

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Pneumologie und Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Die Infektion mit *Litomosoides sigmodontis* induziert regulatorische T-
Helferzellen und supprimiert den asthmatischen Phänotyp in einem
Mausmodell“**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Diesner

aus München

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. E. Hamelmann
2. Prof. Dr. med. M. Maurer
3. Prof. Dr. med. M. Kopp

Datum der Promotion: 20.11.2009

Meinen Eltern

Index

	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
1	EINLEITUNG	6
1.1	Epidemiologie von allergischen Erkrankungen, Erklärungsansätze.....	6
1.2	Immunologische Grundlagen.....	7
1.2.1	Definition von Allergien	7
1.2.1.1	Allergische Reaktion Typ 1 - Soforttyp.....	7
1.2.2	Asthma, allergisches Asthma bronchiale und asthmatischer Phänotyp.....	8
1.2.3	T-Helferzellen in der allergischen Immunreaktion	9
1.2.3.1	T-Helferzellen	9
1.2.3.2	Th1-Zellen.....	9
1.2.3.3	Th2-Zellen.....	9
1.2.3.4	Regulatorische T-Helferzellen (Tregs).....	9
1.2.3.4.1	Natürliche Tregs: CD4 ⁺ -CD25 ⁺ -Zellen.....	10
1.2.3.4.2	Adaptive (induzierte) T _R 1-Zellen und T _H 3-Lymphozyten.....	10
1.2.3.5	Mechanismen der Immunsuppression durch Tregs	10
1.2.3.5.1	IL-10.....	11
1.2.3.5.2	TGF-β	11
1.2.3.6	Tregs in der allergischen Immunreaktion	11
1.3	Parasitäre Infektion mit Filarien.....	12
1.3.1	Überblick über bisherige Erkenntnisse.....	12
1.3.2	Die verwendeten Filarien - <i>Litomosoides sigmodontis</i>	13
1.3.3	Murine Zytokinmuster bei Infektion mit <i>Lsigmo</i>	13
1.4	Erklärungsmodelle.....	14
1.4.1	Umwelthypothese.....	14
1.4.2	Die Hygienehypothese	14
1.4.3	Erweiterte Hygienehypothese	14
1.5	Der Versuch – Überlegungen und Fragestellungen.....	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Tiere, Haltung und Tierversuchsbewilligung	17
2.2	Behandlungsprotokoll.....	17
2.3	Implantation der Filarien.....	17
2.4	Kontrolle der Infektion.....	18
2.5	Sensibilisierung und Provokation.....	18
2.6	Peritoneallavage mit Zytozentrifugation.....	19
2.7	Proliferationsmessung mittels Lymphozytentransformationstest.....	19
2.7.1	Aufbereitung der Milzzellen	19
2.7.2	Stimulation der Milzzellen	20
2.7.3	Proliferationsmessung	20
2.8	Broncheo-alveoläre Lavage mit Zytozentrifugation	20
2.9	Histologische Untersuchungen	20

2.9.1	Präparation der Lungen	20
2.9.2	Eosinophilen-Major-Basic-Protein (MBP)-Immunofluoreszenzfärbung	21
2.9.3	Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung).....	21
2.10	Lungenfunktionsmessung (Atemwegshyperreaktivität, AHR)	22
2.11	Immunglobulinbestimmung	22
2.11.1	Serumgewinnung zur Bestimmung der Immunglobuline.....	22
2.11.2	Immunglobulinbestimmung mittels Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay.....	22
2.12	Zytokinbestimmung	23
2.12.1	Aufbereitung der Milzzellen und Stimulation	23
2.12.2	Stimulation der Milzzellen.....	23
2.12.3	Zytokinbestimmung	23
2.12.3.1	IFN- γ , IL-10	23
2.12.3.2	IL-4 und IL-5	24
2.13	Durchflusszytometrie (FACS).....	24
2.13.1	Messung der Oberflächenmarker	24
2.13.2	Messung der intrazellulären Marker („Intracellular staining“)	25
2.14	Statistische Analyse	26
2.15	Materialien.....	27
2.15.1	Tiere und Haltung (zu Kap 2.1)	27
2.15.2	Implantation der Filarien (zu Kap. 2.3).....	27
2.15.3	Kontrolle der Infektion (zu Kap. 2.4).....	27
2.15.4	Sensibilisierung und Provokation (zu Kap. 2.5).....	27
2.15.5	Peritoneallavage mit Zytozentrifugation (zu Kap. 2.6)	27
2.15.6	Proliferation (zu Kap. 2.7).....	28
2.15.7	Broncheo-alveoläre Lavage und Zytozentrifugation (zu Kap. 2.8)	28
2.15.8	Histologie (zu Kap. 2.9).....	28
2.15.8.1	Präparation der Lungen (zu Kap. 2.9.1)	28
2.15.8.2	MBP-Färbung (zu Kap. 2.9.2).....	28
2.15.8.3	PAS-Färbung (zu Kap. 2.9.3).....	29
2.15.9	Messung der Atemwegshyperreagibilität (zu Kap. 2.10)	29
2.15.10	Immunglobulinbestimmung (zu Kap. 2.11)	29
2.15.11	Zytokinbestimmungen (zu Kap. 2.12).....	30
2.15.11.1	Aufbereitung der Milzzellen (zu Kap.2.12.1).....	30
2.15.11.2	Stimulation der Milzzellen (zu Kap. 2.12.2)	30
2.15.11.3	Zytokinbestimmung mittels ELISA (zu Kap. 2.12.2).....	30
2.15.12	FACS-Analyse (zu Kap. 2.13)	31
2.15.12.1	Messung der Oberflächenmarker (zu Kap. 2.13.1).....	31
2.15.12.2	Messung des „Intracellular stainings“ (zu Kap. 2.13.2)	31
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Immunologische Reaktion auf die Filarieninfektion.....	33
3.1.1	Zellbestimmung in der Peritoneallavage.....	33
3.1.2	Proliferation der mononukleären Milzzellen nach Stimulation mit Filarien-Antigen	34
3.2	Auswirkungen der Filarieninfektion auf den asthmatischen Phänotyp.....	35
3.2.1	Zellbestimmung in der broncheo-alveolären Lavage	35
3.2.2	Lungenfunktionsmessung.....	36
3.3	Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Lungenhistologie.....	37
3.3.1	MBP-Färbung (Immunofluoreszenz-Histologie)	37
3.3.2	Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung).....	38
3.4	Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Serum-Immunglobuline.....	39

3.4.1	Gesamt-IgE	40
3.4.2	OVA-spezifisches IgE.....	40
3.4.3	OVA-spezifisches IgG1	40
3.4.4	OVA-spezifisches IgG2a.....	40
3.5	Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Milzzellfunktion.....	41
3.5.1	Antigen-spezifische Proliferation.....	41
3.5.2	Unspezifische Proliferation	42
3.5.3	Allergenspezifische Th1- und Th2-Zytokinproduktion.....	43
3.5.3.1	IL-4.....	43
3.5.3.2	IL-5.....	44
3.5.3.3	IFN- γ	45
3.5.4	Regulatorische Zytokine	46
3.5.4.1	IL-10.....	46
3.5.4.2	TGF- β	47
3.6	Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Leukozytensubpopulationen.....	48
3.6.1	Peritoneallavage	48
3.6.1.1	Aktiviert T-Helferzellen	48
3.6.1.2	Aktiviert dendritische Zellen	49
3.6.2	Milzzellen.....	50
3.6.2.1	Tregs.....	50
3.6.2.2	TGF- β -präsentierende T-Helferzellen	51
4	DISKUSSION	52
4.1	Zusammenfassung des Versuchs.....	52
4.1.1	Theoretischer Hintergrund	52
4.1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
4.2	Interpretation der Einzelresultate und Literaturvergleich	53
4.2.1	Anmerkungen zum Literaturvergleich	53
4.2.2	Versuchsaufbau, Tier- und Parasitenwahl.....	53
4.2.3	Die Infektion mit <i>Lsigmo</i> induziert eine lokale und systemische Immunreaktion	54
4.2.4	Die Infektion mit <i>Lsigmo</i> supprimiert den asthmatischen Phänotyp.....	54
4.2.4.1	Suppression der Atemwegsinflammation.....	54
4.2.4.2	Reduktion der Atemwegshyperreagibilität	55
4.2.4.3	Suppression der humoralen Immunantwort.....	56
4.2.5	Die Infektion mit <i>Lsigmo</i> supprimiert die zelluläre Immunreaktion	56
4.2.5.1	Reduktion der Proliferationsrate mononukleärer Milzzellen.....	56
4.2.5.2	Suppression der Th1- und Th2-Zytokine außer TGF- β	57
4.2.5.3	Regulatorische Zytokine: TGF- β , nicht IL-10, ist für die Immunsuppression verantwortlich	57
4.2.6	Die Infektion mit <i>Lsigmo</i> verändert die Lymphozyten-Subpopulationen	58
4.2.6.1	Aktivierung der Lymphozyten und im speziellen Dendritenzellen am Ort der Infektion	59
4.2.6.2	Vermehrtes Auftreten von Tregs und TGF- β -exprimierenden Lymphozyten am Ort der systemischen Immunreaktion	59
4.3	Abschlussthese und Ausblicke.....	60
4.3.1	Abgeleitete These: TGF- β ⁺ -Tregs werden durch die Filarieninfektion aktiviert und unterdrücken die Entwicklung des asthmatischen Phänotyps	60
4.3.2	Ausblicke	60
5	REFERENZEN.....	62
	APPENDIZES.....	67
	Lebenslauf	67
	Publikationsliste.....	68
	Selbständigkeitserklärung	69
	DANKSAGUNGEN..	70

Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreagibilität
Ak	Antikörper
Al-[OH] ³	Aluminiumhydroxid
BAL	broncho-alveoläre Lavage
CDx	Cluster of Differentiation-Rezeptor Typ x
Ci	Curie
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
ConA	Concanavalin A
DC(s)	Dendritic Cell(s) = Dendritenzelle(n)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay = enzymgebundener Immunosorbenttest
F-/PBS	nicht-filarieninfiziert (Sham-Operation), mit PBS behandelt
F+/PBS	filarieninfiziert, mit PBS behandelt
F-/OVA	nicht-filarieninfiziert (Sham-Operation), mit OVA behandelt
F+/OVA	filarieninfiziert, mit OVA behandelt
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter = fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FKS	Fetales Kälber Serum
FIx	Fold increase x = x-facher Anstieg
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Foxp3	Expressionsfaktor Forkhead Box P3
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
ICOS	Inducible Co-Stimulator = induzierbarer Kostimulator
IFN- γ	Interferon γ
Igx	Immunglobulin x
IL-x	Interleukin x
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LsAg	<i>Litomosoides sigmodontis</i> Antigen
<i>Lsigmo</i>	<i>Litomosoides sigmodontis</i>
LU	Laboratory-Units = Laboreinheiten
M	Mol
mg	Milligramm
MBP	Major Basic Protein= basisches Hauptprotein
MCH	Metacholin
MHCII	Major-Histocompatibility-Complex Typ II
MW	Mittelwert
MP	Makrophage
nm	Nanometer
ONWG	obere Nachweisgrenze
OVA	Ovalbumin
p	p-Wert des t-Tests
PAS	Periodic Acid-Schiff Atain (=Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung)
PBS	Phosphate Buffered Saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	Personal Computer = Rechner
Penh	Enhanced Pause = verlängerte Pause
PEP	Positive Expiratory Pressure = positiver Expirationsdruck
pg	Pikogramm
PIP	Positive Inspiratory Pressure = positiver Inspirationsdruck
PL	Peritoneallavage

RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviation = Standardabweichung
SI	Stimulationsindex
TGF- β	Transforming Growth Factor beta = transformierender Wachstumsfaktor beta
Th _x	T-Helferzelle Typ x
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- β	Tumor-Nekrose-Faktor beta
Treg(s)	regulatorische T-Zelle(n)
UNWG	untere Nachweisgrenze
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von allergischen Erkrankungen, Erklärungsansätze

Die Prävalenz von Erkrankungen des allergischen Formenkreises stieg innerhalb der letzten Jahrzehnte in Industrienationen und Schwellenländern stetig an^{1,2}.

Die Auswirkungen davon sind bedeutend: das allergische Asthma, die häufigste atopische Erkrankung, stellt in Industrieländern mittlerweile auch die häufigste Atemwegserkrankung in der Gesamtbevölkerung³ (Deutschland: 6-8%) sowie die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter⁴ (Deutschland: 10%) dar. Dabei verursacht es jährliche Kosten in Höhe von ca. 2,5 Milliarden Euro (Stand: 2005), also rund 1% der Gesamtgesundheitsausgaben⁵.

Um die Gründe für die steigende Häufigkeit von allergischen Erkrankungen (und damit auch des allergischen Asthmas) zu verstehen, wurden u.a. groß angelegte epidemiologische Studien durchgeführt. Diese zeigen eine große Differenz von allergischen Erkrankungen im Vergleich der Industrieländer zu Entwicklungsländern auf, wobei in letzteren wesentlich niedrigere Prävalenzraten auftreten². Deutlich wird auch ein Gefälle zwischen urbanen und ländlichen Gegenden, sowohl innerhalb der Industrieländer als auch der Entwicklungsländer^{2,6}. Migranten, die aus einem Gebiet mit niedrigen Atopieraten in Gegenden mit hohen Atopieraten übersiedeln, zeigen eine deutliche Tendenz zu ähnlich hohen Allergieprävalenzen.

Eine definitive Erklärung dieser Beobachtungen konnte bisher noch nicht gefunden werden.

Für die Bereitschaft Allergien zu entwickeln besteht zwar eine genetische Disposition⁷, diese jedoch kann die rapiden regionalen Veränderungen nicht erklären.

Bezüglich dieser Unterschiede existieren im Wesentlichen zwei Erklärungsmodelle, die „Umwelt-Hypothese“ und die „Hygiene-Hypothese“, (s. Kap. 1.4).

Ausgehend von der „Hygiene-Hypothese“ werden in den letzten Jahrzehnten verstärkt die einzelnen Faktoren untersucht - insbesondere die zellulären Immunkomponenten, da sich die Hinweise mehren, dass sie den Schlüssel zum Verständnis der Allergien und des Immunsystems bergen. Deren vollständige Aufklärung scheint aber aufgrund der Komplexität des Geschehens und der involvierten Faktoren noch weit entfernt.

Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit den Auswirkungen parasitärer Infektionen auf die allergische Immunreaktion und das dafür relevante Immungeschehen muriner Wirte – und versucht, Zusammenhänge zu erkennen und zu erklären.

1.2 Immunologische Grundlagen

1.2.1 Definition von Allergien

1906 prägte Freiherr Clemens von Pirquet erstmals den Begriff der Allergie und definierte ihn damals als „veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine fremde Substanz zu reagieren“⁸.

Heute versteht man unter Allergien überschießende Immunreaktionen gegen körperfremde Antigene, die primär apathogen sind⁹.

Im Besonderen zählen dazu Umweltantigene, gegen die das Immunsystem nicht reagieren „sollte“, da sie natürlichen Ursprungs sind (Pflanzenpollen, Kot der Hausstaubmilbe, Nahrungsmittel u.v.m.), teilweise ubiquär vorkommen und damit kaum vermeidbar sind. Auch ist ihre Allergenität nicht durch menschliche Eingriffe (Prozessierung, artifizielle Herstellung) erklärbar.

Insgesamt werden 4 Typen der allergischen Reaktionstypen¹⁰ unterschieden: Typ 1 (Immunglobulin-E-[IgE] vermittelte Sofortreaktion), Typ 2 (Immunglobulin-G-[IgG] und Immunglobulin-M-[IgM] vermittelte zytotoxische Reaktion), Typ 3 (IgG-Immunkomplex-vermittelte Reaktion) und Typ 4 (zellvermittelte Spätreaktion). An der Entstehung und Unterhaltung des allergischen Asthmas sind hauptsächlich Typ 1 und Typ 4 beteiligt. Da die Versuche dieses Experimentes hauptsächlich auf die Untersuchung der Auswirkungen der Typ-1-Reaktion ausgerichtet sind, soll im Folgenden nur auf jene weiter eingegangen werden.

