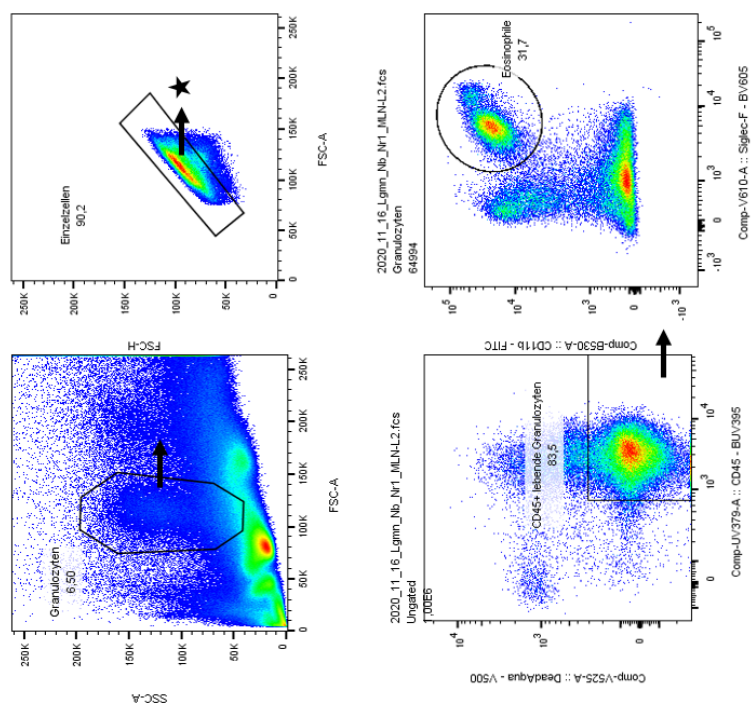
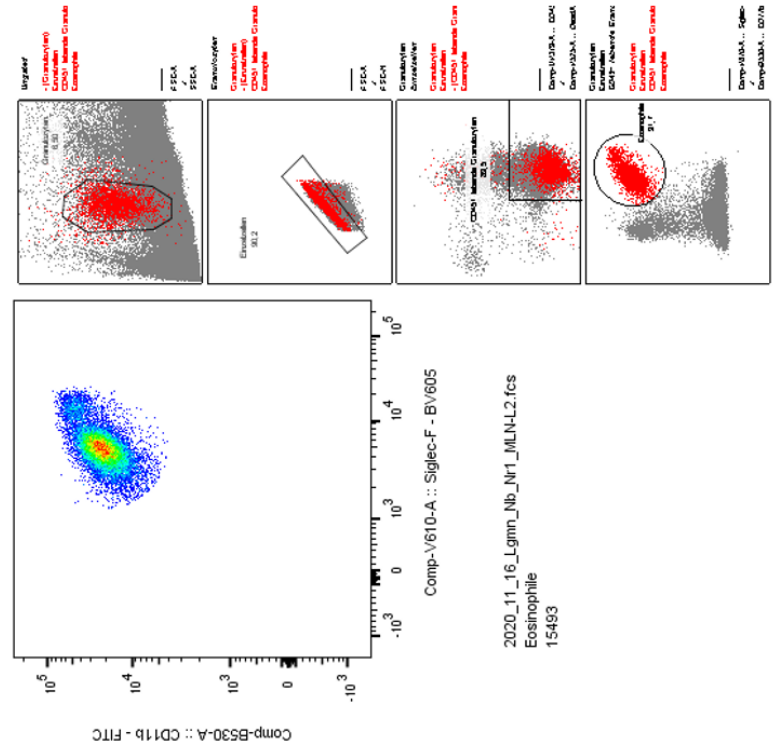


Abbildung 15: Gating von "Steady State" - ILC2 aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe. Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das "Backgating".



2020_11_16_Lgmn_Nb_Nf1_MLN.L2.fcs



Abbildung 16: Gating von Eosinophilen aus den mesenterischen Lymphknoten im Rahmen der *N. b.* Infektion. Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das "Backgating".

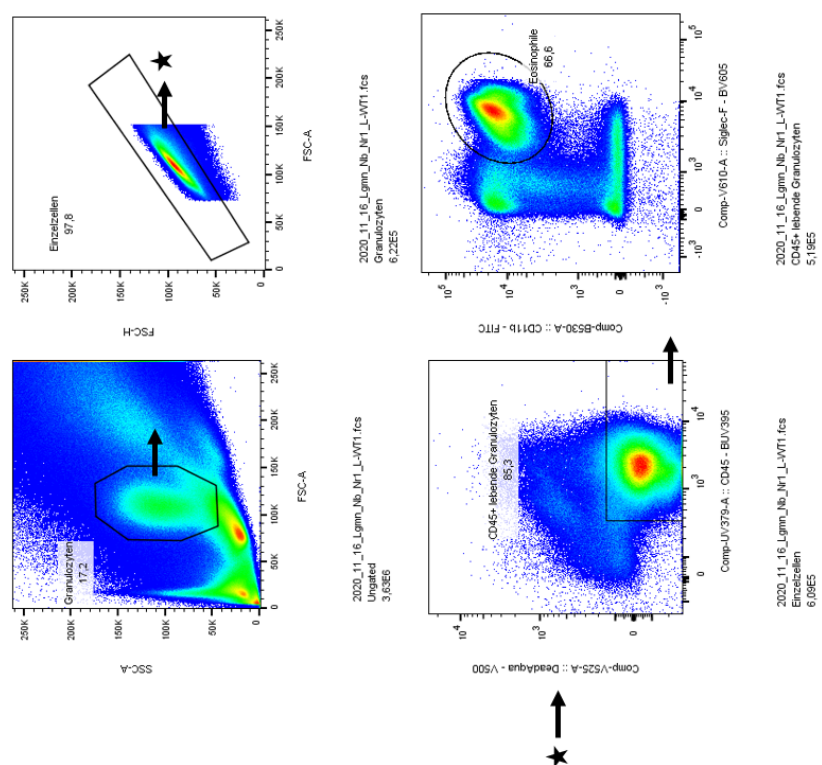
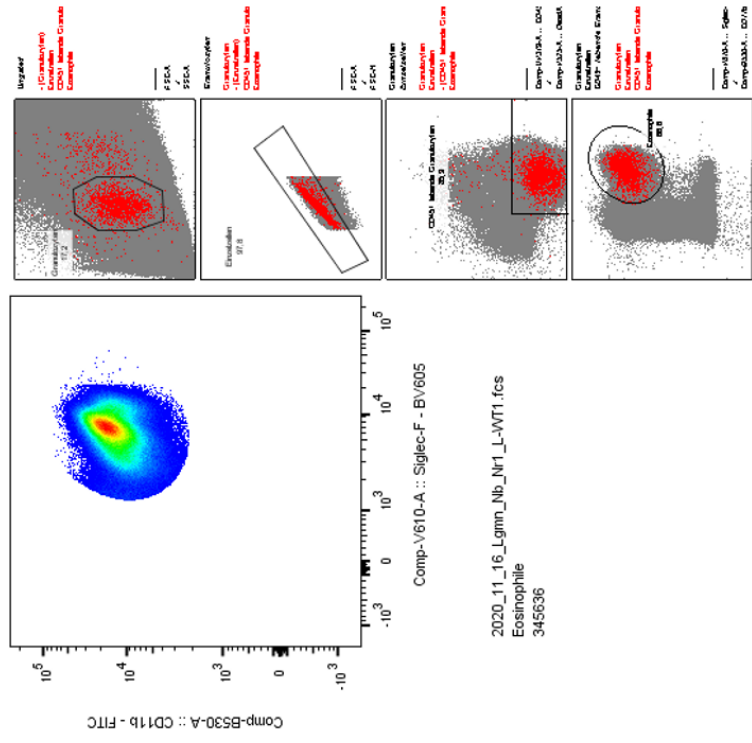


Abbildung 17: Gating von Eosinophilen aus der Lunge im Rahmen der *N. b.* Infektion. Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das "Backgating".

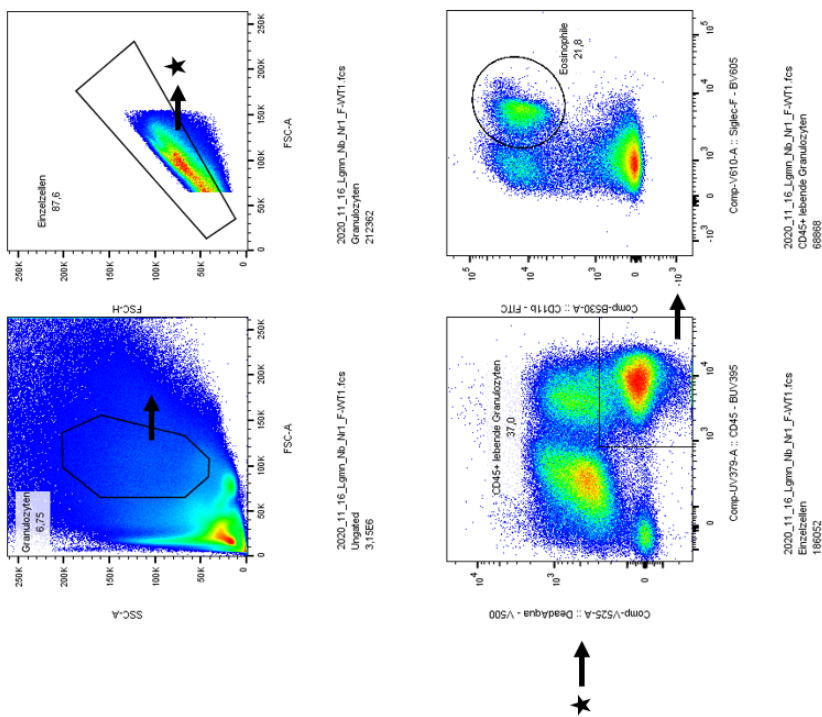
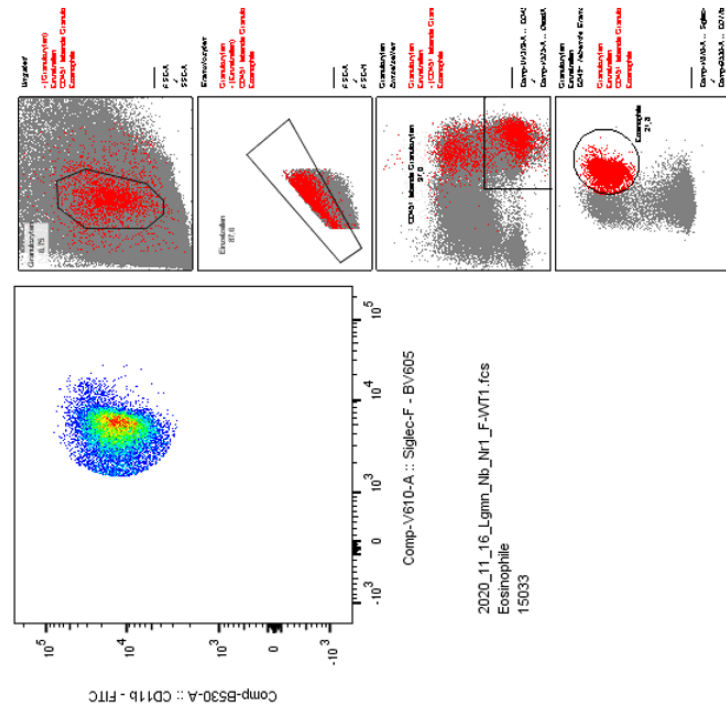


Abbildung 18: Gating von Eosinophilen aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe im Rahmen der *N. b.* Infektion. Auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das “Backgating“.

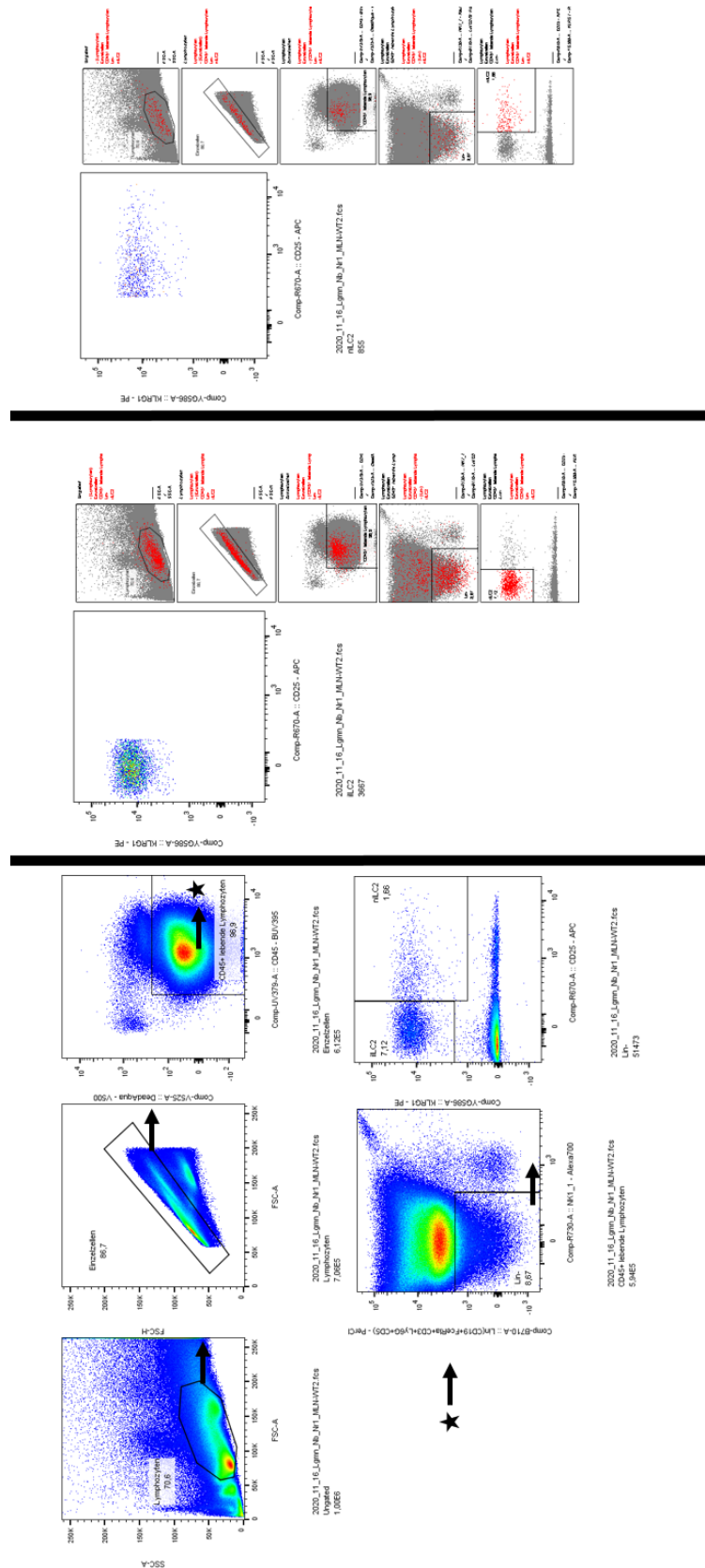


Abbildung 19: Gating von iILC2 und nILC2 aus den mesenterischen Lymphknoten im Rahmen der *N. b.* Infektion. Auf der linken Seite die Gating - Strategie, das “Backgating“ befindet sich mittig (iILC2) und auf der rechten Seite (nILC2).

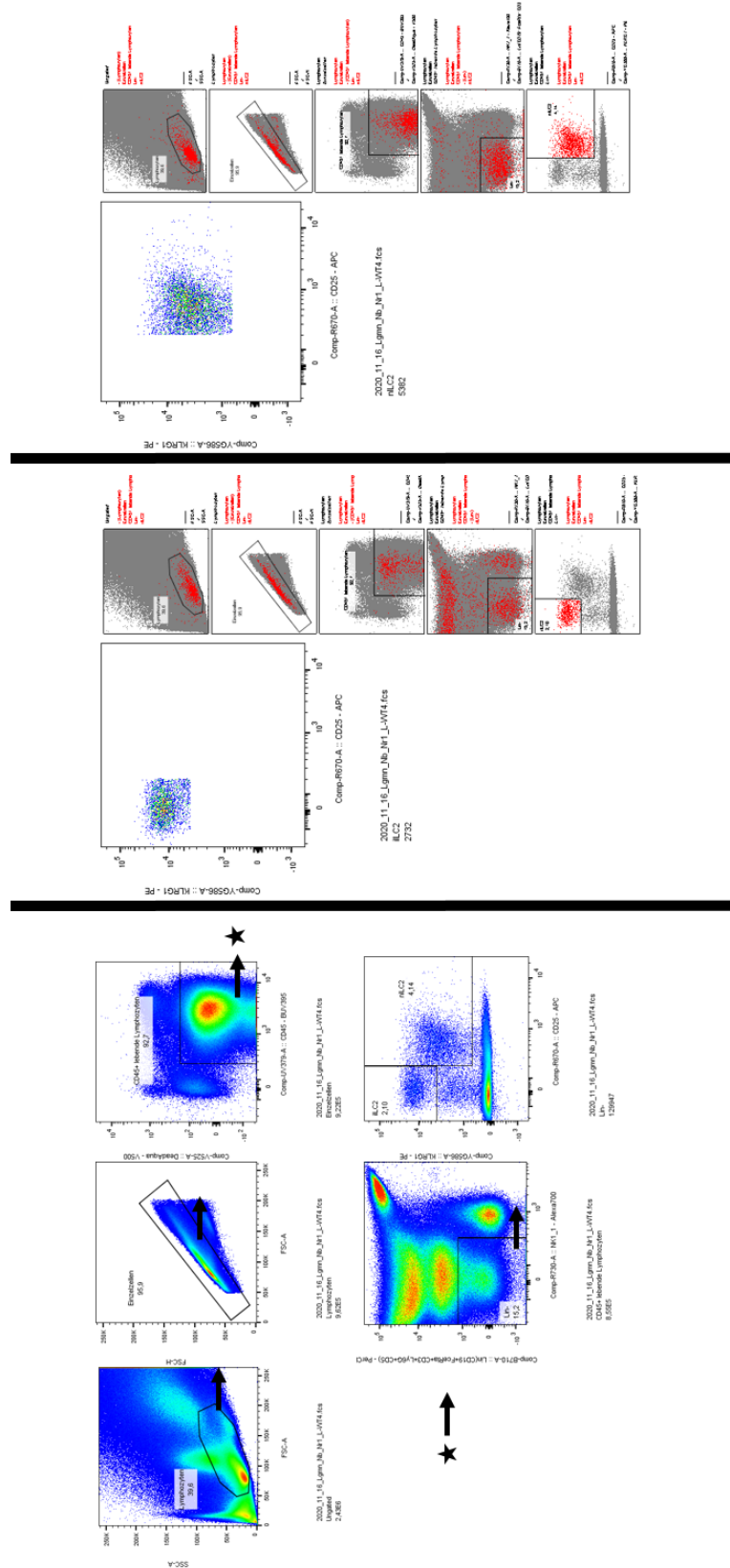


Abbildung 20: Gating von iILC2 und nILC2 aus der Lunge im Rahmen der *N. b.* Infektion. Auf der linken Seite die Gating - Strategie, das "Backgating" befindet sich mittig (iILC2) und auf der rechten Seite (nILC2).

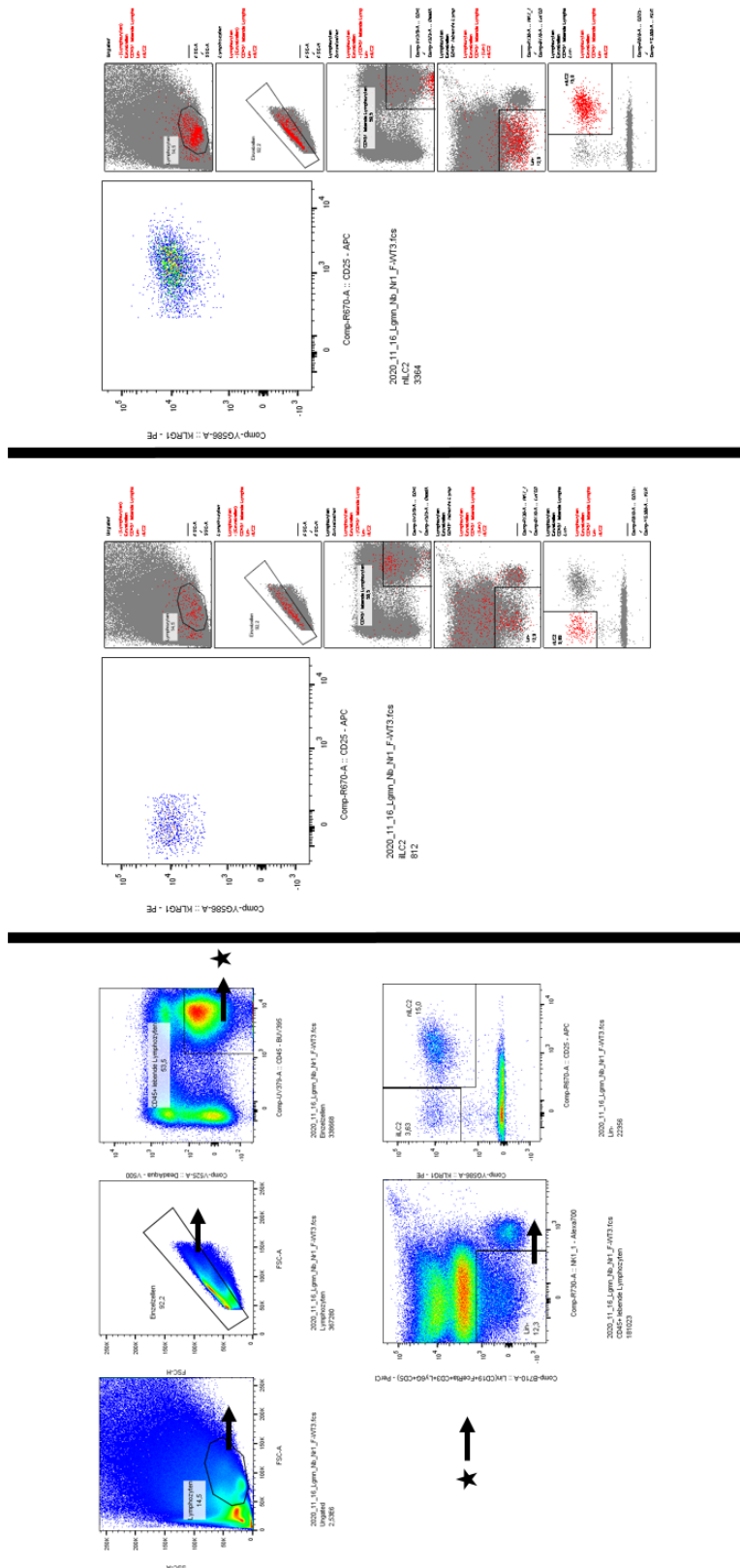


Abbildung 21: Gating von iILC2 und nILC2 aus dem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe im Rahmen der *N. b.* Infektion. Auf der linken Seite die Gating - Strategie, das "Backgating" befindet sich mittig (iILC2) und auf der rechten Seite (nILC2).

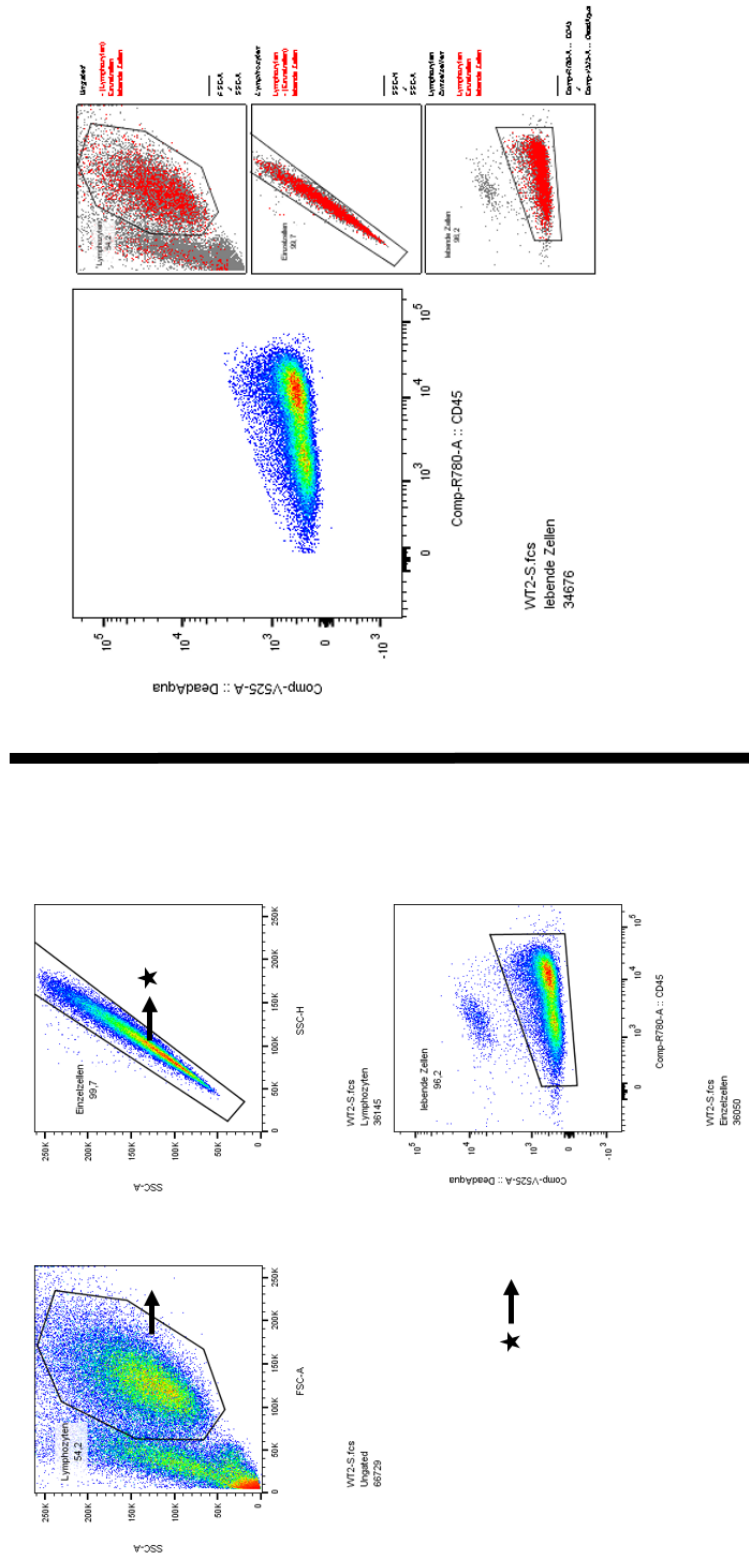


Abbildung 22: Gating von stimulierten Zellen im Rahmen einer *in vitro* Kultur (mit IL-7 + IL-25 + IL-33). Dazu analog ist das Gating bei einer Stimulation mit lediglich IL-7 und IL-33 - auf der linken Seite die Gating - Strategie auf der rechten Seite das "Backgating".

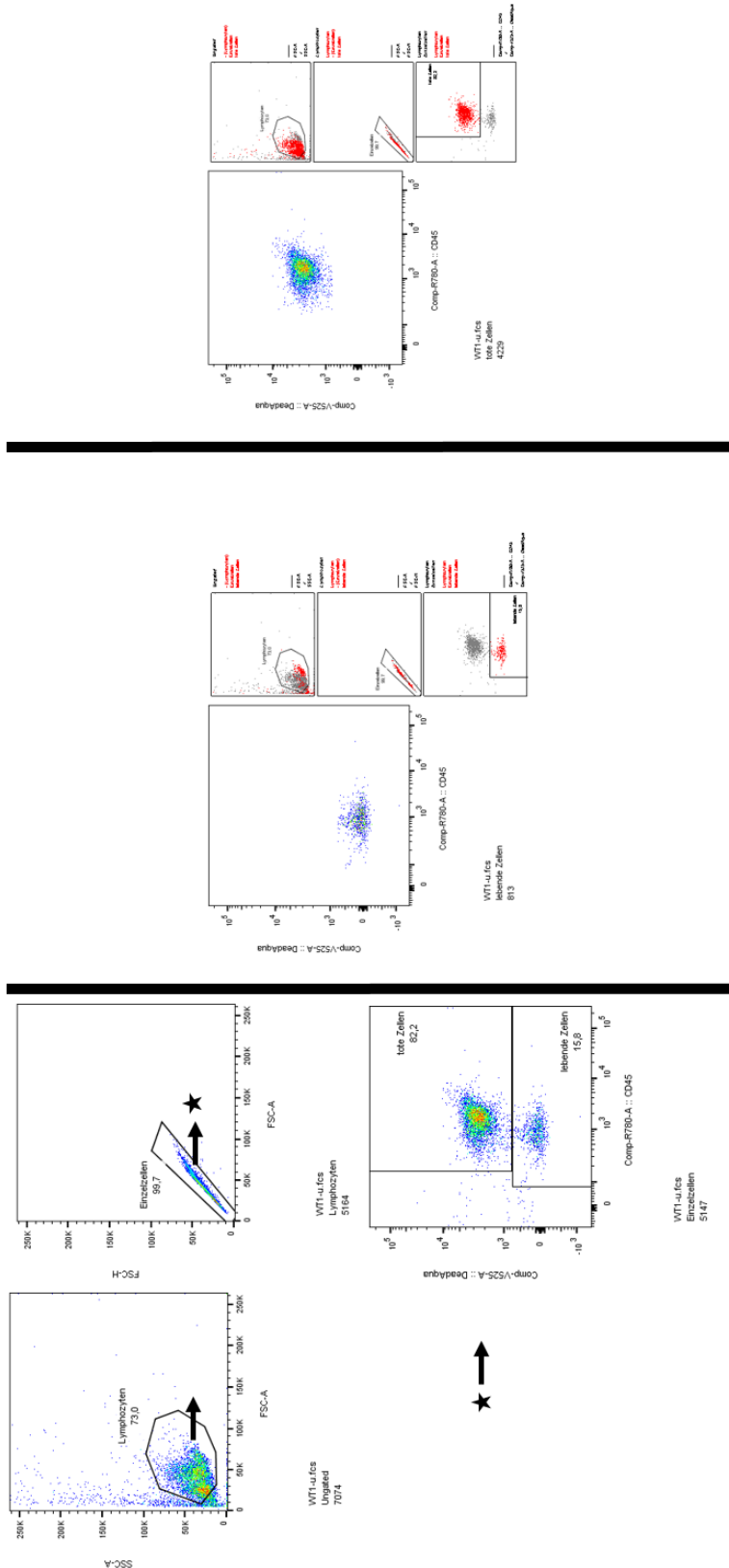


Abbildung 23: Gating von lebenden und toten Zellen im Rahmen einer *in vitro* Kultur (mit IL-7). Auf der linken Seite die Gating - Strategie, das "Backgating" befindet sich sowohl mittig (lebende Zellen) als auch auf der rechten Seite (tote Zellen).

z. Erklärungen zur Statistik

Auf Empfehlung des Charité - Promotionsbüros (Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow - Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353, Berlin), wurde die Beratung durch einen akkreditierten Statistiker in Anspruch genommen. Dafür wurde mit Dr. rer. nat. Maximilian Wechsung, vom Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, Charitéplatz 1, 10117, Berlin), gesprochen. Die statistischen Tests dieser Studie wurden wie folgt durchgeführt. Zunächst wurde vor jedem Experiment eine primäre Fragestellung (selten 2 primäre Fragestellungen) definiert (primäres / -er Outcome / Endpunkt). Nach Akquirierung der Daten wurde nun zunächst kontrolliert, ob diese annähernd normalverteilt sind (bei Kohorten von 4 / 5 / 6 Mäusen ist dies nur näherungsweise möglich). Anschließend wurden mit den Datensätzen ungepaarte t - Tests durchgeführt, um zu analysieren, ob die gesehenen Unterschiede statistische Signifikanz (mit Signifikanzniveau $p < 0,05$) besaßen. Dabei waren diese Tests vorwiegend relevant für die primären Endpunkte. Dennoch wurde auch für die als sekundäre Endpunkte untersuchten Parameter ungepaarte t - Tests durchgeführt, für diese wurde jedoch nicht auf multiples Testen adjustiert / korrigiert (vgl. Zertifikat Statistik im Anhang).

6. Ergebnisse

a. Mikrobiotische Regulation der ILC2 (Wildlinge)

Bisher bekannt über iILC2 ist, dass sie entweder im Rahmen einer *N. b.* Infektion oder aber durch eine Stimulation mit intraperitoneal appliziertem IL-25 (Huang et al., 2015) oder IL-33 (Flamar et al., 2020) in den MLN oder der Lunge zu finden sind. Unklar ist bisher jedoch ob und welche weiteren Stimuli bzw. Bedingungen zum Auftreten von iILC2 führen.

Rosshart und Kollegen beschreiben in ihren Artikeln eine Population an Mäusen, getauft auf den Namen Wildlinge, welche ein Mikrobiom aufweisen, das der freien Wildbahn ähnelt. Darüber hinaus legen sie dar, dass dieses Mausmodell besser geeignet ist, um auch (patho -) physiologische Vorgänge im Menschen durch Mausexperimente zu erklären (Rosshart et al., 2019, Rosshart et al., 2017).

Aus der Literatur wissen wir, dass iILC2 nicht oder kaum in SPF Mäusen vorkommen. Wir wollten nun herausfinden, ob bedingt durch ein Mikrobiom, welches der freien Wildbahn ähnelt, iILC2 in Mäusen (Wildlingen) zu finden sind. Dies wurde bisher nicht durch Rosshart und Kollegen untersucht. Hierbei wollten wir insbesondere die MLN betrachten, in welchen bereits von Huang und Kollegen, sowie Flamar und Klose, das Auftreten von iILC2 beobachtet wurde. Als Kontrolltiere wählten wir die unter Standardbedingungen der FEM der Charité am CBF gehaltenen SPF Mäuse. Aus der Literatur bekannt ist, dass die Wildling - Mäuse ein natürlicheres Mikrobiom besitzen, in welchem sich vermehrt Pathogene befinden, darunter diverse Viren, Bakterien und Pilze, welche in Ihrer Gesamtheit eine kontinuierliche Herausforderung bzw. "challenge" der Wirts - Fitness darstellen. Während Rosshart und Kollegen in ihren Artikeln das Mikrobiom der Wildlinge nicht auf Parasiten untersucht haben, so hat die FEM in ihren Screenings allerdings feststellen können, dass die Wildlinge auch von Parasiten belastet sind.

Zunächst analysierten wir die MLN auf das Vorhandensein von iILC2. Während in den SPF Mäusen sehr wenig bis keine iILC2 zu finden waren (dies ist bekannt aus bereits publizierter Literatur), so fanden sich in den MLN der Wildlinge signifikant mehr iILC2 (**Abb. 24 A bis C**).

Um diese iILC2 genauer zu analysieren stellte sich die Frage ob sie diverse Eigenschaften besaßen. Hierfür betrachteten wir bekannte ILC2 - Oberflächenmarker wie

CD25 (den IL-2 - Rezeptor), ST2 (den IL-33 - Rezeptor) und KLRG1. Es zeigte sich, dass die iILC2 aus den MLN der Wildlinge signifikant weniger CD25 (**Abb. 25 A und B**), und signifikant mehr KLRG1 (**Abb. 25 C**) auf ihrer Oberfläche exprimierten. Bezüglich ST2 fanden sich keine Unterschiede.

Für umfassendere Analysen der iILC2 der MLN betrachteten wir darüber hinaus deren Größe, mithilfe der MFI für den FSC-A, als auch ihre Granularität, durch die Bestimmung der MFI für den SSC-A. Hier zeigte sich, dass die Wildlinge signifikant größere iILC2 besaßen (**Abb. 26**), die SSC-A Werte wichen nicht relevant ab.