1.2.1.1 **Allergische Reaktion Typ 1 - Soforttyp**

Als erster Schritt zur Entwicklung dieses Typs der allergischen Reaktion steht die Sensibilisierung. Antigenpräsentierende Immunzellen (Makrophagen [MPs], Dendritenzellen [DCs]) erkennen ein Antigen als körperfremd und präsentieren es T-Helferzellen (Th) des Typs 0 (Vorläuferzellen, Th0). Diese wiederum differenzieren sich unter Einfluss von Interleukin-4 (IL-4) zu allergenspezifischen T-Helferzellen des Typs 2 (Th2), die daraufhin IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren. Dies induziert die Produktion von allergenspezifischem IgE durch B-Zellen^{11,12}. Das IgE bindet an spezifische Rezeptoren der Mastzellen und basophilen Granulozyten (Basophilen). Bei einem Folgekontakt mit dem Allergen binden die Allergene an das membranständige IgE der Mastzellen und Basophilen, die daraufhin durch Degranulation ihre intrazellulären Botenstoffe wie Histamin, Serotonin, Leukotriene und Prostaglandine freisetzen.

Dies führt innerhalb von Minuten zu einer allergischen Frühreaktion, die durch erhöhte Gefäßpermeabilität, vermehrte Schleimproduktion, Konstriktion der glatten Muskulatur und Chemotaxis von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist.

Nach 3-8 Stunden schließt sich die allergische Spätphase an: Durch die Produktion von IL-4, 5, 10 und 13 durch die Th2-Zellen werden Eosinophile, Basophile, Alveolarmakrophagen und weitere T-Lymphozyten aktiviert und strömen in die Kontaktregionen des Gewebes (z.B. das Lungengewebe) ein^{13,14,15}. Dort führt die Ausschüttung von Botenstoffen der basophilen und eosinophilen Granulozyten zum Fortschreiten des Entzündungsgeschehens und damit direkt und indirekt zu Gewebsschäden.

1.2.2 Asthma, allergisches Asthma bronchiale und asthmatischer Phänotyp

Definiert wird **Asthma** als chronische Erkrankung der Atemwege, gekennzeichnet durch das Auftreten der Trias von bronchialer Hyperreagibilität sowie generalisierter und reversibler bronchialer Atemwegsobstruktion auf dem Boden einer chronischen Atemwegsentzündung. Sind diese Veränderungen auf allergische Ursachen zurückzuführen, so spricht man vom allergischen Asthma bronchiale. Im Kindesalter ist dies die häufigste Form des Asthmas und wird überwiegend IgE-vermittelt^{16,17,18,19}. Klinisch äußert es sich durch intermittierende Atemnot, Husten und auskultatorisches Giemen.

Beim **allergischen Asthma bronchiale** führt die allergische Frühreaktion in der Lunge zum Bronchialwandödem, Dyskrinie und Muskelkontraktion. Der Einstrom von Eosinophilen, Basophilen, Alveolarmakrophagen und T-Lymphozyten und deren immunologische Aktivität führt zur asthmatischen Spätreaktion, die zum Fortschreiten der durch die Frühreaktion hervorgerufenen Veränderungen mit zusätzlicher verstärkter Mukusproduktion führt. Im Folgenden wird durch die immigrierten Entzündungszellen eine Vielzahl von Mediatoren freigesetzt, welche die Entzündungsreaktion langfristig aufrechterhalten und so strukturelle Veränderungen der Atemwege wie Epithelschädigung, Zunahme der Bronchialmuskulatur und Drüsenhypertrophie bedingen. Die chronische Entzündung führt im Weiteren zum Umbau der Atemwege mit Bronchialwandverdickung (Atemwegs-Remodelling) und therapeutisch schwer beeinflussbarer Atemwegsobstruktion^{20,21}.

Unter dem Begriff des **asthmatischen Phänotyps** subsumiert man das gemeinsame Vorkommen von Atemwegshyperreagibilität, spezifischer IgE-Produktion, Inflammation der Atemwege mit Eosinophilie und verstärkter Mukuszellaktivität sowie das Vorkommen von Entzündungszellen in der broncheo-alveolären Lavage.

1.2.3 T-Helferzellen in der allergischen Immunreaktion

1.2.3.1 T-Helferzellen

T-Helferzellen stammen von T-Vorläuferzellen ab (naive T-Helferzellen mit dem Oberflächenmerkmal Cluster of Differentiation 4, kurz CD4⁺). Alle Subpopulationen (unterteilt in Th1, Th2 und regulatorische T-Zellen, kurz Tregs) erkennen Antigene, die ihnen von den antigenpräsentierenden Zellen auf Major Histocompatibility Complex-II-Molekülen (MHCII) dargeboten werden.

Die Zellpopulationen Th1 und Th2 hemmen sich gegenseitig (Th1 wird durch das Th2-Zytokin IL-4, Th2 durch das Th1-Zytokin Interferon- γ [INF- γ] gehemmt)²².

Die Rolle der Tregs geriet in den letzten Jahren immer stärker in den wissenschaftlichen Fokus. Ihnen kommt nach heutigen Erkenntnissen die Rolle der peripheren Regulatoren zu, z.B. die Hemmung antigen-spezifischer T-Lymphozyten (s. Kap. 1.2.3.4.1).

1.2.3.2 Th1-Zellen

Nach Kontakt mit aktivierten antigenpräsentierenden Zellen differenzieren sich Th1-Zellen unter dem Einfluss von IL-12 aus ihren Vorläuferzellen. Antigene können dabei bakterieller oder viraler Genese sein. Die Th1-Zytokine IFN- γ und IL-12 aktivieren wiederum Makrophagen und regen zytotoxische T-Zellen zur Proliferation an. Außerdem regen sie B-Zellen zum Klassenwechsel der produzierten Antikörper zugunsten von v.a. IgG2a an^{23,24,25}.

1.2.3.3 Th2-Zellen

Die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Th2-Zellen erfolgt unter dem Einfluss von IL-4 nach Kontakt mit aktivierten antigenpräsentierenden Zellen. Antigene können hierbei Allergene oder Helminthen sein. Aktivierte Th2-Lymphozyten produzieren IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und Tumornekrosefaktor Beta (TNF- β). Vor allem IL-4, aber auch IL-5 und IL-13 regen B-Zellen zur Produktion von IgE, IgG1, IgA und IgM an^{23,24,25}.

1.2.3.4 Regulatorische T-Helferzellen (Tregs)

Intensiv beforscht wird im Moment die Rolle der Tregs. Ihnen konnte eine suppressorische Wirkung auf Immungeschehen nachgewiesen werden^{26,27}, in Mausmodellen zum Beispiel bezüglich chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (Inflammatory Bowels Disease)²⁸, Transplantat-Abstoßungen^{29,30} oder *Leishmania major* Infektionen³¹.

Zwei Hauptpopulationen wurden bisher identifiziert: natürliche und adaptive („induced“) Tregs. Natürliche Tregs entstehen im Thymus und sind das ganze Leben in beinahe konstanten Mengen vorhanden³². Adaptive Tregs entwickeln sich erst unter bestimmten Voraussetzungen (z.B.

Antigenkontakt) aus CD4⁺-Zellen. Noch ist unklar, ob beide Populationen überhaupt große funktionelle Unterschiede aufweisen, oder ob lediglich ihre Genese unterschiedliche Wege aufweist.

1.2.3.4.1 Natürliche Tregs: CD4⁺-CD25⁺-Zellen

Identifiziert werden natürliche Tregs über ihre Oberflächenmerkmale CD4⁺/CD25⁺ sowie weitere Marker wie z.B. CD45RB^{low}. Weiter differenziert werden sie durch ihre Zytokinproduktion von IL-10 bzw. (teilweise membrangebundenem) transformierendem Wachstumsfaktor Beta (TGF-β). Der momentan signifikanteste und sensibelste Nachweis wird allerdings durch den Nachweis des Expressionsfaktors Forkhead Box P3 (Foxp3) gestellt³³.

Natürliche Tregs supprimieren konventionelle CD25⁺-Zellen nach Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors durch Hemmung der IL-2 Produktion^{34,35}. Ihre supprimierenden Fähigkeiten gegenüber T-Zellen werden bei Zell-Zell-Kontakt entfaltet³⁶ und sind antigen-unspezifisch³⁷.

Obwohl die genauen Zusammenhänge der supprimierenden Abläufe noch nicht genau bekannt sind, resultiert ihre Suppression letztendlich in der Hemmung der IL-2 Produktion in den Zielzellen³⁵.

1.2.3.4.2 Adaptive (induzierte) T_R1-Zellen und T_H3-Lymphozyten

Adaptive (induzierte) Tregs werden manchmal auch sekundäre Supressorzellen genannt, da sie sich aus konventionellen CD4-CD25⁺-Zellen differenzieren³⁸.

T_R1-Zellen sezernieren hauptsächlich IL-10, daneben auch TGF-β, IFN-γ, und IL-15, nicht aber IL-2 oder IL-4³⁹. T_R1-Zellen können durch die Sekretion von TGF-β und/oder IL-10 sowohl eine Typ1- als auch eine Typ2-gerichtete Immunantwort unabhängig von einem direkten Zell-Zell-Kontakt unterdrücken^{40,41}. Ferner hemmen T_R1-Zellen die Antikörperproduktion durch B-Zellen und die Fähigkeit zur effizienten Antigenpräsentation durch Monozyten und dendritische Zellen^{40,42}.

T_H3-Zellen werden durch oral aufgenommene Antigene induziert, produzieren mehr TGF-β als IL-10⁴³, unterstützen die IgA-Produktion und hemmen sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Immunantwort^{43,44,45,46}.

1.2.3.5 Mechanismen der Immunsuppression durch Tregs

Mehrere Wirkungsmechanismen der Immunsuppression durch Tregs konnten bisher nachgewiesen werden. Zum einen können Tregs durch direkten Zell-Zell-Kontakt andere T-

Helferzellen supprimieren⁴⁷. Zum anderen erreichen sie dies durch die Sekretion supprimierender Zytokine, allen voran IL-10 und TGF- β .

1.2.3.5.1 IL-10

IL-10 erreicht seinen immunsupprimierenden Effekt durch Wirkung auf beinahe alle Entzündungszellen, und kann dadurch die Produktion fast aller proinflammatorischer Zytokine und Chemokine unterdrücken⁴⁸.

Zusätzlich kann IL-10 die Expression einiger kostimulierender Oberflächenmoleküle reduzieren, darunter CD80, CD86, und sogar MHCII. Dies wiederum hemmt wirkungsvoll die Fähigkeit von antigenpräsentierenden Zellen zur T-Zell-Aktivierung⁴⁰.

1.2.3.5.2 TGF- β

Durch seine Eigenschaft, die Produktion von IL-2 hemmen und Zellzyklus-Inhibitoren heraufregulieren zu können, hemmt TGF- β wirkungsvoll die Proliferation von CD4⁺-Zellen⁴⁹.

Außerdem blockiert TGF- β die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen durch Inhibierung der Transkriptionsfaktoren für die IFN- γ -Expression (T-bet)⁵⁰ und IL-4 (GATA-3)⁵¹.

Auch kann es die Aktivierung von Makrophagen, deren Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Reifung von dendritischen Zellen hemmen. Genau wie IL-10 besitzt es dazu noch die Fähigkeit, eine MHCII-Aufregulierung zu unterbinden⁴⁰.

TGF- β ist außerdem ein entscheidender Faktor bei der Aktivierung von Tregs (Induktion des Transkriptionsfaktors Foxp3)⁵² und für die Transformation von CD25⁺-T-Helferzellen in Tregs mit supprimierenden Fähigkeiten (gekennzeichnet durch die Oberflächenmarker CD4⁺/CD25⁺/CD45RB^{low}/TGF- β ^{surface}) verantwortlich ist⁵³.

1.2.3.6 Tregs in der allergischen Immunreaktion

Die Rolle der Tregs in Bezug auf Allergien ist bisher nicht ausreichend geklärt. Noch treten zu viele Diskrepanzen in verschiedenen Studien auf, um eine abschließende Einordnung der Tregs vorzunehmen. Unbestritten jedoch ist, dass den Tregs, wie bereits in Kap. 1.2.3.4 besprochen, eine Schlüsselposition in der Entstehung und dem Verlauf der Allergien zukommt. So besitzen zum Beispiel gesunde Nicht-Allergiker im Gegensatz zu Allergikern größere allergenspezifische Treg-Populationen, die ihre Funktion via IL-10 und/oder TGF- β Produktion ausüben⁵⁴.

Von Atopikern isolierte Tregs mit den Markern CD4⁺/CD25⁺ zeigten in anderen *in vitro* Studien ein Unvermögen, körpereigene allergen-stimulierte CD4⁺-T-Helferzellen zu supprimieren, insbesondere während symptomatischer Perioden, d.h. bei Pollenallergikern in der Pollensaison⁵⁵. Am Beispiel des pädiatrischen Asthmas konnte gezeigt werden, dass die Menge

an Tregs in Blut und broncheo-alveolärer Lavage (BAL) bei asthmatischen Kindern erniedrigt ist. In gleichem Versuch konnten isolierte Tregs der Nicht-Asthmatiker die Proliferation und Zytokinproduktion autologer Responder-T-Zellen unterdrücken – im Gegensatz zu den Tregs der Asthmatiker⁵⁶. Zu gleichen Ergebnissen kam ein Versuch, bei dem Tregs von Nicht-Allergikern die allergenspezifische Proliferation von Effektorzellen von Birkenpollen-Allergikern reduzierten⁵⁷. Auch Hyposensibilisierungsstudien belegen diese Befunde, so konnten nach 2jähriger Hyposensibilisierungstherapie auf Pollen signifikant erhöhte Mengen von CD4⁺/CD25⁺-Zellen in der Nasenmukosa der behandelten Patienten gefunden werden, die mit einer klinisch verminderten klinischen Symptomatik einhergingen⁵⁸.

Zusammengefasst legen inzwischen verschiedene Studien klare Veränderungen der Treg-Populationen in Bezug auf Allergien nahe. Tregs stellen daher interessante Kandidatenzellen für einen Einsatz in der Immuntherapie dar. Wie bereits in Studien gezeigt wurde, könnte die Induktion von allergenspezifischen Tregs durch spezifische Peptide zu einer Hemmung der Th2-gesteuerten Entzündungsprozesse und einer damit verbundenen Atemwegshyperreaktivität führen⁵⁹.

1.3 Parasitäre Infektion mit Filarien

1.3.1 Überblick über bisherige Erkenntnisse

Eine der fehlenden Infektionsquellen in entwickelten Ländern stellen, im Sinne der Hygienehypothese, die Helminthen dar⁶⁰. Dafür, dass Helminthen-Infektionen die Entstehung von Allergien und Asthma beeinflussen können, ergaben sich in epidemiologischen Studien schon mehrfach deutliche Hinweise. So weisen zum Beispiel Patienten, die in endemischen Gegenden für *Ascaris lumbricoides* leben, eine erniedrigte Reaktionsrate in Prick-Tests sowie eine verringerte aero-allergen-spezifische IgE-Produktion auf. Anti-helminthische Behandlung hob diesen Effekt auf^{61,62}. In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die humane Infektion mit Hakenwürmern (*Necator americanus*) oder Schistosomen (*Schistosoma haematobium*) zu geringeren Reaktionen auf Milbenallergene führten^{63,64}.

Die suppressive Auswirkung von Helminthen-Infektionen auf allergische Erkrankungen konnte mittlerweile ebenfalls schon mehrfach im Mausmodell demonstriert werden^{65,66}. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch die Helminthen-Infektion die Atemwegshyperreagibilität und -inflammation gemindert wird. Verwendet wurden Parasiten wie *Angiostrongylus costaricensis* oder *Ascaris suum*, die in BALB/c, B10.A oder C57Bl/6 Mäuse implantiert wurden. Bei beiden Modellen wurden die Mäuse dann auf ein Modellallergen

sensibilisiert. Nach der Sensibilisierung wurde das Modellallergen in die oberen Atemwege appliziert, um eine allergische Reaktion in der Lunge zu provozieren. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Infektion mit den jeweiligen Parasiten die Zellzahl in der broncheo-alveolären Lavage sowie Zytokine wie IL-1- β , IL-4 oder IL-5 zu reduzieren vermag.