Da iILC2 in ihrer Entstehung und Homöostase eng mit nILC2 verwandt sind, untersuchten wir auch diese Zellpopulation in den MLN hinsichtlich Anzahl, Oberflächenmarker und physikalischen Eigenschaften. Es zeigte sich, dass die Wildlinge in ihren MLN signifikant mehr nILC2 als in den Kontrollen mit artifiziellem Mikrobiom besaßen (**Abb. 27 A und B**). Diese zeigten bezüglich CD25 und ST2 keine abweichenden Expressionen, wiesen aber weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche auf (**Abb. 28 A**). Gleichzeitig waren sie größer und komplexer (**Abb. 28 B und C**).

ILC2 sind in der Lage IL-5 zu sezernieren. Eosinophile Granulozyten werden durch IL-5 zur Expansion ihrer Population und Aktivität angeregt, um folgend Funktionen wie die Bekämpfung von Parasiten zu propagieren. Deshalb wollten wir untersuchen, ob die Wildlinge in ihren MLN von den SPF Mäusen abweichende Populationen an Eosinophilen besitzen. Hier zeigten sich signifikant mehr eosinophile Granulozyten (**Abb. 29 A bis C**). Diese waren auch gleichzeitig größer (FSC-A) und komplexer (SSC-A) als Hinweis auf eine erhöhte Zellaktivität (**Abb. 30 A bis D**).

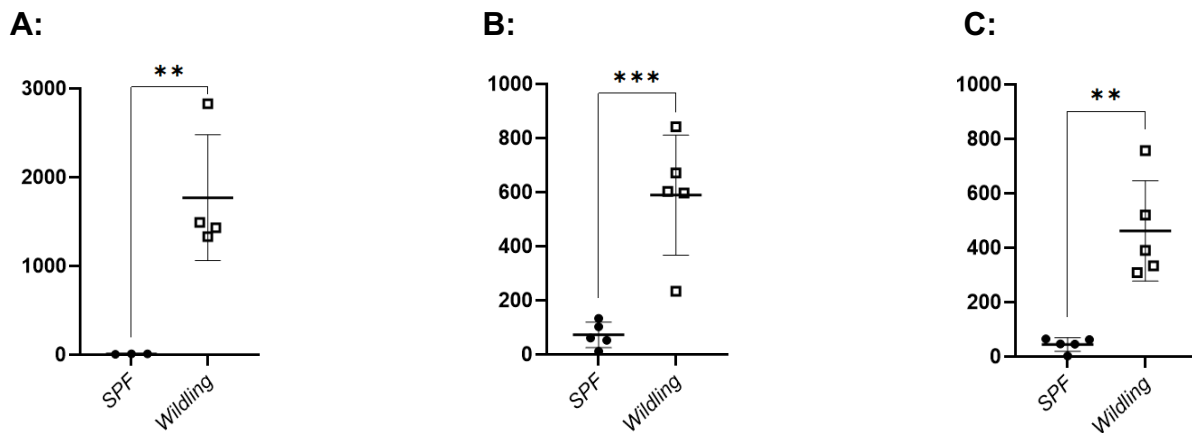


Abbildung 24: Wildlinge besitzen mehr iILC2 in ihren MLN. Absolute Anzahlen an iILC2 in den MLN von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (Statistischer Test = ungepaarter t-Test).

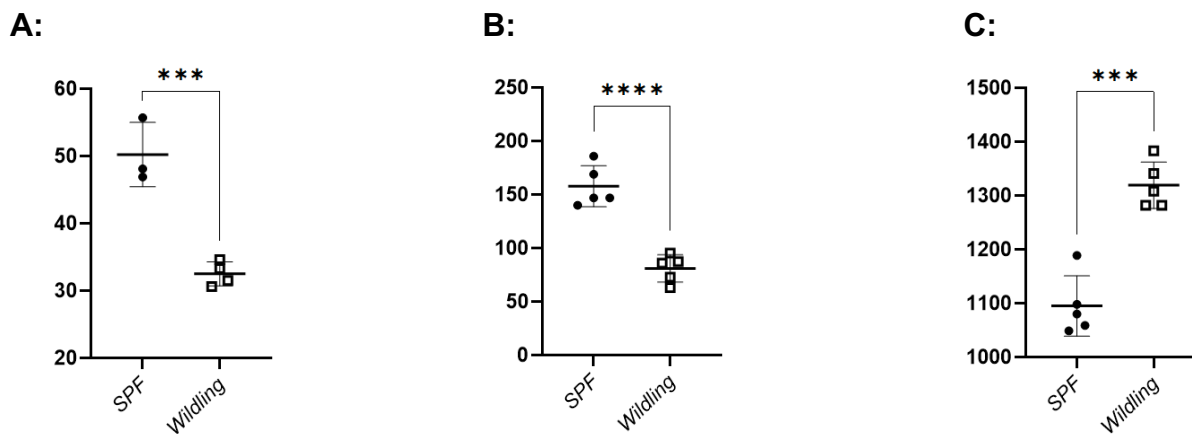


Abbildung 25: Die iILC2 der MLN der Wildlinge exprimieren weniger CD25 (A und B), sowie mehr KLRG1 (C) auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von CD25 (A und B), sowie KLRG1 (C) auf den iILC2 der MLN von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker der iILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

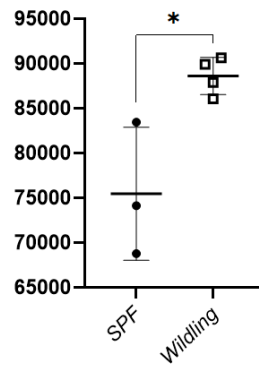
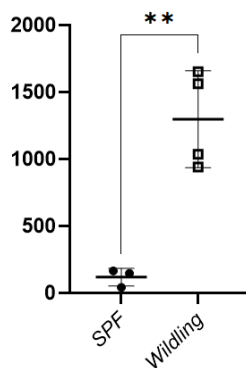


Abbildung 26: Die iILC2 der MLN der Wildlinge sind größer. MFI der FSC-A Werte der iILC2 der MLN von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der iILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

A:



B:

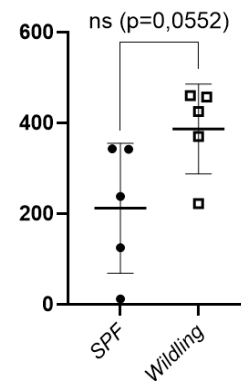


Abbildung 27: Wildlinge weisen mehr nILC2 in ihren MLN auf. Absolute Anzahlen an nILC2 in den MLN von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

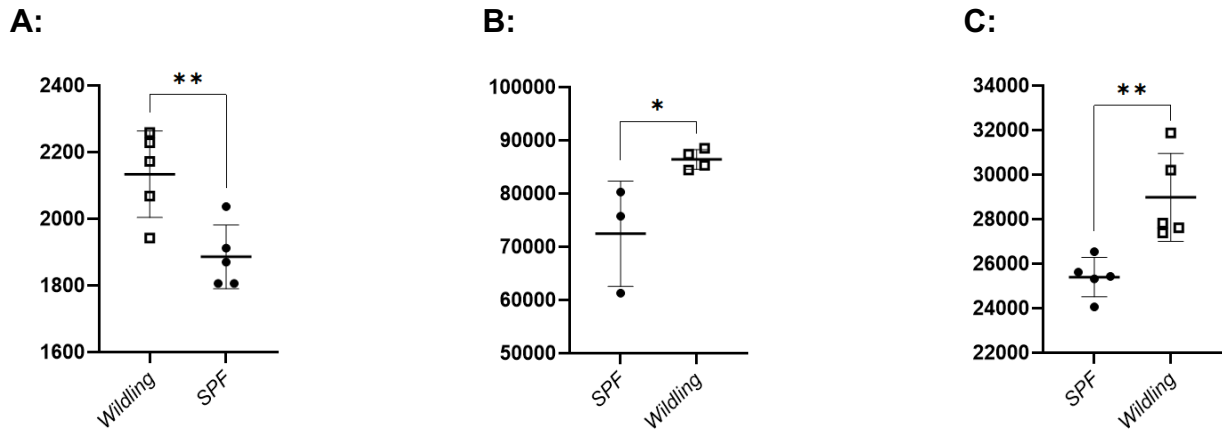


Abbildung 28: Die nILC2 der MLN der Wildlinge exprimieren weniger KLRG1 (A) auf ihrer Oberfläche und sind größer (B) und komplexer (C). MFI der Expression von KLRG1 (A) auf den nILC2 bzw. der FSC-A (B) und SSC-A Werte (C) der nILC2 der MLN von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker und der physikalischen Eigenschaften der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

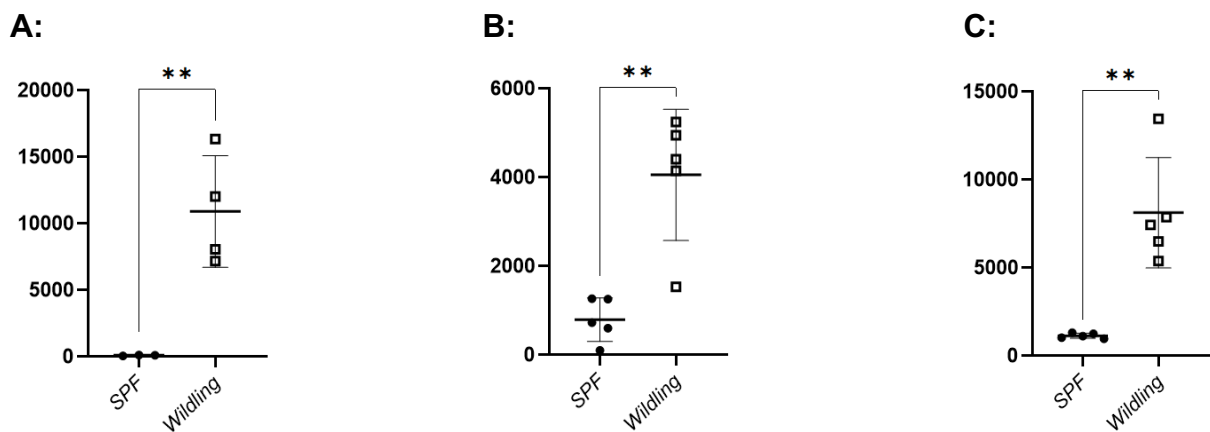
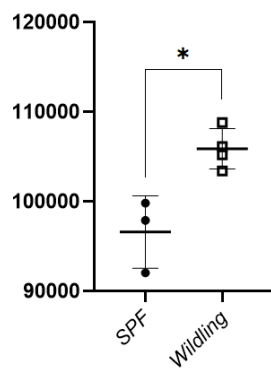
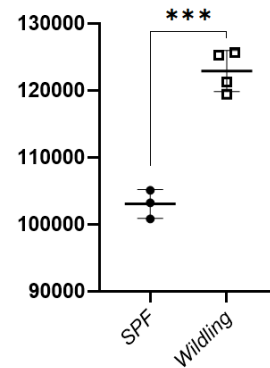


Abbildung 29: Wildlinge weisen mehr Eosinophile in ihren MLN auf. Absolute Anzahlen an Eosinophilen in den MLN von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Eosinophilen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

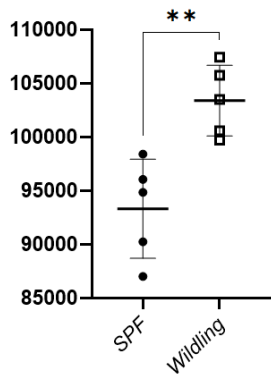
A:



B:



C:



D:

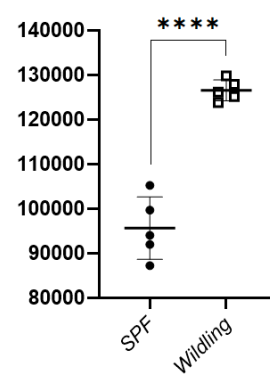


Abbildung 30: Die Eosinophilen der MLN der Wildlinge sind größer (A), sowie komplexer (B bis D). MFI der FSC-A (A) und SSC-A (B bis D) Werte der Eosinophilen der MLN von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der Eosinophilen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

In der freien Wildbahn tritt eine deutlich andere metabolische Belastung als im Rahmen der nutritiven Überversorgung der SPF Labormäuse, auf. ILC2 sind in der Literatur assoziiert mit der Regulation der Fett - Homöostase. In diesem Kontext wollten wir analysieren ob es im Fettgewebe der Wildlinge iILC2 gibt, und darüber hinaus ob diese, als auch verwandte Zellen (nILC2) oder durch sie regulierte Zellen (Eosinophile), hinsichtlich Frequenz, Oberflächenmarker oder Größe / Granularität, andersartig in Erscheinung treten.

Anders als in den MLN (hier keine / kaum iILC2) zeigten sich bereits in den SPF Mäusen geringe Mengen an iILC2 im Fettgewebe. In den Wildlingen waren die Anzahlen an iILC2 jedoch signifikant erhöht im Vergleich zu den SPF Mäusen (**Abb. 31 A bis D**). Es gilt jedoch hervorzuheben, dass die Menge an iILC2 im Fettgewebe der Wildlinge im Vergleich geringer war als die Menge in den MLN der Wildlinge.

Die iILC2 aus dem Fettgewebe der Wildlinge exprimierten ebenfalls weniger CD25 (**Abb. 32 A bis C**). Gleichzeitig exprimierten sie jedoch nicht mehr, sondern weniger KLRG1 (**Abb. 33 A bis C**). Und darüber hinaus fanden sich auch bezüglich ST2 signifikante Differenzen. So wiesen die iILC2 aus dem Fettgewebe der Wildlinge weniger ST2 auf ihrer Oberfläche auf (**Abb. 34 A bis C**). Des Weiteren schienen diese iILC2 kleiner (**Abb. 35 A**) und gleichzeitig weniger komplex zu sein (**Abb. 35 B**).

Die Population an nILC2 war im Fettgewebe der Wildlinge, im Gegensatz zur Population an nILC2 in den MLN, nicht vergrößert, sondern reduziert (**Abb. 36 A bis D**). Diese nILC2 besaßen darüber hinaus auf ihrer Oberfläche weniger CD25 (**Abb. 37 A und B**) und weniger KLRG1 (**Abb. 37 C**) jedoch keine Unterschiede bezüglich ST2. Des Weiteren waren sie größer (**Abb. 38 A und B**) sowie weniger komplex (**Abb. 39 A und B**).

Ebenfalls gegensätzlich zu den MLN präsentierten sich die Eosinophilen des Fettgewebes der Wildlinge. Hier fanden sich, vergleichbar mit den nILC2, ebenfalls nicht mehr, sondern weniger eosinophile Granulozyten (**Abb. 40 A bis C**). Gleichzeitig waren diese kleiner (**Abb. 41 A und B**) als auch weniger granuliert (**Abb. 42 A bis D**).

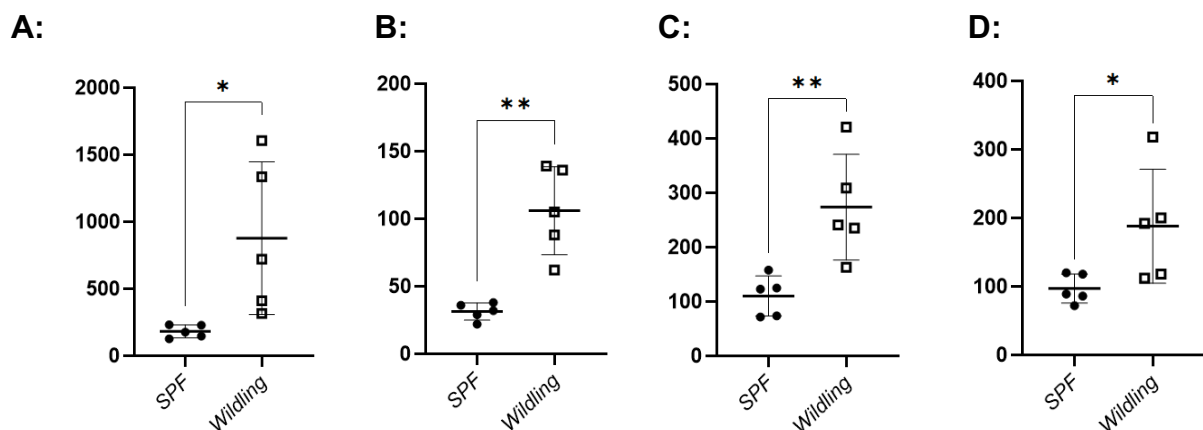


Abbildung 31: Wildlinge weisen mehr iILC2 in ihrem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe auf. Absolute Anzahlen an iILC2 im epididymalen / perigonadalen

Fettgewebe von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (Statistischer Test = ungepaarter t-Test).

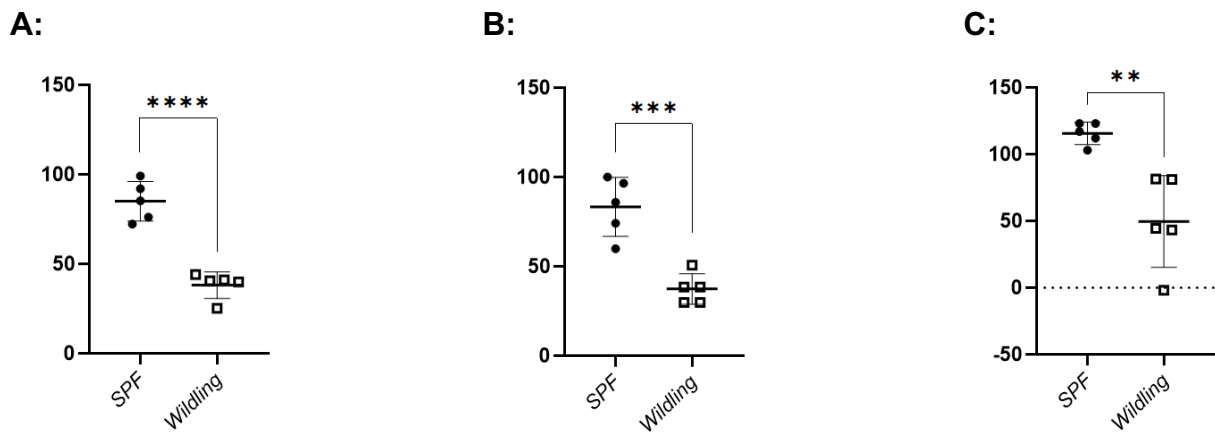


Abbildung 32: Die iILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge exprimieren weniger CD25 auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von CD25 auf den iILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker der iILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

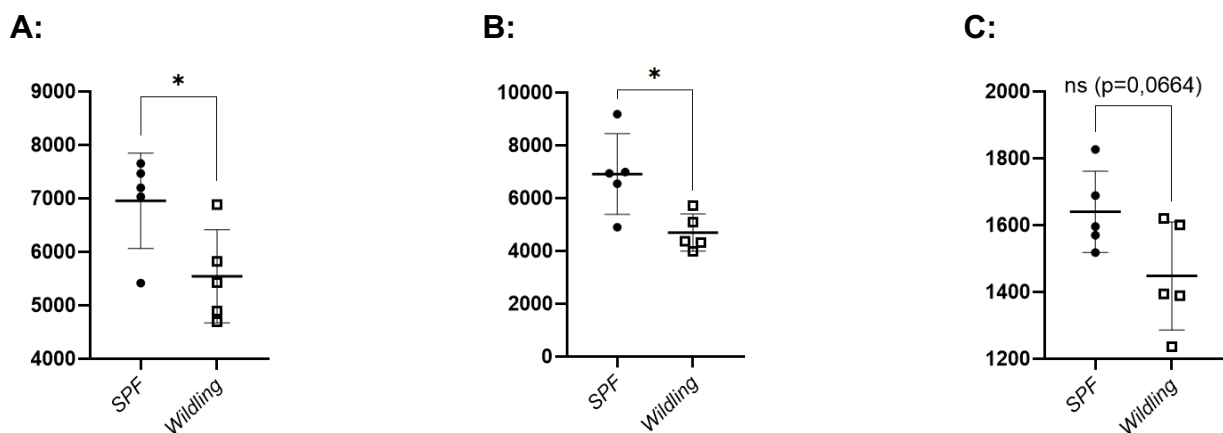


Abbildung 33: Die iILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge exprimieren weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von KLRG1 auf den iILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker der iILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker der iLC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

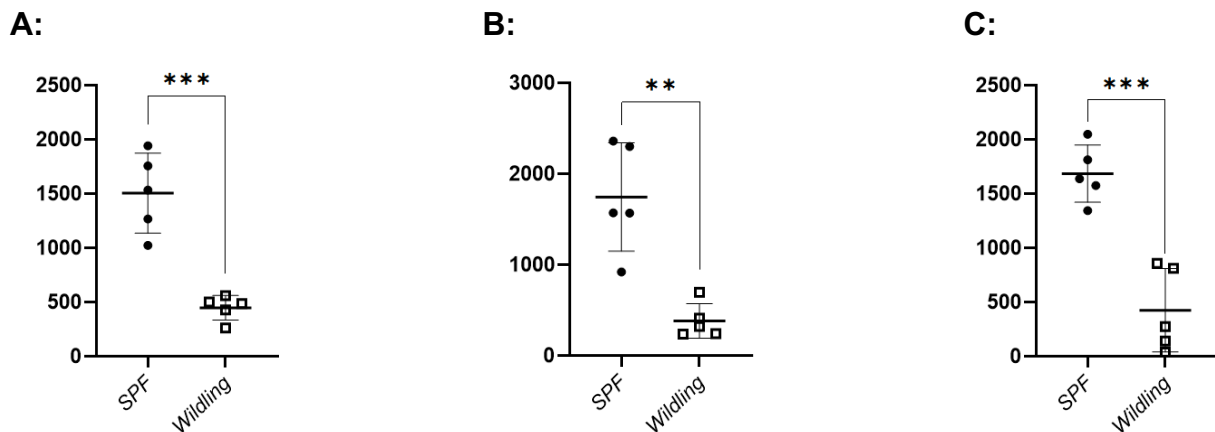


Abbildung 34: Die iLC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge exprimieren weniger ST2 auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von ST2 auf den iLC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker der iLC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

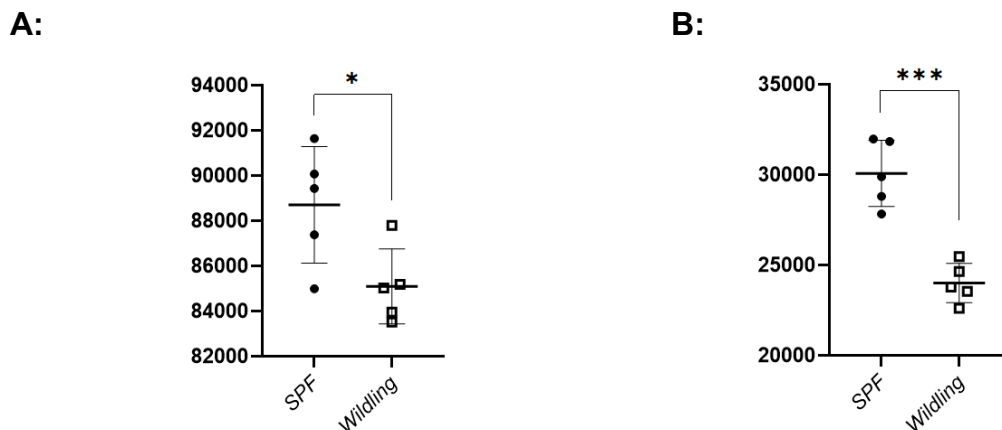


Abbildung 35: Die iLC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind kleiner (A) und weniger komplex (B). MFI der FSC-A (A) und SSC-A (B) Werte der iLC2 des epididymalen / perigonadalen von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären

Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

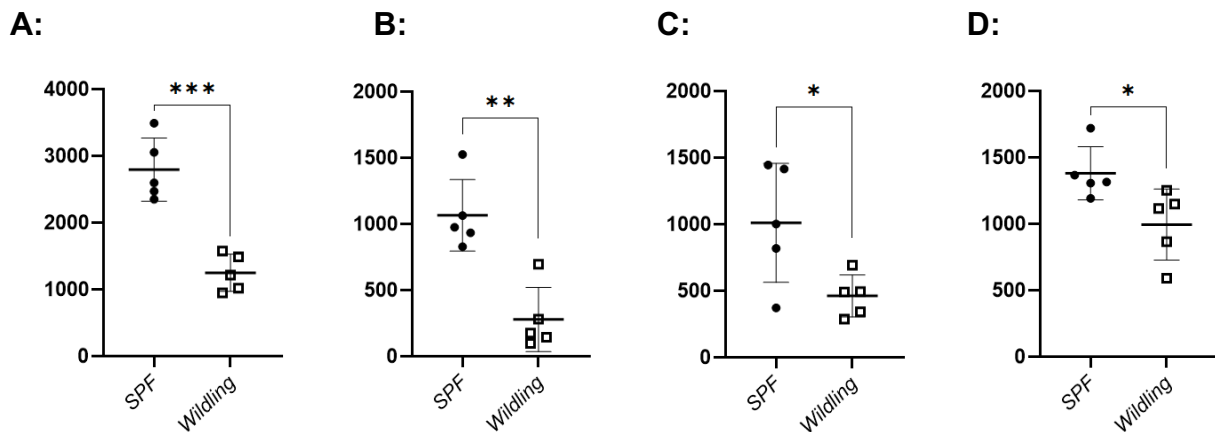


Abbildung 36: Wildlinge weisen weniger nILC2 in ihrem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe auf. Absolute Anzahlen an nILC2 im epididymalen / perigonadalen Fettgewebe von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

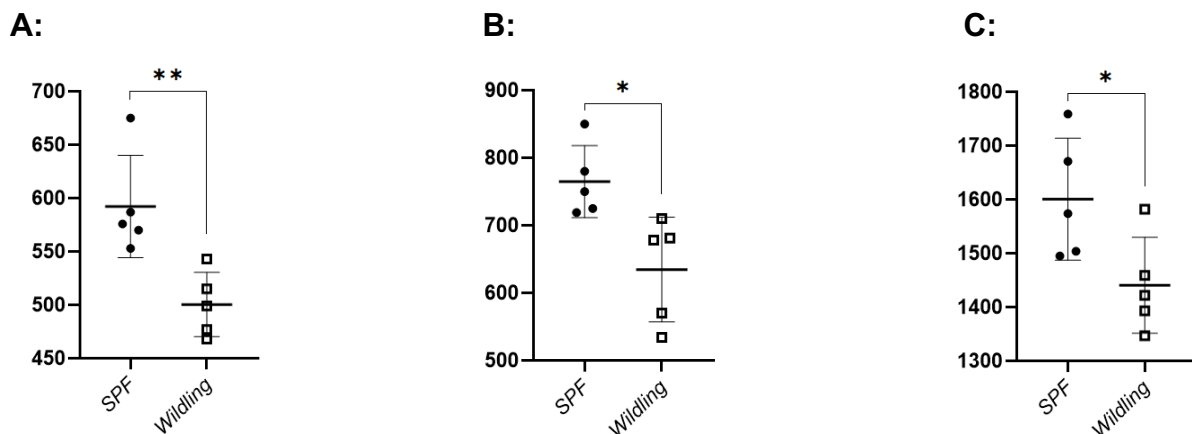
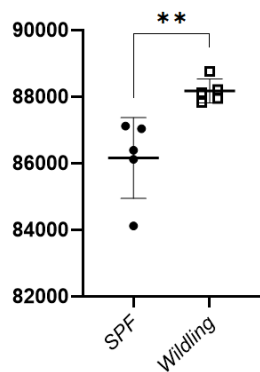


Abbildung 37: Die nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge exprimieren weniger CD25 (A und B) und weniger KLRG1 (C) auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von CD25 (A und B) als auch KLRG1 (C) auf den nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

A:



B:

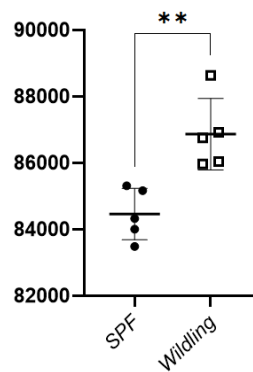
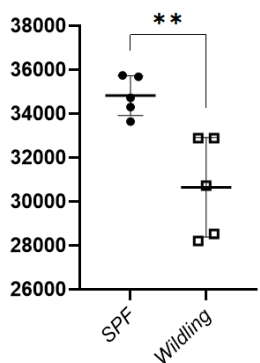


Abbildung 38: Die nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind größer. MFI der FSC-A Werte der nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

A:



B:

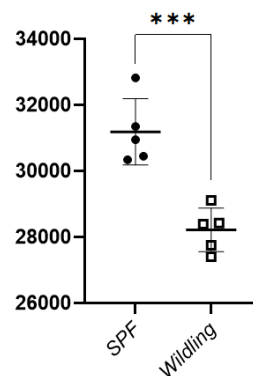


Abbildung 39: Die nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind weniger komplex. MFI der SSC-A Werte der nILC2 des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

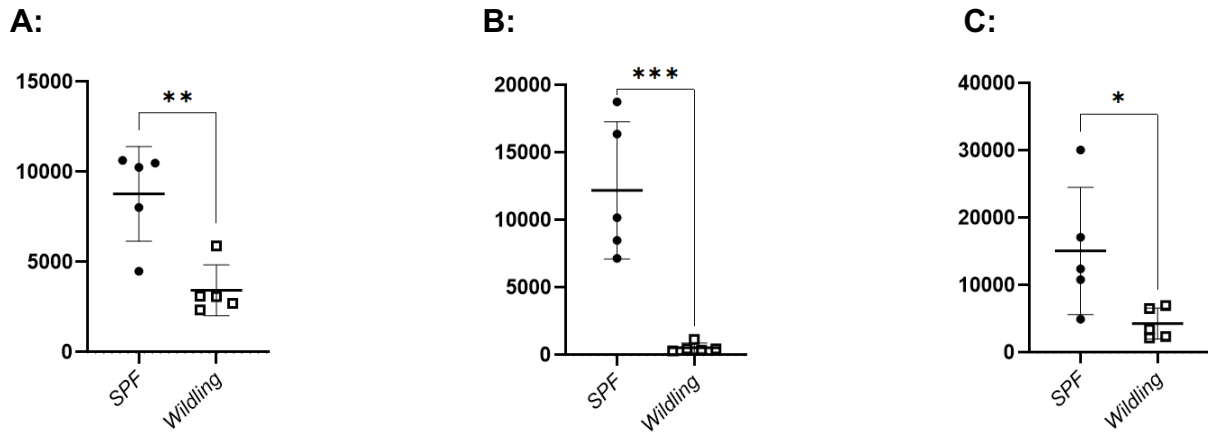


Abbildung 40: Wildlinge weisen weniger Eosinophile in ihrem epididymalen / perigonadalen Fettgewebe auf. Absolute Anzahlen an Eosinophilen im epididymalen / perigonadalen Fettgewebe von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, Für die sekundären Endpunkte der Eosinophilen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

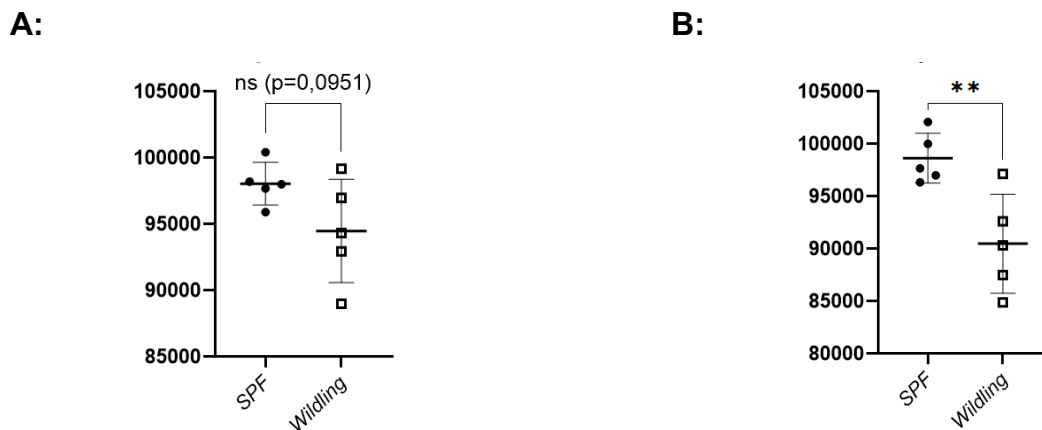


Abbildung 41: Die Eosinophilen des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind kleiner. MFI der FSC-A Werte der Eosinophilen des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der Eosinophilen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

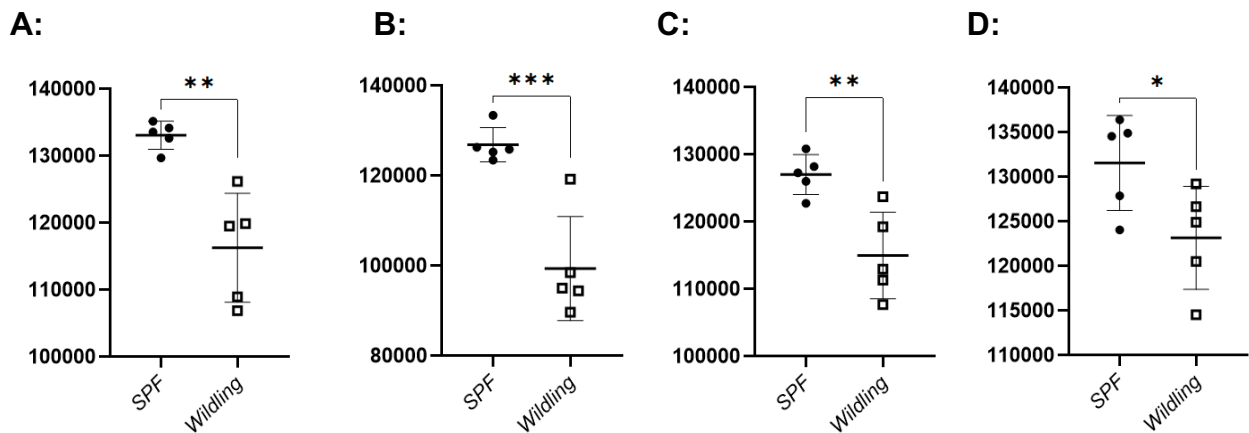


Abbildung 42: Die Eosinophilen des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes der Wildlinge sind weniger komplex. MFI der SSC-A Werte der Eosinophilen des epididymalen / perigonadalen Fettgewebes von Wildlingen im Vergleich zu den identischen Populationen in SPF Labormäusen (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der Eosinophilen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

b. Genetische Regulation der ILC2 (*Kcnab2*, *Ermn*, *Lgmn*)

ILC2 werden im Rahmen einer Helminth - Infektion aktiviert und differenzieren sich zu iILC2 (Huang et al., 2015, Huang et al., 2018, Flamar et al., 2020). Nach ihrer Aktivierung wandern sie von der Lamina propria des Dünndarms, zu ihren Effektororganen (Huang et al., 2018). Dort sind sie Teil eines komplexen Netzwerkes aus Immunzellen und Transmittern, welches die Helminthen bekämpft. Bisher ist wenig über die zellbiologischen Prozesse innerhalb der ILC2 nach ihrer Aktivierung zu iILC2 bekannt. Um sich diesem noch unbekanntem Feld zu nähern führten Huang und Kollegen, als auch Flamar und Klose mit Kollegen RNS - Sequenzierungen mit sortierten iILC2 durch, um zu sehen, welche Transkripte innerhalb der Zellen häufig zu finden sind, um so zu Rückschlüssen hinsichtlich wichtiger Gene innerhalb der iILC2 zu kommen. Unter diesen Genen befanden sich *Kcnab2*, *Ermn* und *Lgmn*.

Die Zellaktivierung stellt einen der ersten Schritte innerhalb der Immunantwort der iILC2 dar. Wichtige Bestandteile, für die Initiierung von Prozessen der Zellphysiologie sind Ionenkanäle, welche sowohl intra - als auch extrazellulär, über die Veränderung von

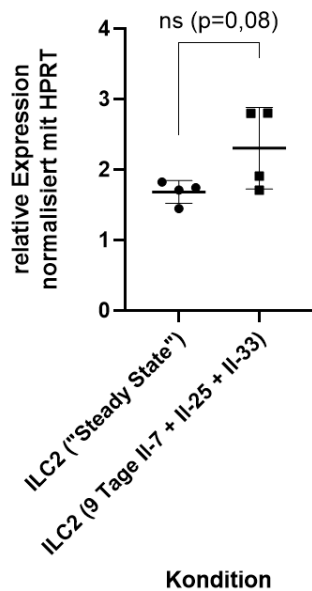
Membran - oder Organell - Potentialen die benötigten Gradienten für mikrobiologische Vorgänge bereitstellen.

Somit kamen wir zur Hypothese, dass die $\beta 2$ Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalium - Kanals, kodiert durch *Kcnab2*, als Ionenkanal, ein notwendiger Bestandteil innerhalb der Physiologie der aktivierten iILC2 ist. Um dies zu belegen galt es zunächst zu untersuchen ob *Kcnab2* - Transkripte in "Steady State" - ILC2 zu finden sind und anschließend zu verifizieren, dass *Kcnab2* innerhalb der iILC2 heraufreguliert wird. Hierfür wurden zunächst ILC2 aus WT - Mäusen sortiert, ihre RNS gewonnen und folgend bestimmt auf welchem Niveau *Kcnab2* transkribiert wird. Es zeigte sich, dass bereits in "Steady State" - ILC2 eine Transkription von *Kcnab2* stattfindet (**Abb. 43 A**). In einem folgenden Experiment wurden die sortierten ILC2 nun mit den aktivierenden Zytokinen IL-25 und IL-33 (unterstützt durch IL-7) stimuliert. Aus der Literatur wissen wir, dass durch diese Zytokin - Kombination eine starke Zellaktivierung resultiert. Es schien, als würde die *Kcnab2* - mRNA - Expression heraufreguliert werden, dies war jedoch nicht signifikant (**Abb. 43 A**). Es zeigte sich also, dass bereits in den ILC2 *Kcnab2* transkribiert wird, und scheinbar unter Stimulation leicht ansteigt.

In vitro Kulturen können die komplexen Vorgänge innerhalb einer Helminth - Infektion jedoch nur teilweise widerspiegeln. Deshalb, und um die Existenz einer Heraufregulation nicht nur unter den artifiziellen Bedingungen einer *in vitro* Kultur zu sehen, betrachteten wir die Expression von *Kcnab2* im Rahmen einer *N. b.* Infektion. Aus den MLN von infizierten WT - Mäusen wurden am 7. Tage der Infektion die nILC2 und iILC2 gewonnen, und ihre *Kcnab2* - mRNA - Level untereinander und mit "Steady State" - ILC2 aus der Lamina propria des Dünndarms verglichen. Es zeigte sich eine Heraufregulation die einem stufenweisen Muster ähnelt (**Abb. 43 B**). Zunächst bestätigte sich, dass bereits in "Steady State" - ILC2 *Kcnab2* exprimiert wird. Diese Expression ist jedoch signifikant geringer als in iILC2 und nILC2. Zwischen iILC2 und nILC2 fand sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der *Kcnab2* mRNA.

Betrachtet man diese Ergebnisse, so war nun deutlich, dass *Kcnab2* in ILC2 exprimiert wird, und unter den Bedingungen einer *N. b.* Wurminfektion, heraufreguliert wird.

A:



B:

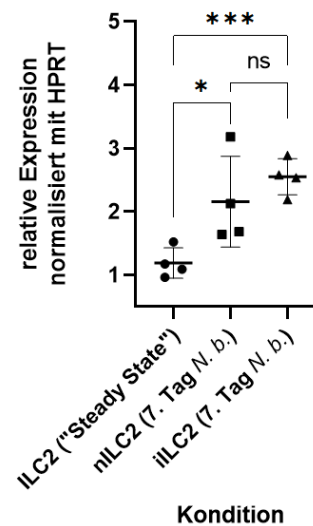


Abbildung 43: *Kcnab2* wird im “Steady State“ in ILC2 exprimiert (A und B), und unter Stimulation heraufreguliert (A = *in vitro* - nicht signifikant, B = *in vivo*). *Kcnab2* - Expression in Wildtyp - ILC2 sortiert aus der Lamina propria (L. p.) des Dünndarms im “Steady State“ verglichen mit der *Kcnab2* - Expression in Wildtyp - ILC2 sortiert aus der L. p. nach einer *in vitro* Stimulation von 9 Tagen mit den Interleukinen 7, 25 und 33 (A). *Kcnab2* - Expression in Wildtyp - ILC2 sortiert aus der Lamina propria (L. p.) des Dünndarms im “Steady State“ verglichen mit der *Kcnab2* - Expression in Wildtyp - iILC2 und Wildtyp - nILC2 sortiert aus den MLN am 7. Tage einer *N. b.* Infektion (B) (für A und B: Errechnung der Expression mittels $2^{-\Delta CT}$ - Methode und dem Haushaltsgen *Hprt*, statistischer Test = ungepaarter t-Test).

Um folgend zu untersuchen was *Kcnab2* in den ILC2, innerhalb eines lebenden Organismus für Funktionen ausübt, untersuchten wir *Kcnab2* - KO Mäuse im Sinne eines “loss of function“ - Zugangs. Zunächst galt es zu klären ob *Kcnab2* für das basale Überleben und die Entwicklung der ILC2 von Bedeutung ist. Um dies zu untersuchen betrachteten wir, ob bereits im “Steady State“ Unterschiede in der ILC2 - Population zu finden sind. Hierfür wurden aus den Lungen und der Lamina propria der KO - Mäuse die Lymphozyten isoliert und folgend die Frequenz an ILC2 bestimmt. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und *Kcnab2* - KO.

Die ILC2 der *Kcnab2* - KO Mäuse wurden hinsichtlich Oberflächen - und Reifungsmarker als auch Transkriptionsfaktoren genauer untersucht, um so zu klären, ob hier Differenzen

zu finden waren. Durch FACS - Analysen ließen sich jedoch hinsichtlich GATA3, CD127 sowie CD25 und ST2 keine eindeutigen Unterschiede erkennen. Auch für Ki67, welches mit Proliferation in Zusammenhang gebracht wird (Sun and Kaufman, 2018), konnte per FACS - Analyse keine klaren Differenz aufgedeckt werden. Es zeigte sich lediglich, dass die *Kcnab2* - KO ILC2 der L. p. des Dünndarms signifikant mehr KLRG1 exprimierten (**Abb. 44**).

Im "Steady State" fand sich folglich kein wirklich eindeutiger Phänotyp in den *Kcnab2* - KO Mäusen. Da die publizierten Studien jedoch andeuteten, dass *Kcnab2* im Rahmen der Aktivierung von ILC2 zu iILC2 bzw. dann in diesen eine Rolle spielen könnte, wurden (zu iILC2 - ähnlichen Zellen) stimulierte ILC2 genauer betrachtet. Hierbei wollten wir nun klären ob die Funktionalität der Zellen nach Aktivierung, also unter anderem im Kontext einer Typ 2 Immunantwort verändert ist.

Mit der Hypothese, dass die stimulierten ILC2 der *Kcnab2* - KO Mäuse durch das Fehlen von *Kcnab2* in ihrer Funktionalität eingeschränkt sind, untersuchten wir Diese Zellpopulation genauer. Sortierte ILC2 wurden mit einer Zytokin - Mischung, welche stark aktivierend wirkt (IL-25, IL-33 und IL-7), stimuliert und folgend analysiert. Nach Ablauf der Zeit zeigten die *Kcnab2* - KO ILC2 eine geringere Zellzahl (**Abb. 45**) jedoch war dieser Unterschied nach statistischer Testung nicht signifikant.

Um Erklärungen hierfür zu finden wurden Oberflächenmarker, als auch physikalische Eigenschaften der stimulierten ILC2 untersucht. Es zeigte sich eine signifikant geringere Expression von CD25 (dem IL-2 - Rezeptor) auf den stimulierten *Kcnab2* - KO ILC2 (**Abb. 46**). Weitere untersuchte Eigenschaften (Expression von KLRG1, CD127 und ST2 sowie die physikalischen Eigenschaften FSC-A und SSC-A) zeigten keine deutlichen Unterschiede.

Im Kontext der ILC2 - Aktivierung, bzw. dann als differenzierte iILC2, sezernieren die Zellen diverse Zytokine, um so Effektorzellen im Kontext der Immunantwort zu beeinflussen. Mit der Vermutung, dass durch das Fehlen des (auch intrazellulären) Ionenkanals, die Degranulation diverser Zytokine eingeschränkt ist, wurde diese Fähigkeit der ILC2 genauer untersucht. Hierfür wurden sortierte ILC2 stimuliert (mit IL-25, IL-33 und IL-7), und folgend die sezernierte Menge an Botenstoffen, darunter auch typischen Zytokine der Typ 2 Immunantwort, analysiert. Betrachtet wurden IL-5, TNF- α ,

IL-13, IL-6, IL-4 und IL-10. Es zeigte sich, dass die *Kcnab2* - KO ILC2 signifikant weniger IL-5 und IL-13 sezernieren konnten. Und auch für IL-4 zeigte sich eine deutliche, wenn auch nicht ganz signifikante, Tendenz hin zu einer geringeren Sezernierung durch die *Kcnab2* - KO ILC2 (**Abb. 47 A bis C**).

Schlussendlich untersuchten wir die Überlebenseigenschaften der *Kcnab2* - KO ILC2. In dem wir sie lediglich mit IL-7 alleine kultivierten. Aus der Literatur ist bekannt, dass IL-7 alleine die ILC2 nicht aktiviert, sondern nur für das basale Überleben der ILC (nicht jedoch für Proliferation) sorgt. Hierbei betrachteten wir die Menge an lebenden und toten ILC2, als auch deren Oberflächenmarker (ST2, CD25, KLRG1 und CD127) sowie deren physikalische Eigenschaften (FSC-A, SSC-A). Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT - und *Kcnab2* - KO ILC2.

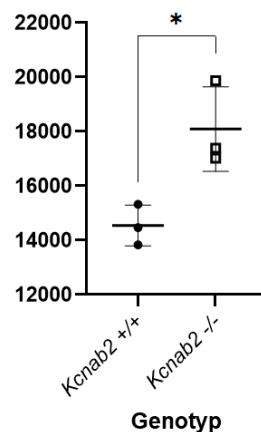


Abbildung 44: Die ILC2 der L. p. der *Kcnab2* - KO Mäuse exprimieren mehr KLRG1 auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von KLRG1 auf den ILC2 aus der L. p. des Dünndarms von *Kcnab2* - KO (*Kcnab2* -/-) Mäusen im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Kcnab2* +/+) (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der ILC2 - Oberflächenmarker wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

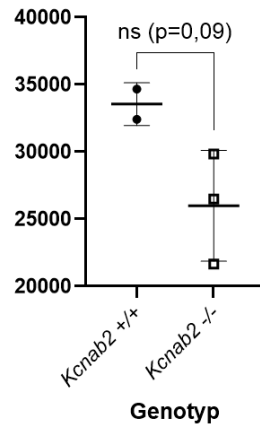


Abbildung 45: Die ILC2 der *Kcnab2* - KO Mäusen nehmen nach Stimulation weniger stark in ihrer Zellzahl zu (nicht signifikant). Absolute Anzahl an lebenden *Kcnab2* - KO ILC2 (*Kcnab2* -/-) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, im Vergleich zur absoluten Anzahl an lebenden WT - ILC2 (*Kcnab2* +/+) nach identischer Stimulation.

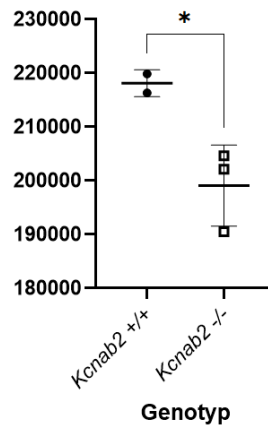


Abbildung 46: Die ILC2 der *Kcnab2* - KO Mäusen exprimieren nach Stimulation weniger CD25 auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von CD25 auf lebenden *Kcnab2* - KO ILC2 (*Kcnab2* -/-) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, im Vergleich zur Expression von CD25 auf lebenden WT - ILC2 (*Kcnab2* +/+) nach identischer Stimulation (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der ILC2 - Oberflächenmarker wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

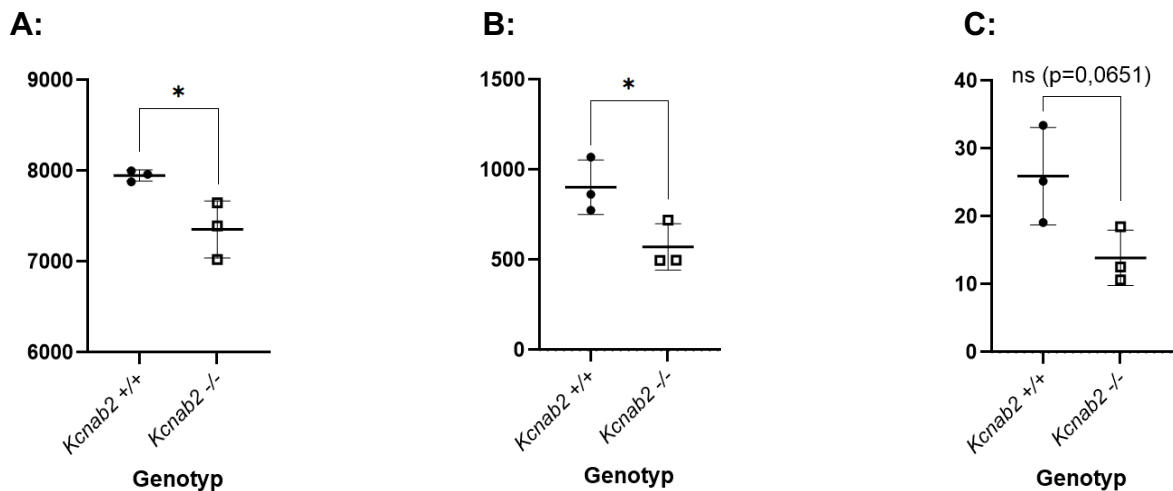


Abbildung 47: Die ILC2 der *Kcnab2* - KO Mäusen sezernieren nach Stimulation weniger IL-5 (A), IL-13 (B) und IL-4 (C - nicht signifikant). Konzentrationen (pg / ml) an den Typ 2 Zytokinen IL-5 (A), IL-13 (B) und IL-4 (C) im Kulturmedium von 10.000 *Kcnab2* - KO ILC2 (*Kcnab2* -/-) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, im Vergleich zu den Konzentrationen der identischen Typ 2 Zytokinen im Kulturmedium von 10.000 WT - ILC2 (*Kcnab2* +/+) nach identischer Stimulation (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der sezernierten Typ 2 Zytokinen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Die Aktivierung der ILC2 zu iILC2 findet lokal in der L. p. des Dünndarms statt. Nun müssen diese Zellen jedoch zu den nächstliegenden Lymphknoten bzw. dann zu den entfernten Effektororganen gelangen. Dies erfolgt per Chemotaxis, hierfür benötigen die Zellen jedoch die Fähigkeit zur Fortbewegung, also zur geordneten Umstrukturierung ihres Zytoskelettes. ERMIN ist ein durch *Ernm* kodiertes Protein, welches im Kontext der Aktivierung von iILC2 von Relevanz sein könnte, und es ist in der Literatur als Zytoskelett - Protein, assoziiert mit der Umstrukturierung von Zellfortsätzen und Zellmorphologie, beschrieben. Wir wollten nun untersuchen, ob *Ernm* im Kontext der ILC2 Physiologie und Pathophysiologie an Bedeutung besitzt.

Zunächst untersuchten wir, ob im "Steady State" *Ernm* - Transkripte in WT - ILC2 zu finden waren. Hierfür sortierten wir ILC2 aus der L. p. des Dünndarms und gewannen ihre RNS, um diese per qPCR zu analysieren. Es zeigte sich, dass ohne jegliche Einflüsse, also im "Steady State", annähernd keine Transkription von *Ernm* in mRNS stattfindet (**Abb. 48 A und B**). Nachdem Dies nun gezeigt war wollten wir darstellen, dass

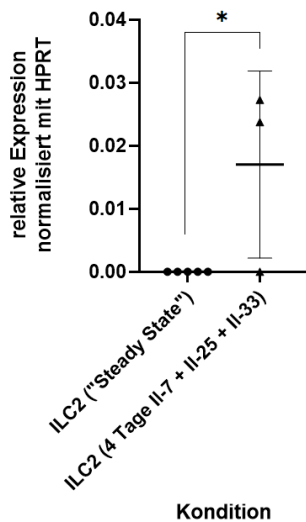
im Rahmen der Aktivierung der ILC2 die *Ernm* - Transkription heraufreguliert wird. Hierfür stimulierten wir sortierte ILC2 mit den aktivierenden Zytokinen IL-25 und IL-33 (unterstützt durch IL-7), um diese stark zu aktivieren, und wiederholten das vorherige Experiment. Es zeigte sich, dass im Rahmen der Stimulation die Expression der *Ernm* - RNS signifikant heraufreguliert wird (**Abb. 48 A und B**). Um diese eindeutige Heraufregulation nicht nur unter künstlichen *in vitro* Bedingungen zu sehen wählten wir *in vivo* Experimente um eine Induktion der *Ernm* - Transkription im Kontext der Wurminfektion zu bestätigen. Hierfür wurden nILC2 und iILC2 aus den MLN von mit *N. b.* infizierten WT - Mäusen am 7. Tage der Infektion sortiert, ihre RNS gewonnen und die Level an *Ernm* - RNS untereinander und mit "Steady State" - ILC2, verglichen. Dabei zeigte sich erneut, dass *Ernm* - RNS in "Steady State" - ILC2 der Lamina propria kaum bis gar nicht zu finden ist. Nun neu war, dass es aber auch in nILC2 der MLN nur auf sehr niedrigem Level exprimiert wird. Wohingegen es im Vergleich dazu in den iILC2, welche aus den MLN isoliert wurden, signifikant herauf reguliert wird (**Abb. 49**).

Nachdem nun die Induktion der *Ernm* - Transkription *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt war, und gleichzeitig deutlich wurde, dass im "Steady State" *Ernm* nur sehr wenig in mRNS umgesetzt wird, galt es zu untersuchen, wie sich die Population an ILC2 im lebenden Organismus ohne die Anwesenheit von *Ernm* darstellt. Aufgrund der geringen Expression im "Steady State" war zu erwarten, dass sich die ILC2 - Populationen in den *Ernm* - KO Mäusen sehr ähnlich wie in ihren Wildtyp - Kontrollen darstellen. Hierfür wurden ILC2 aus der Lunge und der L. p. des Dünndarms ausgezählt, und es zeigte sich, dass im "Steady State" keine signifikanten Unterschiede beim Fehlen von *Ernm* zu finden waren (**Abb. 50 und 51**).

Neben der reinen Anzahl der ILC2 wollten wir des Weiteren analysieren, ob einzelne Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren innerhalb und auf den ILC2 durch das Fehlen von *Ernm* beeinflusst werden. Wir entschieden uns für die Analyse des ILC2 definierenden Transkriptionsfaktors GATA3, sowie die Oberflächenmarker KLRG1, CD127, ST2 und CD25. Des Weiteren betrachteten wir Ki67, ein Marker für Proliferation und Zellteilung. Hierfür wurden ILC2 mit entsprechenden Fluorochrom - markierten Antikörpern behandelt und die Marker bzw. Transkriptionsfaktoren so angefärbt. Es zeigte sich im Rahmen von FACS - Analysen, dass die ILC2 der *Ernm* - KO Mäuse in der Lunge signifikant mehr CD25 exprimieren, und diejenigen aus der L. p. signifikant weniger CD127 (**Abb. 52**). Ansonsten zeigte die untersuchten Marker keine signifikanten

Unterschiede. Diese, ohne äußere Einflüsse vorhandenen und nur geringen Unterschiede, waren wenig überraschend, da bereits gesehen wurde, dass im Normalzustand der ILC2, diese kaum *Ernm* transkribieren.

A:



B:

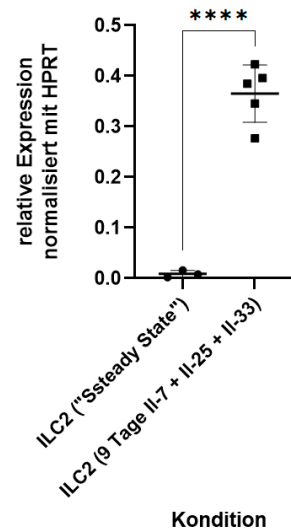


Abbildung 48: *Ernm* wird im “Steady State“ in ILC2 nicht exprimiert (A und B), und unter Stimulation heraufreguliert (A und B = *in vitro*). *Ernm* - Expression in Wildtyp - ILC2 sortiert aus der L. p. des Dünndarms im “Steady State“, verglichen mit der *Ernm* - Expression in identischen Wildtyp - ILC2 nach einer *in vitro* Stimulation für 4 (A) oder 9 (B) Tage mit den Interleukinen 7, 25 und 33 (für A und B: Errechnung der Expression mittels $2^{-\Delta CT}$ - Methode und dem Haushaltsgen *Hprt*, statistischer Test = ungepaarter t-Test).

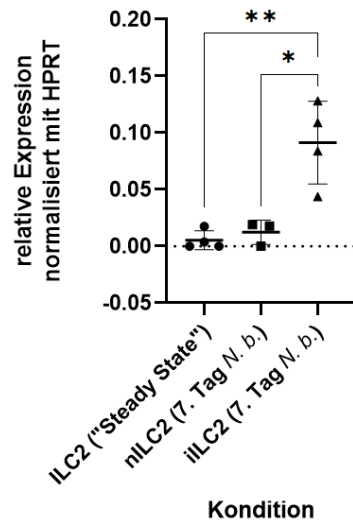
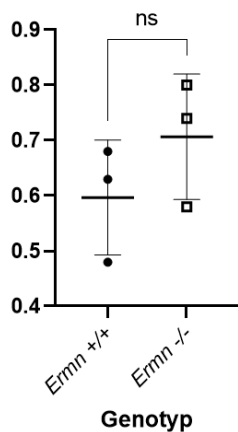


Abbildung 49: *Ermn* wird im "Steady State" in ILC2 nicht exprimiert, und unter Stimulation in iILC2, jedoch nicht in nILC2, heraufreguliert (*in vivo*). *Ermn* - Expression in Wildtyp - ILC2 sortiert aus der Lamina propria (L. p.) des Dünndarms im "Steady State" verglichen mit der *Ermn* - Expression in Wildtyp - iILC2 und Wildtyp - nILC2 sortiert aus den MLN am 7. Tage einer *N. b.* Infektion (Errechnung der Expression mittels $2^{-\Delta CT}$ - Methode und dem Haushaltsgen *Hprt*, statistischer Test = ungepaarter t-Test).

A:



B:

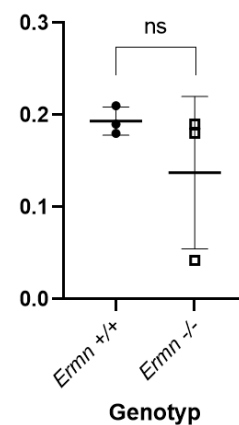


Abbildung 50: *Ermn* - KO Mäuse weisen im "Steady State" keine signifikanten Unterschiede in ihrer ILC2 - Anzahl auf (A = Lunge, B = Lamina propria). Relative (% aller Events) Anzahlen der ILC2 in der Lunge (A) und der L. p. (B) des Dünndarms, von *Ermn* - KO (*Ermn -/-*) Mäusen im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ermn +/+*) (Statistischer Test = ungepaarter t-Test).

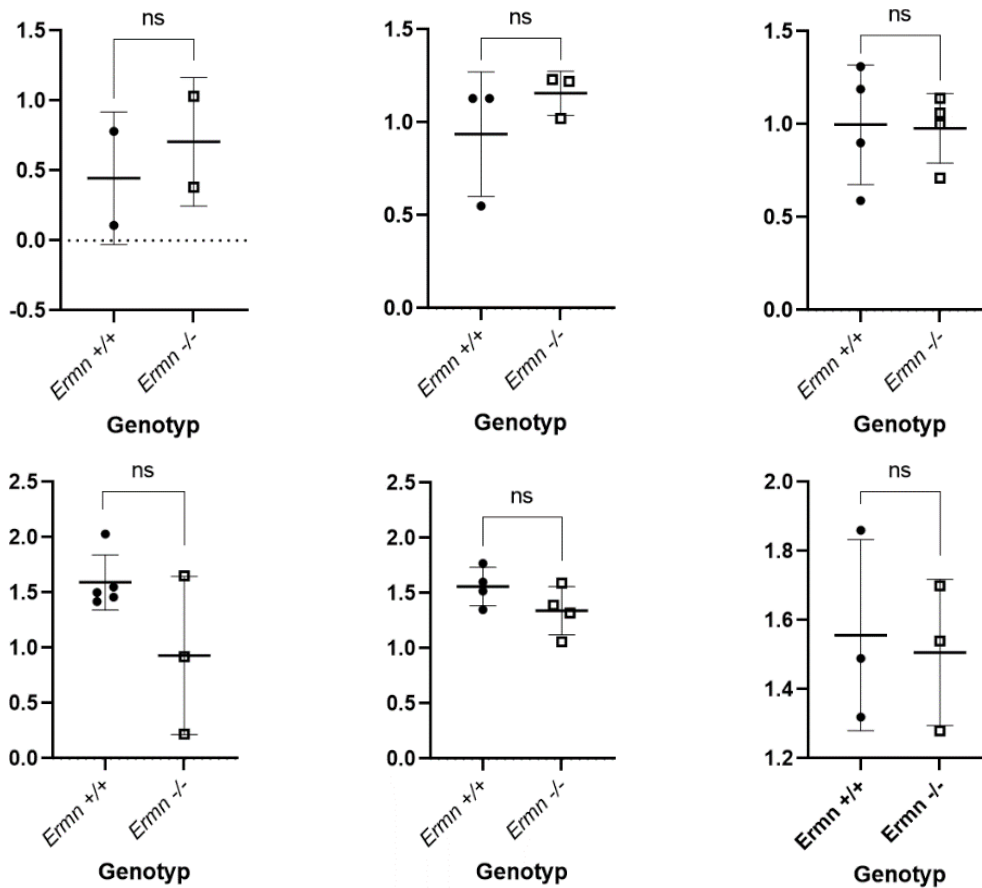
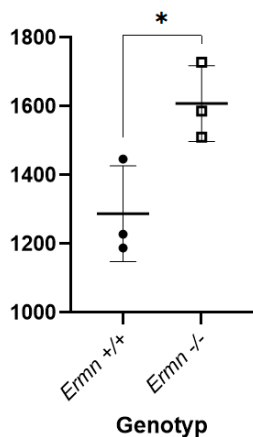


Abbildung 51: *Ermn* - KO Mäuse weisen im “Steady State“ keine signifikanten Unterschiede in ihrer ILC2 - Anzahl, in der Lamina propria des Dünndarms, auf. Relative (% aller Events) Anzahlen der ILC2 in der L. p. des Dünndarms, von *Ermn* - KO (*Ermn* -/-) Mäusen im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ermn* +/+) (Statistischer Test = ungepaarter t-Test).

A:



B:

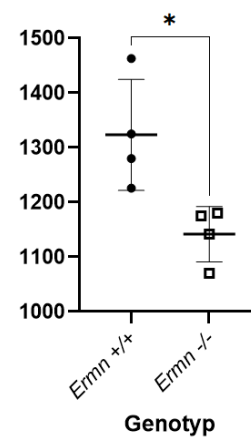


Abbildung 52: Die ILC2 der *Ermn* - KO Mäusen exprimieren in der Lunge mehr CD25 auf ihrer Oberfläche (A) und in der Lamina propria des Dünndarms weniger CD127

(B). MFI der Expression von CD25 der ILC2 aus der Lunge **(A)** und von CD127 der ILC2 aus der L. p. des Dünndarms **(B)** von *Ernm* - KO (*Ernm* *-/-*) Mäusen im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ernm* *+/+*) (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der ILC2 - Oberflächenmarker wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Um nun zu sehen was sich in den ILC2 im Rahmen ihrer Aktivierung, in Abhängigkeit von *Ernm* verändert, führten wir diverse *in vitro* Experimente, unter diversen Bedingungen einer Stimulation, durch. So wollten wir ihre Fähigkeiten zur Proliferation, zum Überleben, zur Reifung bzw. Veränderung von Oberflächenmarker, zur Migration und zur eigenen Sekretion von Zytokinen testen. Bereits gezeigt wurde, dass durch die Stimulation mit den Zytokinen IL-25 und IL-33 (unterstützt durch IL-7) die Transkription von *Ernm* stark herauf reguliert wird. Zunächst galt es zu klären, ob diese Stimulation Einfluss auf die Zellzahl hat. Hierfür wurden per FACS - Analyse die lebenden ILC2 nach Ablauf einer stark stimulierenden *in vitro* Kultur (IL-7, IL-25, IL-33) ausgezählt. Es zeigte sich, dass nach 4 Tagen signifikant weniger *Ernm* - KO ILC2 in den *in vitro* Kulturen zu finden waren **(Abb. 53)**. Liess man die Stimulation jedoch länger anhalten, so änderte sich dies. Nach einer Stimulation von 6 Tagen zeigten sich signifikant mehr *Ernm* - KO ILC2 in den Kulturen, und auch nach 5 Tagen schienen schon mehr *Ernm* - KO ILC2 vorhanden zu sein **(Abb. 54 A und B)**.

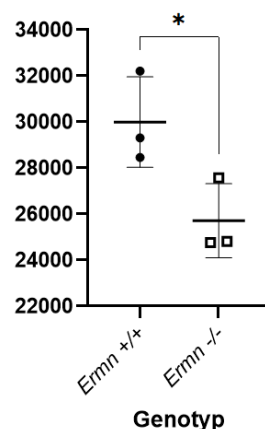
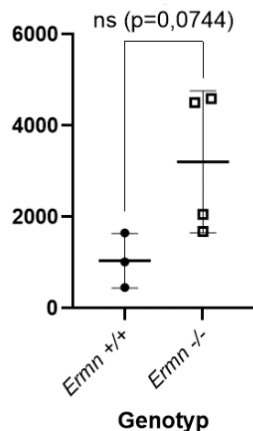


Abbildung 53: Die ILC2 der *Ernm* - KO Mäusen nehmen nach kürzer andauernder Stimulation weniger stark in ihrer Zellzahl zu (4 Tage). Absolute Anzahl an lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* *-/-*) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, im Vergleich zur absoluten Anzahl an lebenden WT -

ILC2 (*Ermn* +/+) nach identischer Stimulation, bei einer Ausgangszahl von 10.000 ILC2 (Statistischer Test = ungepaarter t-Test).

A:



B:

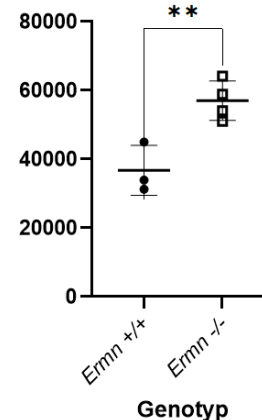


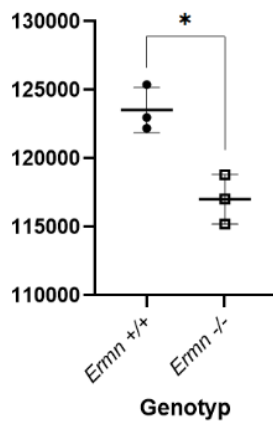
Abbildung 54: Die ILC2 der *Ermn* - KO Mäusen nehmen nach länger andauernder Stimulation stärker in ihrer Zellzahl zu (A = 5 Tage - nicht signifikant, B = 6 Tage). Absolute Anzahl an lebenden *Ermn* - KO ILC2 (*Ermn* -/-) nach Ablauf einer 5 tägigen (A) oder 6 tägigen (B) *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, im Vergleich zur absoluten Anzahl an lebenden WT - ILC2 (*Ermn* +/+) nach identischer Stimulation, bei einer Ausgangszahl von 15.000 ILC2 (A) oder 20.000 ILC2 (B) (Statistischer Test = ungepaarter t-Test).

Um diese Zusammenhänge genauer zu untersuchen galt es zu klären, was die Ursache für eine voneinander abweichende Zellzahl ist. Potentiell möglich waren dabei eine stärkere oder schwächere Proliferation einer Zellpopulation oder aber eine erhöhte bzw. erniedrigte Apoptoserate der anderen Population, bzw. eine Kombination aus beidem. Um dies zu untersuchen wählten wir einen Assay zur Detektion von apoptotischen Zellen darüber hinaus einen Farbstoff zur Detektion von Zellteilungen, und einen Farbstoff zur Darstellung des DNS - Gehaltes lebender Zellen, um so Rückschlüsse auf ihre Position im Zellzyklus zu erhalten. Bei Betrachtung der Menge an lebenden, bereits abgestorbenen und unmittelbar in Apoptose befindlichen ILC2 in *in vitro* Kulturen, mit IL-25, IL-33 und IL-7, welche zu einer starken Stimulation der ILC2 führen, ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *Ermn* - KO feststellen. Die Analysen mit dem Farbstoff zur Detektion von Zellteilungen in vergleichbaren (stimulierenden) Kulturen

zeigten, hinsichtlich des Anteils an Zellen, welche sich geteilt und denen, welche sich nicht geteilt hatten, ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, zwischen *Ernm* - KO ILC2 und Wildtyp - ILC2. Und auch die Betrachtung der Position der ILC2 im Zellzyklus, hinsichtlich einer Einteilung in Zellen, welche in der Synthese oder G2 bzw. Mitose Phase befindlich sind (also hohen DNS - Gehalt besaßen) bzw. in der G0 oder G1 Phase (mit niedrigem DNS - Gehalt) erlaubte es uns nicht, signifikante Differenzen beim Fehlen von *Ernm* in ILC2 zu finden.

Neben der Zellzahl, welche im Rahmen der Stimulation (IL-7, IL-25 und IL-33) zunimmt, waren jedoch auch andere Parameter für uns interessant, welche sich im Rahmen der Zellaktivierung, durch die 3 Zytokine, verändern. Zu diesen sekundären Endpunkten zählten physikalische Parameter wie die Zellgröße, welche durch die MFI des FSC-A wiedergespiegelt wird, und die Zellkomplexität, welche durch die MFI des SSC-A abgebildet wird. Dabei lässt sich sagen, dass die Komplexität ein Maß für die Granularität der Zellen ist, und somit auch etwas über die Menge an Vesikeln in der Zelle, welche beispielsweise Effektormolekülen wie Interleukine beinhalten, aussagt. Hier zeigten sich bezüglich der SSC-A keine signifikanten Unterschiede. Jedoch waren die *Ernm* - KO ILC2, wenn sie nach 4 Tagen in signifikant geringerer Menge vorlagen (vgl. oben) auch signifikant kleiner (FSC-A). Und wenn sie nach 5 Tagen dann signifikant mehr vorlagen auch signifikant größer (FSC-A) (**Abb. 55 A und B**). Weiterhin betrachteten wir die klassischen ILC2 Oberflächenmarker: KLRG1 (einen Reifungsmarker der ILC2), CD127 (den IL-7 - Rezeptor), CD25 (den IL-2 - Rezeptor) und ST2 (den IL-33 - Rezeptor). Hierbei zeigte sich, dass die *Ernm* - KO ILC2 nach 5 Tagen, wenn sie vermehrt vorlagen auch signifikant mehr CD127 und nahezu signifikant mehr ST2 auf ihrer Oberfläche exprimierten (**Abb. 56 A und B**).