Verschiedene weitere Versuche weisen darauf hin, dass die durch die Filarieninfektion hervorgerufene Reduktion des allergischen Phänotyps durch unterschiedliche Mechanismen erklärt werden kann, wie z.B. durch die Induzierung von Tregs⁶⁷ oder B-Zellen⁶⁸.

Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bisher nur teilweise untersucht. Aufgrund der epidemiologischen Daten und der Daten aus Mausmodellen bezüglich allergischer Erkrankungen stellen parasitäre Infektionen z.Zt. einen der Hauptkandidaten dar, der der erweiterten Hygienehypothese zugrunde liegen könnte: reduzierte Infektionen mit Parasiten führen demnach zu einer verringerten Entwicklung der regulatorischen Elemente des Immunsystems, wodurch sowohl Th1- wie auch Th2-polarisierte Erkrankungen, die gegen körpereigene oder primär apathogene Umweltantigene gerichtet sind und welche normalerweise durch regulatorische Elemente des Immunsystems supprimiert werden, stark zunehmen.

1.3.2 Die verwendeten Filarien - *Litomosoides sigmodontis*

Die im Experiment verwendeten Filarien der Gattung *Litomosoides sigmodontis* (*Lsigmo*) sind eng verwandt mit den humanpathogenen Filarien⁶⁹. Gleichzeitig sind sie die einzigen Filarien ihrer Gattung, die in Mausmodellen ihren vollständigen Reifezyklus durchlaufen und daher besonders zum vollständigen Studium ihrer immunologischen Auswirkungen geeignet sind. Der natürliche Zyklus stellt sich wie folgt da: Die Larven (Mikrofilarien) der Parasiten befinden sich in der Blutbahn ihres natürlichen Wirtes, der Baumwollratte *Sigmodon hispidus* (Stadium L1). Durch eine Blutmahlzeit werden sie durch ihren Vektor, die tropische Rattenmilbe *Ornithonyssus bacoti*, aufgenommen und gelangen dort innerhalb von 10 Tagen in die Speicheldrüsen der Milben (Stadium L3). Bei einem erneuten Biss der Milbe werden sie auf den neuen Wirt übertragen. Anschließend gelangen sie mit Hilfe des Blutkreislaufes in die Lunge des Wirtes, um von dort aus aktiv in die Pleurahöhle einzudringen. Dort reifen sie innerhalb von 4 Wochen zu adulten Würmern heran, die nach 3 Wochen Mikrofilarien produzieren.

1.3.3 Murine Zytokinmuster bei Infektion mit *Lsigmo*

In verschiedenen Studien wurde das Zytokinmuster, das durch die Infektion mit *Lsigmo* in mononukleären Milzzellen von Labormäusen induziert wird, bestimmt.

Kontakt mit den Filarien-Antigenen führte zu einem Anstieg aller Zytokinlevel in der frühen Infektionsphase, in der mittleren Infektionsphase aber zu einer fast kompletten Reduktion aller Zytokine. Ausgenommen hiervon ist einzig IL-10. In der späten Infektionsphase werden

schließlich noch IFN- γ und IL-13 aufreguliert. Die Rolle von TGF- β wurde in diesen Arbeiten nicht untersucht^{70,71}.

1.4 Erklärungsmodelle

Wie bereits in Kapitel 1.1 ausgeführt wurde, hat die Prävalenz von Allergien und Asthma in den letzten Jahren dramatisch zugenommen. Über die zugrunde liegenden Mechanismen existieren drei Haupthypothesen, die die Veränderungen erklären sollen.

1.4.1 Umwelthypothese

Neu hinzugekommene Faktoren wie veränderte Ernährungsgewohnheiten oder Umweltreize könnten die Ursache für ein erhöhtes Auftreten von Allergien darstellen („Umwelt-Hypothese“)⁷². Für die Umwelthypothese liegen teilweise sehr kontroverse Studien vor^{73,74,75}, zusammengefasst konnte bisher noch kein grundlegender Einflussfaktor gefunden werden⁷⁶. Die Suche danach gestaltet sich aufgrund der großen strukturellen und wirkungsspezifischen Unterschiede der bekannten Faktoren sowie der stark ausgeprägten individuellen Reaktionsvarianz der Patienten auf identische Auslöser schwierig. Auch ist ein kausaler Zusammenhang zwischen einem einzelnen Umweltfaktor und der Entstehung von allergischer Sensibilisierung oder Erkrankung nur sehr schwer durch epidemiologische Studien darstellbar.

1.4.2 Die Hygienehypothese

Basierend auf epidemiologischen Studien ist die grundlegende Überlegung dieser Hypothese, dass fehlende Infektionen im frühen Kindesalter zu einer Fehlregulierung im Immunsystem führen könnten („Hygienehypothese“)^{77,78}.

Initial wurde als pathophysiologische Grundlage für diese Hypothese ein Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Immunantwort diskutiert^{79,80,81,82}. Als Ursache dafür wurde ein mangelhafter Th2/Th1-Shift bei atopischen Patienten angenommen. Niedrigere Infektionsraten mit bakteriellen und viralen Antigenen führen somit zu einer erniedrigten Th1-Polarisierung und einem relativen Überwiegen der Th2-Polarisierung^{83,84}. Die dadurch stärker Th2-polarisierte Immunreaktion soll zu einem verstärkten Auftreten von Th2-Erkrankungen wie der Atopie und/oder dem allergischen Asthma führen^{85,86}.

1.4.3 Erweiterte Hygienehypothese

Diese Sichtweise der „Th1/Th2 Imbalance“ in ihrer bisherigen Struktur ist durch jüngere Studien jedoch vermehrt angezweifelt worden. Zum einen konnten positive Assoziationen zwischen dem

Auftreten von Th1-polarisierten Krankheiten wie Diabetes Typ 1, Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa und Asthma gezeigt werden^{87,88}. Dies widerspricht der obigen Überlegung.

Zum anderen wurde eindeutig nachgewiesen, dass in Regionen mit hoher Helminthen-Durchseuchung Allergien sehr selten sind^{89,90}. Da die gegen Helminthen-Infektionen gerichtete Immunreaktion aber Th2 polarisiert ist, kann die alleinige Th2-Dominanz Allergien nicht erklären.

In den letzten Jahren wurde die Hygienehypothese daher durch die Theorie erweitert, dass die kontinuierliche Stimulation des Immunsystems gleichzeitig wichtig für dessen Auto-Regulation sein könnte⁹¹. Jede Immunreaktion hat danach eine (zeitlich versetzte) Aktivierung der suppressorischen Elemente zu Folge, wie zum Beispiel der Tregs. Wird daher bei steigender Hygiene die Stimulationsrate des Immunsystems gesenkt, wird gleichzeitig auch die Ausprägung der Suppressionsmechanismen reduziert. Die genauen immunologischen Mechanismen, die durch diese Infektionen induziert werden, sind allerdings noch wenig geklärt und daher Gegenstand zahlreicher aktueller Untersuchungen – wie auch dieser Studie.

1.5 Der Versuch – Überlegungen und Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Studie war es in einem „proof-of-principle“ Versuch den kausalen Zusammenhang zwischen einer parasitären Infektion und der Beeinflussung der immunologischen Reaktion auf Allergene zu untersuchen. Dabei standen in diesem Versuch folgende grundsätzliche Fragestellungen im Vordergrund:

- Welchen Einfluss hat die Infektion mit *Lsigmo* auf den asthmatischen Phänotyp?
- Welche Hinweise ergeben sich auf den Mechanismus der parasitär induzierten Suppression der allergischen Immunreaktionen?

Im Einzelnen wurden diese beiden Fragen durch folgende Detailfragen verfolgt:

- War die Infektion mit *Lsigmo* erfolgreich (messbare Immunreaktion auf Filarien)?
- Welche Unterschiede im Immunglobulinprofil (Serum) ergeben sich durch die Infektion mit *Lsigmo*?
- Welche histologischen Veränderungen ergeben sich durch die Infektion mit *Lsigmo* in der Lunge?
- Welche Auswirkungen auf die Atemwegsreagibilität hat die Infektion mit *Lsigmo* in vivo?

-
- Welche Unterschiede im Zytokinprofil der Versuchstiere ergeben sich durch Infektion mit *Lsigmo*?
 - Welche Unterschiede im Zellprofil (Zellquantität/-subtypen, Aktivierungsprofil) ergeben sich am Ort der Infektion (Peritoneum), am Ort der allergischen Reaktion (Lunge) und am Ort der Zelldifferenzierung (Milz) durch Infektion mit *Lsigmo*?

Um diesen Fragen am besten Rechnung tragen zu können, ergab sich folgender Versuchsaufbau: BALB/c-Mäusen wurden Filarien der Gattung *Lsigmo* gemäß Vorarbeiten der kooperierenden Arbeitsgruppe implantiert⁹², und diese einem etablierten Sensibilisierungs- und Expositionsmodell mit dem Allergen Ovalbumin (OVA) unterzogen. OVA stellt ein Modellallergen dar, das seit Jahren für immunologische und allergologische Fragestellungen verwandt wird⁹³. Untersucht wurden der klinische Parameter Atemwegshyperreagibilität, histologische Befunde in der Lunge und immunologische Parameter wie Immunglobulinprofile im Serum, Zellpopulationen der BAL und PL sowie Zytokinprofile der Milzzellen.

2 Material und Methoden

Genauere Materialangaben am Ende dieses Kapitels (Kap. 2.15).

2.1 Tiere, Haltung und Tierversuchsbewilligung

Verwendet wurden BALB/c Mäuse im Alter zwischen 6 und 8 Wochen. Sie wurden in pathogenfreien Bedingungen in individuell belüfteten, mit Luftfiltern versehenen Überdruck-Käfigen gehalten. Versorgt wurden sie mit OVA-freiem Futter und Wasser ad libitum, entsprechend den Richtlinien des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGeSi).

Der Tierversuchsantrag mit dem Aktenkennzeichen G0247/03 vom 27.02.04 wurde bewilligt.

2.2 Behandlungsprotokoll

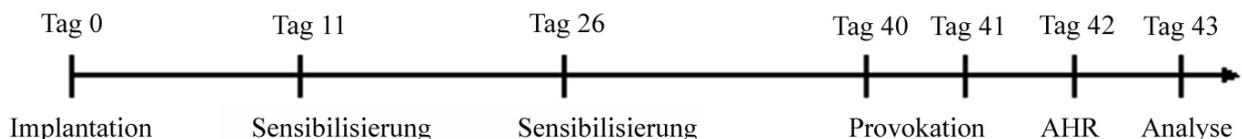


Abb.1 Behandlungsprotokoll. Nach der Implantation/Sham-Operation der Tiere wurden den Tieren an Tag 11 und 26 entweder PBS oder OVA in den Bauchraum gespritzt (Sensibilisierung), am Tag 40 und 41 die Lungen der Tiere unter Narkose mit jeweils PBS oder OVA provoziert, am Tag 42 die Messung der Atemwegshyperreagibilität (AHR) durchgeführt, die Tiere an Tag 43 getötet und anschließend die Versuchsanalysen durchgeführt.

2.3 Implantation der Filarien

Prä-mature weibliche Würmer der Gattung *Loa loa* wurden aus der Pleurahöhle und dem Peritonealraum infizierter Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) unter sterilen Bedingungen isoliert. Die BALB/c-Empfängermäuse wurden für die Implantation mittels einer 1:1 Mischung aus Xylasin (15mg/kgKG) und Ketamin (100mg/kgKG) narkotisiert.

Das Bauchfell wurde rasiert, die Haut mit Hilfe von 80%igem Ethanol desinfiziert und je sechs Filarien in den Peritonealraum der Empfängermäuse transferiert.

Die Kontrollgruppen unterliefen gleicher Prozedur, mit Ausnahme der Filarienimplantation (Sham-Operation). Anschließend wurde die Inzision vernäht⁹²².

Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Hoffmann des Tropeninstituts Tübingen durchgeführt.

2.4 Kontrolle der Infektion

Mature Filarien vermehren sich via Absetzung von Mikrofilarien in das Gefäßsystem des Endwirts. Periphere Mikrofilarien wurden daher zur Überprüfung der Infektion im Blut der Empfängertiere mikroskopisch nachgewiesen. Dazu wurden am Tag 38 30µl Blut aus einer lateralen Schwanzvene gewonnen und mit 1ml 10%ige FACS-Lyse-Lösung gemischt. Nach 5minütiger Inkubation wurde es zentrifugiert (400g, 10 min). Der Überstand wurde bis auf 10µl abgesaugt, der Rest resuspendiert, auf einen Objektträger gegeben und die enthaltenen Mikrofilarien unter einem Mikroskop unter verblindeten Bedingungen ausgezählt.

Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Hoffmann des Tropeninstituts Tübingen durchgeführt.

2.5 Sensibilisierung und Provokation

Die Sensibilisierung der Tiere erfolgte per intraperitonealer (i.p.) Injektion von 20 µg OVA, das vorher an 2 mg Aluminiumoxid ($\text{Al}[\text{OH}]^3$) adsorbiert und in 100µl PBS gelöst wurde. Die Negativkontrollgruppen wurden mit der gleichen Menge PBS und $\text{Al}(\text{OH})^3$ ebenfalls i.p. behandelt. Diese systemische Behandlung fand an den Tagen 11 und 26 nach der Filariantransplantation statt.

Alle Gruppen wurden am Tag 40 und 41 einer intranasalen (i.n.) Provokation unterzogen um eine Entzündung der Atemwege auszulösen. Dafür wurde ihnen unter Narkose (0.18 mg Rompun und 2,6 mg Ketanest in 200µl sterilem 0,9% NaCl i.p.) insgesamt 100 µg OVA in 100µl PBS (Testtiere und Positivkontrollen) bzw. 200µl PBS (Negativkontrollen) in die Atemwege injiziert. Die Atemwegshyperreagibilität aller Tiere wurde 24 Stunden nach der letzten Provokation gemessen (AHR, Tag 42). Am Tag 43 erfolgte die Tötung der Tiere sowie die weitere Analyse.

Gruppe	Sensibilisierung	Provokation	Filarieninfektion	Bezeichnung
Negativkontrollgruppe	-	-	-	F-/PBS
Kontrolle Filarieninfektion	-	-	+	F+/PBS
Positivkontrolle	+	+	-	F-/OVA
Versuchsgruppe	+	+	+	F+/OVA

Abb.2: Zusammenfassende Darstellung aller Versuchsgruppen.

2.6 Peritoneallavage mit Zytozentrifugation

Nach Beendigung des Behandlungsprotokolls erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation. Mithilfe einer Kanüle wurden zweimalig jeweils 1 ml steriles PBS (4°C) unter Sichtkontrolle in den Peritonealraum injiziert, der Bauchraum gespült, das PBS wieder aspiriert und anschließend beide Lavageportionen in getrennten Eppendorf-Gefäßen auf Eis gelagert.

Die Flüssigkeiten der ersten Waschungen wurden zentrifugiert (1200g, 10 min, 4°C), und der Überstand für die Zytokinbestimmung mittels ELISA bei -20°C eingefroren.

Die Zellen der ersten und zweiten Waschungen wurden zusammengeführt, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in einheitlichen Mengen von 1ml PBS resuspendiert.

Aus dieser Zellsuspension erfolgte die Zellzählung und -differenzierung. Dafür wurden je Tier 100µl BAL-Flüssigkeit auf einen Objektträger (OT) zentrifugiert (100g, 5 min.), und diese mittels Diff-Quick Schnellfärbung (= modifizierte Hämatoxylin-Eosin-Färbung) gefärbt. Die Differenzierung der Zellen erfolgte bei 250facher Vergrößerung nach morphologischen Kriterien und unter verblindeten Bedingungen.