A:



B:

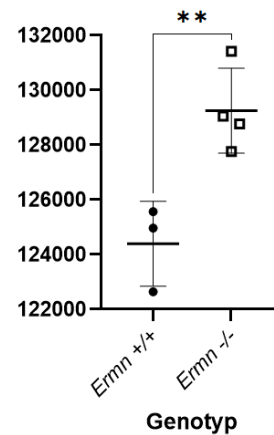
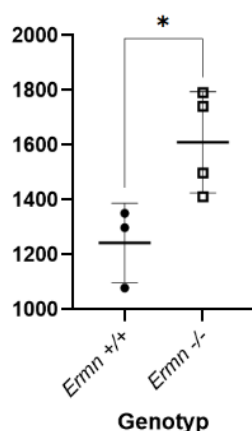


Abbildung 55: Die ILC2 der *Ernm* - KO Mäusen sind, wenn sie nach kürzerer Stimulation in geringerer Anzahl vorliegen, kleiner (**A = 4 Tage**), und wenn sie nach längerer Stimulation vermehrt vorliegen, größer (**B = 5 Tage**). MFI der FSC-A Werte von lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-), nach Ablauf einer *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, im Vergleich zu den FSC-A Werten von lebenden WT - ILC2 (*Ernm* +/+) nach identischer Stimulation. Bedingungen der Stimulation: 4 Tage 10.000 Zellen (**A**), 5 Tage 15.000 Zellen (**B**) (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der ILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

A:



B:

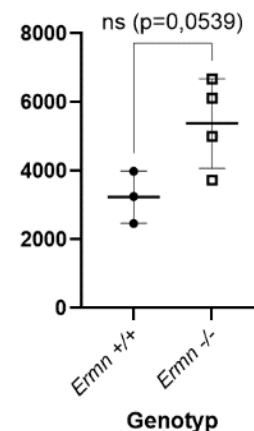
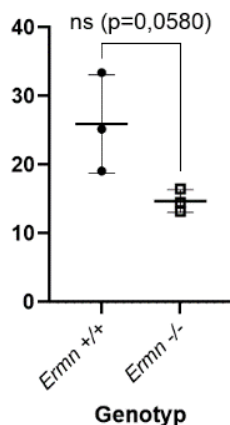


Abbildung 56: Die ILC2 der *Ernm* - KO Mäusen exprimieren nach 5 tägiger Stimulation, wenn sie vermehrt vorliegen, mehr CD127 (**A**) und mehr ST2 (**B** - nicht signifikant), auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von CD127 (**A**) und ST2 (**B**) auf lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-), nach Ablauf einer *in vitro* Stimulation mit den

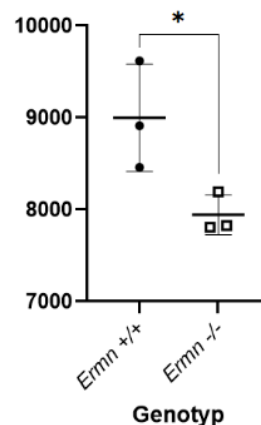
Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, im Vergleich zu deren Expression auf lebenden WT - ILC2 (*Ernm* +/+) nach identischer Stimulation. Bedingungen der Stimulation: 5 Tage 15.000 Zellen (**A** und **B**) (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der ILC2 - Oberflächenmarker wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Eine weitere essentielle Fähigkeit von ILC2 und auch ILC im Allgemeinen, ist es durch die Sezernierung von löslichen Mediatoren, wie Zytokinen ihre Umgebung und auch eine potentielle Immunantwort zu regulieren bzw. zu initiieren. Deshalb wollten wir messen, ob die *Ernm* - KO ILC2, im Rahmen der Stimulation mit IL-7, IL-25 und IL-33 in der Kultur, also im Rahmen ihrer Aktivierung, in der Fähigkeit die Typ 2 Zytokine: IL-4, IL-5 und IL-13 sowie darüber hinaus IL-10, IL-6 als auch TNF- α , in das Medium der Kultur zu sezernieren, beeinträchtigt oder verändert sind. Hierbei zeigte sich, dass die *Ernm* - KO ILC2 nach 4 Tagen nahezu signifikant weniger IL-4 (**Abb. 57 A**), und signifikant weniger IL-5 und IL-10 in das Kulturmedium sezerniert hatten (**Abb. 57 B** und **C**). Interessanterweise produzierte die *Ernm* - KO ILC2 nach 4 Tagen signifikant mehr TNF- α (**Abb. 57 D**). An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass ILC2 nicht primär mit der Sezernierung von TNF- α assoziiert werden. Folglich ist zu erkennen, dass die im Kulturmedium gefundenen Mengen sehr gering waren (circa 5 - 20 pg / ml) wohingegen bei den anderen Zytokinen meist mehrere tausend pg / ml gemessen werden konnten. Bezüglich IL-13 und IL-6 fanden sich, beim Fehlen von *Ernm*, keine signifikanten Differenzen in der Zytokin Produktion.

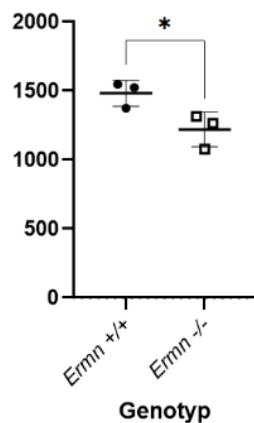
A:



B:



C:



D:

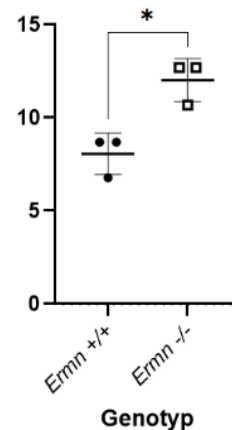


Abbildung 57: Die ILC2 der *Ernm* - KO Mäusen sezernieren nach Stimulation weniger IL-4 (A - nicht signifikant), IL-5 (B), IL-10 (C) und mehr TNF-α (D). Konzentrationen (pg / ml) an IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C) und TNF-α (D) im Kulturmedium von *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-) nach Ablauf einer *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, im Vergleich zu den Konzentrationen der identischen Zytokine im Kulturmedium von WT - ILC2 (*Ernm* +/+) nach identischer Stimulation. Bedingungen der Stimulation: stets 4 Tage und 10.000 Zellen (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der sezernierten Typ 2 Zytokinen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Erhöhte oder erniedrigte Zellzahlen bzw. die durch sie vermittelten Effekte sind einerseits wie bereits betrachtet durch abweichende Proliferation der Zellen oder durch abweichende Zytokin Sekretion einzelner Zellen erklärbar. Denkbar wären jedoch auch veränderte Überlebenseigenschaften der *Ernm* - KO ILC2. Hierfür kultivierten wir sortierte ILC2 mit lediglich IL-7. IL-7 wird in der Literatur beschrieben als ein Zytokin, welches im Allgemeinen wichtig für die Erhaltung von Lymphozyten ist. Im Kontext der ILC2 gilt es als ein costimulatorisches Zytokin, welches nur in Zusammenspiel mit aktivierenden Zytokinen (wie IL-25 und IL-33) eine Aktivierung und Proliferation der ILC2 bewirken kann. In den nun nur mit IL-7 durchgeführten Kulturen, stand jedoch das Überleben der ILC2 im Vordergrund. Dabei wollten wir testen, ob die *Ernm* - KO ILC2 in der Kultur mit IL-7 eventuell weniger oder mehr Widerstandsfähigkeit aufzeigten. Nach Ablauf der Kultur ließen sich die ILC2 stets in eine Population aus lebenden und eine Population aus toten Zellen unterteilen. Hierbei zeigten sich keine signifikanten numerischen Differenzen zwischen der *Ernm* - KO ILC2 und den Wildtyp - ILC2. Des Weiteren wurden per FACS -

Analysen die Oberflächenmarker (ST2, CD25, KLRG1 und CD127) sowie die physikalischen Eigenschaften (FSC-A, SSC-A) auf den nur mit IL-7 kultivierten Zellen analysiert, und auch hier fanden sich keine signifikanten Differenzen sowohl zwischen den lebenden als auch den toten Zellen der Wildtyp - und *Ernm* - KO Mäuse.

Nachdem nun betrachtet wurde wie sich ILC2 in Abwesenheit von *Ernm* in Kulturen, welche eine starke Stimulation bewirken (IL-25 und IL-33, mit IL-7), als auch in Kulturen, die lediglich das Überleben der Zellen vermitteln sollen (nur IL-7), verhalten, wollten wir die Effekte einzelner Zytokine genauer betrachten. Hierfür wurde IL-25, welches vor allem durch die, die Helminthen "schmeckenden", Tuft - Zellen produziert wird, und ein Schlüsselzytokin in der anti - Helminth - Immunantwort darstellt, gewählt. Zunächst untersuchten wir die Effekte von IL-25 auf WT- ILC2. Hierfür wurden aus der Dünndarm L. p. sortierte ILC2 mit IL-7 und IL-33 kultiviert und gleichzeitig identische Zellpopulationen mit IL-7, IL-33 und zusätzlich IL-25. Im Folgenden wurde primär betrachtet inwiefern sich die Zellzahl in Abhängigkeit von IL-25 verändert und darüber hinaus sekundär die physikalischen Eigenschaften, Oberflächenmarker und sezernierten Zytokine evaluiert. Es zeigte sich, dass signifikant mehr ILC2 durch die Hinzugabe von IL-25 resultierten (**Abb. 58 A**) und gleichzeitig waren diese ILC2 signifikant komplexer (**Abb. 58 C**), was ein Hinweis für einer erhöhte Menge an in Sekretgranula befindlichen Effektormolekülen sein kann. Ebenfalls gleichzeitig exprimierten die ILC2 unter dem Einfluss von IL-25 signifikant mehr KLRG1 (**Abb. 59 A**) und CD25 (**Abb. 59 C**). Darüber hinaus wird durch die WT - ILC2 durch die Hinzugabe von IL-25 signifikant mehr IL-10 (**Abb. 60 A**), IL-5 (**Abb. 61 B**) und IL-13 (**Abb. 61 C**) sezerniert.

Nun wurden die Experimente mit *Ernm* - KO ILC2, wiederholt, um zu sehen ob ohne das *Ernm* - Gen, vom Wildtyp abweichende Effekte, durch IL-25 in den ILC2 bewirkt werden. Es zeigte sich, dass auch die *Ernm* - KO ILC2 mit IL-25 signifikant stärker in ihrer Zellzahl zunahm (**Abb. 58 D**) und dabei signifikant komplexer waren (**Abb. 58 F**). Des Weiteren exprimierten sie auch signifikant mehr CD25 auf ihrer Oberfläche (**Abb. 59 G**) und auch die Sezernierung von IL-10, durch die *Ernm* - KO ILC2, wurde durch die Hinzugabe von IL-25 signifikant verstärkt (**Abb. 60 D**).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die *Ernm* - KO ILC2 durch die Hinzugabe von IL-25 sehr ähnlich wie der Wildtyp verhalten. Somit also das Protein ERMIN vermutlich keine besondere Stellung in der durch IL-25 angestoßenen Kaskade besitzt.

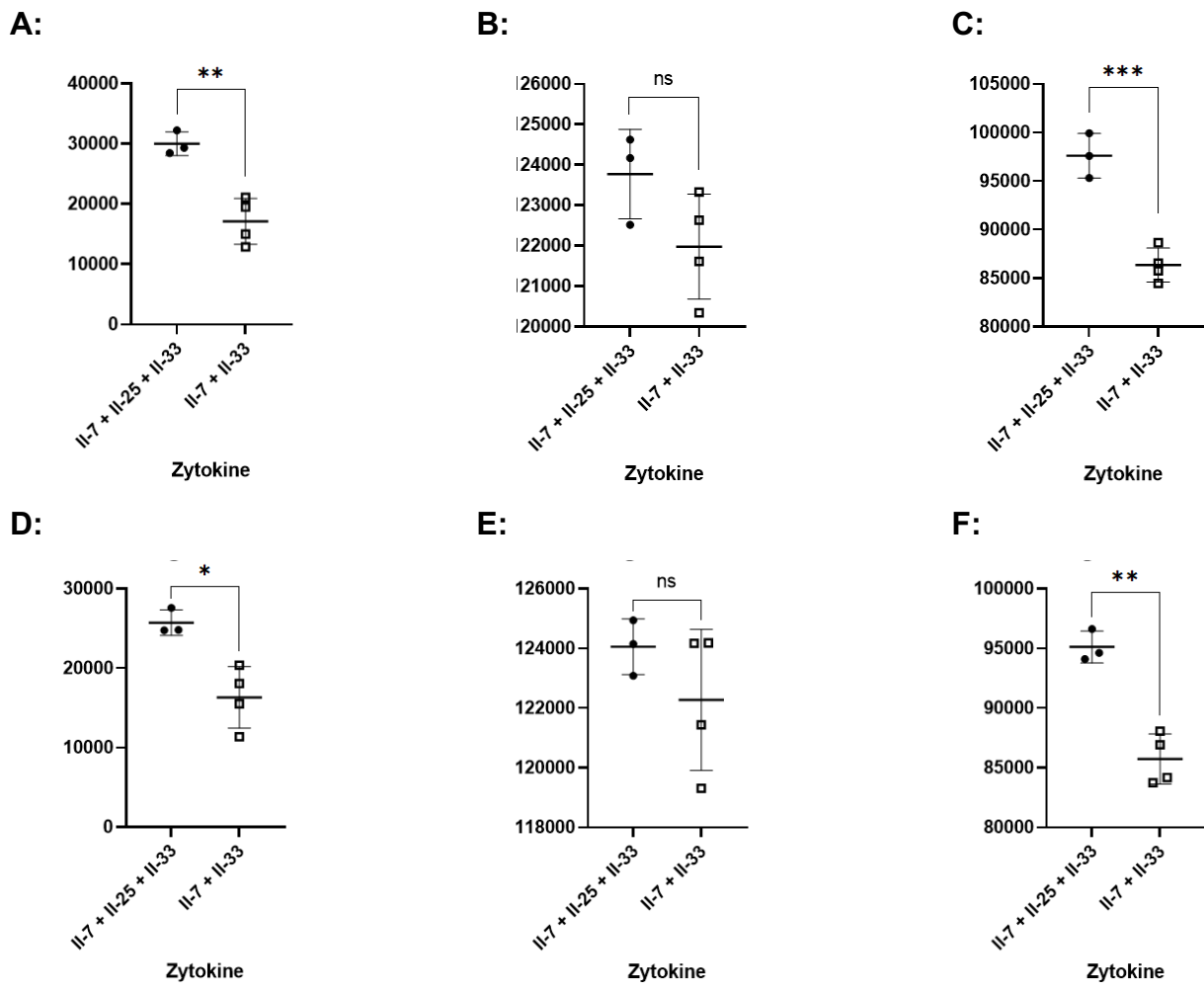


Abbildung 58: WT - ILC2 nehmen mit IL-25 stärker in ihrer Zellzahl (A), sowie Komplexität (C) zu. *Ernm* - KO ILC2 verhalten sich identisch (D = Zellzahl, F = Komplexität). Absolute Anzahl (A und D), sowie MFI der physikalische Eigenschaften (FSC-A (B und E), SSC-A (C und F)) von lebenden WT - ILC2 (*Ernm* +/+) (A bis C) oder lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-) (D bis F) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7 und IL-33, im Vergleich zur absoluten Anzahl, sowie der MFI der physikalischen Eigenschaften (FSC-A, SSC-A) von lebenden WT - ILC2 (*Ernm* +/+) oder lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, bei einer Ausgangszahl von 10.000 ILC2 (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der physikalischen Eigenschaften der ILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

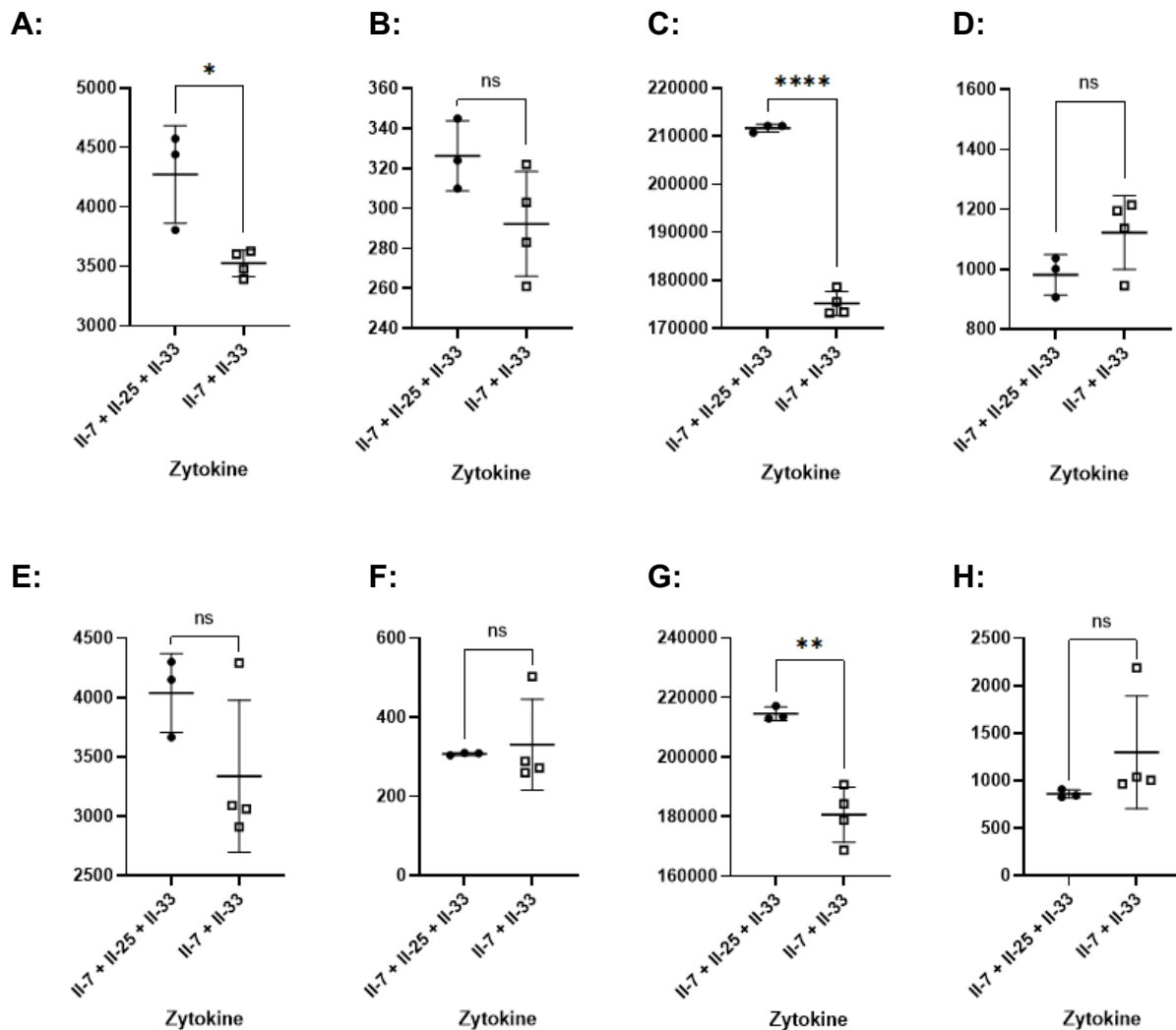


Abbildung 59: WT - ILC2 exprimieren mit IL-25 mehr KLRG1 (A) und mehr CD25 (C) auf ihrer Oberfläche. *Ernm* - KO ILC2 verhalten sich hinsichtlich CD25 (G) identisch. MFI der Expression von KLRG1 (A und E), CD127 (B und F), CD25 (C und G) und ST2 (D und H) auf lebenden WT - ILC2 (*Ernm* +/+) (A bis D) oder lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-) (E bis H) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7 und IL-33, im Vergleich zur Expression von KLRG1, CD127, CD25 und ST2 auf lebenden WT - ILC2 (*Ernm* +/+) oder lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, bei einer Ausgangszahl von 10.000 ILC2 (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der ILC2 - Oberflächenmarker wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

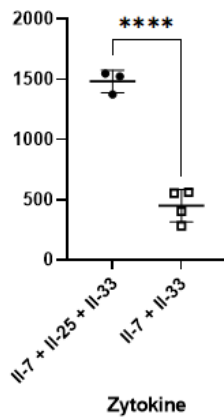
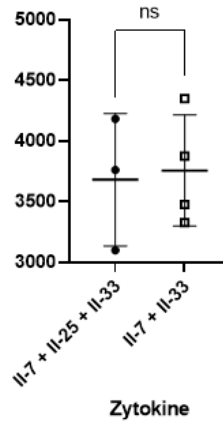
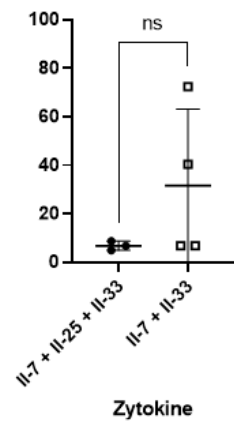
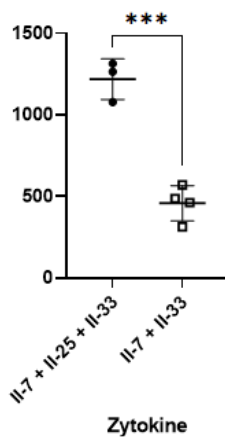
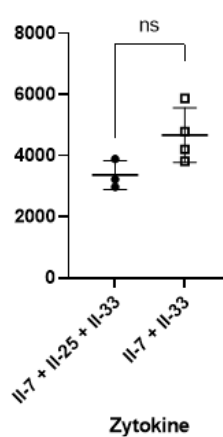
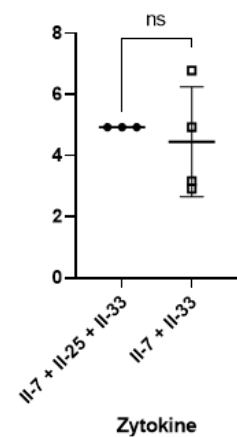
A:**B:****C:****D:****E:****F:**

Abbildung 60: WT - ILC2 sezernieren mit IL-25 mehr IL-10 (A). *Ernm* - KO ILC2 verhalten sich identisch (D). Konzentrationen (pg / ml) an den Zytokinen IL-10 (A und D), IL-6 (B und E) und TNF- α (C und F) im Kulturmedium von lebenden WT - ILC2 (*Ernm* +/+) (A bis C) oder lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-) (D bis F) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7 und IL-33, im Vergleich zur Konzentrationen an den (Typ 2) Zytokinen (IL-10, IL-6 und TNF- α) im Kulturmedium von lebenden WT - ILC2 (*Ernm* +/+) oder lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, bei einer Ausgangszahl von 10.000 ILC2 (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der sezernierten Zytokinen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

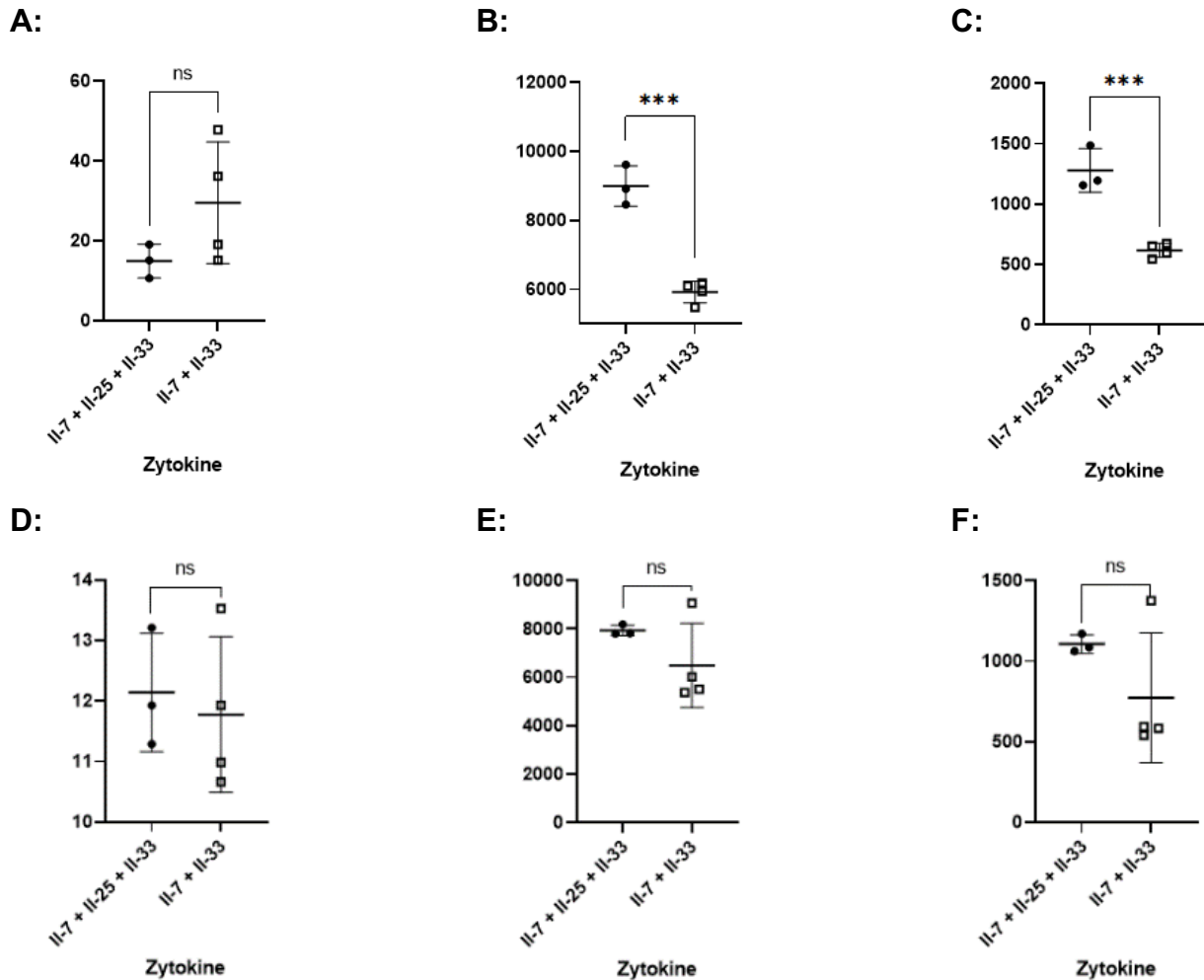


Abbildung 61: WT - ILC2 sezernieren mit IL-25 mehr IL-5 (B) und IL-13 (C). Konzentrationen (pg / ml) an den Typ 2 Zytokinen (IL-4 (A und D), IL-5 (B und E) und IL-13 (C und F)) im Kulturmedium von lebenden WT - ILC2 (*Ernm*^{+/+}) (A bis C) oder lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm*^{-/-}) (D bis F) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7 und IL-33, im Vergleich zur Konzentrationen an den Typ 2 Zytokinen (IL-4, IL-5 und IL-13) im Kulturmedium von lebenden WT - ILC2 (*Ernm*^{+/+}) oder lebenden *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm*^{-/-}) nach Ablauf einer 4 tägigen *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33, bei einer Ausgangszahl von 10.000 ILC2 (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der sezernierten Typ 2 Zytokinen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

ERMIN ist ein Zytoskelett - Protein. Umorganisation des Zytoskelettes ist der mikrobiologische Hintergrund hinter einer gerichteten Zellbewegung, welche im Rahmen von Immunprozessen, im Kontext einer gezielten Migration, von Bedeutung ist. Deshalb

ist es nahelegend zu untersuchen, ob durch das Fehlen von *Ernm* die ILC2 abweichende Migrationseigenschaften besitzen. Hierfür wurden ILC2 von WT - und *Ernm* - KO Mäusen aus der L. p. isoliert. Zunächst wurden diese nun mit IL-7, IL-25 und IL-33 stimuliert, da wir bereits gezeigt hatten, dass eine starke *Ernm* - Expression erst unter diesen Bedingungen stattfindet, und so wir davon ausgingen, dass Differenzen leichter aufgedeckt werden können. Im Anschluss wurden aus diesen Kulturen, die stark stimulierten ILC2 sortiert, welche dann nach einem Zeitfenster der Regeneration in einem Migrationsassay getestet wurden. Hierfür wurde ein "Boyden Chamber Assay" gewählt. Dabei mussten die ILC2 über eine Membran mit definierter Porengröße, angelockt von einem Zytokin Cocktail, welcher IL-33 enthielt, migrieren. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp - ILC2, und ILC2, welche kein *Ernm* besaßen.

Inflammatorische ILC2 sind im Rahmen einer *N. b.* Infektion in den MLN und der Lunge nachweisbar und spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen der gegen die Helminthen gerichtete Typ 2 Immunantwort. Da *Ernm* in iILC2 deutlich stärker exprimiert wird als in "Steady State" - ILC2 ohne Infektion galt es nun zu klären, ob *Ernm* innerhalb der iILC2 eine funktional wichtige Rolle im Kontext einer Infektion besitzt. Um herauszufinden ob das Fehlen von *Ernm* eine Veränderung der Immunantwort gegen *N. b.* bewirkt wählten wir ein *in vivo* Modell. Wir infizierten *Ernm* - KO Mäuse mit L3 Larven des Helminthen und analysierten die Wurmlast im Dünndarm und betrachteten weiterhin, per FACS - Analyse, die zelluläre Immunantwort der Tiere. Nach Ablauf einer 7 tägigen Infektion fanden sich im Dünndarm der *Ernm* - KO Tiere keine signifikant höhere Anzahl an reifen *N. b.* Würmern (**Abb. 62 A bis C**). Bezüglich der im Fokus des Interesses stehenden iILC2 zeigten sich in den Lungen der Tiere nach Ablauf der Zeit mehr iILC2 (**Abb. 63 A bis C**). Dies war jedoch nicht statistisch signifikant. Und auch in den MLN zeigte sich eine höhere Anzahl an iILC2 (**Abb. 64 A bis C**), was lediglich einmal statistische Signifikanz besaß, jedoch ebenfalls in allen Experimenten zu erkennen war.

Um die iILC2 genauer zu analysieren wurden physikalische Eigenschaften (FSC-A und SSC-A), als auch die ILC2 - Oberflächenmarker (KLRG1, CD127, CD25 und ST2) betrachtet. Hierbei zeigten sich keine konsistenten Unterschiede zwischen Wildtyp und *Ernm* - KO. Lediglich in den MLN der *Ernm* - KO Mäuse exprimierten die iILC2 signifikant weniger KLRG1 (**Abb. 65**).

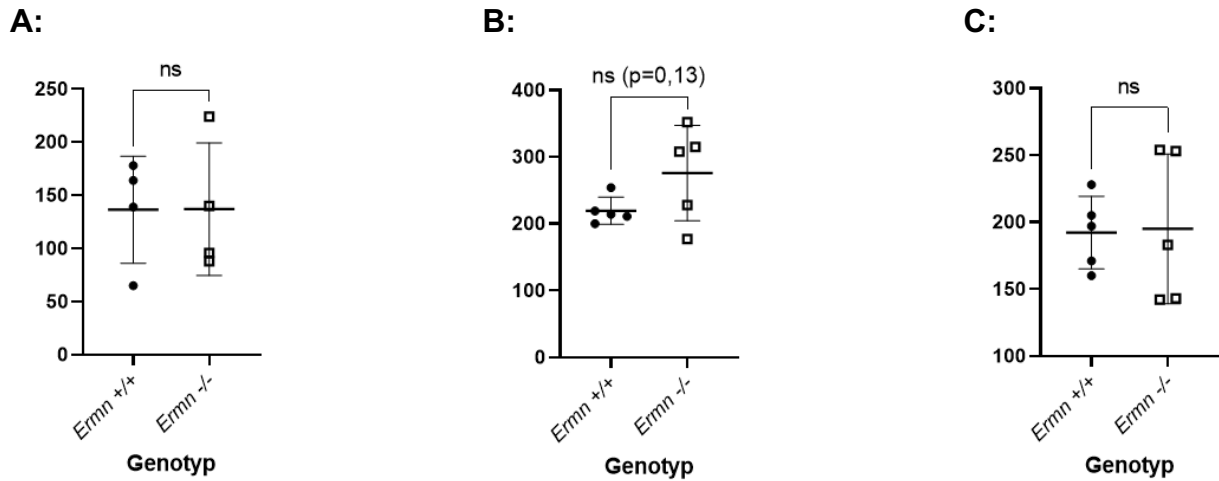


Abbildung 62: *Ermn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion keine **signifikant höhere Wurmlast auf**. Intestinale Wurmlast (absolute Anzahl) des Dünndarms der *Ermn* - KO Mäuse (*Ermn* -/-) am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zur Wurmlast von WT - Mäusen (*Ermn* +/+) (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, **A** = Infektion Nr. 1, **B** = Infektion Nr. 2, **C** = Infektion Nr. 3).

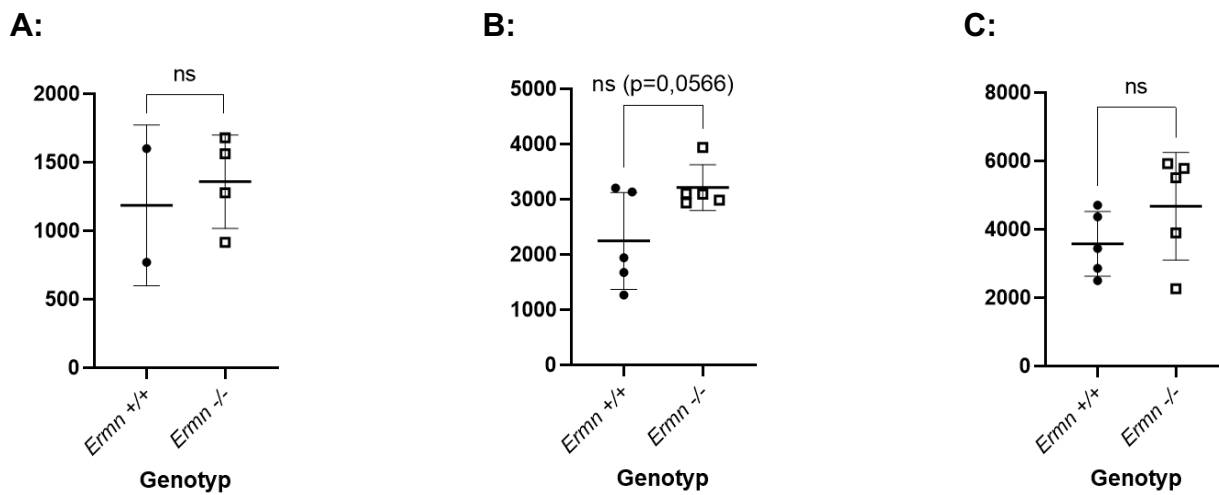


Abbildung 63: *Ermn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion **mehr iILC2 in ihren Lungen auf (A bis C - nicht signifikant)**. Absolute Anzahlen der iILC2 in der Lunge von *Ermn* - KO (*Ermn* -/-) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ermn* +/+) zum identischen Zeitpunkt der Infektion (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, **A** = Infektion Nr. 1, **B** = Infektion Nr. 2, **C** = Infektion Nr. 3).

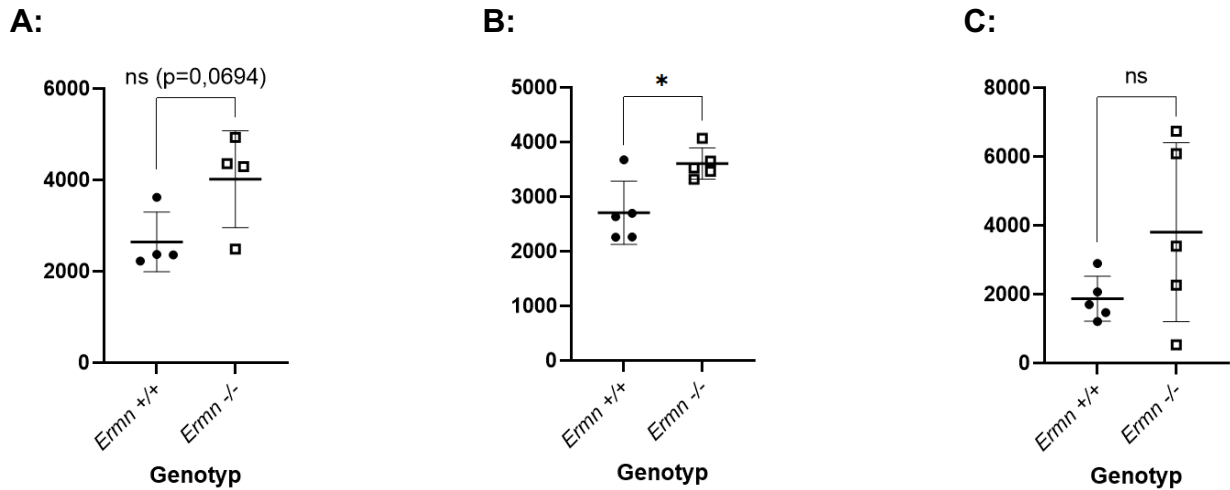


Abbildung 64: *Ermn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion mehr iILC2 in ihren MLN auf (A und C - nicht signifikant). Absolute Anzahlen der iILC2 in den MLN von *Ermn* - KO (*Ermn* -/-) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ermn* +/+) zum identischen Zeitpunkt der Infektion (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, **A** = Infektion Nr. 1, **B** = Infektion Nr. 2, **C** = Infektion Nr. 3).

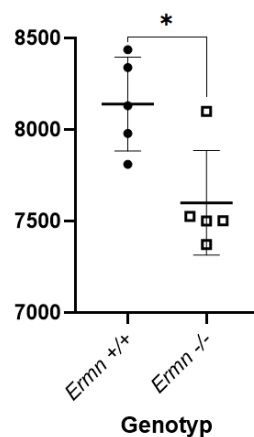


Abbildung 65: Die iILC2 der MLN der *Ermn* - KO Mäuse exprimieren im Rahmen einer *N. b.* Infektion weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von KLRG1 auf den iILC2 der MLN von *Ermn* - KO (*Ermn* -/-) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ermn* +/+) zum identischen Zeitpunkt der Infektion (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker der iILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Eosinophile werden unter anderem durch das IL-5 der ILC2 in ihrer Homöostase reguliert. Für die Degranulation von Vesikeln, welche Zytokine gespeichert haben benötigt es ebenfalls eine Umorganisation des Zytoskelettes. Da *Ernm* ein Zytoskelett - Protein ist, dessen Funktion in iILC2 jedoch nicht abschließend geklärt ist, ist es auch denkbar, dass es in diesen Prozess der Transmitterfreisetzung involviert ist. Um diesen Zusammenhang zu adressieren betrachteten wir zunächst per FACS - Analyse die Populationen an eosinophilen Granulozyten. Hierbei fanden wir in den MLN der *Ernm* - KO Mäuse signifikant mehr Eosinophile (**Abb. 66 A**). Diese waren gleichzeitig signifikant größer (FSC-A) und weniger komplexer (SSC-A) (**Abb. 66 B und C**).

Da die Population an Eosinophilen durch unter anderem die Sekretion von IL-5 reguliert wird, war es notwendig die Mengen an IL-5 im Blutserum der infizierten *Ernm* - KO Mäuse zu analysieren. Erwiesen ist, dass es neben iILC2 auch weitere IL-5 sezernierende Zellen gibt, doch im Kontext einer Helminth - Infektion sind die Mengen an IL-5 im Serum eng assoziiert mit der Funktionalität und Sekretion der in diesem Kontext entscheidenden iILC2. Um dies zu untersuchen wurde das Blutserum der infizierten Tiere gewonnen, und mithilfe eines Immunoassays (LEGENDplex™) am Durchflusszytometer analysiert. Es zeigte sich, dass in den *Ernm* - KO Mäuse signifikant weniger IL-5 im Blutserum zirkulierte (**Abb. 67 A**). Darüber hinaus wurden weitere Zytokine untersucht. Darunter andere Typ 2 Zytokine: IL-4 und IL-13 sowie weitergehend IL-10, IL-6 als auch TNF- α . Während bezüglich der meisten anderen Zytokine keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren, so zeigten sich die Mengen an IL-4 im Blutserum der *Ernm* - KO Mäuse ebenfalls signifikant reduziert (**Abb. 67 B**).

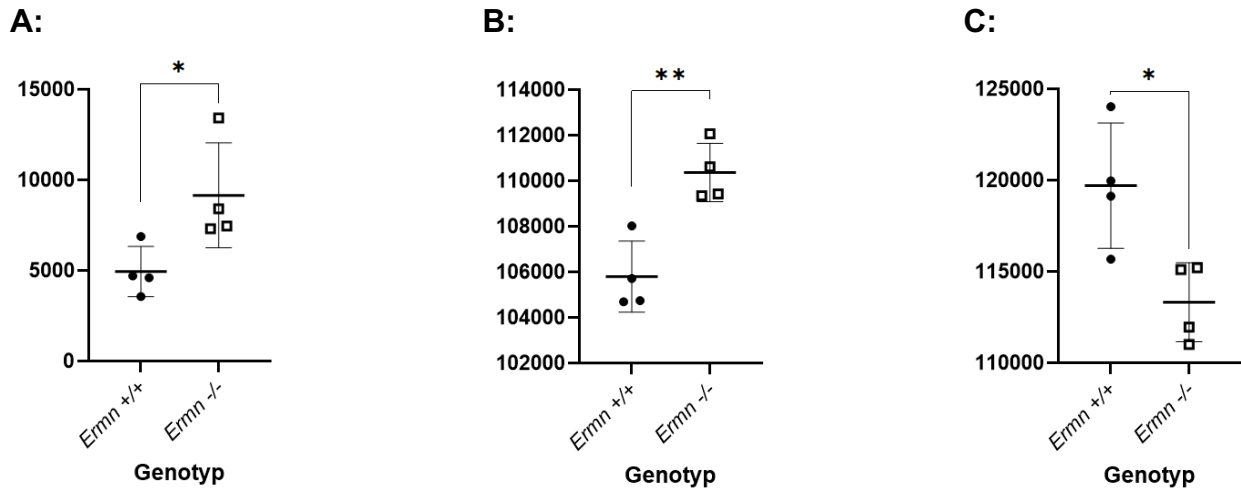


Abbildung 66: *Ermn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion mehr Eosinophile in ihren MLN auf (A), welche größer (B) und weniger komplex sind (C). Absolute Anzahlen (A), MFI der FSC-A (B) und SSC-A Werte (C) der Eosinophilen der MLN von *Ermn* - KO (*Ermn* *-/-*) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ermn* *+/+*) zum identischen Zeitpunkt der Infektion (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Eosinophilen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

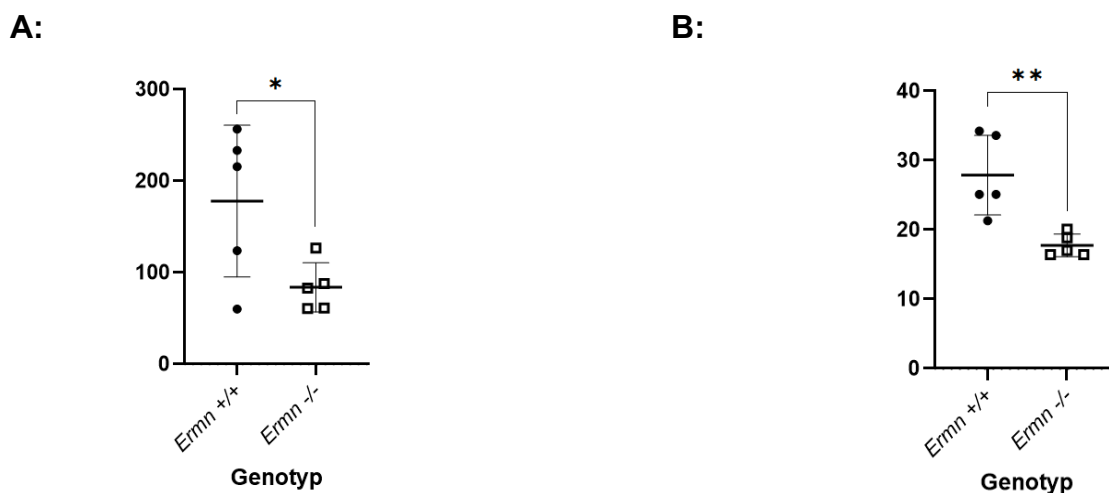
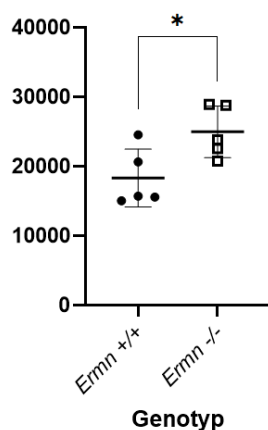


Abbildung 67: *Ermn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion weniger IL-5 (A) und IL-4 (B) in ihrem Blutserum auf. Konzentrationen (pg / ml) der Typ 2 Zytokinen IL-5 (A), IL-4 (B) im Blutserum von *Ermn* - KO (*Ermn* *-/-*) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den Konzentrationen der identischen Zytokine im Blutserum von WT - Mäusen (*Ermn* *+/+*) zum identischen Zeitpunkt der Infektion

(Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Zytokine im Blutserum wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Da iILC2 und nILC2 eng miteinander verwandt sind betrachteten wir ebenfalls die Populationen der nILC2 in den MLN und der Lunge im Kontext einer *N. b.* Infektion. Hier zeigte sich zunächst, dass die Anzahl an nILC2 nicht verändert war bzw. später, dass mehr nILC2 in den Lungen (**Abb. 68 A**) und in den MLN zu finden waren (**Abb. 68 B**). Die Größe (FSC-A), und auch Komplexität (SSC-A) der *Ernm* - KO nILC2 wich nicht in signifikanter Weise von denen der Wildtyp Kontrollen ab. Des Weiteren zeigten auch die ILC2 - Oberflächenmarker keine größeren Unterschiede. Lediglich KLRG1 war in der Lunge signifikant weniger auf den nILC2 exprimiert (**Abb. 69 A**), und auch in den MLN war diese Tendenz deutlich zu erkennen aber nicht signifikant. In den MLN exprimierten die nILC2 signifikant mehr CD127 (**Abb. 69 B**) und in der Lunge signifikant weniger CD25 (**Abb. 69 C**).

A:



B:

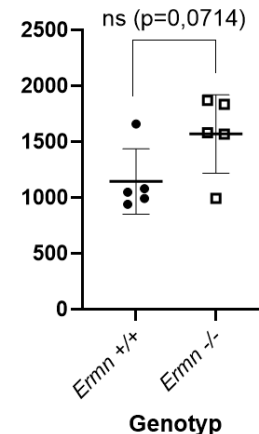


Abbildung 68: *Ernm* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion mehr nILC2 in ihren Lungen (A) und ihren MLN auf (B - nicht signifikant). Absolute Anzahlen der nILC2 in der Lunge (A) und den MLN (B) von *Ernm* - KO (*Ernm* -/-) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ernm* +/+) zum identischen Zeitpunkt der Infektion (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

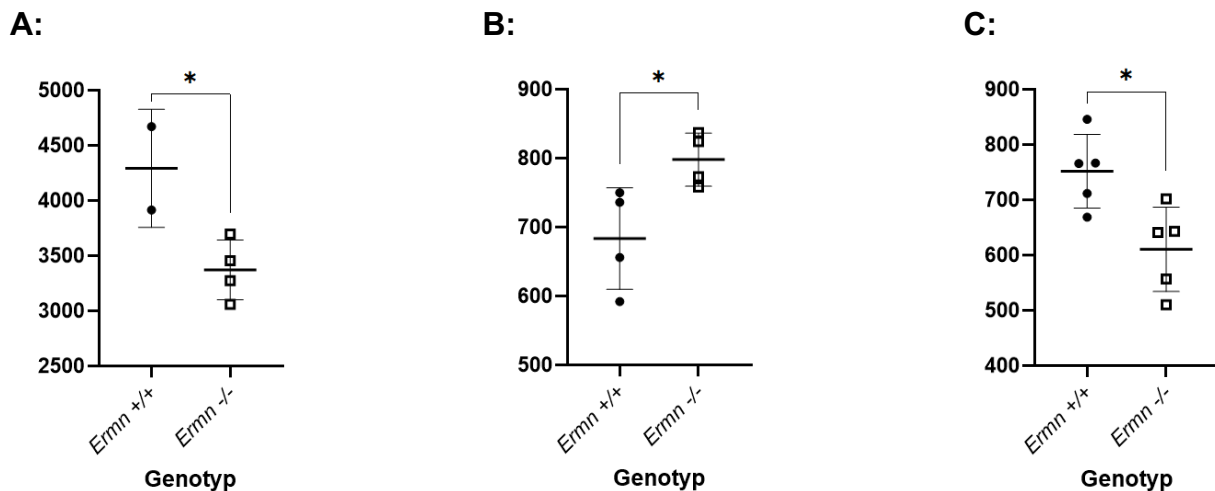
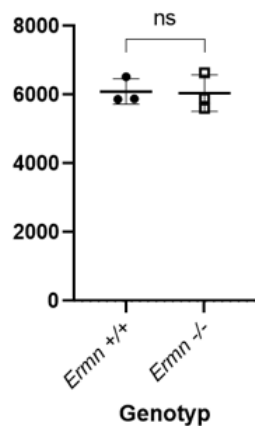


Abbildung 69: Die nILC2 der Lunge der *Ernm* - KO Mäuse exprimieren im Rahmen einer *N. b.* Infektion weniger KLRG1 (A) und CD25 (C), und die nILC2 der MLN mehr CD127 (B), auf ihrer Oberfläche. MFI der Expression von KLRG1 (A), CD127 (B) und CD25 (C) auf den nILC2 in der Lunge (A und C) und den MLN (B) von *Ernm* - KO (*Ernm* -/-) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Ernm* +/+) zum identischen Zeitpunkt der Infektion (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker der nILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

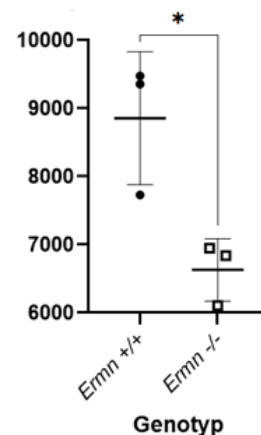
Im Kontext der *N. b.* Infektionen sahen wir, dass (nicht signifikant) mehr Würmer bei gleichzeitig auch intensiverer Immunantwort (mehr iILC2) vorzufinden waren. Dies ist kein klarer Zusammenhang, wie eine Exazerbation der Wurmlast bei fehlenden Immunzellen. Eine mögliche Hypothese bezog sich auf die Tatsache, dass ERMIN ein Zytoskelett - Protein ist und sein Fehlen die ILC2 in der Zytoskelett - abhängigen Motilität in der frühen Phase der Infektion einschränkt. Durch das verzögerte Ankommen und Eingreifen am Herd der Infektion kommt es zunächst zu einer Verzögerung der Immunantwort, in welcher die Würmer sich vermehren können. Da die Gesamtheit der Immunantwort jedoch nicht ausgeschaltet, sondern lediglich verzögert ist, kommt es im späteren Verlauf zu einer stärkeren Immunantwort als physiologische Reaktion auf die erhöhte Wurmlast. Um sich diesen Vermutungen zu nähern wurde eine Kombination aus Stimulation und Migrationsassay gewählt, welche an 2 diversen Zeitpunkten abgegriffen wurden. Sortierte ILC2 wurden in die obere Kammer eines “Boyden Chamber Assays“ gegeben, angezogen durch ein Zytokin - Mix (IL-7, IL-25 und IL-33) in der unteren

Kammer. Der Zytokin - Mix wirkt dabei stark stimulierend und induzierte gleichzeitig eine Chemotaxis. Der Gedanke war, dass die ILC2 von der oberen Kammer, angelockt durch die Zytokine, über die Membran migrieren müssen, um dann im unteren Kompartiment anzukommen und zu proliferieren. Um gleichzeitig die Zeitabhängigkeit der vermuteten, zu einem frühen Zeitpunkt bestehenden schlechteren Migration aufzuzeigen, wurden die Kulturen einmal nach 3 Tagen und einmal, nach 7 Tagen analysiert. Dabei untersuchten wir sowohl die untere Kammer (hier befanden sich die migrierten und proliferierten ILC2) als auch die der Membran aufliegenden oberen Kammer (bzw. die Oberfläche der Membran). Die auf der Membran zurück gebliebenen ILC2 waren Zellen mit insuffizienter Migration. Darüber hinaus betrachteten wir die Mengen an sezernierten Typ 2 Zytokinen: IL-4, IL-5 und IL-13 sowie weitergehend IL-10, IL-6 als auch TNF- α . In den durchgeführten Experimenten zeigten sich zumeist keine signifikanten Unterschiede zwischen *Ernm* - KO und Wildtyp. Lediglich bestätigte sich, dass die *Ernm* - KO ILC2 nach 7 Tagen signifikant weniger IL-5 in das Kulturmedium sezerniert hatten (**Abb. 70 B**), wohingegen dieser Unterschied nach 3 Tagen noch nicht vorhanden war (**Abb. 70 A**). Auch IL-13 wurde beim Fehlen von *Ernm* durch ILC2 signifikant reduziert sezerniert (**Abb. 70 C und D**).

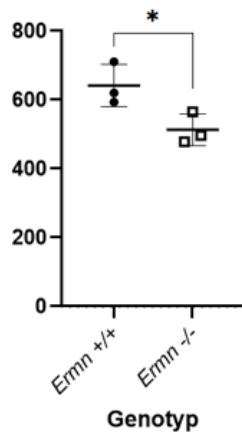
A:



B:



C:



D:

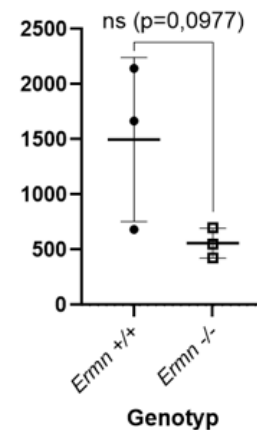


Abbildung 70: Die ILC2 der *Ernm* - KO Mäusen sezernieren im Rahmen einer Kombination aus Stimulation und Migrationsassay weniger IL-5 (A = nach 3 Tagen - nicht signifikant, B = nach 7 Tagen) und IL-13 (C = nach 3 Tagen, D = nach 7 Tagen - nicht signifikant). Konzentrationen (pg / ml) an den Typ 2 Zytokinen IL-5 (A = nach 3 Tagen, B = nach 7 Tagen) und IL-13 (C = nach 3 Tagen, D = nach 7 Tagen) im Kulturmedium von *Ernm* - KO ILC2 (*Ernm* -/-), nach Ablauf einer 3 (A und C) oder 7 (B und D) tägigen Kombination aus einer *in vitro* Kultur mit den Zytokinen IL-7, IL-25 und IL-33 und einem Migrationsassay im Vergleich zu den Konzentrationen der identischen Zytokine im Kulturmedium von WT - ILC2 (*Ernm* +/+) nach identischem Verfahren (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Zytokine im Kulturmedium wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Nachdem die iILC2 nun lokal in der L. p. aktiviert wurden, zu den Lymphbahnen migriert sind und in diese eingetreten sind, gelangen sie zu den lokalen Lymphknoten (beispielsweise den MLN des Gastrointestinaltraktes). Hier interagieren sie mit Effektorzellen, darunter auch T - Zellen, welche auf die Präsentation von Antigenen auf den Oberflächen anderer Zellen angewiesen sind.

Bekannt ist bisher, dass ILC2 MHC-II - Moleküle besitzen (Oliphant et al., 2014). Mit diesen können Sie beispielsweise T - Zellen aktivieren. In den Analysen der Sequenzierungs - Datensätzen von Flamar, Klose und Kollegen zeigte sich, dass ein Protein namens LEGUMAIN, kodiert durch das Gen *Lgmn*, in iILC2 exprimiert wird. LEGUMAIN wird in der Literatur mit MHC-II - Komplexen assoziiert und war in denjenigen Zellen, welche nur eine insuffiziente Immunantwort propagieren konnten, weniger exprimiert.

Wir wollten nun betrachten, ob das Fehlen von LEGUMAIN selber ebenfalls zu einer vom normalen abweichenden Immunantwort führen würde, und diese genauer untersuchen.

Zunächst galt es festzustellen, ob LEGUMAIN bzw. sein Gen *Lgmn* in ILC2 exprimiert wird. Hierfür wurden ILC2 aus der L. p. des Dünndarms von Wildtyp - Mäusen isoliert und per qPCR die Transkriptionslevel an *Lgmn* - RNS untersucht. Es zeigte sich, dass bereits im "Steady State" *Lgmn* in ILC2 exprimiert wird (**Abb. 71 A**). Darauffolgend wollten wir untersuchen, ob diese Transkription im Rahmen der Aktivierung heraufreguliert wird. Hierfür wurden sortierte ILC2 mit einem Zytokin - Cocktail (IL-25, IL-33 und IL-7), welcher eine starke Aktivierung bewirkt, kultiviert und die RNS - Analysen wiederholt. Es zeigte sich, dass die *Lgmn* - Transkription in ILC2 unter *in vitro* Stimulation signifikant gesteigert wird (**Abb. 71 A**). Nachdem wir dies nun gezeigt hatten, wollten wir das Vorhandensein der Induktion der *Lgmn* - Transkription auch *in vivo* zeigen. Hierfür wurde erneut das Tiermodell der *N. b.* Infektion in Mäusen gewählt, und am 7. Tage der Infektion die iILC2 aus den MLN der infizierten Tiere isoliert. Die per qPCR festgestellten Level der RNS - Transkription wurden mit den Transkriptions - Leveln von "Steady State" - ILC2, sortiert aus der L. p. des Dünndarms verglichen. Man sah erneut, dass im "Steady State" *Lgmn* exprimiert wird. Weiterhin zeigte sich, dass in WT - iILC2 die *Lgmn* - Expression im Rahmen der Helminth - Infektion signifikant gesteigert ist (**Abb. 71 B**). Gleichzeitig interessant war, dass in den nILC2, welche im Rahmen der Infektion gewonnen wurden, *Lgmn* signifikant vermehrt transkribiert wird als in "Steady State" - ILC2, jedoch signifikant weniger als in den iILC2 der infizierten Tiere.

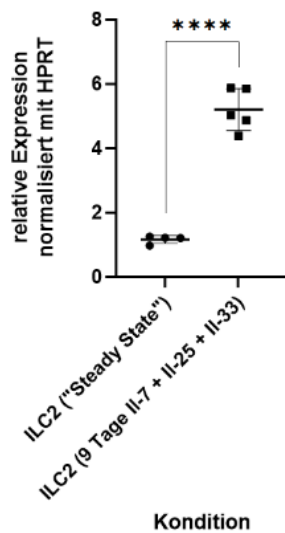
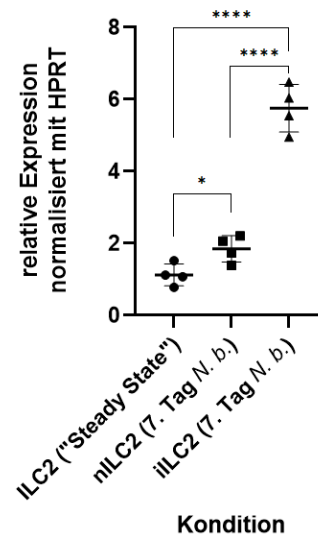
A:**B:**

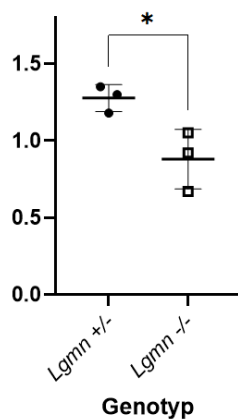
Abbildung 71: *Lgmn* wird im "Steady State" in ILC2 exprimiert (A und B), und unter Stimulation heraufreguliert (A = *in vitro*, B = *in vivo*). *Lgmn* - Expression in Wildtyp - ILC2 sortiert aus der L. p. des Dünndarms im "Steady State" verglichen mit der *Lgmn* - Expression in Wildtyp - ILC2 sortiert aus der L. p. nach einer *in vitro* Stimulation von 9 Tagen mit IL-7, IL-25 und IL-33 (A). *Lgmn* - Expression in Wildtyp - ILC2 sortiert aus der L. p. des Dünndarms im "Steady State" verglichen mit der *Lgmn* - Expression in Wildtyp - iILC2 und Wildtyp - nILC2 sortiert aus den MLN am 7. Tage einer *N. b.* Infektion (B) (für A und B: Errechnung der Expression mittels $2^{-\Delta CT}$ - Methode und dem Haushaltsgen *Hprt*, statistischer Test = ungepaarter t-Test).

Da bereits im "Steady State" *Lgmn* innerhalb der ILC2 exprimiert wird, wollten wir klären, ob es bereits ohne äußerliche Einflüsse ein Phänotyp in *Lgmn* - defizienten Mäusen, hinsichtlich der ILC2 - Population oder der durch sie regulierten Zellen (eosinophile Granulozyten) gibt. Um dies zu untersuchen wurden die *Lgmn* - KO Mäuse, im Sinne eines "loss of function" Zuganges, analysiert. Dabei wurden ILC2 haltige Organe wie der Dünndarm, das epididymale Fett, die Lunge und die MLN untersucht. Lediglich im Dünndarm zeigte sich, dass die *Lgmn* - KO Mäuse signifikant weniger ILC2 vorwiesen (Abb. 72 A). Für die restlichen Organe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bezüglich der eosinophilen Granulozyten sah man keine numerischen Unterschiede, die signifikant waren. Für weitergehende Analysen wurden die ILC2 - Oberflächenmarker (CD25, ST2, CD127 und KLRG1) untersucht. Wir fanden keine signifikanten

Unterschiede zwischen Wildtyp und *Lgmn* - KO, bis auf eine signifikant verstärkte KLRG1 - Expression der ILC2 aus dem epididymalen Fettgewebe (**Abb. 72 B**).

Da *Lgmn* in der Literatur mit MHC-II - Komplexen assoziiert wird, wollten wir feststellen, ob durch das Fehlen von *Lgmn* auf den ILC2 abweichende MHC-II - Mengen vorhanden sind. Hierfür wurden isolierte ILC2 per FACS - Analyse auf den Oberflächenrezeptor untersucht, es zeigten sich jedoch keine signifikanten Differenzen hinsichtlich ihrer MHC-II - Expression.

A:



B:

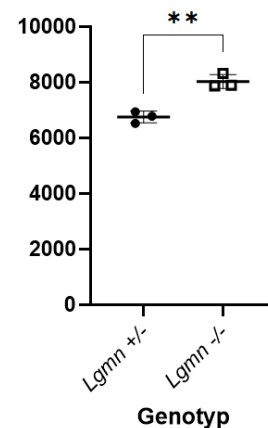


Abbildung 72: *Lgmn* - KO Mäuse weisen im “Steady State“ weniger ILC2 in der L. p. des Dünndarms auf (A), und die ILC2 des epididymalen Fettgewebes exprimieren mehr KLRG1 auf ihrer Oberfläche (B). Relative (% aller Events) Anzahlen an der ILC2 aus der L. p. des Dünndarms (**A**) und MFI der Expression von KLRG1 auf den ILC2 aus dem epididymalen Fettgewebe (**B**) von *Lgmn* - KO (*Lgmn* -/-) Mäusen im Vergleich zu den identischen Populationen in Mäusen, welche das *Lgmn* - Gen besaßen (*Lgmn* +/-) (MFI errechnet über den “Geometric Mean“ der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der ILC2 - Oberflächenmarker wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Im “Steady State“ ließ sich aus diesen Experimenten folglich kein deutlicher Phänotyp bezüglich der ILC2s oder Eosinophilen ableiten. Bedenkt man den Artikel von Ricardo - Gonzalez und Kollegen, in welche 3 wichtige ILC2 Signalwege ausgeknockt wurden (IL-25, IL-33 und TSLP), und dennoch im “Steady State“ noch kein bemerkenswerter Unterschied der ILC2 - Population zu beobachten war (Ricardo-Gonzalez et al., 2018), galt es die Analysen von *Lgmn* unter Bedingungen einer Stimulation fortzuführen. Wir

wählten das *in vivo* Modell der *N. b.* Infektion, welches ein starker Aktivator der Typ 2 Immunität und damit der iILC2, ist. Zunächst wurde orientierend untersucht, ob *Lgmn* - KO Mäuse die Helminth - Infektion schlechter überwinden konnten, indem am 7. Tage der Infektion die intestinale Wurmlast im Dünndarm der infizierten Tiere analysiert wurde. Hier zeigte sich, dass die Tiere, welchen *Lgmn* fehlte tendenziell mehr reife *N. b.* Würmer im Darmlumen aufwiesen, allerdings waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant (**Abb. 73 A und B**).

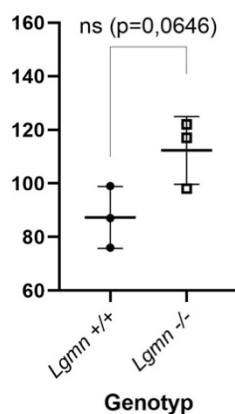
Um die induzierte Typ 2 Immunantwort genauer zu untersuchen wurden per FACS - Analyse die iILC2 aus den MLN, der Lunge und dem epididymalen Fettgewebe identifiziert. Hier zeigte sich, dass die *Lgmn* - KO Mäuse in numerischer Weise nicht mehr oder weniger iILC2 in den erwähnten Organen besaßen. Darüber hinaus wurden die iILC2 auf physikalische Eigenschaften (FSC-A und SSC-A), als auch die ILC2 - Oberflächenmarker (CD25, ST2, KLRG1 und CD127), sowie den mit LEGUMAIN assoziierten MHC-II - Komplex, untersucht. Dabei fanden sich kaum signifikante Unterschiede. Interessant war jedoch, dass KLRG1 auf den iILC2 der MLN und des epididymalen Fettes signifikant reduziert war (in der Lunge sah man ebenfalls eine Tendenz zu weniger Expression) (**Abb. 74 A und B**). Hierbei muss erinnert werden, dass im "Steady State" der *Lgmn* - KO Mäuse (nicht im Kontext einer Infektion), die ILC2 des epididymalen Fettgewebes mehr KLRG1 exprimierten (**Abb. 72 B**). MHC-II wurde auf den iILC2 des epididymalen Fettgewebes signifikant weniger exprimiert (**Abb. 74 C**), und diese Zellen aus dem epididymalen Fettgewebe waren gleichzeitig signifikant kleiner (FSC-A) und weniger komplex (SSC-A) (**Abb. 74 D und E**). Des Weiteren exprimierten die iILC2 der Lunge der *Lgmn* - KO Tiere signifikant mehr MHC-II (**Abb. 74 F**).

Da die iILC2 mit dem durch sie sezernierten IL-5 die eosinophilen Granulozyten mitregulieren betrachteten wir ebenfalls diese Zellpopulation. In den *Lgmn* - KO Mäusen zeigten sich dabei in den untersuchten Organen (MLN, Lunge und epididymales Fett), lediglich in den MLN fast signifikant mehr eosinophile Granulozyten, welche gleichzeitig auch komplexer waren (**Abb. 75 A und B**). Die Komplexität kann dabei als ein Maß für die Granularität und somit die in zellulären Vesikeln gespeicherten Botenstoffe (z. B. Effektormoleküle) aufgefasst werden.

Um zu untersuchen ob die abweichenden Zahlen der Zellpopulationen ggf. auf diverse Zytokin - Level zurückzuführen sind, analysierten wir die im Blutserum der infizierten Tiere zirkulierenden Mengen an den klassischen Typ 2 Zytokinen: IL-4, IL-5 und IL-13 sowie darüber hinaus IL-10, IL-6 als auch TNF- α . Dabei zeigte sich, dass in den *Lgmn* - KO Mäusen keine signifikanten Differenzen in den Mengen an zirkulierenden Mediatoren zu entdecken waren.

Auch die nILC2 wurden von uns analysiert, da sie eng mit den im Zentrum der Studie stehenden iILC2 verwandt sind. Hier zeigte sich jedoch keine konsistenten und signifikanten Differenzen zwischen Wildtyp und Mäusen, denen das *Lgmn* - Gen fehlte. Und auch die weiterhin untersuchten Eigenschaften und Marker (CD25, ST2, KLRG1, CD127 und MHC-II sowie FSC-A und SSC-A) zeigten, auf den nILC2 der MLN, Lunge und des epididymalen Fettgewebes, der *Lgmn* - KO Mäuse keine signifikanten Unterschiede.

A:



B:

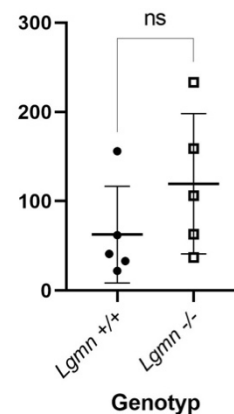


Abbildung 73: *Lgmn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion eine nicht signifikant höhere Wurmlast auf. Intestinale Wurmlast (absolute Anzahl) des Dünndarms der *Lgmn* - KO Mäuse (*Lgmn* -/-) am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zur Wurmlast von WT - Mäusen (*Lgmn* +/+) (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, **A** = Infektion Nr. 1, **B** = Infektion Nr. 2).

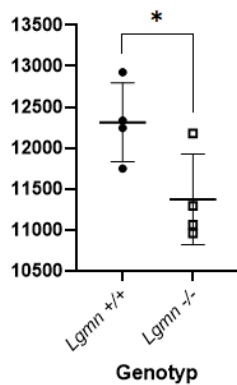
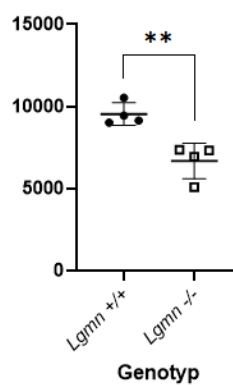
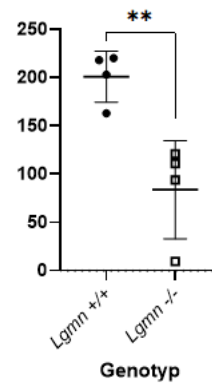
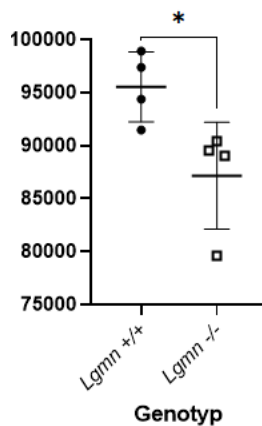
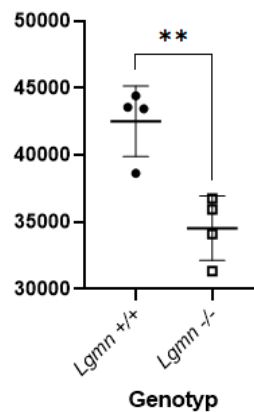
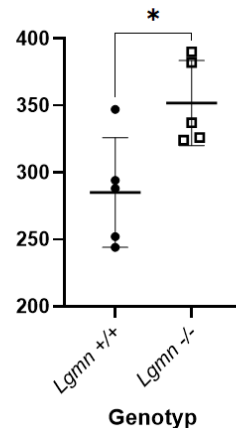
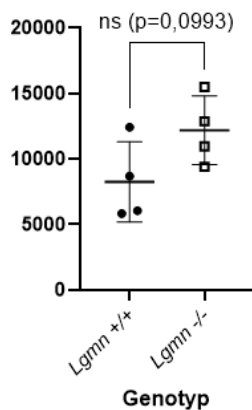
A:**B:****C:****D:****E:****F:**

Abbildung 74: Die iILC2 der MLN der *Lgmn* - KO Mäuse exprimieren im Rahmen einer *N. b.* Infektion weniger KLRG1 auf ihrer Oberfläche (A), die iILC2 aus dem epididymalen Fettgewebe weniger KLRG1 (B) und MHC-II (C), und sind darüber hinaus kleiner (D) und weniger komplex (E) und die iILC2 aus der Lunge exprimieren mehr MHC-II (F). MFI der Expression von KLRG1 (A und B), MHC-II (C und F), als auch der physikalischen Eigenschaften (FSC-A = D und SSC-A = E) auf den / der iILC2 aus den MLN (A), dem epididymalen Fettgewebe (B bis E) und der Lunge (F) von *Lgmn* - KO (*Lgmn* -/-) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Lgmn* +/+) zum identischen Zeitpunkt der Infektion (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Oberflächenmarker und physikalischen Eigenschaften der iILC2 wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

A:



B:

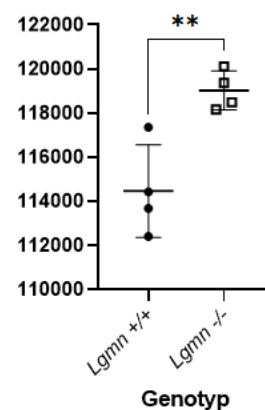
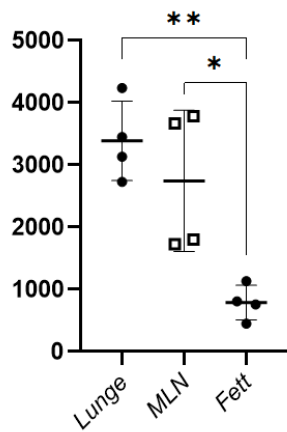


Abbildung 75: *Lgmn* - KO Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion mehr Eosinophile in ihren MLN auf (A - nicht signifikant), welche komplexer sind (B). Absolute Anzahl (A) und MFI der SSC-A Werte (B) der Eosinophilen der MLN von *Lgmn* - KO (*Lgmn* -/-) Mäusen, am 7. Tage einer *N. b.* Infektion im Vergleich zu den identischen Populationen in WT - Mäusen (*Lgmn* +/+) zum identischen Zeitpunkt der Infektion (MFI errechnet über den "Geometric Mean" der Fluoreszenzstärke, statistischer Test = ungepaarter t-Test, für die sekundären Endpunkte der Eosinophilen wurde nicht für multiples Testen adjustiert).