2.7 Proliferationsmessung mittels Lymphozytentransformationstest

2.7.1 Aufbereitung der Milzzellen

Die Milzen der Versuchstiere wurden nach Entnahme aus dem Körper in Kulturmedium gelagert und direkt nach Beendigung der Gruppenentnahme verarbeitet. Hierbei wurden sie unter sterilen Bedingungen mit Hilfe der stumpfen Seite des Stopfens einer 1ml-Spritze durch ein Metallnetz (Maschenweite 250µm) gepresst und mit RPMI (4°C) gespült, um die Zellen aus dem Gewebe zu lösen. Das gewonnene Material wurde anschließend zweimal durch Nygonsiebe (Maschenweite 100 µm) gepresst und mit RPMI gespült. Aus der Zellsuspension wurden die Lymphozyten unter Verwendung von 3 ml Lympholyte (Raumtemperatur) in 15 ml Falcons durch Zentrifugation (1300g, 20 min ohne Bremse, RT) entsprechend ihres Dichtegradienten konzentriert. Die lymphozytenreiche Schicht wurde abgetragen und durch dreimaliges Waschen (mit RPMI und 1000g beim ersten bzw. 800g bei zweitem und dritten Durchgang, jeweils 10 min mit Bremse, RT) aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen in 1ml Kulturmedium resuspendiert und mittels Coulter Counter gezählt.

2.7.2 Stimulation der Milzzellen

Für die Proliferationsmessung wurden 100µl der Milzzellsuspensionen nach Zellzählung mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ /ml in 96-well-Proliferationsplatten übertragen.

Je 2 der Proliferationsplatten wurden 100µl Concanavalin A (ConA; 2.5 µg/mL), OVA (50 µg/mL) oder Lsigmo-Antigen94 (LsAg; 20 mg/ml, hergestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Hoffmann) zugesetzt und die Suspensionen für 72h bei 37°C inkubiert.

2.7.3 Proliferationsmessung

Anschließend wurden 25µl (methyl-3H)-Thymidin (entspricht 0,5µCi) hinzupipettiert und die Suspensionen für weitere 24h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Proben mittels TOMTEK-Harvester auf Filterpapier überführt, getrocknet und in Szintillationsgel eingeschweißt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im β-Counter, die Angaben in cpm. Darstellung der Messwerte als Stimulationsindex (= cpm der Probe / cpm Nullwert [Kulturmedium]).

2.8 Broncho-alveoläre Lavage mit Zytozentrifugation

Lunge und Trachea der Tiere wurden nach Tötung freipräpariert. Mithilfe einer in die Trachea eingeführten Braunüle wurden zweimalig 800µl steriles PBS plus Proteaseinhibitor (4°C) unter Sichtkontrolle in die nach oben abgebundene Trachea injiziert, wieder aspiriert und anschließend in Eppendorf-Gefäßen auf Eis aufbewahrt. Zytozentrifugation wie in Kap. 3.6 bereits beschrieben.

2.9 Histologische Untersuchungen

2.9.1 Präparation der Lungen

Zuerst wurden die Lungengefäße gespült, indem durch den rechten Vorhof 10 ml PBS (4°C) injiziert wurde, das durch die durchtrennte Vena cava abfließen konnte. Dies wurde wiederholt, bis die Lungen optisch weiß erschienen. Der rechte Bronchus der Versuchstiere wurde daraufhin mit einem Faden abgebunden, und über den Verweilkatheter 1 ml 10%ige Tissue-Tek® Lösung (für Kryokonservierung der Schnitte) bzw. 1 ml 4%ige Paraformaldehydlösung (für Paraffinschnitte) in die linke Lunge infundiert. Die so behandelte Lunge wurde entfernt, mit

Tissue-Tek[®] eingebettet und in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Anschließend wurde die rechte Lunge entfernt, in Kryoröhrchen überführt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff gelagert, wobei dieser Lungenteil für die vorliegende Arbeit nicht weiter analysiert wurde.

2.9.2 Eosinophilen-Major-Basic-Protein (MBP)-Immunofluoreszenzfärbung

Von den mit Tissue-Tek[®] perfundierten, gefrorenen Lungen wurden mit einem Cryo-Schnitt-Gerät 8µm dicke Schnitte angefertigt und 60 min bei 30°C getrocknet. Danach wurden sie mit Aceton fixiert und mit einer 10%igen FKS-Lösung (Fetales Kälber Serum [FKS] in PBS, künftig als FKS-PBS bezeichnet) in einer feuchten Kammer geblockt. Danach wurde der Primär-Antikörper (rat-anti-mouse MEAR/mMBP-1⁹⁵, 1µg/ml FKS-PBS) aufgetragen und die Präparate über Nacht inkubiert (feuchte Kammer, 4°C). Nach dreimaliger Waschung mit FKS-PBS (10 min auf Schüttler) wurde eine halbstündige Färbung mit 1%igem Chromotrope (Chromotrope 2R, verdünnt in PBS) durchgeführt (feuchte Kammer, Lichtabschluss), der wiederum eine dreimalige Waschung folgte. Sodann wurde die Inkubation (1h, feuchte Kammer, Lichtabschluss, 4°C) mit dem Sekundär-Antikörper (Cy3 donkey-anti-rat, 1:400 verdünnt in FKS-PBS) vorgenommen. Wiederum wurden die Präparate dreimal gewaschen (je 10 min, Schüttler), dann mit Citifluor eingedeckelt und bei -20°C gelagert.

Die quantitative Auswertung erfolgte mittels 15 bis 20 repräsentativer Fotos pro Präparat, die unter dem Fluoreszenz-Mikroskop hergestellt wurden und anschließend mit einem PC-gesteuerten Auszählungsprogramm ausgezählt wurden.

2.9.3 Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung)

Die mit Paraformaldehyd perfundierten Lungen wurden in Paraffin eingebettet und auf -20°C gekühlt. Anschließend wurden 5µm dicke Schnitte der Präparate angefertigt und auf Objektträger überführt. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet, in Xylol deparaffinisiert (5 min) und anschließend mit absteigenden Ethanolkonzentrationen (100%/96%/80%/70%) und Aqua dest. rehydriert (je 5 min). Danach wurden sie mit 3%iger Essigsäure (2 min) behandelt, mit zuvor gefiltertem Alzianblau gefärbt (20 min), kurz unter Leitungswasser entfärbt und kurz in Aqua dest. ruhen gelassen (1 min). Nach einem Bad in Periodsäure (5 min) und einer kurzen Ruhepause in Aqua dest. (1 min) wurden sie 5 min lang mit Schiff'schen Reagenz behandelt. Anschließend wurden sie 5 min in Leitungswasser entfärbt, 30 sek lang in Meyers Hämalaun getaucht und wiederum 5 min in Leitungswasser entfärbt. Dann wurden sie mit Hilfe aufsteigender Alkoholreihen (70%/80%/96%/100%) und Xylol entwässert (je 5 min), kurz getrocknet (3 min) und eingedeckelt.

2.10 Lungenfunktionsmessung (Atemwegshyperreaktivität, AHR)

Die Lungenfunktion der Mäuse wurde mittels Ganzkörper-Plethysmografie untersucht. Die Tiere wurden dazu einzeln in den Plethysmografen gesetzt. Nach Bestimmung der Nullwerte (Messung der Atemfunktion ohne vorherige Stimulation) wurden die Tiere zuerst mit PBS und anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen (6,25mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml) eines unspezifischen Bronchokonstriktors (Methylcholin, MCH) vernebelt. Nach jeder Vernebelung werden die Lungenfunktionen drei Minuten lang gemessen.

Als Referenzwert für die Atemwegswiderstände wurde der sog. Penh (Pause enhanced) ermittelt. Dieser wird aus Änderungen des positiven Inspirationsdruckes (PIP), des positiven Expirationsdruckes (PEP) und des Zeitverhältnisses zwischen früher und später Expiration ermittelt. Er zeigt somit die Unterschiede in den Druckverhältnissen bei der Ein- und Ausatmung auf⁹⁶, und korreliert eng mit invasiven AR-Messungen⁹⁷.

Zur Auswertung wurden die Methacholin-Penh-Werte als Vielfaches der entsprechenden PBS-Penh-Werte dargestellt (,Fold increase', FI).

2.11 Immunglobulinbestimmung

2.11.1 Serumgewinnung zur Bestimmung der Immunglobuline

Den Tieren wurde venöses Blut aus der lateralen Schwanzvene entnommen und dieses zur Gerinnung 30 min bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt. Nach Zentrifugation (1200 ×g, 10 min, RT) wurde das gewonnene Serum zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.11.2 Immunglobulinbestimmung mittels Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay

Für genaue Angaben der Probenverdünnungen, verwendeten Antikörper und Standards (Detektionslimits) siehe zugehörige Materialtabelle (Kap. 2.15.10). Bestimmt wurden das Gesamt-IgE und allergen-spezifische IgE-, IgG1- und IgG2a-Antikörper.

Für die Messung wurden ein laboreigener ELISA verwendet. 96-well Rundbodenplatten wurden mit dem primären Antikörper beschichtet (gelöst in Carbonatpuffer, 50µl/well, 4°C, über Nacht). Nach Blockierung von unspezifischen Bindungen durch den Blockpuffer (150µl/well, 60 min, RT, Schüttler) und zweimaligem Waschen (je 1 min) mit Waschpuffer wurden die Proben und die Standardreihen (50µl/well) auf die Platten aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde nicht gebundenes Protein durch viermaliges Waschen (je 1 min) von der Platte entfernt. Anschließend wurden die Platten mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (50µl/well, 60

min, RT, Schüttler) inkubiert. Nach viermaligem Waschen (je 1 min) wurde der Enzymkomplex Streptavidin-Peroxidase für eine Stunde in einer Verdünnung von 1:10000 auf die Platte aufgebracht (50µl/well). Nach achtmaligem Waschen (je 1 min) wurde das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB (150µl/well, 1:100 in Gallati-Puffer verdünnt) zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 5 – 15 min, je nach Geschwindigkeit der Farbentwicklung, mit 2M Schwefelsäure (50µl/well) gestoppt, und die Platten photometrisch gemessen (Testfilter: 460 nm, Referenzfilter: 570 nm).

2.12 Zytokinbestimmung

2.12.1 Aufbereitung der Milzzellen und Stimulation

Durchführung wie bei Aufbereitung zur Proliferationsmessung, s. Kapitel 2.7.1

2.12.2 Stimulation der Milzzellen

Nach Zellzählung wurden 100µl der Zellsuspensionen mit einer Konzentration von 1×10^6 /ml in jeweils 6 Zellkulturplatten pro Probe übertragen.

Je 2 der Petrischalen wurden 100µl ConA (2.5 µg/mL), OVA (50 µg/mL) oder *Lsigmo* Antigen (LsAg; 20 mg/ml) zugesetzt⁹⁴.

Die Überstände der Zellkulturen wurden nach 48 und 72 Stunden abgenommen, bei -80°C eingefroren und die Zytokinkonzentrationen später mittels ELISA (s. 2.12.3) bestimmt.

2.12.3 Zytokinbestimmung

2.12.3.1 IFN- γ , IL-10

Für die Messung wurden BD OptEIA™-Sets der Firma BD Pharmingen verwandt, und es wurde strikt nach Angaben des Herstellers verfahren. 96-well Rundbodenplatten wurden mit dem primären Antikörper beschichtet (gelöst in Carbonatpuffer, 50µl/well, 4°C, über Nacht). Nach Blockierung von unspezifischen Bindungen durch den Blockpuffer (150µl/well, 60 min, RT, Schüttler) und zweimaligem Waschen (je 1 min) mit Waschpuffer wurden die Proben (50µl/well) und die Standardreihen (50µl/well, Konzentrationsranges 1000 – 3,9 pg/ml) auf die Platten aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde nicht gebundenes Protein durch viermaliges Waschen (je 1 min) von der Platte entfernt. Anschließend wurden die Platten mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (50µl/well, 60 min, RT, Schüttler) inkubiert. Nach viermaligem Waschen (je 1 min) wurde der Enzymkomplex Streptavidin-Peroxidase für eine Stunde in einer Verdünnung von 1:10000 auf die Platte aufgebracht (50µl/well). Nach

achtmaligem Waschen (je 1 min) wurde das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB (150µl/well, 1:100 in Gallati-Puffer verdünnt) zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 5 – 15 min, je nach Geschwindigkeit der Farbentwicklung, mit 2M Schwefelsäure (50µl/well) gestoppt, und die Platten photometrisch gemessenen (Testfilter: 450 nm, Referenzfilter: 490 nm).

2.12.3.2 IL-4 und IL-5

Hierbei wurde ein leicht modifiziertes Hersteller-Protokoll verwendet. 96-Well-Rundbodenplatten wurden mit dem Erstantikörpers (Verdünnung 1:250,50µl/Well) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaliger Waschung mit Waschpuffer wurde 150µl Blockierungspuffer in die Wells zugegeben, es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach dreimaliger Waschung, wurden je 50µl der Proben bzw. eine Verdünnungsreihe des Standards in die Wells pipettiert (Maximal-Konzentration des Standards IL-4: 2 ng/ml; IL-5: 4 ng/ml, beide Standards wurden in 1:2 Verdünnungsschritten auf 7,8 pg/ml herunter verdünnt). Als Leerwert diente der Verdünnungspuffer, die Ansätze wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, fünfmalig gewaschen, und 50µl des Zweitantikörpers (IL-4: 0,25 µg/ml; IL-5: 1 µg/ml) in die Wells pipettiert. Der Zweitantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, die Platten anschließend fünfmal gewaschen. Nach Zugabe von 50µl Streptavidin-Peroxidase (1:10000 mit Waschpuffer), folgte eine Inkubation für 30 bis 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach achtmaligem Waschen (je 1 min) wurde das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB (150µl/well, 1:100 in Gallati-Puffer verdünnt) zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 5 – 15 min, je nach Geschwindigkeit der Farbentwicklung, mit 2M Schwefelsäure (50µl/well) gestoppt, und die Platten photometrisch gemessenen (Testfilter: 460 nm, Referenzfilter: 570 nm).

2.13 Durchflusszytometrie (FACS)

2.13.1 Messung der Oberflächenmarker

Zur weiteren Charakterisierung der Milz- und PL-Zellen wurden diese mit folgenden Antikörpern angefärbt: CD3, CD4, ICOS, MHCII, CD11c, CD80, CD86, CD45RB, CD25, TGF-β. Alle Antikörper waren direkt mit den Fluorochromen Phycoerythrin (PE), Fluoreszeinisothocyanat (FITC) oder Cyanin (Cy5) markiert und von BD Pharmingen bezogen, abgesehen vom Antikörper gegen murines TGF-β, der von IQ-Products bezogen wurde.

Je 2×10^5 Zellen (Zellen aus Milz oder PL) wurden in 100µl FACS Flow™ in 96-Well-Platten überführt. Es folgte eine Zentrifugation (550g, 4°C, 5 min mit Bremse). Der Überstand wurde verworfen, in 50µl der Blockierlösung (Anti-FcR-Ak und Ratten-Immunglobulin) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wurden die Zellen erneut in 50µl FACS Flow aufgenommen.

Alle nun folgenden Schritte wurden im Dunklen durchgeführt. Je 4µl der jeweiligen Antikörpermischung (Konzentration vorher austitriert) wurde den Zellen beigefügt und die Mischung für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden weitere 150µl FACS Flow hinzugegeben und die Suspension wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nochmals in 200µl FACS Flow resuspendiert und gewaschen. Die Zellen wurden dann in 150µl FACS Flow aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gelagert. Erst kurz vor der Analyse wurden die Zellen mit 150µl einer 1µg/ml Propidiumiodidlösung gemischt.

Die markierten Zellen wurden dann mit Hilfe eines FACS-Messgerätes und der CellQuest® Software quantitativ ausgewertet. Bei der Messung wurden pro Probe mindestens 100.000 lebende Zellen ausgezählt. Abgestorbene Zellen wurden durch die vorangegangene Markierung mit Propidiumiodid von der Zählung ausgeschlossen.

Als Referenzen dienten entsprechende Isotyp-Kontrollen der Antikörper.