Eine bemerkenswerte Neuheit zu iILC2, welche im Rahmen der Analyse der WT - Kontrolltiere auffiel, war, dass wenn man die einzelnen Organe der Tiere, welche im Rahmen der *N. b.* Infektion untersucht wurden, hinsichtlich ihrer iILC2 - Population verglich, im epididymalen Fettgewebe im Rahmen der Infektion in den WT - Mäusen signifikant weniger iILC2 zu finden als in den beiden anderen Geweben. Während in der Lunge (gesamte Probe) und den MLN (in 1 Mio. Events) jeweils einige Tausend zu finden waren, so waren im Fettgewebe (gesamte Probe) nur einige Hundert zu finden (**Abb. 76 A und B**).

A:



B:

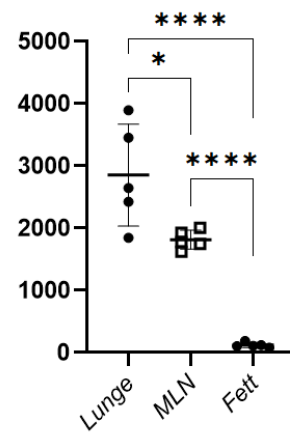


Abbildung 76: WT - Mäuse weisen im Rahmen einer *N. b.* Infektion im epididymalen Fettgewebe weniger iILC2 als in den MLN oder der Lunge auf. Absolute Anzahl an iILC2 in der Lunge (gesamte Probe), den MLN (in 1 Mio. Events) und dem epididymalen Fettgewebe (gesamte Probe), isoliert aus WT - Mäusen am 7. Tage einer *N. b.* Infektion. Im Fettgewebe zeigten sich signifikant weniger iILC2 als in den MLN und in der Lunge (Statistischer Test = ungepaarter t-Test, **A** = Infektion Nr. 1, **B** = Infektion Nr. 2).

7. Diskussion

iILC2 wurden zum ersten Mal im Jahre 2015 beschrieben (Huang et al., 2015), als eine Population an angeborenen Lymphozyten, welche auf IL-25 mit Proliferation reagieren, und die nILC2, welche durch IL-33 zur Proliferation gebracht werden, komplementieren. Darüber hinaus spielen iILC2, durch ihr Typ 2 Zytokin Produktion, eine entscheidende Rolle im Rahmen einer Helminth - Infektion, beispielsweise einer *N. b.* Infektion, und können sich nach Ablauf der Infektion in nILC2 entwickeln. Ein folgender Artikel von Huang und Kollegen zeigte, dass die iILC2 sich aus ILC2, welche im "Steady State" in der L. p. des Dünndarms residieren entwickeln, und im Rahmen einer Helminth - Infektion, per S1p - abhängiger Chemotaxis, über den Lymphstrom zu den Effektororganen und Schauplätzen der Infektion gelangen (Huang et al., 2018), um dort Verteidigung und Reparatur zu vermitteln. Wie genau jedoch die iILC2 durch die IL-25 - Gabe oder *N. b.* Infektion (Huang et al., 2015) entstehen, bleibt jedoch fraglich und die spezifischen inter - und vor allem intrazellulären Kaskaden waren weitestgehend unbekannt. Erst im Jahre 2020 publizierten Flamar und Klose, dass auch IL-33 (ein wichtiges Alarmin der Typ 2 Immunantwort) in der Lage ist die Homöostase der ILC2 so zu beeinflussen, dass iILC2 entstehen (Flamar et al., 2020). Darüber hinaus identifizierten sie Tph1, die Tryptophan Hydroxylase 1, das durchsatzlimitierende Enzym der Serotoninsynthese, als ein wichtiges Enzym innerhalb der iILC2, welches im Rahmen einer IL-33 Behandlung oder *N. b.* Infektion herauf reguliert wird. Ohne Tph1 sind die iILC2 in ihrer Funktionalität eingeschränkt. "Downstream" von Tph1 entdeckten sie ICOS, als ein in der Kaskade der iILC2 - Aktivierung bedeutenden Oberflächenrezeptor der iILC2 (Flamar et al., 2020). Ob und welche weiteren Signalkaskaden innerhalb der iILC2 existieren bzw. welche Proteine für ihre Funktionalität von Bedeutung sind, ist bis heute weitestgehend ungeklärt. Durch logische Überlegungen und die Kombination aus Literatur und Expression einzelner Gene, gerieten die Asparaginyl Endopeptidase LEGUMAIN, kodiert durch *Lgmn*, die β 2 Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalium - Kanals, kodiert durch *Kcnab2* sowie das Zytoskelett - Protein ERMIN, kodiert durch *Ernm*, in den Fokus dieser Studien, und wir wollten untersuchen, ob und welche Rolle sie innerhalb der iILC2 besitzen. Des Weiteren wurden iILC2 bisher nur im Kontext einer externen Zytokin - Applikation oder aber einer Infektion mit Helminthen beschrieben und beobachtet. Unbekannt ist bisher, ob sie auch durch andere Stimuli hervorgerufen werden, oder aber unter anderen Bedingungen, wie diversen Mikrobiota oder aber in

anderen Individuen, im "Steady State" vorkommen. Rosshart und Kollegen beschrieben in 2 Artikeln eine Population an Mäusen, welche ein Mikrobiom aufweisen, dass der freien Wildbahn entspricht und taufte diese auf den Namen "Wildlinge". Des Weiteren zeigten sie, dass diese Wildlinge ein besseres Modell, als herkömmliche SPF Mäuse, für die Widerspiegelung einiger pathophysiologischen Vorgängen des Menschen in der Maus, sind (Rosshart et al., 2019, Rosshart et al., 2017). Wir wollten nun analysieren, ob iILC2 in diesen Tieren mit wildem Mikrobiom, deren Physiologie dem Menschen scheinbar "ähnlicher" ist vorhanden sind, und falls ja, wie sie sich dort präsentieren.

In Mäusen mit einem Mikrobiom, welches der freien Wildbahn ähnelt, konnten in den MLN, als auch dem perigonadalen bzw. epididymalen Fettgewebe, signifikant mehr iILC2 gefunden werden als in SPF Mäusen (**Abb. 24** und **31**). An dieser Stelle gibt es diverse Ansätze dies zu erklären. Naheliegender wäre, dass das Mikrobiom der Wildlinge neben Viren oder Bakterien auch diverse Parasiten beheimatet, welche einen permanenten Stimulus einer Typ 2 Immunantwort darstellen. Hier gilt es jedoch, durch weiterführende Studien darzustellen, welcher spezifische Bestandteil des Mikrobioms der ursächliche Stimulus ist. Darüber hinaus ist zu diskutieren, dass es theoretisch andere Stimuli für eine Typ 2 Immunantwort gibt, so beispielsweise Allergene. Bisher ist kein klarer Zusammenhang zwischen einer allergischen Inflammation und iILC2 beschrieben worden. Denkbar wäre jedoch auch, dass die Wildlinge durch das von den SPF Mäusen abweichende Mikrobiom einen dauerhaften allergischen Reiz, führend zu einer geringgradigen Typ 2 Inflammation im Sinne einer allergischen Inflammation, besitzen. Um dies jedoch genauer zu untersuchen benötigt es weiterführende Experimente und die Identifikation dieser Reize. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Wildlinge, das natürlichere, der freien Wildbahn näherkommende, Mikrobiom besitzen, so ist als Konsequenz zu vermuten, dass iILC2 in der freien Wildbahn vorkommen. Und folgend sollte man Wildling Mäuse präferieren, um Effekte und Physiologie der iILC2 zu untersuchen. Dies hat auch die Grundlage der von Rosshart und Kollegen publizierten Daten, in welchen Sie zeigen konnten, dass komplexe Phänotypen der menschlichen Immunologie, durch Wildlinge besser abgebildet werden. Interessant an dieser Stelle ist die Frage, welche Funktionen die iILC2 in einer derartigen Situation, in welcher die Fitness des Wirtes nicht unmittelbar (beispielsweise wie im Rahmen einer *N. b.* Infektion) bedroht ist, besitzen. Um dieser Frage nachzugehen sind weiterführende Studien mit Wildling Mäusen wichtig. Zu untersuchen gilt es auch, wie Wildlinge auf eine *N. b.*

Infektion reagieren würden. Denkbar wäre hier eine schnellere Eradikation durch bereits vorhandene iILC2. Interessant wäre auch die Untersuchung des Blutserums der Wildlinge um hier nach Mediatoren einer Typ 2 Immunantwort zu suchen.

In den Mäusen mit einem natürlichen Mikrobiom finden sich iILC2. Wenn man nun annimmt, dass dieses Mikrobiom besser geeignet ist, um Vorgänge im Menschen zu erklären, so müsste man untersuchen, ob der Mensch im "Steady State", also ohne jegliche erkennbare Bedrohung seiner Gesundheit, iILC2 besitzt und welche Funktionen sie in ihm ausüben. Bisher gibt es keine Studien zu humanen iILC2. In der Zukunft sind diese jedoch unerlässlich. Insbesondere gilt es zu klären, in welchen Organen im Menschen iILC2 auftreten, und welche Funktionen sie dort ausüben.

Des Weiteren ist bemerkenswert, dass die Wildlinge äußerlich betrachtet nahezu unauffällig sind. Also eine Fitness besitzen, welche ihnen erlaubt die Belastung durch das intestinale Mikrobiom zu kompensieren. Fraglich ist welche Rolle die iILC2 in diesem Kontext spielen und ob ihr Vorhandensein nicht zwischen gesund und krank unterscheiden lässt, sondern es diverse Abstufungen in der iILC2 - Homöostase gibt.

Im Artikel von Huang und Kollegen aus dem Jahre 2015 wird postuliert, dass zwei verschiedenen ILC2 Wege existieren, einmal ein natürlicher oder homöostatischer Weg (durch nILC2 vermittelt) und darüber hinaus ein inflammatorischer Weg (durch iILC2 vermittelt) (Huang et al., 2015). Bisher ist nicht allzu viel über die Trennung der Wege bekannt, jedoch beispielsweise, dass der inflammatorische Weg essentielle Rolle im Rahmen einer Infektion besitzt, und der natürliche Weg beispielsweise in der Fett - Homöostase von Bedeutung ist (Klose and Artis, 2016). In diesem Kontext waren folgende Ergebnisse dieser Studie interessant und müssen in Zusammenhang gebracht werden: Die iILC2 in den diversen Geweben der Wildlinge besitzen einen anderen Phänotyp. Zwar liegen in beiden Geweben mehr iILC2 als in SPF Mäusen vor und exprimieren beide weniger CD25 (**Abb. 24, 25, 31 und 32**). Doch die iILC2 aus den MLN besitzen mehr KLRG1 als die SPF Kontrollen, folglich einen höheren Reifegrad, wenn man bedenkt, dass KLRG1 ein Reifungsmarker der ILC2 ist (**Abb. 25 C**), wohingegen die iILC2 aus dem Fett weniger KLRG1 exprimieren als die SPF Mäuse (**Abb. 33**), und darüber hinaus weniger ST2 (den IL-33 - Rezeptor) (**Abb. 34**). Gleichzeitig gehen beide Zellpopulationen (die vermehrt vorliegen) mit diversen Mengen an assoziierten Zellen einher. Während in den MLN mehr nILC2 (**Abb. 27**) mit wenig KLRG1 (also eher unreife

Zellen) (**Abb. 28 A**), zusammen mit zahlreichen eosinophilen Granulozyten (**Abb. 29**), die iILC2 begleiten, so sind es im Fettgewebe weniger nILC2 (**Abb. 36**), als auch weniger Eosinophile (**Abb. 40**), als in den SPF Mäusen.

In den Untersuchungen dieser Studie (z. B. bei Analyse der WT - Kontrollen im Rahmen der *Lgmn* Experimente) wurde festgestellt, dass im "Steady State" in der L. p. des Dünndarms, den MLN, der Lunge und dem Fettgewebe, lediglich (n)ILC2 zu finden sind, welche wie in der Literatur beschrieben KLRG1 und CD127 exprimieren, darüber hinaus jedoch auch ST2 und CD25 (Vivier et al., 2018). Nun zeigten sich im Rahmen der *N. b.* Infektion in den MLN und Lungen zahlreiche iILC2, welche CD25 und ST2 nicht mehr exprimierten. Dies war bereits bekannt (Huang et al., 2015, Huang et al., 2018, Flamar et al., 2020). Interessant war jedoch, dass im Rahmen der *N. b.* Infektion im Fettgewebe deutlich weniger iILC2 zu finden waren als in den anderen, primär von der Infektion betroffenen, Organen (**Abb. 76**).

All dies könnte nahelegen, dass die von Huang und Kollegen vorgeschlagene Unterteilung in einen inflammatorischen und einen natürlichen / homöostatischen Weg existieren. In den MLN der Wildlinge (welche im direkten Abstromgebiet des potenziell mit Würmern infizierten Darms liegen), ist eine klassisch inflammatorische Situation zu finden. Es finden sich zahlreiche iILC2 (vermutlich entwickelt aus ruhenden "Steady State" - ILC2 der L. p). Diese sezernieren zur Kontrolle der Würmer IL-5, was die eosinophilen Granulozyten stimuliert, wodurch die erhöhte Zellpopulation erklärt werden kann. Darüber hinaus wurde berichtet, dass iILC2 sich in nILC2 - ähnliche Zellen, entwickeln können, wodurch die expandierte nILC2 - Population erklären lässt (welche aber noch relativ unreif ist, sichtbar an der geringen KLRG1 - Expression).

Demgegenüber stehen die Ergebnisse aus dem Fettgewebe. So ist das Fett im Rahmen einer *N. b.* Infektion keine primäre Zwischenstelle des Lebenszyklus der Helminthen. Folglich gibt es lokal im Fettgewebe keine anti - infektiösen Aufgaben für die iILC2, weshalb sie sich dort im Gegensatz zur Lunge und den MLN, nicht so stark anreichern. Auch impliziert dies, dass die iILC2 der *N. b.* Infektion keine oder weniger Aufgaben in homöostatischen Funktionen wie der metabolischen Regulation besitzen, sondern lediglich Aufgaben, die zur Wurmeradikation führen. Gleichzeitig finden sich auch im Rahmen der *N. b.* Infektion im Fettgewebe vor allem nILC2, welche vermutlich die homöostatischen Aufgaben, wie beispielsweise die Regulation des Fettgewebes ("beiging" und anderes) und dortige Thermogenese mit propagieren. Interessant und weiter zu untersuchen wäre jedoch eine Aufklärung der Plastizität der iILC2, so wurde

von Huang und Kollegen berichtet, dass sie sich in nILC2 - ähnliche Zellen, entwickeln können. Hier gilt es zu untersuchen, ob die nILC2 des Fettgewebes durch sich zu nILC2 - ähnlichen Zellen entwickelnde iILC2 ergänzt werden können, und wie diese Populationen sich im Phänotyp und der Arbeitsteilung weiterhin unterscheidet.

Insbesondere vor dem Hintergrund, dass dennoch einige iILC2 im Fettgewebe zu finden waren (sowohl im Rahmen einer *N. b.* Infektion als auch in den Wildlingen) stellt sich die Frage, ob es doch teilweise eine Überschneidung der Aufgabenfelder von iILC2 und nILC2 gibt bzw. die Plastizität dieser Zellen untereinander hier nicht genauer aufgelöst werden konnte (durch z. B. Überschneidungen und Trennschärfe im Gating). Die iILC2 aus dem Fettgewebe der Wildlinge sind folglich komplexer zu erklären. Hinweisend für abweichende Funktion könnten die divers präsentierten Oberflächenmarker (weniger ST2 und KLRG1) als auch die begleitenden Zellen (weniger nILC2 und weniger Eosinophile) sein. An dieser Stelle gilt es zu bedenken, dass die Wildlinge neben der Belastung, durch im Mikrobiom enthaltene Parasiten, auch eine metabolische Belastung, durch die Konfrontierung mit einem anspruchsvolleren Mikrobiom, erfahren. Und darüber hinaus stellt sich die Frage, ob iILC2, neben der Rolle in der Bekämpfung der Helminthen, auch eine Rolle im metabolischen Kontext der Regulation des Fettgewebes spielen könnten. Auch denkbar wäre, dass es diverse Untergruppen an iILC2 gibt, die für diverse Funktionen verantwortlich sind. In einer isolierten *N. b.* Infektion sieht man keinen starken Anstieg der iILC2 im Fettgewebe jedoch in den MLN oder der Lunge. Die Wildlinge besitzen jedoch mehr iILC2 im Fettgewebe welche durch Helminthen (vgl. *N. b.*) so nicht zu erklären wären. Denkbar wäre hier die Belastung durch andere Helminthen, welche in ihrem Lebenszyklus auch das Fettgewebe passieren, so dass gegen sie gerichtete iILC2 auch hier vermehrt auftreten müssen. Oder eine weitere Erklärung wäre, dass die iILC2 im Fettgewebe unabhängig einer etwaigeren Infektion auftreten, sondern für die Homöostase des Fettgewebes von Bedeutung sind. Eine derartige unterschiedliche Aufgabenverteilung innerhalb der iILC2 wäre dann auch übertragbar auf die eosinophilen Granulozyten. Im Fettgewebe fanden sich signifikant weniger Eosinophile, und in den MLN signifikant mehr. Hier wäre denkbar, dass die iILC2 der MLN, liegend im intestinalen Abstromgebiet des potentiell befallenen Darms, durch die Sezernierung von IL-5 eine anti - Helminth - Immunantwort und die Stimulierung von eosinophilen Granulozyten initiieren. Demgegenüber stehen die iILC2 des Fettgewebes, welche ihre Aufgaben ohne die Zwischenschaltung von eosinophilen Granulozyten ausüben, weshalb die Population der Eosinophilen im Fett der Wildlinge verringert ist.

Eine potentielle Erklärung für die verringerte Menge an nILC2 wäre folgende: Huang und Kollegen haben gezeigt, dass iILC2 aus dem Kontext einer *N. b.* Infektion sich zu nILC2 - ähnlichen Zellen entwickeln können. Nehmen wir nun an, dass die iILC2 aus den MLN mit Helminth - Befall assoziiert sind, so könnte es sein, dass die nachgewiesenen nILC2 der MLN aus ehemaligen iILC2 hervorgehen. Wenn wir nun annehmen, dass die iILC2 aus dem Fettgewebe zwar einen ähnlichen Phänotyp (der beim Gating gewählt wurde), wie die iILC2 aus den MLN besitzen, jedoch eine andere Aufgabenverteilung (eher metabolische Funktionen und weniger anti - Helminth - Abwehr), so könnte es sein, dass sie sich nicht oder weniger zu nILC2 - ähnlichen Zellen entwickeln.

Um diese Zusammenhänge genauer zu untersuchen wäre es interessant die iILC2 der diversen Gewebe zu sortieren, und folgend die Durchführung von Transkriptionsstudien (bspw. Sequenzierung zur Frage nach diversen Transkriptomen) oder aber ihre Funktionen (beispielsweise Zytokin Sekretion: Inflammatorische Typ 2 Zytokine (z. B. IL-5 und IL-13) versus metabolische Mediatoren (z. B. Met-Enk)) genauer zu betrachten.

Eine weitere Erklärung für die abweichenden Populationen an Eosinophilen innerhalb der Organe könnte jedoch auch auf andere Zellen und Faktoren unabhängig der iILC2 zurückzuführen sein. So seien an dieser Stelle erneut allergische, über IgE vermittelte, Phänomene zu nennen oder aber Th2 - Zellen, welche Einfluss auf die Populationen an z. B. eosinophilen Granulozyten, unabhängig der iILC2, nehmen können.

Bezüglich der genetischen Regulation der iILC2 gelang es uns herauszufinden, dass *Kcnab2* im Ruhezustand bereits in ILC2 transkribiert wird (**Abb. 43**), aber da die "Steady State" - Population an ILC2 nicht verändert war, scheint *Kcnab2* nicht an der Entwicklung und dem folgenden Überleben der ILC2 beteiligt zu sein. Im Rahmen der Zellaktivierung (*in vitro* als auch *in vivo*) wird *Kcnab2* heraufreguliert (**Abb. 43**). Da es sowohl in den nILC2 als auch den iILC2 vermehrt transkribiert wurde, ist festzustellen, dass es nicht spezifisch für iILC2 ist. Welche Funktionen innerhalb der iILC2 oder nILC2 durch *Kcnab2* ausgeübt werden ist jedoch weiterhin unklar. Im Rahmen der Stimulierung kam es nicht zu signifikant verringerten Zellzahlen, ohne das *Kcnab2* - Gen (**Abb. 45**). Deshalb kann man sagen, dass vermutlich in der Proliferation oder im Überleben der ILC2 *Kcnab2* keine Rolle spielt. Interessant war jedoch die verringerte Sezernierung von den Typ 2 Zytokinen IL-5 und IL-13 im Rahmen einer *in vitro* Stimulierung, wenn *Kcnab2* nicht vorhanden war (**Abb. 47**). Denkbar wäre also, dass *Kcnab2* ein intrazellulärer Ionenkanal ist, der wichtig für die Degranulierung von intrazellulär gespeicherten Vesikeln mit Zytokinen ist. Da

CD25, also der IL-2 - Rezeptor auf den *Kcnab2* - KO ILC2 im Kontext der Stimulierung verringert exprimiert wurde (**Abb. 46**), hat diese mangelnde Degranulation eventuell etwas mit dem über ihn vermittelten Signalweg zu tun.

Die bereits im "Steady State" vorhandene Expression könnte durch die basale Sekretion der Typ 2 Zytokine durch die ILC2 erklärt werden, welche nötig für eine grundlegende Homöostase, der für die Typ 2 Immunität verantwortlichen Zellen, sorgt. Im Kontext der Stimulierung bzw. Aktivierung wird folgend eine deutlich stärkere Sekretion von Nöten, welche durch die stärkere *Kcnab2* - Expression mit gewährleistet wird.

Interessant wären nun *N. b.* Infektionen in *Kcnab2* - KO Mäusen, um hier zu sehen, ob die im Blut zirkulierenden Mediatoren verringert sind, oder aber ob von iILC2 beeinflusste Zellen, wie die durch IL-5 stimulierten Eosinophilen oder IL-13 stimulierten Goblet - Zellen, verringert vorkommen, und ob die Mäuse die Wurminfektion schlechter bewältigen können. Weiterführende Untersuchungen wären eine spezifische chemischen Blockade oder aber Potenzierung des Kalium - Kanals, um so zu untersuchen, ob die Funktionen der ILC2 beeinflusst werden können. So könnte man in Zukunft Pharmaka entwickeln, welche als eine Art "Booster" der endogenen Immunantwort im Rahmen einer Helminth - Infektion eingenommen werden können, oder aber von der Einnahme diverser anderer Medikamente, beispielsweise Kanal beeinflussende Pharmaka der Kardiologie, während einer Infektion mit Helminthen, abraten.

Ernm wird im "Steady State" kaum bis nicht in ILC2 exprimiert und erst im Kontext der Aktivierung in seiner Expression heraufreguliert (**Abb. 48** und **49**). Da *Ernm* im "Steady State" nicht transkribiert wird, waren hier auch keine erheblichen Unterschiede in den ILC2 - Populationen zu finden (**Abb. 50** und **51**), und die Rolle von *Ernm* unter Bedingungen ohne Infektion oder Stimulation scheint irrelevant. Jedoch ist es möglich sowohl *in vivo* im Rahmen einer *N. b.* Infektion als auch *in vitro* mit IL-25, IL-33 und IL-7, die deutliche Induktion der *Ernm* - Expression nachzuweisen (**Abb. 48** und **49**). Dies ermöglicht einmal die Aussage, dass die Steigerung der Transkription im Signalweg der 3 Zytokine liegt (welche auch im Kontext der Infektion frei werden, und eine allgemeine Aktivierung der ILC2 bewirken). Des Weiteren scheint die gesteigerte Expression von *Ernm* spezifisch für iILC2 zu sein und ist nicht in nILC2 nachweisbar. Unter der Prämisse, dass ERMIN ein Zytoskelett - Protein ist, entstand zunächst die Theorie, dass es im Rahmen der iILC2 - Aktivierung und Entstehung für deren Zytoskelett - abhängige Wanderung (von der L. p. des Dünndarms zu den Effektororganen) mitverantwortlich ist.

Da ILC2 im Ruhezustand nicht wandern, war so die unter diesen Bedingungen fehlende Transkription erklärt.

Hierbei gelang es jedoch nicht nachzuweisen, dass ohne *Ernm* die ILC2 schlechtere Migrationseigenschaften besaßen. Auch im Kontext einer *N. b.* Infektion sahen wir nicht, dass ohne *Ernm* eine deutlich schwerere Infektion (im Sinne der Wurmlast) auftritt (**Abb. 62**). Jedoch wurde beobachtet, dass mehr iILC2 in den untersuchten Organen vorlagen (**Abb. 63** und **64**). Auch exprimierten sie weniger KLRG1 (**Abb. 65**), als Zeichen für mangelnde Reife. Fraglich war nun ob dies aufgrund einer Insuffizienz der Zellen hinsichtlich ihrer Funktion (und deshalb erhöhtem Bedarf an iILC2) oder auf eine stärkere Inflammation zurückzuführen war. *In vitro* sahen wir, dass die Anzahl an *Ernm* - KO ILC2 erst verringert später vermehrt war (**Abb. 53** und **54**), was dabei aber nicht durch Apoptose, Proliferation, die Überlebensfähigkeiten der Zellen oder die Analyse des Zellzyklus, zu erklären war, weshalb hier weiterführende Experimente nötig sind. Des Weiteren sahen wir, dass die *Ernm* - KO ILC2 weniger Zytokine sezernieren konnten (*in vitro* waren z. B. IL-5. und IL-10 und *in vivo* IL-4 und IL-5 im Serum reduziert (wird durch diverse Zellen produziert) (**Abb. 57** und **67**).

Deshalb entwickelten wir eine Theorie, dass *Ernm* eventuell für den intrazellulären Transport von diversen Molekülen, darunter Substrate, als auch Mediatoren mitverantwortlich ist. So ließe sich erklären, dass die *Ernm* - KO ILC2 erst verzögert mit der Zellzahl zunehmen, da die Umorganisation der Zellen vor der Teilung gestört ist, oder aber, dass die Freisetzung von in Vesikeln gespeicherten Zytokinen verlangsamt ist, und deshalb weniger Interleukine im Kulturmedium der Zellen vorliegen. *Ernm* - KO ILC2 sezernieren weniger IL-5 (*in vitro* und *in vivo*), dennoch sahen wir mehr eosinophile Granulozyten (**Abb. 66 A**). Dies bedeutet, dass die Eosinophilen auch über andere Signalwege stimuliert werden können, und ist ein Hinweis auf eine stärkere Infektion bei vorhandener Insuffizienz derjenigen Zellen, die für IL-5 verantwortlich sind, wie iILC2.

IL-25 ist bereits beschrieben als ein ILC2 - aktivierendes Zytokin. Dies gelang uns erneut dazulegen. So nehmen ILC2 unter Hinzugabe von IL-25 stärker in der Zellzahl zu, sind komplexer als Hinweis auf die intrazellulären Sekretgranula, und exprimierten mehr CD25 und KLRG1, als Zeichen einer fortgeschrittenen Maturität (**Abb. 58** und **59**). Des Weiteren potenziert IL-25 die Sekretion von IL-5, IL-10 und IL-13, also den typischen Klasse 2 Zytokinen (**Abb. 60** und **61**). *Ernm* - KO ILC2 verhielten sich sehr ähnlich unter der Hinzugabe von IL-25, weshalb davon auszugehen ist, dass ERMIN keine Relevanz

im durch IL-25 nach Rezeptorbindung, innerhalb der ILC2, angestoßenen Signalweg besitzt. Umgekehrt steigert IL-25 (in Kombination mit IL-33 und IL-7) jedoch die Transkription von *Ermn* (**Abb. 58 bis 61 und 48**).

Lgmn wird bereits im Ruhezustand innerhalb der ILC2 exprimiert, und dann *in vivo* als auch *in vitro* im Kontext einer Stimulation vermehrt umgesetzt (**Abb. 71**). Da eine basale Transkription vorhanden war, vermuteten wir einen Phänotyp bereits in Ruhe. So waren in der L. p. des Dünndarms weniger ILC2 zu finden (**Abb. 72 A**). Dies ist bedeutsam, wenn man bedenkt, dass dieses Kompartiment als Reserve für die Entstehung von iILC2 im Kontext einer Helminth - Infektion, wichtig ist. Ansonsten sahen wir keine größeren Unterschiede der ILC2 - Populationen hinsichtlich Anzahl, physikalischen Eigenschaften oder Oberflächenmarker, darunter insbesondere auch MHC-II. Deshalb ist davon auszugehen, dass es unter diesen ruhenden Bedingungen in den anderen Organen (Lunge / MLN / Fettgewebe) nicht in Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Überleben oder Reifung involviert ist. Unter Stimulation wird *Lgmn* stark induziert, und scheint dabei vor allem auf die iILC2 beschränkt (geringer auch nILC2) zu sein (**Abb. 71**). Deshalb wurde vermutet, dass die Funktionen von *Lgmn* erst im Kontext einer starken Aktivierung (wie einer *N. b.* Infektion) sichtbar werden. Hier zeigten sich zwar tendenziell mehr Helminthen (nie signifikant) im Dünndarm (**Abb. 73**) aber keine abweichenden Mengen an iILC2. Wichtig ist jedoch zu sagen, dass die iILC2 einen anderen Phänotyp besaßen, so exprimierten sie weniger KLRG1 (**Abb. 74 A und B**), als Hinweis für eine verringerte Reife. Und weiterführend im Fettgewebe weniger MHC-II, welcher jedoch in der Lunge vermehrt auf den iILC2 exprimiert wurde (**Abb. 74 C und F**).

Hervorzuheben ist, dass in *Lgmn* - defizienten Mäusen, anders als zunächst vermutet, kein eindeutiger Unterschied bezüglich der auf der Oberfläche exprimierten MHC-II - Moleküle dargestellt werden konnte, jedoch kleinere Differenzen zu sehen waren, welche allerdings schwer zu interpretieren sind (**Abb. 74**). Wichtig ist dabei zu bedenken, dass der Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen nicht abschließend geklärt ist. So ist es durchaus denkbar, dass durch das Fehlen der Asparaginy Endopeptidase im Zellinneren gelegene Proteine schlechter bzw. anders gespalten werden (auch von Gewebe zu Gewebe) und so nicht zwangsläufig weniger, sondern ein abnormer MHC-II - Proteinkomplex entsteht, welcher beispielsweise T - Zellen schlechter oder anders aktivieren könnte. Zwar konnte im Endresultat nicht gezeigt werden, dass das Fehlen von LEGUMAIN eine schlechtere Immunantwort gegen Helminthen bewirkt, jedoch kann

auch nicht abschließend gesagt werden, ob nicht doch sehr feine Prozesse innerhalb der ILC2, welche mit den hier durchgeführten Experimenten nicht abgebildet werden, verändert sind. Denkbar beispielsweise die Untersuchung von abweichenden Eigenschaften zur Antigen - Präsentation, welche durch entsprechende Experimente, wie einen Antigen - Präsentations - Assay mit der Frage einer insuffizienten Aktivierung von zum Beispiel T - Zellen, weiter untersucht werden könnten.

Abschließend gilt es noch eine wichtige Schwäche der Studie hervorzuheben, bei allen KO - Mäusen handelte es sich um sogenannte "full" - Knock Outs, also waren alle Körperzellen von Geburt an von dem KO betroffen, nicht nur spezifisch alle ILC2 oder aber gezielte ILC2 - Populationen in einem definierten Gewebe bzw. zu einem definierten Zeitpunkt. Zwar konnten wir im Rahmen des Sortierens deutlich höhere Auflösung bezüglich der ILC2 erhalten, dennoch gilt es zu bedenken, dass vor allem im Rahmen einer *N. b.* Infektion gewebespezifische Kaskaden und Antworten, auf zum Beispiel die Alarmine IL-25 und IL-33, angestoßen werden, welche durch die von uns analysierten Mäuse nur begrenzt aufgelöst werden konnten, da hier nicht spezifisch gesagt werden kann in welchen Zellen nun die Veränderung zum Tragen kommen. So wäre es interessant zu analysieren ob eins der Gene auch in anderen Zellen der Typ 2 Immunantwort (wie Th2 - Zellen) vorhanden ist. Und es gilt festzustellen, dass weiterführende Experimente mit zellspezifischen und eventuell induzierbaren KO - Modellen nötig sind.

8. Literaturverzeichnis

a. Internetquellen

ANDREW D YATES, PREMANAND ACHUTHAN, WASIU AKANNI, JAMES ALLEN, JAMIE ALLEN, JORGE ALVAREZ-JARRETA, M RIDWAN AMODE, IRINA M ARMEAN, ANDREY G AZOV, RUTH BENNETT, JYOTHISH BHAI, KONSTANTINOS BILLIS, SANJAY BODDU, JOSÉ CARLOS MARUGÁN, CARLA CUMMINS, CLAIRE DAVIDSON, KAMALKUMAR DODIYA, REHAM FATIMA, ASTRID GALL, CARLOS GARCIA GIRO´N, LAURENT GIL, TIAGO GREGO, LEANNE HAGGERTY, ERIN HASKELL, THIBAUT HOURLIER, OSAGIE G IZUOGU, SOPHIE H JANACEK, THOMAS JUETTEMANN, MIKE KAY, ILIAS LAVIDAS, TUAN LE, DIANA LEMOS, JOSE GONZALEZ MARTINEZ, THOMAS MAUREL, MARK MCDOWALL, AOIFE MCMAHON, SHAMIKA MOHANAN, BENJAMIN MOORE, MICHAEL NUHN, DENYE N OHEH, ANNE PARKER, ANDREW PARTON, MATEUS PATRICIO, MANOJ PANDIAN SAKTHIVEL, AHAMED IMRAN ABDUL SALAM, BIANCA M SCHMITT, HELEN SCHUILENBURG, DAN SHEPPARD, MIRA SYCHEVA, MAREK SZUBA, KIERON TAYLOR, ANJA THORMANN, GLEN THREADGOLD, ALESSANDRO VULLO, BRANDON WALTS, ANDREA WINTERBOTTOM, AMONIDA ZADISSA, MARC CHAKIACHVILI, BETHANY FLINT, ADAM FRANKISH, SARAH E HUNT, GARTH IISLEY, MYRTO KOSTADIMA, NICK LANGRIDGE, JANE E LOVELAND, FERGAL J MARTIN, JOANNELLA MORALES, JONATHAN M MUDGE, MATTHIEU MUFFATO, EMILY PERRY, MAGALI RUFFIER, STEPHEN J TREVANION, FIONA CUNNINGHAM, KEVIN L HOWE, DANIEL R ZERBINO, PAUL FLICEK. 2020. Ensembl 2020 (Ensembl - Version 101) - Gene: Lgmn ENSMUSG00000021190 / Gene: Kcnab2 ENSMUSG00000028931 / Gene: Ermn ENSMUSG00000026830.

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000021190;r=12:102394084-102439813 Zugriff = 16.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Phenotype?db=core;g=ENSMUSG00000021190;r=12:102394084-102439813 Zugriff = 16.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSMUSG00000021190;r=12:102394084-102439813 Zugriff = 16.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Ontologies/cellular_component?db=core;g=ENSMUSG00000021190;r=12:102394084-102439813 Zugriff = 16.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Phenotype?db=core;g=ENSMUSG0000021190;r=12:102394084-102439813 Zugriff = 16.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG0000028931;r=4:152390742-152477910 Zugriff = 16.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSMUSG0000028931;r=4:152390742-152477910 Zugriff = 26.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Ontologies/cellular_component?db=core;g=ENSMUSG0000028931;r=4:152390742-152477910 Zugriff = 26.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSMUSG0000026830;r=2:58045113-58052864;t=ENSMUST00000090940 Zugriff = 15.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Ontologies/cellular_component?db=core;g=ENSMUSG0000026830;r=2:58045113-58052864;t=ENSMUST00000090940 Zugriff = 15.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Ontologies/molecular_function?db=core;g=ENSMUSG0000026830;r=2:58045113-58052864;t=ENSMUST00000090940 Zugriff = 15.10.2020 /

https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Ontologies/biological_process?db=core;g=ENSMUSG0000026830;r=2:58045113-58052864;t=ENSMUST00000090940 Zugriff = 15.10.2020.

ROBERT HOFFMANN. 2008. A wiki for the life sciences where authorship matters - wikigenes collaborative publishing - Gen Review: Lgmn - legumain (Mus musculus). <https://www.wikigenes.org/e/gene/e/19141.html> Zugriff = 16.10.2020.

ST. MICHAEL'S. 2020. Research - Cell Viability / Apoptosis. <http://stmichaelshospitalresearch.ca/staff-services/research-facilities/facilities/flow-cytometry-core/cell-viability-apoptosis/> Zugriff = 27.11.2020.

STEN LINNARSSON. 2020. Mousebrain.org - Ermn Mus musculus ermin, ERM-like protein (Ernm). <http://mousebrain.org/genes/Ernm.html> Zugriff = 15.10.2020.

THE UNIPROT CONSORTIUM. 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge - UniProtKB - P62482 (KCAB2_MOUSE) / UniProtKB - Q5EBJ4 (ERMIN_MOUSE) /.
<https://www.uniprot.org/uniprot/P62482> Zugriff = 26.10.2020 /
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q5EBJ4> Zugriff = 15.10.2020.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.. 2021. Zellkultureinsätze.
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/cell-culture-plastics/cell-culture-inserts.html#poresize> Zugriff = 09.08.2021.

b. Originalpublikationen / Artikel / Bücher

- AKUTHOTA, P., WANG, H. B., SPENCER, L. A. & WELLER, P. F. 2008. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy*, 38, 1254-63.
- ALLEN, J. E. & MAIZELS, R. M. 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol*, 11, 375-88.
- ANANTHAKRISHNAN, R. & EHRLICHER, A. 2007. The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci*, 3, 303-17.
- ANTONIOU, A. N., BLACKWOOD, S. L., MAZZEO, D. & WATTS, C. 2000. Control of antigen presentation by a single protease cleavage site. *Immunity*, 12, 391-8.
- ARTIS, D. & SPITS, H. 2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517, 293-301.
- AU-YEUNG, N., MANDHANA, R. & HORVATH, C. M. 2013. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *JAKSTAT*, 2, e23931.
- AUTIERI, M. V., KOZAK, C. A., COHEN, J. A. & PRYSTOWSKY, M. B. 1995. Genomic organization and genetic mapping of the neuroimmune gene *I2rf5* to mouse chromosome 4. *Genomics*, 25, 282-4.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- BANDO, J. K., LIANG, H. E. & LOCKSLEY, R. M. 2015. Identification and distribution of developing innate lymphoid cells in the fetal mouse intestine. *Nat Immunol*, 16, 153-60.
- BARLOW, J. L., BELLOSI, A., HARDMAN, C. S., DRYNAN, L. F., WONG, S. H., CRUICKSHANK, J. P. & MCKENZIE, A. N. 2012. Innate IL-13-producing nuocytes

- arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*, 129, 191-8 e1-4.
- BARLOW, J. L., PEEL, S., FOX, J., PANOVA, V., HARDMAN, C. S., CAMELO, A., BUCKS, C., WU, X., KANE, C. M., NEILL, D. R., FLYNN, R. J., SAYERS, I., HALL, I. P. & MCKENZIE, A. N. 2013. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 933-41.
- BARNIG, C., CERNADAS, M., DUTILE, S., LIU, X., PERRELLA, M. A., KAZANI, S., WECHSLER, M. E., ISRAEL, E. & LEVY, B. D. 2013. Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci Transl Med*, 5, 174ra26.
- BARRETT, N. A., MAEKAWA, A., RAHMAN, O. M., AUSTEN, K. F. & KANAOKA, Y. 2009. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol*, 182, 1119-28.
- BARTEMES, K., CHEN, C. C., IJIMA, K., DRAKE, L. & KITA, H. 2018. IL-33-Responsive Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Regulated by Female Sex Hormones in the Uterus. *J Immunol*, 200, 229-236.
- BERNINK, J. H., PETERS, C. P., MUNNEKE, M., TE VELDE, A. A., MEIJER, S. L., WEIJER, K., HREGGVIDSDOTTIR, H. S., HEINSBROEK, S. E., LEGRAND, N., BUSKENS, C. J., BEMELMAN, W. A., MJOSBERG, J. M. & SPITS, H. 2013. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol*, 14, 221-9.
- BI, J., CUI, L., YU, G., YANG, X., CHEN, Y. & WAN, X. 2017. NK Cells Alleviate Lung Inflammation by Negatively Regulating Group 2 Innate Lymphoid Cells. *J Immunol*, 198, 3336-3344.
- BISANZIO, D., MUTUKU, F., BUSTINDUY, A. L., MUNGAI, P. L., MUCHIRI, E. M., KING, C. H. & KITRON, U. 2014. Cross-sectional Study of the Burden of Vector-Borne and Soil-Transmitted Polyparasitism in Rural Communities of Coast Province, Kenya. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Volume 8.
- BLUM, J. S., WEARSCH, P. A. & CRESSWELL, P. 2013. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol*, 31, 443-73.
- BRESTOFF, J. R. & ARTIS, D. 2015. Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. *Cell*, 161, 146-60.

- BRESTOFF, J. R., KIM, B. S., SAENZ, S. A., STINE, R. R., MONTICELLI, L. A., SONNENBERG, G. F., THOME, J. J., FARBER, D. L., LUTFY, K., SEALE, P. & ARTIS, D. 2015. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature*, 519, 242-6.
- BRIGHTON, P. J., SZEKERES, P. G. & WILLARS, G. B. 2004. Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacol Rev*, 56, 231-48.
- BROCKSCHNIEDER, D., SABANAY, H., RIETHMACHER, D. & PELES, E. 2006. Ermin, a myelinating oligodendrocyte-specific protein that regulates cell morphology. *J Neurosci*, 26, 757-62.
- BUDI, E. H., DUAN, D. & DERYNCK, R. 2017. Transforming Growth Factor-beta Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol*, 27, 658-672.
- BUNDY, D. A. & COOPER, E. S. 1989. Trichuris and trichuriasis in humans. *Adv Parasitol*, 28, 107-73.
- CAMBERIS, M., LE GROS, G. & URBAN, J., JR. 2003. Animal model of Nippostrongylus brasiliensis and Heligmosomoides polygyrus. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 19, Unit 19 12.
- CARDOSO, V., CHESNE, J., RIBEIRO, H., GARCIA-CASSANI, B., CARVALHO, T., BOUCHERY, T., SHAH, K., BARBOSA-MORAIS, N. L., HARRIS, N. & VEIGA-FERNANDES, H. 2017. Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. *Nature*, 549, 277-281.
- CARRIERE, V., ROUSSEL, L., ORTEGA, N., LACORRE, D. A., AMERICH, L., AGUILAR, L., BOUCHE, G. & GIRARD, J. P. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 282-7.
- CAYROL, C., DUVAL, A., SCHMITT, P., ROGA, S., CAMUS, M., STELLA, A., BURLET-SCHILTZ, O., GONZALEZ-DE-PEREDO, A. & GIRARD, J. P. 2018. Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nat Immunol*, 19, 375-385.
- CELLA, M., FUCHS, A., VERMI, W., FACCHETTI, F., OTERO, K., LENNERZ, J. K., DOHERTY, J. M., MILLS, J. C. & COLONNA, M. 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, 457, 722-5.

- CEPHUS, J. Y., STIER, M. T., FUSEINI, H., YUNG, J. A., TOKI, S., BLOODWORTH, M. H., ZHOU, W., GOLENIEWSKA, K., ZHANG, J., GARON, S. L., HAMILTON, R. G., POLOSHUKIN, V. V., BOYD, K. L., PEEBLES, R. S., JR. & NEWCOMB, D. C. 2017. Testosterone Attenuates Group 2 Innate Lymphoid Cell-Mediated Airway Inflammation. *Cell Rep*, 21, 2487-2499.
- CHAN, M. S. 1997. The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on. *Parasitol Today*, 13, 438-43.
- CHANG, J. E., DOHERTY, T. A., BAUM, R. & BROIDE, D. 2014. Prostaglandin D2 regulates human type 2 innate lymphoid cell chemotaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 899-901 e3.
- CHEN, H. C. 2005. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*, 294, 15-22.
- CHEN, J. M., DANDO, P. M., STEVENS, R. A., FORTUNATO, M. & BARRETT, A. J. 1998. Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase. *Biochem J*, 335 (Pt 1), 111-7.
- CLOUTHIER, D. L. & WATTS, T. H. 2014. Cell-specific and context-dependent effects of GTR in cancer, autoimmunity, and infection. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25, 91-106.
- COHEN, J. A., ARAI, M., PRAK, E. L., BROOKS, S. A., YOUNG, L. H. & PRYSTOWSKY, M. B. 1992. Characterization of a novel mRNA expressed by neurons in mature brain. *J Neurosci Res*, 31, 273-84.
- CONNOR, J. X., MCCORMACK, K., PLETSCH, A., GAETA, S., GANETZKY, B., CHIU, S. Y. & MESSING, A. 2005. Genetic modifiers of the Kv beta2-null phenotype in mice. *Genes Brain Behav*, 4, 77-88.
- CONNOR, L. M., TANG, S. C., CAMBERIS, M., LE GROS, G. & RONCHESE, F. 2014. Helminth-conditioned dendritic cells prime CD4+ T cells to IL-4 production in vivo. *J Immunol*, 193, 2709-17.
- CONNOR, L. M., TANG, S. C., COGNARD, E., OCHIAI, S., HILLIGAN, K. L., OLD, S. I., PELLEFIGUES, C., WHITE, R. F., PATEL, D., SMITH, A. A., ECCLES, D. A., LAMIABLE, O., MCCONNELL, M. J. & RONCHESE, F. 2017. Th2 responses are primed by skin dendritic cells with distinct transcriptional profiles. *J Exp Med*, 214, 125-142.
- CROFT, M. & SIEGEL, R. M. 2017. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 13, 217-233.

- CROMPTON, D. W. 2000. The public health importance of hookworm disease. *Parasitology*, 121 Suppl, S39-50.
- DEFRANCO, A. L., LOCKSLEY, R. M. & ROBERTSON, M. 2007. Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. *New Science Press*, 274-275.
- DICKSON, L. & FINLAYSON, K. 2009. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther*, 121, 294-316.
- DIEFENBACH, A., COLONNA, M. & KOYASU, S. 2014. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity*, 41, 354-65.
- DING, X., LUO, Y., ZHANG, X., ZHENG, H., YANG, X., YANG, X. & LIU, M. 2016. IL-33-driven ILC2/eosinophil axis in fat is induced by sympathetic tone and suppressed by obesity. *J Endocrinol*, 231, 35-48.
- DOHERTY, T. A., KHORRAM, N., LUND, S., MEHTA, A. K., CROFT, M. & BROIDE, D. H. 2013. Lung type 2 innate lymphoid cells express cysteinyl leukotriene receptor 1, which regulates TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 205-13.
- DUERR, C. U., MCCARTHY, C. D., MINDT, B. C., RUBIO, M., MELI, A. P., POTLICHET, J., EVA, M. M., GAUCHAT, J. F., QURESHI, S. T., MAZER, B. D., MOSSMAN, K. L., MALO, D., GAMERO, A. M., VIDAL, S. M., KING, I. L., SARFATI, M. & FRITZ, J. H. 2016. Type I interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, 17, 65-75.
- EBERL, G., COLONNA, M., DI SANTO, J. P. & MCKENZIE, A. N. 2015. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science*, 348, aaa6566.
- EBERL, G., MARMON, S., SUNSHINE, M. J., RENNERT, P. D., CHOI, Y. & LITTMAN, D. R. 2004. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol*, 5, 64-73.
- ENDO, Y., HIRAHARA, K., IINUMA, T., SHINODA, K., TUMES, D. J., ASOU, H. K., MATSUGAE, N., OBATA-NINOMIYA, K., YAMAMOTO, H., MOTOHASHI, S., OBOKI, K., NAKAE, S., SAITO, H., OKAMOTO, Y. & NAKAYAMA, T. 2015. The interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity*, 42, 294-308.
- ENDO, Y., HIRAHARA, K., YAGI, R., TUMES, D. J. & NAKAYAMA, T. 2014. Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol*, 35, 69-78.

- EVERTS, B., HUSSAARTS, L., DRIESSEN, N. N., MEEVISSSEN, M. H., SCHRAMM, G., VAN DER HAM, A. J., VAN DER HOEVEN, B., SCHOLZEN, T., BURGDORF, S., MOHRS, M., PEARCE, E. J., HOKKE, C. H., HAAS, H., SMITS, H. H. & YAZDANBAKHS, M. 2012. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *J Exp Med*, 209, 1753-67, S1.
- FALASCA, M., RAIMONDI, C. & MAFFUCCI, T. 2011. Boyden chamber. *Methods Mol Biol*, 769, 87-95.
- FALLON, P. G., BALLANTYNE, S. J., MANGAN, N. E., BARLOW, J. L., DASVARMA, A., HEWETT, D. R., MCILGORM, A., JOLIN, H. E. & MCKENZIE, A. N. 2006. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med*, 203, 1105-16.
- FALLON, P. G., JOLIN, H. E., SMITH, P., EMSON, C. L., TOWNSEND, M. J., FALLON, R., SMITH, P. & MCKENZIE, A. N. 2002. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity*, 17, 7-17.
- FAN, X. & RUDENSKY, A. Y. 2016. Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell*, 164, 1198-211.
- FINK, M., DUPRAT, F., LESAGE, F., HEURTEAUX, C., ROMÉY, G., BARHANIN, J. & LAZDUNSKI, M. 1996. A new K⁺ channel beta subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J Biol Chem*, 271, 26341-8.
- FLAMAR, A. L., KLOSE, C. S. N., MOELLER, J. B., MAHLAKOIV, T., BESSMAN, N. J., ZHANG, W., MORIYAMA, S., STOKIC-TRTICA, V., RANKIN, L. C., PUTZEL, G. G., RODEWALD, H. R., HE, Z., CHEN, L., LIRA, S. A., KARSENTY, G. & ARTIS, D. 2020. Interleukin-33 Induces the Enzyme Tryptophan Hydroxylase 1 to Promote Inflammatory Group 2 Innate Lymphoid Cell-Mediated Immunity. *Immunity*, 52, 606-619 e6.
- FORT, M. M., CHEUNG, J., YEN, D., LI, J., ZURAWSKI, S. M., LO, S., MENON, S., CLIFFORD, T., HUNTE, B., LESLEY, R., MUCHAMUEL, T., HURST, S. D., ZURAWSKI, G., LEACH, M. W., GORMAN, D. M. & RENNICK, D. M. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 15, 985-95.

- FURUSAWA, J., MORO, K., MOTOMURA, Y., OKAMOTO, K., ZHU, J., TAKAYANAGI, H., KUBO, M. & KOYASU, S. 2013. Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. *J Immunol*, 191, 1818-26.
- GASTEIGER, G., FAN, X., DIKIY, S., LEE, S. Y. & RUDENSKY, A. Y. 2015. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science*, 350, 981-5.
- GENTIL, K., HOERAUF, A. & LAYLAND, L. 2013. Eosinophil-mediated responses toward helminths. In: JJ, L. & HF, R. (eds.) *Eosinophils in health and disease*. Waltham: Academic Press.
- GERBE, F., SIDOT, E., SMYTH, D. J., OHMOTO, M., MATSUMOTO, I., DARDALHON, V., CESSERES, P., GARNIER, L., POUZOLLES, M., BRULIN, B., BRUSCHI, M., HARCUS, Y., ZIMMERMANN, V. S., TAYLOR, N., MAIZELS, R. M. & JAY, P. 2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, 529, 226-30.
- GLADIATOR, A., WANGLER, N., TRAUTWEIN-WEIDNER, K. & LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. 2013. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J Immunol*, 190, 521-5.
- GOUGH, D. J., LEVY, D. E., JOHNSTONE, R. W. & CLARKE, C. J. 2008. IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev*, 19, 383-94.
- GROS, U. 2013. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Thieme (Verlag)*, 3. Auflage, 151 - 170.
- H.KING, C. 2019. Chapter Two - Helminthiasis Epidemiology and Control: Scoring Successes and Meeting the Remaining Challenges. *Advances in Parasitology*, Volume 103, 11-30.
- HALIM, T. Y., KRAUSS, R. H., SUN, A. C. & TAKEI, F. 2012. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*, 36, 451-63.
- HALIM, T. Y., STEER, C. A., MATHA, L., GOLD, M. J., MARTINEZ-GONZALEZ, I., MCNAGNY, K. M., MCKENZIE, A. N. & TAKEI, F. 2014. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*, 40, 425-35.
- HAMMAD, H., CHIEPPA, M., PERROS, F., WILLART, M. A., GERMAIN, R. N. & LAMBRECHT, B. N. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med*, 15, 410-6.

- HAMMAD, H. & LAMBRECHT, B. N. 2015. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity*, 43, 29-40.
- HAMS, E., LOCKSLEY, R. M., MCKENZIE, A. N. & FALLON, P. G. 2013. Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. *J Immunol*, 191, 5349-53.
- HAYAKAWA, Y. & WANG, T. C. 2018. The Tuft Cell-ILC2 Circuit Integrates Intestinal Defense and Homeostasis. *Cell*, 174, 251-253.
- HERNANDEZ, P. P., MAHLAKOIV, T., YANG, I., SCHWIERZECK, V., NGUYEN, N., GUENDEL, F., GRONKE, K., RYFFEL, B., HOLSCHER, C., DUMOUTIER, L., RENAULD, J. C., SUERBAUM, S., STAEHELI, P. & DIEFENBACH, A. 2015. Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat Immunol*, 16, 698-707.
- HEROLD, G. 2020 Innere Medizin 2021. *Herold, Gerd (Verlag)*
- HOF, H. & SCHLÜTER, D. 2019. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. *Thieme (Verlag)* 7. Auflage, 515 - 610
- .
- HOMS, A., CODINA-SOLA, M., RODRIGUEZ-SANTIAGO, B., VILLANUEVA, C. M., MONK, D., CUSCO, I. & PEREZ-JURADO, L. A. 2016. Genetic and epigenetic methylation defects and implication of the ERMN gene in autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry*, 6, e855.
- HONDOWICZ, B. D., AN, D., SCHENKEL, J. M., KIM, K. S., STEACH, H. R., KRISHNAMURTY, A. T., KEITANY, G. J., GARZA, E. N., FRASER, K. A., MOON, J. J., ALTEMEIER, W. A., MASOPUST, D. & PEPPER, M. 2016. Interleukin-2-Dependent Allergen-Specific Tissue-Resident Memory Cells Drive Asthma. *Immunity*, 44, 155-166.
- HOWITT, M. R., LAVOIE, S., MICHAUD, M., BLUM, A. M., TRAN, S. V., WEINSTOCK, J. V., GALLINI, C. A., REDDING, K., MARGOLSKEE, R. F., OSBORNE, L. C., ARTIS, D. & GARRETT, W. S. 2016. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*, 351, 1329-33.
- HOYLER, T., KLOSE, C. S., SOUABNI, A., TURQUETI-NEVES, A., PFEIFER, D., RAWLINS, E. L., VOEHRINGER, D., BUSSLINGER, M. & DIEFENBACH, A. 2012. The Transcription Factor GATA-3 Controls Cell Fate and Maintenance of Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity*, 37, 634-48.

- HUANG, Y., GUO, L., QIU, J., CHEN, X., HU-LI, J., SIEBENLIST, U., WILLIAMSON, P. R., URBAN, J. F., JR. & PAUL, W. E. 2015. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, 16, 161-9.
- HUANG, Y., MAO, K., CHEN, X., SUN, M. A., KAWABE, T., LI, W., USHER, N., ZHU, J., URBAN, J. F., JR., PAUL, W. E. & GERMAIN, R. N. 2018. S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense. *Science*, 359, 114-119.
- HUGHES, T., BECKNELL, B., FREUD, A. G., MCCLORY, S., BRIERCHECK, E., YU, J., MAO, C., GIOVENZANA, C., NUOVO, G., WEI, L., ZHANG, X., GAVRILIN, M. A., WEWERS, M. D. & CALIGIURI, M. A. 2010. Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. *Immunity*, 32, 803-14.
- HUNTER, C. A. & KASTELEIN, R. 2012. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity*, 37, 960-9.
- HWANG, J. R., BYEON, Y., KIM, D. & PARK, S. G. 2020. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med*, 52, 750-761.
- IKEDA, K., NAKAJIMA, H., SUZUKI, K., KAGAMI, S., HIROSE, K., SUTO, A., SAITO, Y. & IWAMOTO, I. 2003. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood*, 101, 3594-6.
- ISHIZUKA, I. E., CHEA, S., GUDJONSON, H., CONSTANTINIDES, M. G., DINNER, A. R., BENDELAC, A. & GOLUB, R. 2016. Single-cell analysis defines the divergence between the innate lymphoid cell lineage and lymphoid tissue-inducer cell lineage. *Nat Immunol*, 17, 269-76.
- JACOBSEN, E. A., TARANOVA, A. G., LEE, N. A. & LEE, J. J. 2007. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol*, 119, 1313-20.
- KADEL, S., AINSUA-ENRICH, E., HATIPOGLU, I., TURNER, S., SINGH, S., KHAN, S. & KOVATS, S. 2018. A Major Population of Functional KLRG1(-) ILC2s in Female Lungs Contributes to a Sex Bias in ILC2 Numbers. *Immunohorizons*, 2, 74-86.
- KAMACHI, F., ISSHIKI, T., HARADA, N., AKIBA, H. & MIYAKE, S. 2015. ICOS promotes group 2 innate lymphoid cell activation in lungs. *Biochem Biophys Res Commun*, 463, 739-45.

- KANG, C. M., JANG, A. S., AHN, M. H., SHIN, J. A., KIM, J. H., CHOI, Y. S., RHIM, T. Y. & PARK, C. S. 2005. Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33, 290-6.
- KAROW, T. & LANG-ROTH, R. 2020. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2021. *Thomas Karow (Verlag)* 29. Auflage
- KIDD, P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*, 8, 223-46.
- KILFOIL, P. J., CHAPALAMADUGU, K. C., HU, X., ZHANG, D., RAUCCI, F. J., JR., TUR, J., BRITTIAN, K. R., JONES, S. P., BHATNAGAR, A., TIPPARAJU, S. M. & NYSTORIAK, M. A. 2019. Metabolic regulation of Kv channels and cardiac repolarization by Kvbeta2 subunits. *J Mol Cell Cardiol*, 137, 93-106.
- KIM, B. S. & ARTIS, D. 2015. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- KIM, B. S., SIRACUSA, M. C., SAENZ, S. A., NOTI, M., MONTICELLI, L. A., SONNENBERG, G. F., HEPWORTH, M. R., VAN VOORHEES, A. S., COMEAU, M. R. & ARTIS, D. 2013. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med*, 5, 170ra16.
- KIM, D. C., HSU, F. I., BARRETT, N. A., FRIEND, D. S., GRENNINGLOH, R., HO, I. C., AL-GARAWI, A., LORA, J. M., LAM, B. K., AUSTEN, K. F. & KANAOKA, Y. 2006. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-dependent pulmonary inflammation. *J Immunol*, 176, 4440-8.
- KIM, H. Y., LEE, H. J., CHANG, Y. J., PICHAVANT, M., SHORE, S. A., FITZGERALD, K. A., IWAKURA, Y., ISRAEL, E., BOLGER, K., FAUL, J., DEKRUYFF, R. H. & UMETSU, D. T. 2014. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med*, 20, 54-61.
- KIM, S., PROUT, M., RAMSHAW, H., LOPEZ, A. F., LEGROS, G. & MIN, B. 2010. Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *J Immunol*, 184, 1143-7.
- KING, C. H. 2015. Health metrics for helminth infections. *Acta Trop*, 141, 150-60.
- KLEIN WOLTERINK, R. G., SERAFINI, N., VAN NIMWEGEN, M., VOSSHENRICH, C. A., DE BRUIJN, M. J., FONSECA PEREIRA, D., VEIGA FERNANDES, H., HENDRIKS, R. W. & DI SANTO, J. P. 2013. Essential, dose-dependent role for

- the transcription factor Gata3 in the development of IL-5+ and IL-13+ type 2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 10240-5.
- KLION, A. D. & NUTMAN, T. B. 2004. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 30-7.
- KLOSE, C. S. & ARTIS, D. 2016. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol*, 17, 765-74.
- KLOSE, C. S. & DIEFENBACH, A. 2014. Transcription factors controlling innate lymphoid cell fate decisions. *Curr Top Microbiol Immunol*, 381, 215-55.
- KLOSE, C. S., KISS, E. A., SCHWIERZECK, V., EBERT, K., HOYLER, T., D'HARGUES, Y., GOPPERT, N., CROXFORD, A. L., WAISMAN, A., TANRIVER, Y. & DIEFENBACH, A. 2013. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-RORgammat+ innate lymphoid cells. *Nature*, 494, 261-5.
- KLOSE, C. S. N., MAHLAKOIV, T., MOELLER, J. B., RANKIN, L. C., FLAMAR, A. L., KABATA, H., MONTICELLI, L. A., MORIYAMA, S., PUTZEL, G. G., RAKHILIN, N., SHEN, X., KOSTENIS, E., KONIG, G. M., SENDA, T., CARPENTER, D., FARBER, D. L. & ARTIS, D. 2017. The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation. *Nature*, 549, 282-286.
- KOGA, S., HOZUMI, K., HIRANO, K. I., YAZAWA, M., TEROOATEA, T., MINODA, A., NAGASAWA, T., KOYASU, S. & MORO, K. 2018. Peripheral PDGFRalpha(+)gp38(+) mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. *J Exp Med*, 215, 1609-1626.
- KOVATS, S. 2015. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol*, 294, 63-9.
- KUDO, F., IKUTANI, M., SEKI, Y., OTSUBO, T., KAWAMURA, Y. I., DOHI, T., OSHIMA, K., HATTORI, M., NAKAE, S., TAKATSU, K. & TAKAKI, S. 2016. Interferon-gamma constrains cytokine production of group 2 innate lymphoid cells. *Immunology*, 147, 21-9.
- KUHN, S., GRITTI, L., CROOKS, D. & DOMBROWSKI, Y. 2019. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*, 8.
- KUMAMOTO, Y., LINEHAN, M., WEINSTEIN, J. S., LAIDLAW, B. J., CRAFT, J. E. & IWASAKI, A. 2013. CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity*, 39, 733-43.
- LAFFONT, S., BLANQUART, E., SAVIGNAC, M., CENAC, C., LAVERNY, G., METZGER, D., GIRARD, J. P., BELZ, G. T., PELLETIER, L., SEILLET, C. &

- GUERY, J. C. 2017. Androgen signaling negatively controls group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med*, 214, 1581-1592.
- LEE, M. W., ODEGAARD, J. I., MUKUNDAN, L., QIU, Y., MOLOFSKY, A. B., NUSSBAUM, J. C., YUN, K., LOCKSLEY, R. M. & CHAWLA, A. 2015. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*, 160, 74-87.
- LEFRANCAIS, E., DUVAL, A., MIREY, E., ROGA, S., ESPINOSA, E., CAYROL, C. & GIRARD, J. P. 2014. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 15502-7.
- LI, Y., CHEN, S., CHI, Y., YANG, Y., CHEN, X., WANG, H., LV, Z., WANG, J., YUAN, L., HUANG, P., HUANG, K., CORRIGAN, C. J., WANG, W. & YING, S. 2019. Kinetics of the accumulation of group 2 innate lymphoid cells in IL-33-induced and IL-25-induced murine models of asthma: a potential role for the chemokine CXCL16. *Cell Mol Immunol*, 16, 75-86.
- LIEW, F. Y., GIRARD, J. P. & TURNQUIST, H. R. 2016. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 16, 676-689.
- LIM, A. I., MENEGATTI, S., BUSTAMANTE, J., LE BOURHIS, L., ALLEZ, M., ROGGE, L., CASANOVA, J. L., YSSEL, H. & DI SANTO, J. P. 2016. IL-12 drives functional plasticity of human group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med*, 213, 569-83.
- LIU, C., SUN, C., HUANG, H., JANDA, K. & EDGINGTON, T. 2003. Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy. *Cancer Res*, 63, 2957-64.
- LONGMAN, R. S., DIEHL, G. E., VICTORIO, D. A., HUH, J. R., GALAN, C., MIRALDI, E. R., SWAMINATH, A., BONNEAU, R., SCHERL, E. J. & LITTMAN, D. R. 2014. CX(3)CR1(+) mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *J Exp Med*, 211, 1571-83.
- LONGMORE, M., WILKINSON, I., BALDWIN, A. & WALLIN, E. 2014. Oxford Handbook of Clinical Medicine. *Oxford University Press*, 9. Auflage, 442 - 445.
- LUND, S. J., PORTILLO, A., CAVAGNERO, K., BAUM, R. E., NAJI, L. H., BADRANI, J. H., MEHTA, A., CROFT, M., BROIDE, D. H. & DOHERTY, T. A. 2017. Leukotriene C4 Potentiates IL-33-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Lung Inflammation. *J Immunol*, 199, 1096-1104.
- LUSTIGMAN, S., GELDHOF, P., GRANT, W. N., OSEI-ATWENEBOANA, M. Y., SRIPA, B. & BASANEZ, M. G. 2012. A research agenda for helminth diseases of humans:

- basic research and enabling technologies to support control and elimination of helminthiases. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1445.
- MAAZI, H., BANIE, H., ALEMAN MUENCH, G. R., PATEL, N., WANG, B., SANKARANARAYANAN, I., BHARGAVA, V., SATO, T., LEWIS, G., CESARONI, M., KARRAS, J., DAS, A., SOROOSH, P. & AKBARI, O. 2018. Activated plasmacytoid dendritic cells regulate type 2 innate lymphoid cell-mediated airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*, 141, 893-905 e6.
- MAAZI, H., PATEL, N., SANKARANARAYANAN, I., SUZUKI, Y., RIGAS, D., SOROOSH, P., FREEMAN, G. J., SHARPE, A. H. & AKBARI, O. 2015. ICOS:ICOS-ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis, and induction of airway hyperreactivity. *Immunity*, 42, 538-51.
- MACDONALD, A. S. & MAIZELS, R. M. 2008. Alarming dendritic cells for Th2 induction. *J Exp Med*, 205, 13-7.
- MAGRI, G., MIYAJIMA, M., BASCONES, S., MORTHA, A., PUGA, I., CASSIS, L., BARRA, C. M., COMERMA, L., CHUDNOVSKIY, A., GENTILE, M., LLIGE, D., COLS, M., SERRANO, S., AROSTEGUI, J. I., JUAN, M., YAGUE, J., MERAD, M., FAGARASAN, S. & CERUTTI, A. 2014. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol*.
- MAIER, E., DUSCHL, A. & HOREJS-HOECK, J. 2012. STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. *Eur J Immunol*, 42, 2827-33.
- MAIZELS, R. M., PEARCE, E. J., ARTIS, D., YAZDANBAKHSH, M. & WYNN, T. A. 2009. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med*, 206, 2059-66.
- MANOURY, B., MAZZEO, D., FUGGER, L., VINER, N., PONSFORD, M., STREETER, H., MAZZA, G., WRAITH, D. C. & WATTS, C. 2002. Destructive processing by asparagine endopeptidase limits presentation of a dominant T cell epitope in MBP. *Nat Immunol*, 3, 169-74.
- MANOURY, B., MAZZEO, D., LI, D. N., BILLSON, J., LOAK, K., BENAROCH, P. & WATTS, C. 2003. Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone. *Immunity*, 18, 489-98.
- MARIUZZA, R. A., AGNIHOTRI, P. & ORBAN, J. 2020. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J Biol Chem*, 295, 914-925.