2.13.2 Messung der intrazellulären Marker („Intracellular staining“)

Für die intrazelluläre Zytokinbestimmung wurden Milzzellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in jeweils 1ml RPMI/10% FKS aufgenommen und in 6-well-Flachbodenplatten einer 5-stündigen Kurzzeitstimulation mit 1µg/ml Ionomycin und 20ng/ml PMA unterzogen. Hierbei wird 2 Stunden nach Beginn der Inkubationszeit 1µl Golgi-Stop™ pro 1 ml Zellsuspension hinzugefügt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen lichtgeschützt in FACS-Röhrchen überführt und einer 2-maligen Waschung (550g, 4°C, 5 min mit Bremse) mit je 1ml FACS-PBS unterzogen. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Fc-Block (1:10 in FACS-PBS verdünnt, 50µl/Röhrchen) aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen 20 min lang bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach der Inkubation 2-maliges Waschen mit je 1 ml FACS-PBS und Aufnahme in 1 ml FACS-PBS. Die Zugabe von 4µl der Oberflächenantikörper CD3, CD4 und CD8 und Inkubation für 20 min bei 4°C erfolgten, wie alle folgenden Arbeitsschritte, lichtgeschützt. Die Suspensionen wurden im nächsten Arbeitsschritt einer 2-maligen Waschung mit je 1ml FACS-PBS (550g, 4°C, 5 min mit Bremse) unterzogen, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100µl FACS-PBS aufgenommen. Zugabe von 250µl Cytofix/Cytoperm pro Röhrchen und Resuspendierung. Inkubation für 20 min bei 4°C, lichtgeschützt. Anschließend 2-malige Waschung (550g, 4°C, 5

min mit Bremse) mit je 1ml Perm/Wash-Lösung. Nach Absaugen der Überstände Resuspendierung mit 50 μ l Perm/Wash-Lösung und 4 μ l der Interleukin-Antikörper anti-IL-4, anti-IL-10, anti-TGF- β und anti-IFN- γ . Inkubation für 20 min bei 4°C, lichtgeschützt. Anschließend 2-malige Waschung (550g, 4°C, 5 min mit Bremse) mit je 1ml Perm/Wash-Lösung. Danach Aufnahme der Zellen in 100 μ l FACS-PBS und Lagerung auf Eis bis zur möglichst sofortigen Messung im FACS-Messgerät. Bei der Messung wurden pro Probe mindestens 100.000 Zellen ausgezählt. Als Referenzen dienten entsprechende Isotyp-Kontrollen der Antikörper.

2.14 Statistische Analyse

Die Resultate repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student-t-Tests, EXCEL, Vers. 2002 (Microsoft Corp.) ermittelt. p-Werte < 0,05 wurden als signifikante Unterschiede, p-Werte < 0,005 als hochsignifikant betrachtet.

2.15 Materialien

2.15.1 Tiere und Haltung (zu Kap. 2.1)

BALB/c Mäuse	Winckelmann, Borchten, BRD
Überdruck-Käfigen	Techniplast, Northants, U.K.

2.15.2 Implantation der Filarien (zu Kap. 2.3)

Xylasin	Rompun [®] , Bayer, Leverkusen, BRD
Ketamin	Ketanest [®] , Parke-Davis, Berlin, BRD

2.15.3 Kontrolle der Infektion (zu Kap. 2.4)

FACS-Lyse-Lösung	BD Biosciences, San Diego, USA
------------------	--------------------------------

2.15.4 Sensibilisierung und Provokation (zu Kap. 2.5)

Ovalbumin, OVA Grad VI	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Aluminiumhydroxid (Inject Alum)	Pierce, Rockford, Illinois, USA
PBS-Dulbecco (steril)	PAA Lab. GmbH, Linz, AUT
Kanülen	Terumo, Leuven, BEL
1 ml Spritzen B	Braun, Melsungen, BRD
Xylasin	Rompun [®] , Bayer, Leverkusen, BRD
Ketamin	Ketanest [®] , Parke-Davis, Berlin, BRD

2.15.5 Peritoneallavage mit Zytozentrifugation (zu Kap. 2.6)

Kanülen 0,55 x 25 mm	Terumo, Leuven, BEL
Venenverweilkanüle 24 G	BD Biosciences, San Diego, USA
Proteaseinhibitor	Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics GmbH, Basel, CH
PBS-Dulbecco (steril)	PAA Lab. GmbH, Linz, AUT
Zentrifugen Röhrchen	Eppendorf, BRD
Zellzählgerät Cell-Dyn	Abbott, Wiesbaden, BRD
Diff-Quick	Dade Behring AG, Düringen, CH
Mikroskop	Axioplan, Zeiss, Oberkochen, BRD
Zentrifuge	Shandon Cytospin [®] Cytozentrifuge 4, Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, BRD

2.15.6 Proliferation (zu Kap. 2.7)

Kulturmedium	
	RPMI 1640
	10ml/l Penicillin/Streptomycin
	5ml/l Fungizone
	10ml/l Glutamin
Nylonsiebe	BD Falcon Cellstrainer 100 µm, Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
Lympholyte	Lympholyte [®] -M, Cedarlane Laboratories, Hornby, CAN
96-Well-Rundbodenplatten	BD Falcon [™] , Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
Ovalbumin, OVA Grad VI	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Filarien-Antigen	AG Hoffmann, Tropeninstitut Erlangen, BRD
Zellzähler	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
(methyl-3H)-Thymidin-Präparation	
	400µl (methyl-3H)-Thymidin Stocklösung
	19,6 ml PBS

2.15.7 Broncheo-alveoläre Lavage und Zytozentrifugation (zu Kap. 2.8)

Material wie in Kapitel 2.15.5 bereits beschrieben

2.15.8 Histologie (zu Kap. 2.9)**2.15.8.1 Präparation der Lungen (zu Kap. 2.9.1)**

Tissue Tek[®]	O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Tokyo, JPN
Kryoröhrchen	Nunc GmbH, Wiesbaden, BRD

2.15.8.2 MBP-Färbung (zu Kap. 2.9.2)

Kryostat	Leica Microsystems AG, Wetzlar, BRD
Objektträger	SuperFrost [®] Plus, Langenbrinck, Emmendingen, BRD
Erstantikörper	α-mMBP-1, zur Verfügung gestellt von J. Lee, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA
Chromotrope 2R	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Zweitantikörper	FITC-markiert, Cappel Research Reagents, ICN Biomedicals Inc., Irvine, CA, USA
UTHSCSA Image Tool 3.0	The University of Texas Health Sciences Center at San Antonio, USA
Blockierlösung	
	100 ml H ₂ Odest + 0,272 g KH ₂ PO ₄ + 2,841 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O + 5 g BSA + 0,885 g NaCl + 100µl Fisch-Gelatine. 45%ige Lösung zu 2 ml Lösung 100µl 5%iges Normal-Ziegen-Serum unmittelbar vor Gebrauch zugeben
Chromotrope 2R 1%ige Lösung in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Waschpuffer	

	5 l H ₂ Odest + 28.75 ml Puffer A (27,6 g NaH ₂ PO ₄ in 1 l H ₂ Odest, Lagerung bei 4°C) + 96,2 ml Puffer B (35,6 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in 1 l H ₂ Odest, Lagerung bei Raumtemperatur) + 22,4 g NaCl
Citifucor	Citifluor Ltd., London, UK

2.15.8.3 PAS-Färbung (zu Kap. 2.9.3)

1x Pipetten	Greiner, Nürtingen BRD
Objektträger	Langebrinck, Teningen, BRD
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD
Alzianblau 843	Chroma-Gesellschaft, Schmi + Co, BRD
Schiff'sches Reagens	Merck, Darmstadt, BRD
Periodsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Hämatoxilin-Monohydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumiodat (NaIO₃)	Merck, Darmstadt, BRD
Aluminium-Kalium-Sulfat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Xylol	Merck, Darmstadt, BRD
Vitro Clud	Langenbrinck, Emmendingen, BRD
Lösung Alzianblau	
	1% in 3% Essigsäure lösen, pH auf 2,5 mit Eisessig titrieren, filtrieren.
Lösung Mayers Hämalaun	
	1 g Hämatoxilin-Monohydrat + 0,2 g NaIO ₃ + 50 g Kali-Alaun (Aluminium-Kalium-Sulfat-Dodecahydrat) ad 1 l Aqua dest. Über Nacht bei RT rühren. Dann + 50 g Chloralhydrat + 1g Zitronensäure-Monohydrat über Nacht bei RT rühren. Lichtgeschützt bei RT aufbewahren

2.15.9 Messung der Atemwegshyperreagibilität (zu Kap. 2.10)

Bodyplethysmograph (zur Atemwegsmessung kleiner Nagetiere)	EMKA Technologies, FRA
Aerosolgenerator	Pari-Werke, Starnberg, BRD
Acrylkammer (20 x 20 x 15cm)	Eigenanfertigung der AG Hamelmann, Berlin
Methacholinchlorid MCH	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
PBS-Dulbecco (steril)	PAA Lab. GmbH, Linz, AUT

2.15.10 Immunglobulinbestimmung (zu Kap. 2.11)

Serenverdünnung OVA-behandelter Tiere	Gesamt-IgE	1:100
	OVA-spezifisches IgE	1:100
	OVA-spezifisches IgG1	1:100000
	OVA-spezifisches IgG2a	1:100
Serenverdünnung PBS-behandelter Tiere	Gesamt-IgE	1:10
	OVA-spezifisches IgE	1:2
	OVA-spezifisches IgG1	1:5
	OVA-spezifisches IgG2a	1:5
Prim. Gesamt-IgE-Aks	Anti-IgE 1:1500, Binding Site, Brimingham, UK	
Prim. OVA-spez.-IgE- Aks	Anti-IgE 4µg/ml, BD Pharmingen, San Diego, USA	
Prim. OVA-spez. IgG1- Aks	OVA VI 10µg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD	
Prim. OVA-spez. IgG2a-	OVA VI 10µg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD	

Aks		
Sek. Gesamt-IgE-Aks	Anti-IgE-Biotin 2,5µg/ml, Pharmingen, San Diego, USA	
Sek. OVA-spez. IgE-Aks	Biotiniertes OVA 6µg/ml	OVA VI Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
		Biotin Pierce, Rockford, USA
Sek. OVA-spez. IgG1-Aks	Anti-IgG1-Biotin 0,5µg/ml, BD Pharmingen, San Diego, USA	
Sek. OVA-spez. IgG2a-Aks	Anti-IgG2a-Biotin 2,5µg/ml, BD Pharmingen, San Diego, USA	
Standard Gesamt-IgE	250 ng/ml, BD Pharmingen, San Diego, USA	
Standard OVA-spez. IgE	OVA-Mausserum* 6µg/ml	
Standard OVA-spez. IgG1	OVA-spez. IgG1 340µg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD	
Standard OVA-spez. IgG2a	OVA-Mausserum* 6µg/ml	
* Laborinternes Standardserum für die Bestimmung allergenspezifischer Immunglobuline (Pool von Seren Ovalbumin sensibilisierter BALB/c Mäuse)		

2.15.11 Zytokinbestimmungen (zu Kap. 2.12)

2.15.11.1 Aufbereitung der Milzzellen (zu Kap.2.12.1)

Material wie in Kapitel 2.15.6 bereits beschrieben

2.15.11.2 Stimulation der Milzzellen (zu Kap. 2.12.2)

Material wie in Kapitel 2.15.6 bereits beschrieben

2.15.11.3 Zytokinbestimmung mittels ELISA (zu Kap. 2.12.2)

BD OptEIA™ Sets	BD Pharmingen, San Diego, USA	
IL-4-Erstantikörper	Ratten-mono-klonaler Antikörper IgG1 Klon 11B11; BD Pharmingen, San Diego, USA	
IL-5-Erstantikörper	Ratten-monoklonaler Antikörper IgG1 Klon TRFK5; BD Pharmingen, San Diego, USA	
Standards IL-4	rekombinant hergestelltes IL-4; R&D Systems Inc., Minneapolis, USA	
Standards IL-5	rekombinant hergestelltes IL-5, BD Pharmingen, San Diego, USA	
IL-4-Zweitantikörper	Ratten IgG1, Klon BVD6-24G2; BD Pharmingen, San Diego, USA	
IL-5-Zweitantikörper	Ratten IgG2a, Klon TRFK4; BD Pharmingen, San Diego, USA	
96 well Rundbodenplatten	Greiner, Nürtingen, BRD; NUNC, Roskilde, DK	
Natriumhydrogencarbonat (100mM, pH 8,2)	Serva, Heidelberg, BRD	
PBS (pH 7,0, 20fach)		
	80g NaCl	Merck, Darmstadt, BRD
	32g Na₂HPO₄	Merck, Darmstadt, BRD
	2g KCl	Merck, Darmstadt, BRD
	2g K₂HPO₄	Merck, Darmstadt, BRD
	auf 1l aqua dest	Merck, Darmstadt, BRD

Blockpuffer (pH 7,0)		
	Bovines Serumalbumin BSA, 3 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
	PBS	s.o.
Waschpuffer		
	Tween 20, 0,1 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
	PBS	s.o.
Streptavidin-Peroxidase		
	Streptavidin-Peroxidase	KPL, Maryland, USA
	3,3',5,5'Tetramethylbenzidin (TMB, 100mM)	Fluka, Neu-Ulm, BRD
	50 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, BRD
	50 % Ethanol	Merck, Darmstadt, BRD
Gallatipuffer		
	200mM Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, BRD
	4M Kaliumhydroxidlösung	
	0,01 % Wasserstoffperoxid	
	2M Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, BRD
	Dynatech MR 7000-Photometer	Dynatech, Denkdorf, BRD

2.15.12 FACS-Analyse (zu Kap. 2.13)

2.15.12.1 Messung der Oberflächenmarker (zu Kap. 2.13.1)

Propidium-Iodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD	
Antikörper TGF-β, CD3, CD4, CD69, ICOS, IgD, CD19, CD80, CD138, MHCII, CD11b, CD11c, CD86, CD45RB, CD25, TGF-β	R. A. Kroczeck, RKI, Berlin, BRD	
FACS Flow™	BD Biosciences, San Jose, USA	
Blockierlösung		
	Rat IgG	Nordic, Tilbury, NL
	α-CD32-IgG2 1 mg/ml	R. A. Kroczeck, RKI, Berlin, BRD
BD FACSalibur® Messgerät	BD Biosciences, San Jose, USA	
CellQuest®		

2.15.12.2 Messung des „Intracellular stainings“ (zu Kap. 2.13.2)

RPMI	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD	
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD	
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD	
Golgi-Stop™	BD Biosciences, San Jose, USA	
FACS-PBS		
	PBS	s.o.
	2,5% Fetales Kälber-Serum	Biochrom KG, Berlin, BRD
	0,1% NaN₃	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Blockierlösung		
	Rat IgG	Nordic, Tilbury, NL
	α-CD32-IgG2 1 mg/ml	R. A. Kroczeck, RKI, Berlin, BRD
Anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IFN-γ, anti-TGF-β	R. A. Kroczeck, RKI, Berlin, BRD	
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Biosciences, San Jose, USA	

BD Perm/Wash	BD Biosciences, San Jose, USA
BD FACSalibur[®] Messgerät	BD Biosciences, San Jose, USA
CellQuest[®]	BD Biosciences, San Jose, USA

3 Ergebnisse

Sofern nicht anders angegeben wurden für alle dargestellten Ergebnisse drei voneinander unabhängige Versuche mit jeweils 5-6 Tieren/Versuchsgruppe durchgeführt. Die Ergebnisdarstellung wird entweder als Zusammenfassung aller Versuche oder anhand repräsentativer Versuche realisiert (s. Grafiklegenden).

3.1 Immunologische Reaktion auf die Filarieninfektion

Den gesamten Untersuchungen liegen die erfolgreiche Infektion der Organismen durch das Überleben und die Entwicklung der implantierten Filarien sowie eine immunologische Reaktion des Organismus auf die Infektion zugrunde. Um beides zu überprüfen wurde sowohl am Implantationsort, der Peritonealhöhle, eine Zellbestimmung durchgeführt (Peritoneallavage, PL), die Mikrofilariämie (Daten nicht dargestellt) und filarienspezifischen Immunglobuline im peripheren Blut bestimmt und die Entwicklung eines filarienspezifischen immunologischen Gedächtnis durch Analyse der Milzzellen-Proliferation auf Filarien-Antigen anhand des Lymphozytentransformationstests überprüft. Die Ergebnisse bewiesen die erfolgreiche Implantation bzw. Immunreaktion. Des Weiteren wurden bei der Autopsie der Versuchstiere lebende Filarien in den Peritonealhöhlen gefunden (Daten nicht ausgewertet), deren Existenz die erfolgreiche Infektion untermauern.