- MASOPUST, D., SIVULA, C. P. & JAMESON, S. C. 2017. Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *J Immunol*, 199, 383-388.
- MCCORMACK, K., CONNOR, J. X., ZHOU, L., HO, L. L., GANETZKY, B., CHIU, S. Y. & MESSING, A. 2002. Genetic analysis of the mammalian K⁺ channel beta subunit Kvbeta 2 (Kcnab2). *J Biol Chem*, 277, 13219-28.
- MCHEDLIDZE, T., KINDERMANN, M., NEVES, A. T., VOEHRINGER, D., NEURATH, M. F. & WIRTZ, S. 2016. IL-27 suppresses type 2 immune responses in vivo via direct effects on group 2 innate lymphoid cells. *Mucosal Immunol*, 9, 1384-1394.
- MCHEDLIDZE, T., WALDNER, M., ZOPF, S., WALKER, J., RANKIN, A. L., SCHUCHMANN, M., VOEHRINGER, D., MCKENZIE, A. N., NEURATH, M. F., PFLANZ, S. & WIRTZ, S. 2013. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*, 39, 357-71.
- MCKAY, D. M., SHUTE, A. & LOPES, F. 2017. Helminths and intestinal barrier function. *Tissue Barriers*, 5., e1283385.
- MEBIUS, R. E., RENNERT, P. & WEISSMAN, I. L. 1997. Developing lymph nodes collect CD4⁺CD3⁻LTbeta⁺ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity*, 7, 493-504.
- MEYLAN, F., HAWLEY, E. T., BARRON, L., BARLOW, J. L., PENUMETCHA, P., PELLETIER, M., SCIUME, G., RICHARD, A. C., HAYES, E. T., GOMEZ-RODRIGUEZ, J., CHEN, X., PAUL, W. E., WYNN, T. A., MCKENZIE, A. N. & SIEGEL, R. M. 2014. The TNF-family cytokine TL1A promotes allergic immunopathology through group 2 innate lymphoid cells. *Mucosal Immunol*, 7, 958-68.
- MICHALSKI, J. P. & KOTHARY, R. 2015. Oligodendrocytes in a Nutshell. *Front Cell Neurosci*, 9, 340.
- MILLER, G., MATTHEWS, S. P., REINHECKEL, T., FLEMING, S. & WATTS, C. 2011. Asparagine endopeptidase is required for normal kidney physiology and homeostasis. *FASEB J*, 25, 1606-17.
- MIRCHANDANI, A. S., BESNARD, A. G., YIP, E., SCOTT, C., BAIN, C. C., CEROVIC, V., SALMOND, R. J. & LIEW, F. Y. 2014. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4⁺ Th2 cell responses. *J Immunol*, 192, 2442-8.
- MIYAKE, K., SHIOZAWA, N., NAGAO, T., YOSHIKAWA, S., YAMANISHI, Y. & KARASUYAMA, H. 2017. Trogocytosis of peptide-MHC class II complexes from

- dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 1111-1116.
- MJOSBERG, J., BERNINK, J., GOLEBSKI, K., KARRICH, J. J., PETERS, C. P., BLOM, B., TE VELDE, A. A., FOKKENS, W. J., VAN DRUNEN, C. M. & SPITS, H. 2012. The Transcription Factor GATA3 Is Essential for the Function of Human Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity*, 37, 649-59.
- MJOSBERG, J. M., TRIFARI, S., CRELLIN, N. K., PETERS, C. P., VAN DRUNEN, C. M., PIET, B., FOKKENS, W. J., CUPEDO, T. & SPITS, H. 2011. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nature immunology*, 12, 1055-62.
- MOHAPATRA, A., VAN DYKEN, S. J., SCHNEIDER, C., NUSSBAUM, J. C., LIANG, H. E. & LOCKSLEY, R. M. 2016. Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. *Mucosal Immunol*, 9, 275-86.
- MOLOFSKY, A. B., NUSSBAUM, J. C., LIANG, H. E., VAN DYKEN, S. J., CHENG, L. E., MOHAPATRA, A., CHAWLA, A. & LOCKSLEY, R. M. 2013. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med*, 210, 535-49.
- MOLOFSKY, A. B., VAN GOOL, F., LIANG, H. E., VAN DYKEN, S. J., NUSSBAUM, J. C., LEE, J., BLUESTONE, J. A. & LOCKSLEY, R. M. 2015. Interleukin-33 and Interferon-gamma Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity*, 43, 161-74.
- MONTICELLI, L. A., OSBORNE, L. C., NOTI, M., TRAN, S. V., ZAISS, D. M. & ARTIS, D. 2015. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 10762-7.
- MONTICELLI, L. A., SONNENBERG, G. F., ABT, M. C., ALENGHAT, T., ZIEGLER, C. G., DOERING, T. A., ANGELOSANTO, J. M., LAIDLAW, B. J., YANG, C. Y., SATHALIYAWALA, T., KUBOTA, M., TURNER, D., DIAMOND, J. M., GOLDRATH, A. W., FARBER, D. L., COLLMAN, R. G., WHERRY, E. J. & ARTIS, D. 2011. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*, 12, 1045-54.
- MORITA, H., ARAE, K., UNNO, H., MIYAUCHI, K., TOYAMA, S., NAMBU, A., OBOKI, K., OHNO, T., MOTOMURA, K., MATSUDA, A., YAMAGUCHI, S., NARUSHIMA,

- S., KAJIWARA, N., IIKURA, M., SUTO, H., MCKENZIE, A. N., TAKAHASHI, T., KARASUYAMA, H., OKUMURA, K., AZUMA, M., MORO, K., AKDIS, C. A., GALLI, S. J., KOYASU, S., KUBO, M., SUDO, K., SAITO, H., MATSUMOTO, K. & NAKAE, S. 2015. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity*, 43, 175-86.
- MORITA, Y., ARAKI, H., SUGIMOTO, T., TAKEUCHI, K., YAMANE, T., MAEDA, T., YAMAMOTO, Y., NISHI, K., ASANO, M., SHIRAHAMA-NODA, K., NISHIMURA, M., UZU, T., HARA-NISHIMURA, I., KOYA, D., KASHIWAGI, A. & OHKUBO, I. 2007. Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. *FEBS Lett*, 581, 1417-24.
- MORIYAMA, S., BRESTOFF, J. R., FLAMAR, A. L., MOELLER, J. B., KLOSE, C. S. N., RANKIN, L. C., YUDANIN, N. A., MONTICELLI, L. A., PUTZEL, G. G., RODEWALD, H. R. & ARTIS, D. 2018. beta2-adrenergic receptor-mediated negative regulation of group 2 innate lymphoid cell responses. *Science*, 359, 1056-1061.
- MORO, K., KABATA, H., TANABE, M., KOGA, S., TAKENO, N., MOCHIZUKI, M., FUKUNAGA, K., ASANO, K., BETSUYAKU, T. & KOYASU, S. 2016. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat Immunol*, 17, 76-86.
- MORO, K., YAMADA, T., TANABE, M., TAKEUCHI, T., IKAWA, T., KAWAMOTO, H., FURUSAWA, J., OHTANI, M., FUJII, H. & KOYASU, S. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*, 463, 540-4.
- MOSMANN, T., CHERWINSKI, H., BOND, M., GIEDLIN, M. & COFFMAN, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone: Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136, 2348-2357.
- MOTOMURA, Y., MORITA, H., MORO, K., NAKAE, S., ARTIS, D., ENDO, T. A., KUROKI, Y., OHARA, O., KOYASU, S. & KUBO, M. 2014. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity*, 40, 758-71.
- MOTRAN, C. C., SILVANE, L., CHIAPELLO, L. S., THEUMER, M. G., AMBROSIO, L. F., VOLPINI, X., CELIAS, D. P. & CERVI, L. 2018. Helminth Infections: Recognition

- and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. *Front Immunol*, 9, 664.
- MURAKAMI-SATSUTANI, N., ITO, T., NAKANISHI, T., INAGAKI, N., TANAKA, A., VIEN, P. T., KIBATA, K., INABA, M. & NOMURA, S. 2014. IL-33 promotes the induction and maintenance of Th2 immune responses by enhancing the function of OX40 ligand. *Allergol Int*, 63, 443-55.
- MWANGI, T. W., BETHONY, J. M. & BROOKER, S. 2006. Malaria and helminth interactions in humans: an epidemiological viewpoint. *Ann Trop Med Parasitol*, 100, 551-70.
- NADJSOMBATI, M. S., MCGINTY, J. W., LYONS-COHEN, M. R., JAFFE, J. B., DIPESO, L., SCHNEIDER, C., MILLER, C. N., POLLACK, J. L., NAGANA GOWDA, G. A., FONTANA, M. F., ERLE, D. J., ANDERSON, M. S., LOCKSLEY, R. M., RAFTERY, D. & VON MOLTKE, J. 2018. Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity*, 49, 33-41 e7.
- NAGASHIMA, H., OKUYAMA, Y., FUJITA, T., TAKEDA, T., MOTOMURA, Y., MORO, K., HIDAKA, T., OMORI, K., SAKURAI, T., MACHIYAMA, T., NDHLOVU, L. C., RICCARDI, C., SO, T. & ISHII, N. 2018. GITR cosignal in ILC2s controls allergic lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 141, 1939-1943 e8.
- NEILL, D. R., WONG, S. H., BELLOSI, A., FLYNN, R. J., DALY, M., LANGFORD, T. K., BUCKS, C., KANE, C. M., FALLON, P. G., PANNELL, R., JOLIN, H. E. & MCKENZIE, A. N. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464, 1367-70.
- NERBONNE, J. M. & KASS, R. S. 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, 85, 1205-53.
- NOBS, S. P. & ELINAV, E. 2019. Walk on the wildling side. *Science*, 365, 444-445.
- NURIEVA, R., YANG, X. O., MARTINEZ, G., ZHANG, Y., PANOPOULOS, A. D., MA, L., SCHLUNS, K., TIAN, Q., WATOWICH, S. S., JETTEN, A. M. & DONG, C. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448, 480-3.
- NUSSBAUM, J. C., VAN DYKEN, S. J., VON MOLTKE, J., CHENG, L. E., MOHAPATRA, A., MOLOFSKY, A. B., THORNTON, E. E., KRUMMEL, M. F., CHAWLA, A., LIANG, H. E. & LOCKSLEY, R. M. 2013. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*, 502, 245-8.

- OGASAWARA, N., POPOSKI, J. A., KLINGLER, A. I., TAN, B. K., WEIBMAN, A. R., HULSE, K. E., STEVENS, W. W., PETERS, A. T., GRAMMER, L. C., SCHLEIMER, R. P., WELCH, K. C., SMITH, S. S., CONLEY, D. B., RAVIV, J. R., SOROOSH, P., AKBARI, O., HIMI, T., KERN, R. C. & KATO, A. 2018. IL-10, TGF-beta, and glucocorticoid prevent the production of type 2 cytokines in human group 2 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*, 141, 1147-1151 e8.
- OLIPHANT, C. J., HWANG, Y. Y., WALKER, J. A., SALIMI, M., WONG, S. H., BREWER, J. M., ENGLEZAKIS, A., BARLOW, J. L., HAMS, E., SCANLON, S. T., OGG, G. S., FALLON, P. G. & MCKENZIE, A. N. 2014. MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity*, 41, 283-95.
- OMORI-MIYAKE, M. & ZIEGLER, S. F. 2012. Mouse models of allergic diseases: TSLP and its functional roles. *Allergol Int*, 61, 27-34.
- OTSUKA, A., NAKAJIMA, S., KUBO, M., EGAWA, G., HONDA, T., KITOH, A., NOMURA, T., HANAKAWA, S., SAGITA MONIAGA, C., KIM, B., MATSUOKA, S., WATANABE, T., MIYACHI, Y. & KABASHIMA, K. 2013. Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. *Nat Commun*, 4, 1739.
- PACLIK, D., STEHLE, C., LAHMANN, A., HUTLOFF, A. & ROMAGNANI, C. 2015. ICOS regulates the pool of group 2 innate lymphoid cells under homeostatic and inflammatory conditions in mice. *Eur J Immunol*, 45, 2766-72.
- PAUL, W. E. & ZHU, J. 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*, 10, 225-35.
- PELLY, V. S., KANNAN, Y., COOMES, S. M., ENTWISTLE, L. J., RUCKERL, D., SEDDON, B., MACDONALD, A. S., MCKENZIE, A. & WILSON, M. S. 2016. IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol*, 9, 1407-1417.
- PENG, H., JIANG, X., CHEN, Y., SOJKA, D. K., WEI, H., GAO, X., SUN, R., YOKOYAMA, W. M. & TIAN, Z. 2013. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest*, 123, 1444-56.
- PERKOWSKI, J. J. & MURPHY, G. G. 2011. Deletion of the mouse homolog of KCNAB2, a gene linked to monosomy 1p36, results in associative memory impairments and amygdala hyperexcitability. *J Neurosci*, 31, 46-54.

- PERRIGOUE, J. G., SAENZ, S. A., SIRACUSA, M. C., ALLENSPACH, E. J., TAYLOR, B. C., GIACOMIN, P. R., NAIR, M. G., DU, Y., ZAPH, C., VAN ROOIJEN, N., COMEAU, M. R., PEARCE, E. J., LAUFER, T. M. & ARTIS, D. 2009. MHC class II-dependent basophil-CD4⁺ T cell interactions promote T(H)₂ cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol*, 10, 697-705.
- PIHLGREN, M., DUBOIS, P. M., TOMKOWIAK, M., SJOGREN, T. & MARVEL, J. 1996. Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J Exp Med*, 184, 2141-51.
- PRICE, A. E., LIANG, H. E., SULLIVAN, B. M., REINHARDT, R. L., EISLEY, C. J., ERLE, D. J. & LOCKSLEY, R. M. 2010. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11489-94.
- RADTKE, F., MACDONALD, H. R. & TACCHINI-COTTIER, F. 2013. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol*, 13, 427-37.
- RANA, B. M. J., JOU, E., BARLOW, J. L., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, N., WALKER, J. A., KNOX, C., JOLIN, H. E., HARDMAN, C. S., SIVASUBRAMANIAM, M., SZETO, A., COHEN, E. S., SCOTT, I. C., SLEEMAN, M. A., CHIDOMERE, C. I., CRUZ MIGONI, S., CAAMANO, J., JORGENSEN, H. F., CAROBBIO, S., VIDAL-PUIG, A. & MCKENZIE, A. N. J. 2019. A stromal cell niche sustains ILC2-mediated type-2 conditioning in adipose tissue. *J Exp Med*, 216, 1999-2009.
- RANKIN, L. C., GROOM, J. R., CHOPIN, M., HEROLD, M. J., WALKER, J. A., MIELKE, L. A., MCKENZIE, A. N., CAROTTA, S., NUTT, S. L. & BELZ, G. T. 2013. The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46(+) innate lymphocytes via the Notch pathway. *Nat Immunol*, 14, 389-95.
- RAVIN, K. A. & LOY, M. 2016. The Eosinophil in Infection. *Clin Rev Allergy Immunol*, 50, 214-27.
- READ, K. A., POWELL, M. D., MCDONALD, P. W. & OESTREICH, K. J. 2016. IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4(+) T helper cell differentiation. *Exp Hematol*, 44, 799-808.
- REIS E SOUSA, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*, 6, 476-83.
- RICARDO-GONZALEZ, R. R., VAN DYKEN, S. J., SCHNEIDER, C., LEE, J., NUSSBAUM, J. C., LIANG, H. E., VAKA, D., ECKALBAR, W. L., MOLOFSKY, A. B., ERLE, D. J. & LOCKSLEY, R. M. 2018. Tissue signals imprint ILC2 identity with anticipatory function. *Nat Immunol*.

- RIGAS, D., LEWIS, G., ARON, J. L., WANG, B., BANIE, H., SANKARANARAYANAN, I., GALLE-TREGER, L., MAAZI, H., LO, R., FREEMAN, G. J., SHARPE, A. H., SOROOSH, P. & AKBARI, O. 2017. Type 2 innate lymphoid cell suppression by regulatory T cells attenuates airway hyperreactivity and requires inducible T-cell costimulator-inducible T-cell costimulator ligand interaction. *J Allergy Clin Immunol*, 139, 1468-1477 e2.
- ROBINETTE, M. L., FUCHS, A., CORTEZ, V. S., LEE, J. S., WANG, Y., DURUM, S. K., GILFILLAN, S., COLONNA, M. & IMMUNOLOGICAL GENOME, C. 2015. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol*, 16, 306-17.
- ROCHMAN, Y., SPOLSKI, R. & LEONARD, W. J. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*, 9, 480-90.
- ROEDIGER, B., KYLE, R., YIP, K. H., SUMARIA, N., GUY, T. V., KIM, B. S., MITCHELL, A. J., TAY, S. S., JAIN, R., FORBES-BLOM, E., CHEN, X., TONG, P. L., BOLTON, H. A., ARTIS, D., PAUL, W. E., FAZEKAS DE ST GROTH, B., GRIMBALDESTON, M. A., LE GROS, G. & WENINGER, W. 2013. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, 14, 564-73.
- ROJAS-ZULETA, W. G. & SANCHEZ, E. 2017. IL-9: Function, Sources, and Detection. *Methods Mol Biol*, 1585, 21-35.
- ROSSHART, S. P., HERZ, J., VASSALLO, B. G., HUNTER, A., WALL, M. K., BADGER, J. H., MCCULLOCH, J. A., ANASTASAKIS, D. G., SARSHAD, A. A., LEONARDI, I., COLLINS, N., BLATTER, J. A., HAN, S. J., TAMOUTOUNOUR, S., POTAPOVA, S., FOSTER ST CLAIRE, M. B., YUAN, W., SEN, S. K., DREIER, M. S., HILD, B., HAFNER, M., WANG, D., ILIEV, I. D., BELKAID, Y., TRINCHIERI, G. & REHERMANN, B. 2019. Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science*, 365.
- ROSSHART, S. P., VASSALLO, B. G., ANGELETTI, D., HUTCHINSON, D. S., MORGAN, A. P., TAKEDA, K., HICKMAN, H. D., MCCULLOCH, J. A., BADGER, J. H., AJAMI, N. J., TRINCHIERI, G., PARDO-MANUEL DE VILLENA, F., YEWDELL, J. W. & REHERMANN, B. 2017. Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell*, 171, 1015-1028 e13.

- RUITER, B., PATIL, S. U. & SHREFFLER, W. G. 2015. Vitamins A and D have antagonistic effects on expression of effector cytokines and gut-homing integrin in human innate lymphoid cells. *Clin Exp Allergy*, 45, 1214-25.
- SALEK ESFAHANI, B., GHARESOURAN, J., GHAFOURI-FARD, S., TALEBIAN, S., ARSANG-JANG, S., OMRANI, M. D., TAHERI, M. & REZAZADEH, M. 2019. Down-regulation of ERMN expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *Metab Brain Dis*, 34, 1261-1266.
- SALIMI, M., BARLOW, J. L., SAUNDERS, S. P., XUE, L., GUTOWSKA-OWSIK, D., WANG, X., HUANG, L. C., JOHNSON, D., SCANLON, S. T., MCKENZIE, A. N., FALLON, P. G. & OGG, G. S. 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med*, 210, 2939-50.
- SALIMI, M., STOGER, L., LIU, W., GO, S., PAVORD, I., KLENERMAN, P., OGG, G. & XUE, L. 2017. Cysteinyl leukotriene E4 activates human group 2 innate lymphoid cells and enhances the effect of prostaglandin D2 and epithelial cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 140, 1090-1100 e11.
- SALIMI, M., XUE, L., JOLIN, H., HARDMAN, C., COUSINS, D. J., MCKENZIE, A. N. & OGG, G. S. 2016. Group 2 Innate Lymphoid Cells Express Functional NKp30 Receptor Inducing Type 2 Cytokine Production. *J Immunol*, 196, 45-54.
- SAVIOLI, L. & ALBONICO, M. 2004. Soil-transmitted helminthiasis. *Nat Rev Microbiol*, 2, 618-9.
- SAWA, S., CHERRIER, M., LOCHNER, M., SATOH-TAKAYAMA, N., FEHLING, H. J., LANGA, F., DI SANTO, J. P. & EBERL, G. 2010. Lineage relationship analysis of RORgammat+ innate lymphoid cells. *Science*, 330, 665-9.
- SCHMITZ, J., OWYANG, A., OLDHAM, E., SONG, Y., MURPHY, E., MCCLANAHAN, T. K., ZURAWSKI, G., MOSHREFI, M., QIN, J., LI, X., GORMAN, D. M., BAZAN, J. F. & KASTELEIN, R. A. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23, 479-90.
- SCHNEIDER, C., O'LEARY, C. E., VON MOLTKE, J., LIANG, H. E., ANG, Q. Y., TURNBAUGH, P. J., RADHAKRISHNAN, S., PELLIZZON, M., MA, A. & LOCKSLEY, R. M. 2018. A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell*, 174, 271-284 e14.

- SEEHUS, C. R., KADAVALLORE, A., TORRE, B., YECKES, A. R., WANG, Y., TANG, J. & KAYE, J. 2017. Alternative activation generates IL-10 producing type 2 innate lymphoid cells. *Nat Commun*, 8, 1900.
- SERAFINI, N., KLEIN WOLTERINK, R. G., SATOH-TAKAYAMA, N., XU, W., VOSSHENRICH, C. A., HENDRIKS, R. W. & DI SANTO, J. P. 2014. Gata3 drives development of RORgammat+ group 3 innate lymphoid cells. *J Exp Med*, 211, 199-208.
- SERAFINI, N., VOSSHENRICH, C. A. & DI SANTO, J. P. 2015. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol*, 15, 415-28.
- SHAMRI, R., XENAKIS, J. J. & SPENCER, L. A. 2011. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res*, 343, 57-83.
- SHIRAHAMA-NODA, K., YAMAMOTO, A., SUGIHARA, K., HASHIMOTO, N., ASANO, M., NISHIMURA, M. & HARA-NISHIMURA, I. 2003. Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. *J Biol Chem*, 278, 33194-9.
- SILVER, J. S., KEARLEY, J., COPENHAVER, A. M., SANDEN, C., MORI, M., YU, L., PRITCHARD, G. H., BERLIN, A. A., HUNTER, C. A., BOWLER, R., ERJEFALT, J. S., KOLBECK, R. & HUMBLE, A. A. 2016. Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol*, 17, 626-35.
- SMITH-GARVIN, J. E., KORETZKY, G. A. & JORDAN, M. S. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27, 591-619.
- SOKOL, C. L., BARTON, G. M., FARR, A. G. & MEDZHITOV, R. 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*, 9, 310-8.
- SOKOL, C. L., CHU, N. Q., YU, S., NISH, S. A., LAUFER, T. M. & MEDZHITOV, R. 2009. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol*, 10, 713-20.
- SPENCER, L. A. & WELLER, P. F. 2010. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol*, 88, 250-6.
- SPENCER, S. P., WILHELM, C., YANG, Q., HALL, J. A., BOULADOUX, N., BOYD, A., NUTMAN, T. B., URBAN, J. F., JR., WANG, J., RAMALINGAM, T. R., BHANDOO, A., WYNN, T. A. & BELKAID, Y. 2014. Adaptation of innate

- lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity. *Science*, 343, 432-7.
- SUI, P., WIESNER, D. L., XU, J., ZHANG, Y., LEE, J., VAN DYKEN, S., LASHUA, A., YU, C., KLEIN, B. S., LOCKSLEY, R. M., DEUTSCH, G. & SUN, X. 2018. Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses. *Science*, 360.
- SUN, X. & KAUFMAN, P. D. 2018. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127, 175-186.
- TAIT WOJNO, E. D., MONTICELLI, L. A., TRAN, S. V., ALENGHAT, T., OSBORNE, L. C., THOME, J. J., WILLIS, C., BUDELSKY, A., FARBER, D. L. & ARTIS, D. 2015. The prostaglandin D2 receptor CRTH2 regulates accumulation of group 2 innate lymphoid cells in the inflamed lung. *Mucosal Immunol*, 8, 1313-23.
- TARAZONA, R., WILLIAMS, O., MOSKOPHIDIS, D., SMYTH, L. A., TANAKA, Y., MURDJEVA, M., WACK, A., MAMALAKI, C. & KIOUSSIS, D. 1998. Susceptibility and resistance to antigen-induced apoptosis in the thymus of transgenic mice. *J Immunol*, 160, 5397-403.
- THIO, C. L., CHI, P. Y., LAI, A. C. & CHANG, Y. J. 2018. Regulation of type 2 innate lymphoid cell-dependent airway hyperreactivity by butyrate. *J Allergy Clin Immunol*, 142, 1867-1883 e12.
- TRABANELLI, S., CHEVALIER, M. F., MARTINEZ-USATORRE, A., GOMEZ-CADENA, A., SALOME, B., LECCISO, M., SALVESTRINI, V., VERDEIL, G., RACLE, J., PAPAYANNIDIS, C., MORITA, H., PIZZITOLA, I., GRANDCLEMENT, C., BOHNER, P., BRUNI, E., GIROTRA, M., PALLAVI, R., FALVO, P., LEIBUNDGUT, E. O., BAERLOCHER, G. M., CARLO-STELLA, C., TAURINO, D., SANTORO, A., SPINELLI, O., RAMBALDI, A., GIARIN, E., BASSO, G., TRESOLDI, C., CICERI, F., GFELLER, D., AKDIS, C. A., MAZZARELLA, L., MINUCCI, S., PELICCI, P. G., MARCENARO, E., MCKENZIE, A. N. J., VANHECKE, D., COUKOS, G., MAVILIO, D., CURTI, A., DERRE, L. & JANDUS, C. 2017. Tumour-derived PGD2 and NKp30-B7H6 engagement drives an immunosuppressive ILC2-MDSC axis. *Nat Commun*, 8, 593.
- TRIGUNAITE, A., DIMO, J. & JORGENSEN, T. N. 2015. Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cell Immunol*, 294, 87-94.
- TURNER, J. E., MORRISON, P. J., WILHELM, C., WILSON, M., AHLFORS, H., RENAULD, J. C., PANZER, U., HELMBY, H. & STOCKINGER, B. 2013. IL-9-

- mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J Exp Med*, 210, 2951-65.
- UEBELE, V. N., ENGLAND, S. K., CHAUDHARY, A., TAMKUN, M. M. & SNYDERS, D. J. 1996. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv beta 2.1 subunits. *J Biol Chem*, 271, 2406-12.
- VACHER, H., YANG, J. W., CERDA, O., AUTILLO-TOUATI, A., DARGENT, B. & TRIMMER, J. S. 2011. Cdk-mediated phosphorylation of the Kvbeta2 auxiliary subunit regulates Kv1 channel axonal targeting. *J Cell Biol*, 192, 813-24.
- VAN DYKEN, S. J., NUSSBAUM, J. C., LEE, J., MOLOFSKY, A. B., LIANG, H. E., POLLACK, J. L., GATE, R. E., HALIBURTON, G. E., YE, C. J., MARSON, A., ERLE, D. J. & LOCKSLEY, R. M. 2016. A tissue checkpoint regulates type 2 immunity. *Nat Immunol*, 17, 1381-1387.
- VIVIER, E., ARTIS, D., COLONNA, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J. P., EBERL, G., KOYASU, S., LOCKSLEY, R. M., MCKENZIE, A. N. J., MEBIUS, R. E., POWRIE, F. & SPITS, H. 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174, 1054-1066.
- VON MOLTKE, J., JI, M., LIANG, H. E. & LOCKSLEY, R. M. 2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, 529, 221-5.
- VON MOLTKE, J., O'LEARY, C. E., BARRETT, N. A., KANAOKA, Y., AUSTEN, K. F. & LOCKSLEY, R. M. 2017. Leukotrienes provide an NFAT-dependent signal that synergizes with IL-33 to activate ILC2s. *J Exp Med*, 214, 27-37.
- VYKLIČKY, V., KORINEK, M., SMEJKALOVA, T., BALIK, A., KRAUSOVA, B., KANIAKOVA, M., LICHNEROVA, K., CERNY, J., KRUSEK, J., DITTERT, I., HORAK, M. & VYKLIČKY, L. 2014. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*, 63, S191-203.
- WALFORD, H. H. & DOHERTY, T. A. 2013. STAT6 and lung inflammation. *JAKSTAT*, 2, e25301.
- WALKER, C. S., CONNER, A. C., POYNER, D. R. & HAY, D. L. 2010. Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 476-83.
- WALKER, J. A. & MCKENZIE, A. N. J. 2018. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 18, 121-133.

- WALKER, J. A., OLIPHANT, C. J., ENGLEZAKIS, A., YU, Y., CLARE, S., RODEWALD, H. R., BELZ, G., LIU, P., FALLON, P. G. & MCKENZIE, A. N. 2015. Bcl11b is essential for group 2 innate lymphoid cell development. *J Exp Med*, 212, 875-82.
- WALLRAPP, A., RIESENFELD, S. J., BURKETT, P. R., ABDULNOUR, R. E., NYMAN, J., DIONNE, D., HOFREE, M., CUOCO, M. S., RODMAN, C., FAROUQ, D., HAAS, B. J., TICKLE, T. L., TROMBETTA, J. J., BARAL, P., KLOSE, C. S. N., MAHLAKOIV, T., ARTIS, D., ROZENBLATT-ROSEN, O., CHIU, I. M., LEVY, B. D., KOWALCZYK, M. S., REGEV, A. & KUCHARO, V. K. 2017. The neuropeptide NMU amplifies ILC2-driven allergic lung inflammation. *Nature*, 549, 351-356.
- WANG, Y. H., ANGKASEKWINAI, P., LU, N., VOO, K. S., ARIMA, K., HANABUCHI, S., HIPPE, A., CORRIGAN, C. J., DONG, C., HOMEY, B., YAO, Z., YING, S., HUSTON, D. P. & LIU, Y. J. 2007. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*, 204, 1837-47.
- WANG, Y. H., ITO, T., WANG, Y. H., HOMEY, B., WATANABE, N., MARTIN, R., BARNES, C. J., MCINTYRE, B. W., GILLIET, M., KUMAR, R., YAO, Z. & LIU, Y. J. 2006. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity*, 24, 827-38.
- WARD-KAVANAGH, L. K., LIN, W. W., SEDY, J. R. & WARE, C. F. 2016. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity*, 44, 1005-19.
- WATANABE, N., HANABUCHI, S., SOUMELIS, V., YUAN, W., HO, S., DE WAAL MALEFYT, R. & LIU, Y. J. 2004. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol*, 5, 426-34.
- WEBB, L. M., LUNDIE, R. J., BORGER, J. G., BROWN, S. L., CONNOR, L. M., CARTWRIGHT, A. N., DOUGALL, A. M., WILBERS, R. H., COOK, P. C., JACKSON-JONES, L. H., PHYTHIAN-ADAMS, A. T., JOHANSSON, C., DAVIS, D. M., DEWALS, B. G., RONCHESE, F. & MACDONALD, A. S. 2017. Type I interferon is required for T helper (Th) 2 induction by dendritic cells. *EMBO J*, 36, 2404-2418.
- WEBB, L. M. & TAIT WOJNO, E. D. 2017. The role of rare innate immune cells in Type 2 immune activation against parasitic helminths. *Parasitology*, 144, 1288-1301.

- WHO-EXPERT-COMMITEE 2002. Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-transmitted Helminthiasis. *WHO Technical Report Series*, 912.
- WIESNER, D. L., SPECHT, C. A., LEE, C. K., SMITH, K. D., MUKAREMERA, L., LEE, S. T., LEE, C. G., ELIAS, J. A., NIELSEN, J. N., BOULWARE, D. R., BOHJANEN, P. R., JENKINS, M. K., LEVITZ, S. M. & NIELSEN, K. 2015. Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type-2 helper T cell responses to cryptococcal infection. *PLoS Pathog*, 11, e1004701.
- WILHELM, C., HIROTA, K., STIEGLITZ, B., VAN SNICK, J., TOLAINI, M., LAHL, K., SPARWASSER, T., HELMBY, H. & STOCKINGER, B. 2011. An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat Immunol*, 12, 1071-7.
- XU, D., CHAN, W. L., LEUNG, B. P., HUANG, F., WHEELER, R., PIEDRAFITA, D., ROBINSON, J. H. & LIEW, F. Y. 1998. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med*, 187, 787-94.
- XUE, L., SALIMI, M., PANSE, I., MJOSBERG, J. M., MCKENZIE, A. N., SPITS, H., KLENERMAN, P. & OGG, G. 2014. Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 1184-94.
- YAGI, R., ZHU, J. & PAUL, W. E. 2011. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *International immunology*, 23, 415-20.
- YOSHIMOTO, T., YASUDA, K., TANAKA, H., NAKAHIRA, M., IMAI, Y., FUJIMORI, Y. & NAKANISHI, K. 2009. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 10, 706-12.
- YU, X., PAPPU, R., RAMIREZ-CARROZZI, V., OTA, N., CAPLAZI, P., ZHANG, J., YAN, D., XU, M., LEE, W. P. & GROGAN, J. L. 2014. TNF superfamily member TL1A elicits type 2 innate lymphoid cells at mucosal barriers. *Mucosal Immunol*, 7, 730-40.
- ZAISS, D. M., YANG, L., SHAH, P. R., KOBIE, J. J., URBAN, J. F. & MOSMANN, T. R. 2006. Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes. *Science*, 314, 1746.
- ZEEUWEN, P. L., VAN VLIJMEN-WILLEMS, I. M., OLTHUIS, D., JOHANSEN, H. T., HITOMI, K., HARA-NISHIMURA, I., POWERS, J. C., JAMES, K. E., OP DEN

- CAMP, H. J., LEMMENS, R. & SCHALKWIJK, J. 2004. Evidence that unrestricted legumain activity is involved in disturbed epidermal cornification in cystatin M/E deficient mice. *Hum Mol Genet*, 13, 1069-79.
- ZHANG, K., XU, X., PASHA, M. A., SIEBEL, C. W., COSTELLO, A., HACZKU, A., MACNAMARA, K., LIANG, T., ZHU, J., BHANDoola, A., MAILLARD, I. & YANG, Q. 2017. Cutting Edge: Notch Signaling Promotes the Plasticity of Group-2 Innate Lymphoid Cells. *J Immunol*, 198, 1798-1803.
- ZHANG, L., XUE, Z., LIU, Q., LIU, Y., XI, S., CHENG, Y., LI, J., YAN, J., SHEN, Y., XIAO, C., XIE, Z., QIU, Z. & JIANG, H. 2019. Disrupted folate metabolism with anesthesia leads to myelination deficits mediated by epigenetic regulation of ERMN. *EBioMedicine*, 43, 473-486.
- ZHANG, Y., ZHANG, Y., GU, W. & SUN, B. 2014. TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv Exp Med Biol*, 841, 15-44.
- ZHAO, L., HUA, T., CROWLEY, C., RU, H., NI, X., SHAW, N., JIAO, L., DING, W., QU, L., HUNG, L. W., HUANG, W., LIU, L., YE, K., OUYANG, S., CHENG, G. & LIU, Z. J. 2014. Structural analysis of asparaginyl endopeptidase reveals the activation mechanism and a reversible intermediate maturation stage. *Cell Res*, 24, 344-58.
- ZHENG, W. & FLAVELL, R. A. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89, 587-96.
- ZHENG, Y., VALDEZ, P. A., DANILENKO, D. M., HU, Y., SA, S. M., GONG, Q., ABBAS, A. R., MODRUSAN, Z., GHILARDI, N., DE SAUVAGE, F. J. & OUYANG, W. 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med*, 14, 282-9.
- ZHOU, W., TOKI, S., ZHANG, J., GOLENIOWKSA, K., NEWCOMB, D. C., CEPHUS, J. Y., DULEK, D. E., BLOODWORTH, M. H., STIER, M. T., POLOSUHKIN, V., GANGULA, R. D., MALLAL, S. A., BROIDE, D. H. & PEEBLES, R. S., JR. 2016. Prostaglandin I₂ Signaling and Inhibition of Group 2 Innate Lymphoid Cell Responses. *Am J Respir Crit Care Med*, 193, 31-42.
- ZHOU, Y., WANG, W., ZHAO, C., WANG, Y., WU, H., SUN, X., GUAN, Y. & ZHANG, Y. 2018. Prostaglandin E₂ Inhibits Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Allergic Airway Inflammation Through E-Prostanoid 4-Cyclic Adenosine Monophosphate Signaling. *Front Immunol*, 9, 501.

- ZHU, J. 2015. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 75, 14-24.
- ZHU, J. & PAUL, W. E. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112, 1557-69.
- ZHU, J., YAMANE, H. & PAUL, W. E. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology*, 28, 445-89.
- ZIEGLER, S. F. 2012. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 130, 845-52.
- ZIEGLER, S. F., ROAN, F., BELL, B. D., STOKLASEK, T. A., KITAJIMA, M. & HAN, H. 2013. The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). *Adv Pharmacol*, 66, 129-55.

9. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung

„Ich, Richard Mertens, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Mikrobielle und genetische Regulation der ILC2 - Aktivierung / Microbial and genetic regulation of ILC2 - activation“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Danksagung

In diesem Text möchte ich mich bei all denen Personen bedanken, die meinen Weg zu dieser Promotion geebnet haben. Zunächst Prof. Dr. Martin Kreis, der mir nach einer verfrühten Bewerbung in seiner Klinik zeigte, wie wichtig ein vorheriger Einstieg in die Forschung ist. Dann Prof. Dr. Andreas Diefenbach, der für mich Platz in seinem Institut gefunden hat. Insbesondere Dr. Christoph Klose, der mich in seiner Arbeitsgemeinschaft aufnahm, und für anregende Diskussion, Unterstützung und Rückhalt zur Verfügung stand. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Institutes für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie bedanken, die mich während meiner Zeit im Labor unterstützten, in die Welt der Grundlagenforschung eingeführt haben und als Freunde und Kollegen für mich da waren. Natürlich möchte ich mich insbesondere auch bei meiner Familie bedanken - zunächst meinen Eltern, die mich formten und so den Grundstein all meiner Fähigkeiten und Leistungen gelegt haben. Dann auch meinen beiden Brüdern, ohne die ich nicht der Mensch wäre, der ich jetzt bin. Auch meinen Freunden, die für emotionale Unterstützung sorgten, gilt mein Dank.

Berlin, den 17.09.2021

Richard Mertens

12. Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Mertens, Richard

Emailadresse: richard.mertens@charite.de

Matrikelnummer:

PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Andreas Diefenbach

Promotionsinstitution / Klinik: CC05 Institut für

Mikrobiologie und Infektionsimmunologie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Richard Mertens innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 14.12.2020

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Ich habe darauf hingewiesen, dass die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe aus statistischer Sicht problematisch klein ist.
- Ich habe auf die Gefahr der Fehlerinflation durch multiples Testen hingewiesen.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 04.01.2021

Name des Beraters: Maximilian Wechsung