Material der PL wurde auch einer FACS-Analyse unterzogen, die Ergebnisse hierzu dienten allerdings nicht der Implantationskontrolle, sondern der weitergehenden immunologischen Untersuchung und werden in Kapitel 3.8 behandelt.

3.1.1 Zellbestimmung in der Peritoneallavage

Eine PL wurde durchgeführt und die Zelldifferenzierungen der Gruppen mit erfolgter Filarienimplantation mit den Gruppen der Scheinimplantation verglichen. Ein Ausbleiben von Unterschieden lässt auf eine ausgebliebene zelluläre Reaktion und damit auf eine nicht erfolgreiche Implantation, z.B. durch ein vorzeitiges Absterben der Filarien, schließen.

Die Implantationsvorgänge zeigten sich als erfolgreich: Festzustellen war ein hochsignifikanter Einstrom von Entzündungszellen in den Peritonealraum durch die Filarieninfektion. Die Gesamtzellzahl stieg auf die 17fache Menge (F-/PBS: 140; F+/PBS: 2456 Zellen/Tier) an, darüber hinaus war bei den infizierten Tieren die Menge an Lymphozyten 3fach (F-/PBS: 137; F+/PBS: 421 Zellen), an neutrophilen Granulozyten 86fach (F-/PBS: 12; F+/PBS: 1040 Zellen),

an eosinophilen Granulozyten 44fach (F-/PBS: 8; F+/PBS: 355 Zellen) sowie an Makrophagen/DCs 27fach (F-/PBS: 8; F+/PBS: 222 Zellen) gegenüber den nicht-infizierten Tieren erhöht.

Aller Ergebnisse zeigten sich als signifikant bis hochsignifikant.

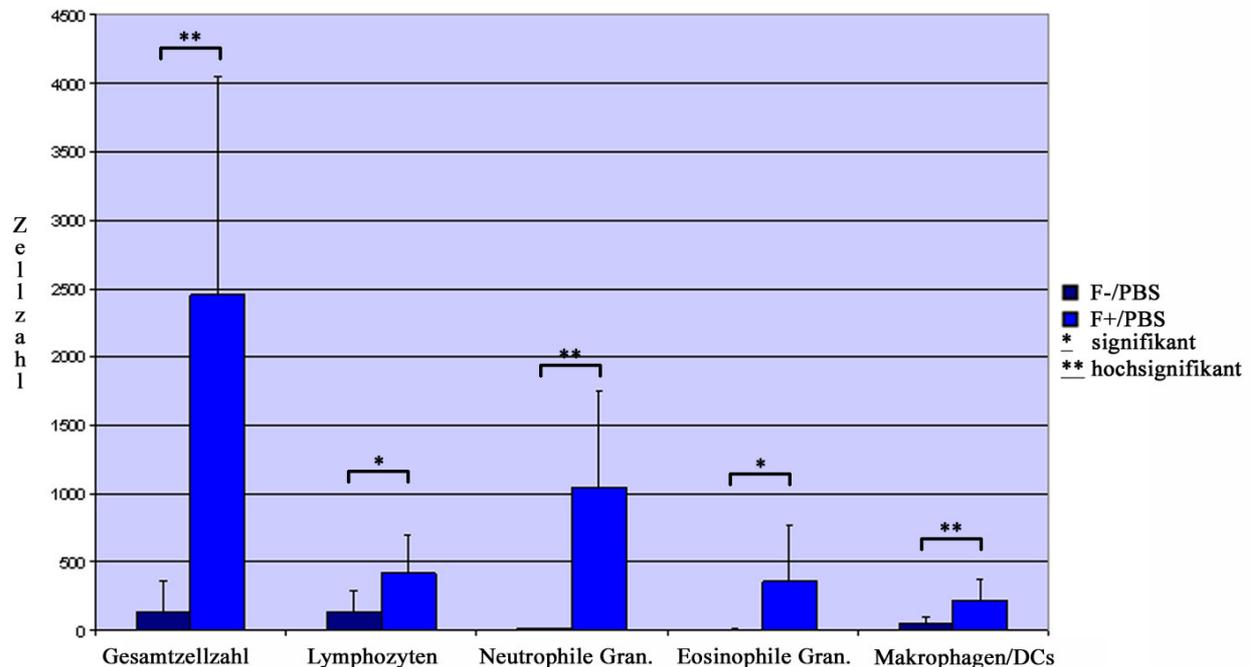


Abb.3: Auswirkungen der Filarieninfektion auf das peritoneale Zellspektrum. Sham-Operation bei Kontrollgruppe (F-/PBS) oder Implantation prämaturner Filarien (F+/PBS), Analyse der Peritoneallavage am Tag 43. Dargestellt werden Zelltypen (x-Achse) und deren absoluter Zellzahl (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt aus 3 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.1.2 Proliferation der mononukleären Milzzellen nach Stimulation mit Filarien-Antigen

Erwartet wurde eine gesteigerte Proliferationsrate der mononukleären Milzzellen nach Stimulation mit dem Filarien-Ag in der Gruppe der filarieninfizierten Tiere. Dies konnte nachgewiesen werden: In der PBS-Gruppe erhöhten sich die Stimulationindizes signifikant um den Faktor 5,8 (F-/PBS: 4,7; F+/PBS: 27 SI).

Auch bei den mit OVA behandelten Tieren hatte die Stimulation mit Filarien-Antigen eine um den Faktor 1,4 gesteigerte Proliferationsrate zur Folge (F-/OVA: 9,2; F+/OVA: 12,5 SI), allerdings erwies sich dieser Unterschied als statistisch nicht relevant.

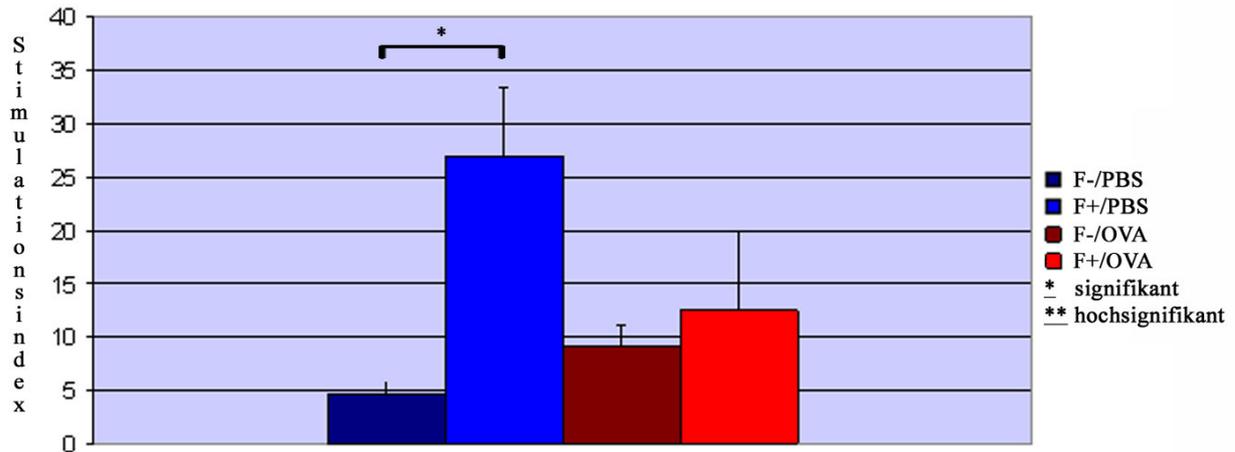


Abb.4: Auswirkung der Filarieninfektion auf die Recall-Proliferation mononukleärer Milzzellen nach Stimulation mit Filarien-Antigen. Milzzellen der Versuchstiere wurden kultiviert, mit Filarien-Antigen stimuliert und nach 24 Stunden deren Proliferationsrate mittels Lymphozytentransformationstests gemessen. Dargestellt werden die Versuchsgruppen (x-Achse) und Stimulationsindizes (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten aus einem repräsentativen Versuch bei drei durchgeführten Versuchen; $n \geq 5$ /Gruppe.

3.2 Auswirkungen der Filarieninfektion auf den asthmatischen Phänotyp

3.2.1 Zellbestimmung in der broncheo-alveolären Lavage

Für eine zytologische Analyse des Entzündungsgeschehens in den Lungen der Mäuse wurde eine BAL durchgeführt und die in der Lavageflüssigkeit enthaltenen Zellen charakterisiert und quantifiziert. Unterschieden wurde dabei zwischen Gesamtzellzahl, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Makrophagen. Zu erwarten war, dass die Behandlung mit OVA einen signifikanten Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge zur Folge hat. Die Rolle der Filarieninfektion auf dieses Geschehen sollte untersucht werden.

Die Infektion mit *Lsigmo* alleine (F-/PBS vs. F+/PBS) verursachte keinen signifikanten Einstrom von Entzündungszellen. Wie erwartet erhöhte die Behandlung mit OVA (F-/PBS vs. F-/OVA) die Gesamtzellzahl, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten hochsignifikant (mit Ausnahme der neutrophilen Granulozyten und der Makrophagen/DCs).

Dieser Anstieg jedoch wurde jeweils durch die Infektion mit *Lsigmo* stark unterdrückt. Dabei reduzierte die Infektion mit *Lsigmo* die Gesamtzellzahl auf fast ein Drittel (F-/OVA: 357,7; F+/OVA: 126 Zellen), die Lymphozyten auf etwas weniger als die Hälfte (F-/OVA: 31,3; F+/OVA 14,9 Zellen) und die Eosinophilen auf weniger als ein Zehntel (F-/OVA: 223; F+/OVA: 19,2 Zellen). Die Unterschiede erwiesen sich als hochsignifikant.

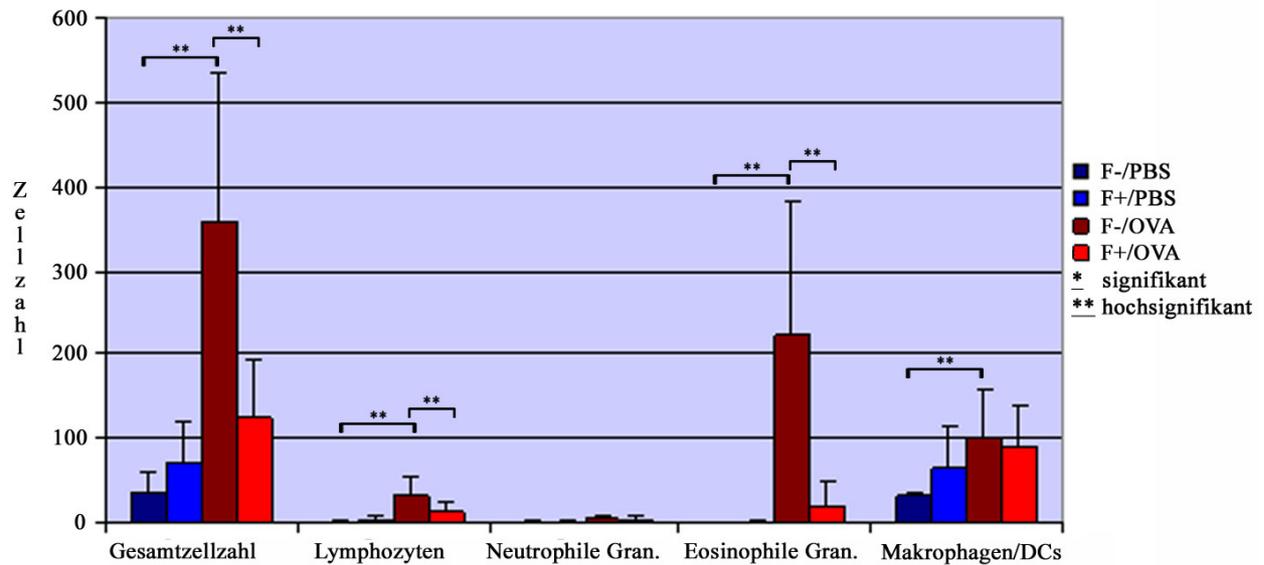


Abb.5: Auswirkungen der Filarieninfektion auf das broncheo-alveoläre Zellspektrum. Broncheo-alveoläre Lavage mit anschließender Zelldifferenzierung. Dargestellt werden die Versuchsgruppen (Legende), Zelltypen (x-Achse) und deren absolute Zellzahl (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Gepoolte Daten aus 2 Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.2.2 Lungenfunktionsmessung

Um die Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Atemwegshyperreagibilität der Versuchstiere zu ermitteln wurden die Versuchstiere in Ganzkörper-Plethysmografen mit ansteigenden Konzentrationen von MCH provoziert. Durch die Sensibilisierung und Provokation in den mit OVA behandelten Gruppen wurden hier durch die induzierte Atemwegsinfektion erhöhte Atemwegshyperreagibilitäten in Form von obstruktiven Atemwegswiderständen erwartet. Der Effekt der Filarieninfektion auf die Atemwegswiderstände sollte untersucht werden.

Die Werte der mit PBS behandelten Tiere blieben erwartungsgemäß auf niedrigem Niveau (Penh bei 50mg/ml: F-/PBS: 3,6; F+/PBS: 3,1), die Filarieninfektion beeinflusste die Penh-Werte nicht (Ergebnis ohne statistische Relevanz). Die Sensibilisierung und Provokation mit OVA führte ebenfalls erwartungsgemäß hochsignifikant zu einem starkem Anstieg der Atemwegswiderstände im Vergleich mit der Behandlung mit PBS (Penh bei 50mg/ml: F-/PBS: 3,6; F-/OVA: 8,1).

Die Infektion mit *Lsigmo* führte zu einer starken Reduktion der Atemwegsobstruktion in der Gruppe der OVA-behandelten Tiere. Dieser Effekt wurde mit steigender MCH-Konzentration bis 25 mg/ml stetig deutlicher, bis die Atemwegsobstruktion durch die Filarieninfektion bei einer MCH-Konzentration von 50 mg/ml schließlich signifikant um mehr als ein Drittel gesenkt wurde (Penh bei 50mg/ml: F-/OVA: 8,1; F+/OVA: 5,2).

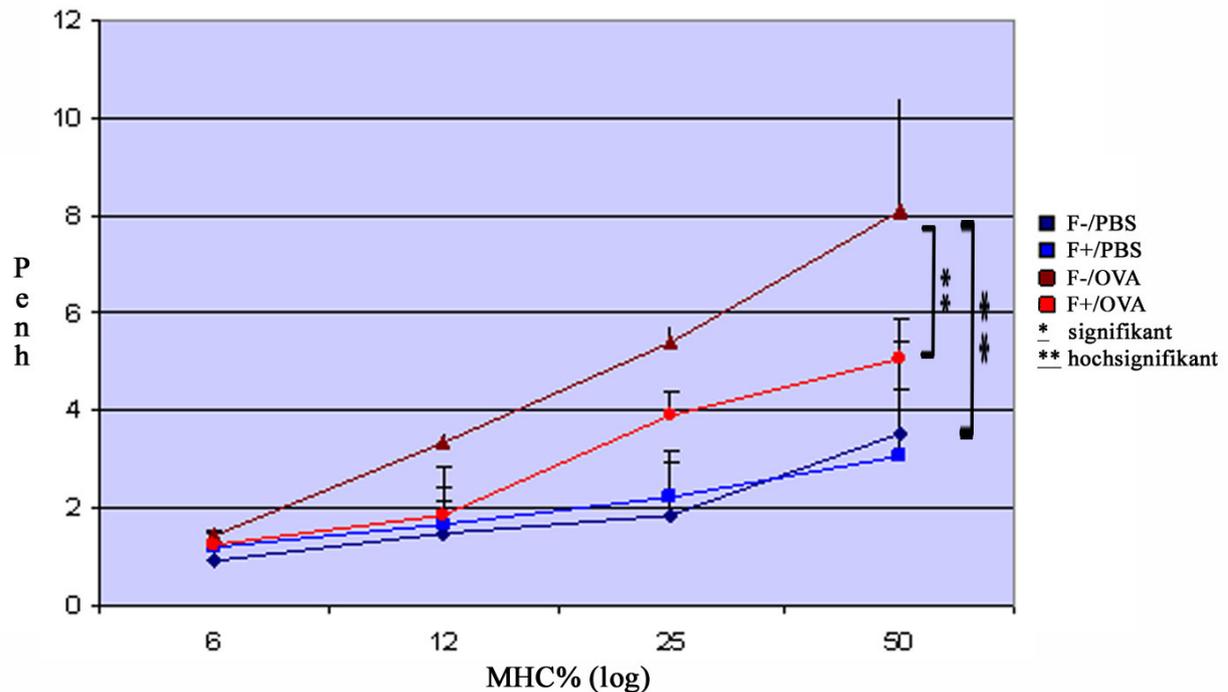


Abb.8: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Atemweghyperreagibilität. Sensibilisierung und Provokation der Atemwege durch OVA in der Versuchsgruppe, PBS in der Kontrollgruppe. Atemwegswiderstandsmessung in Ganzkörper-Plethysmografen unter steigender MCH-Konzentration. Messwerte dargestellt als Penh. Dargestellt werden die Penh-Werte (y-Achse) in Abhängigkeit der MCH-Konzentration (x-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt aus 3 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.3 Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Lungenhistologie

Die Lungen der Versuchstiere wurden histologisch aufbereitet und sowohl mit Hilfe der Major-Basic-Protein-Färbung (MBP-Färbung) auf gewebständige Eosinophile als auch durch die Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung) auf die Mukusproduktion hin ausgewertet.

Die Ergebnisse werden durch repräsentative Bilder der Schnitte und die durchschnittlichen Zellzahlen pro Bronchus in Tabellenform präsentiert.

3.3.1 MBP-Färbung (Immunfluoreszenz-Histologie)

Um das Ausmaß der eosinophilen Atemwegsinfektion anhand des Vorhandenseins gewebständiger eosinophiler Granulozyten zu ermitteln wurden jene mittels eines fluoreszenzgelabelten, eosinophilspezifischen Antikörpers sichtbar gemacht und quantitativ ausgewertet. Erwartet wurden wenige Zellen in den mit PBS behandelten Tieren und eine im Vergleich dazu höhere Anzahl in den mit OVA behandelten Tieren. Der Effekt der Infektion mit *Lsigmo* in den mit OVA behandelten Tieren sollte evaluiert werden.

Wie erwartet wurde durch die Behandlung mit PBS keine Veränderung festgestellt (F-/PBS: 7,6; F+/PBS: 7,5 Zellen), die Behandlung mit OVA führte zu einer Vervielfachung der Zellzahl um

den Faktor 9 (F-/OVA: 60,4 Zellen). Die Infektion mit *Lsigmo* reduzierte die Eosinophilenzahl in den mit OVA behandelten Tieren dagegen deutlich, und zwar um 75% (F+/OVA: 14,3 Zellen). Alle Unterschiede zeigten sich als hochsignifikant.

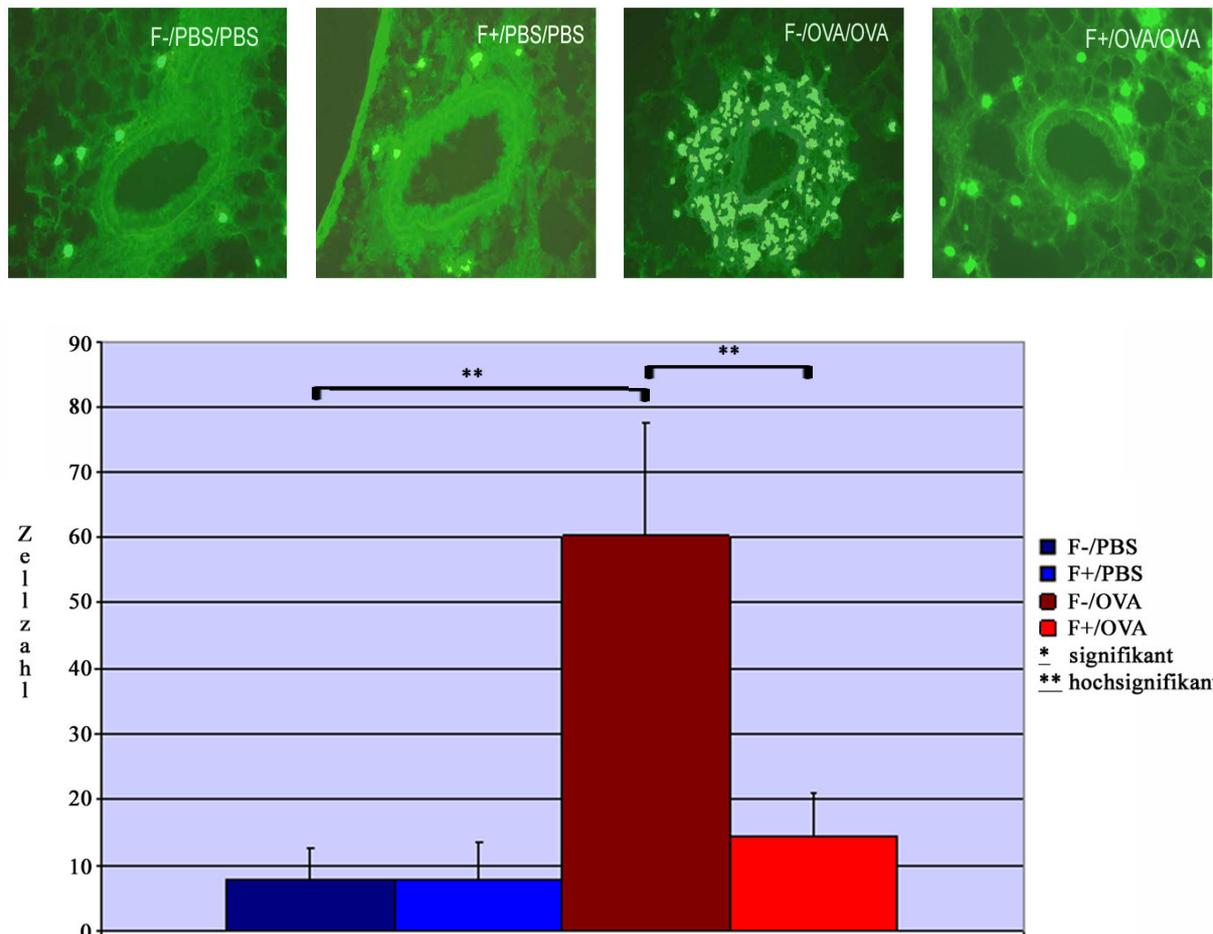


Abb.6: Auswirkung der Filarieninfektion auf die Anzahl gewebständiger eosinophiler Granulozyten in der Lunge. Bronchienquerschnitte der Versuchstiere wurden mittels MBP-Färbung gefärbt und die fluoreszenzgelabelten eosinophilen Granulozyten (hell leuchtend) ausgezählt. Dargestellt werden je ein repräsentativer Schnitt der 4 Versuchsgruppen F-/PBS, F+/PBS, F-/OVA und F+/OVA (siehe Bilder) sowie die Zellzahlen in Grafikform mit Versuchsgruppen (x-Achse) und absoluten Zellzahlen (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt von 2 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe, 10 Schnitte pro Tier ausgezählt.

3.3.2 Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung)

Die Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung) ist eine Spezialfärbung für die Differenzierung von Glykoproteinen. Beim hier verwendeten pH-Wert von 2,5 färben sich alle sauren Muzine dunkelblau, während sich neutrale Muzine rot darstellen. Der Nachweis saurer Muzine wiederum lässt auf aktive Mukuszellen schließen, die für die pulmonale Schleimproduktion verantwortlich sind.

Auch hier zeigte sich der stark reduzierende Effekt der Filarieninfektion: Wie erwartet wiesen die mit PBS behandelten Tiere keine bis kaum aktive Mukuszellen (F-/PBS: 0, F+/PBS: 2,5

Zellen) und die mit OVA behandelten Tiere eine starke Aktivierung der Mukuszellen auf (F-/OVA: 58,5 Zellen). Die Filarieninfektion verringerte die Aktivierung der Mukuszellen auf weniger als die Hälfte des Vergleichswertes (F-/OVA: 58,5; F+/OVA: 23,1 Zellen).

Die Ergebnisse erwiesen sich als hochsignifikant.

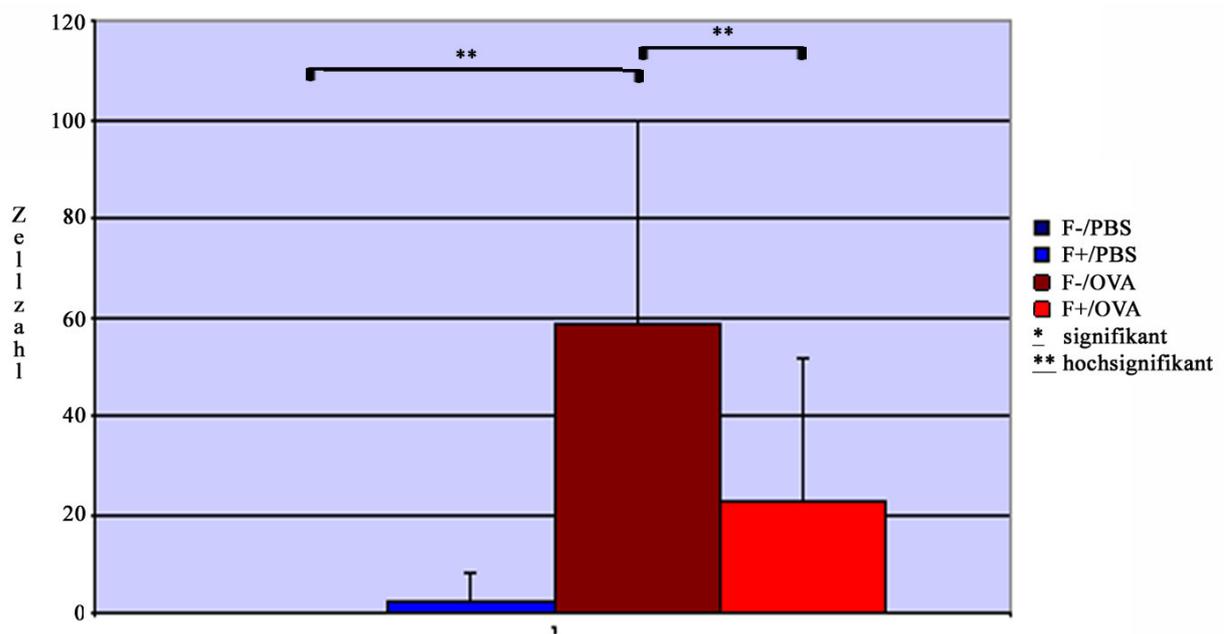
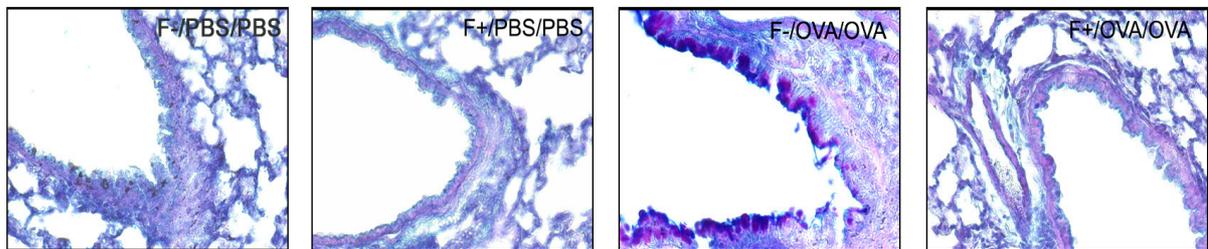


Abb.7: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Anzahl aktiver Mukuszellen des Bronchialsystems. Bronchienquerschnitte der Versuchstiere wurden mittels PAS-Färbung gefärbt und die aktiven Mukuszellen (dunkelviolett) ausgezählt. Dargestellt werden je ein repräsentativer Schnitt der 4 Versuchsgruppen F-/PBS, F+/PBS, F-/OVA und F+/OVA (siehe Bilder) sowie die Zellzahlen in Grafikform mit Versuchsgruppen (x-Achse) und absoluten Zellzahlen (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt von 2 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe, 10 Schnitte pro Tier ausgezählt.

3.4 Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Serum-Immunglobuline

Um die Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Immunglobulinproduktion der Versuchsgruppen zu bestimmen, wurden das Gesamt-IgE und die allergenspezifischen Immunglobulin-Level von IgE, IgG1 sowie IgG2a im Serum der Tiere bestimmt.

Dabei zeigte sich eine generelle Steigerung der Gesamt-IgE Konzentration durch die Filarieninfektion (sowohl in der PBS-, als auch in der OVA-Gruppe), jedoch gleichzeitig die Reduktion der allergenspezifischen IgE und IgG-Konzentrationen durch die Filarieninfektion.

3.4.1 Gesamt-IgE

Wie erwartet produzierten filarieninfizierte Tiere 3 (F-/OVA: 711; F+/OVA: 2251 ng/ml) bzw. 7 (F-/PBS = 152; F+/PBS: 1043 ng/ml) mal mehr IgE-Antikörper (Gesamt-IgE) als Tiere aus den jeweiligen Kontrollgruppen. Die IgE-Konzentrationen der mit Ovalbumin behandelten Tiere lagen dabei über denen der mit PBS behandelten.

Da es allerdings innerhalb der Versuchgruppen zu großen Schwankungen der IgE-Niveaus kam, konnte keine statistische Relevanz festgestellt werden.

3.4.2 OVA-spezifisches IgE

Erwartungsgemäß war bei den mit PBS behandelten Tieren kein OVA-spezifisches IgE nachweisbar (F- PBS und F+/PBS: 0 ng/ml).

Die Behandlung mit OVA führte dagegen in den jeweiligen Gruppen zu einem deutlichen Anstieg des OVA-spezifischen IgEs (F-/OVA: 2097 ng/ml). Die Infektion mit *Lsigmo* reduzierte diesen Effekt allerdings auf weniger als ein 20stel, also um mehr als 95% (F+/OVA: 90 ng/ml). Alle gemessenen Unterschiede erwiesen sich als hochsignifikant.

3.4.3 OVA-spezifisches IgG1

Wie zu erwarten wiesen die mit PBS behandelten Gruppen ebenfalls kein OVA-spezifisches IgG1 auf (F- PBS und F+/PBS: 0 ng/ml).

Die Behandlung mit OVA führte in der Gruppe F-/OVA zu einem deutlichen Anstieg des OVA-spezifischen IgG1s (F-/OVA: 100200 ng/ml), die Infektion mit *Lsigmo* reduzierte diesen Effekt auf weniger ein Viertel, also um mehr als 75% (F+/OVA: 23200 ng/ml).

Alle gemessenen Unterschiede erwiesen sich als hochsignifikant.

3.4.4 OVA-spezifisches IgG2a

Auch in dieser Messung wurden in der PBS-Gruppe keine allergenspezifischen Immunglobuline gefunden.

Die Behandlung mit OVA führte in der Gruppe F-/OVA zu einem signifikanten Anstieg des OVA-spezifischen IgG2as (F-/OVA: 355 ng/ml). Die Infektion mit *Lsigmo* reduzierte diesen Effekt auf weniger ein Fünftel, also um mehr als 80% (F+/OVA: 67 ng/ml).

Allerdings erwies sich dieser Unterschied wiederum durch Schwankungen innerhalb der Versuchgruppen als nicht signifikant.

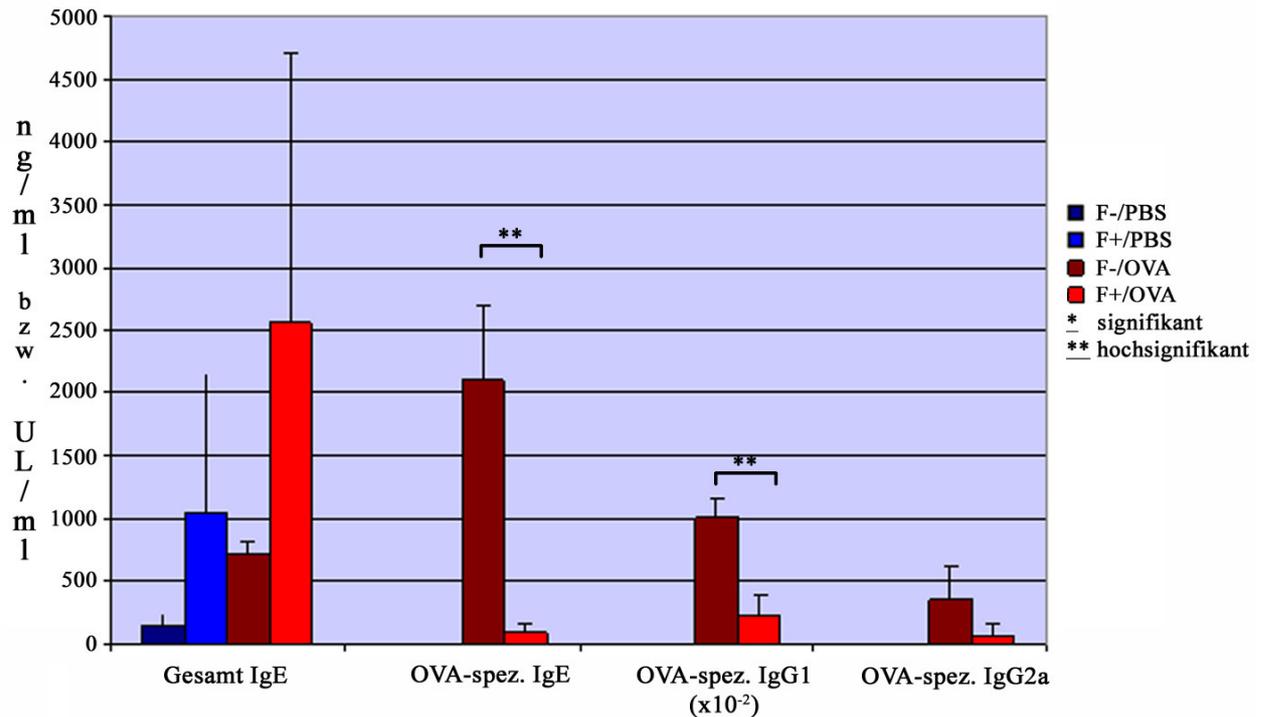


Abb.11: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die allergenspezifische Immunglobulinproduktion. Immunglobulinanalyse aus venösem Blut der Versuchstiere mittels ELISA. Dargestellt werden die Versuchsgruppen (Legende), Gesamt-IgE und allergenspezifisches Ig (IgE, IgG1, IgG2a) (x-Achse) und deren Menge in ng/ml (Gesamt IgE und IgG1) bzw. LU/ml (OVA-spez. IgE und IgG2a) (y-Achse); IgG1 als 10-Logarithmus. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt aus 2 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.5 Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Milzzellfunktion

3.5.1 Antigen-spezifische Proliferation

Durch die Stimulation mit dem Allergen OVA sollte die Auswirkung der Filarieninfektion auf das antigenspezifische Proliferationsverhalten der mononukleären Milzzellen der mit PBS bzw. OVA behandelten Gruppen untersucht werden. Erwartet wurde das Ausbleiben einer Veränderung in der PBS-Gruppe und die Erhöhung der Proliferationsrate in der OVA-Gruppe. Die Auswirkungen der Filarieninfektion auf diesen Effekt galt es zu untersuchen.

Erwartungsgemäß reagierten die Milzzellen der auf OVA sensibilisierten Tiere mit einer drastischen Steigerung ihrer Proliferationsrate um den Faktor 13 (Stimulationsindizes F-/PBS: 1,5; F-/OVA: 19,5). Dieser Effekt wurde jedoch durch die Infektion mit *Lsigmo* wieder um 2/3 reduziert (F-/OVA: 19,5; F+/OVA: 6,9 SI), und damit auf beinahe ähnliche Werte reduziert, die auch in den mit PBS behandelten Tieren zu finden waren (F+/PBS: 4,5 SI). Festzustellen allerdings war auch, dass allein schon die Infektion mit *Lsigmo* generell die Proliferationsrate leicht ansteigen ließ (F-/PBS: 1,5; F+/PBS 4,5 SI).

Die Resultate erwiesen sich als hochsignifikant.

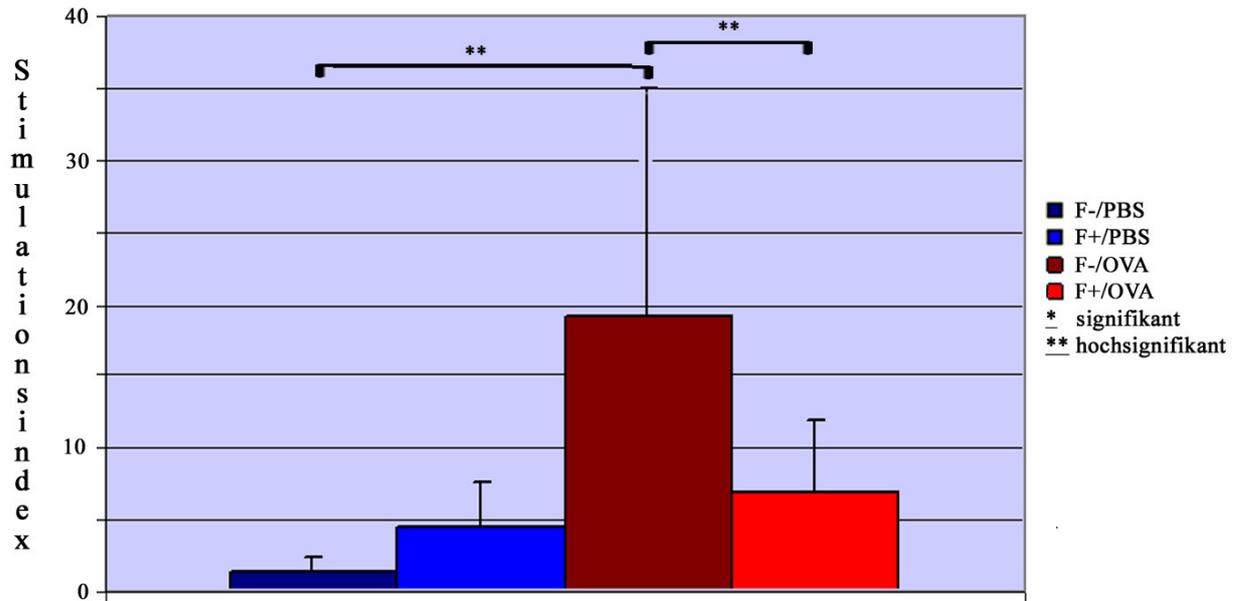


Abb.9: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Recall-Proliferation mononukleärer Milzzellen nach Stimulation mit OVA. Milzzellen der Versuchstiere wurden kultiviert, mit OVA stimuliert und ihre Proliferationsrate nach 72 Stunden mittels Lymphozytentransformationstest gemessen. Dargestellt werden die Versuchsgruppen (x-Achse) und Stimulationsindizes (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten aus einem repräsentativen Versuch; $n \geq 5$ /Gruppe.

3.5.2 Unspezifische Proliferation

Um festzustellen ob die Proliferationsrate durch die Filarieninfektion nur antigenspezifisch oder auch generalisiert reduziert wird, wurden die Milzzellen mit dem unspezifischen Mitogen ConA stimuliert, das die Proliferation aller Milzzellen unabhängig von spezifischen Antigenkontakten induziert.

Obwohl aufgrund hoher Schwankungen die statistische Relevanz ausblieb, wurde ein stark reduzierender Effekt auf die Proliferationsrate durch die Infektion mit *Lsigmo* beobachtet, sowohl in der PBS- als auch in der OVA-Gruppe (Stimulationsindizes der Gruppen F-/PBS: 775,8; F+/PBS: 245,5; F-/OVA: 881,0; F+/OVA: 51,8).

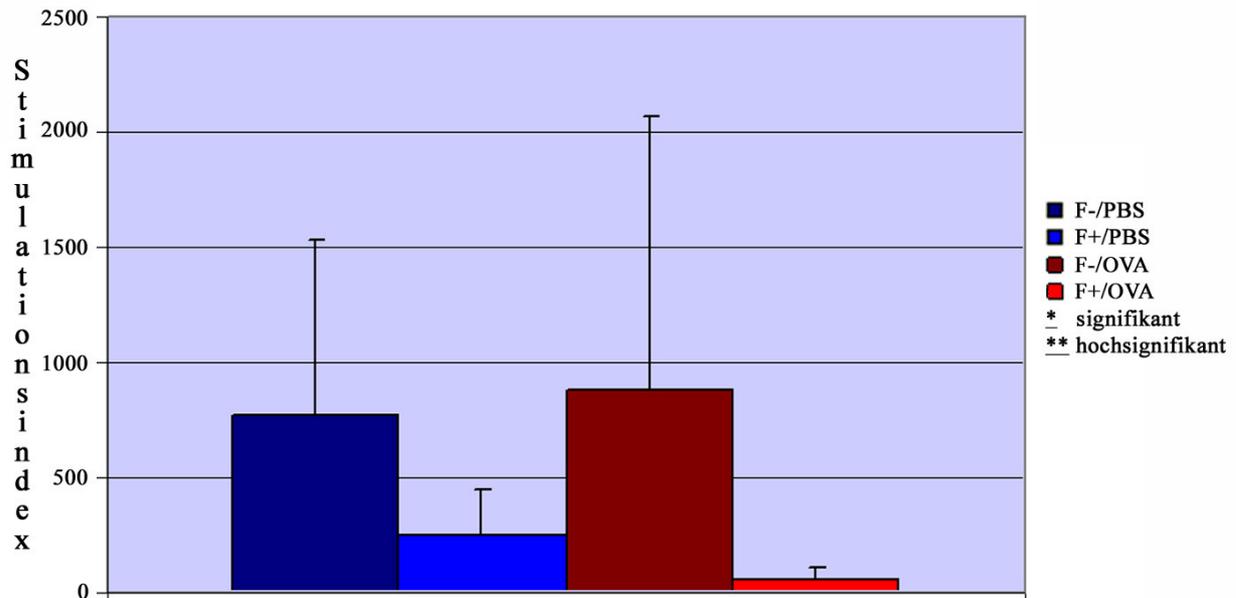


Abb.10: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Recall-Proliferation mononukleärer Milzzellen nach Stimulation mit ConA. Milzzellen der Versuchstiere wurden kultiviert, mit ConA stimuliert und ihre Proliferationsrate nach 24 Stunden mittels Lymphozytentransformationstest gemessen. Dargestellt werden die Versuchsgruppen (x-Achse) und Stimulationsindizes (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten aus einem repräsentativen Versuch; $n \geq 5$ /Gruppe.

3.5.3 Allergenspezifische Th1- und Th2-Zytokinproduktion

Um weitere Einblicke in die Immunreaktion der Mäuse zu erlangen, wurde das Zytokinprofil entnommener Milzzellen untersucht. Diese wurden hierfür mit OVA stimuliert und ihre Zytokinprofile nach 48 sowie 96 Stunden ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die stärkste Reaktion jeweils nach 96 Stunden stattfand, weshalb im Folgenden zwecks Übersichtlichkeit auch nur jene Ergebnisse präsentiert werden.

Untersucht wurden hierbei $\text{IFN-}\gamma$ als Th-1 Zytokin sowie die Th-2 typischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie IL-10 und TGF- β als so genannte „regulatorische“ Zytokine.

Zusätzlich zu der Stimulation mit OVA wurde eine Positivkontrolle mit ConA durchgeführt, um die Fähigkeit der Milzzellen zur kompletten Zytokinproduktion zu überprüfen. Diese konnte nachgewiesen werden, die Ergebnisse werden hier zugunsten der Übersicht nicht dargestellt.

3.5.3.1 IL-4

Bei den PBS behandelten Tiere konnte keine oder kaum IL-4 Produktion festgestellt werden (F-PBS: 0 pg/ml; F+/PBS: 6 pg/ml). Die Behandlung der Tiere mit OVA hatte einen deutlichen Anstieg der IL-4-Produktion zur Folge (F-/OVA: 118 pg/ml). Die Infektion mit *Lsigmo* führte die IL-4-Produktion in der Versuchsgruppe (F+/OVA) wieder auf Mengen nahe der Nachweisgrenze zurück (F+/OVA: 11 pg/ml).

Weder die Behandlung durch PBS noch die Infektion mit Filarien hatte eine erhöhte IL-4-Produktion zur Folge (F-/PBS: 0 pg/ml; F+/PBS: 6 pg/ml).

Alle gemessenen Unterschiede zeigten sich als hochsignifikant.

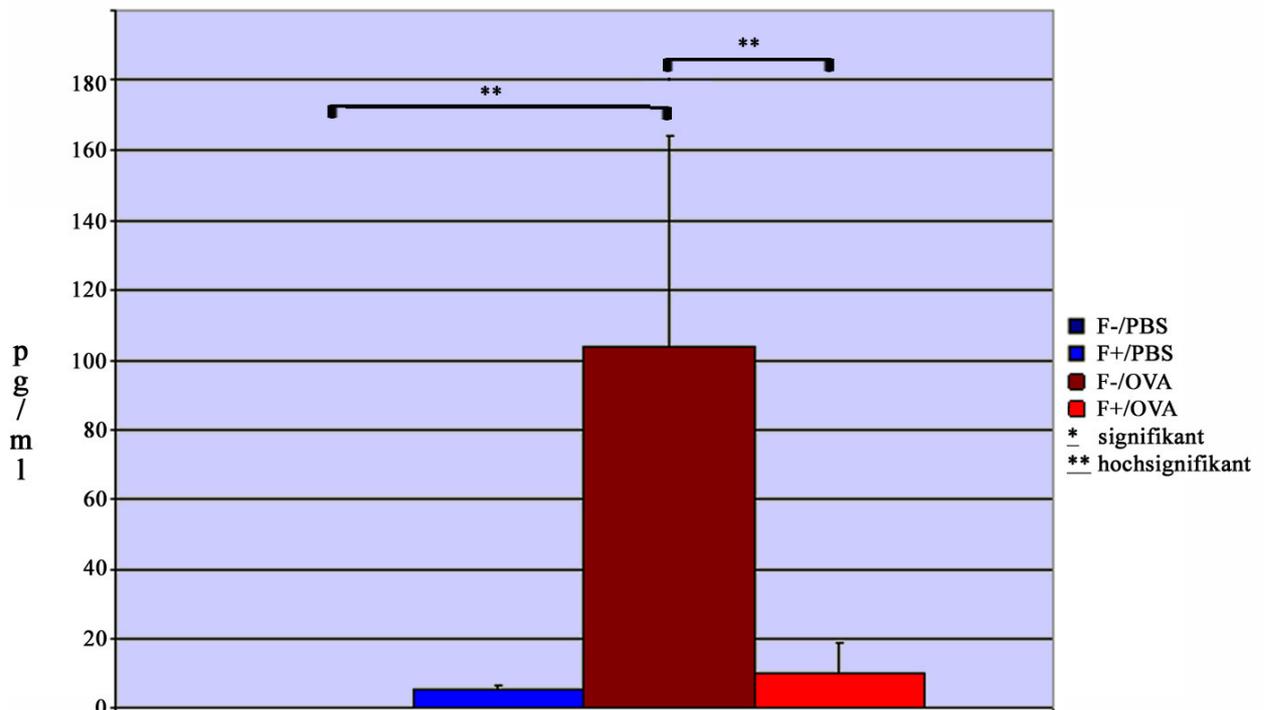


Abb.12: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die IL-4-Produktion nach Stimulation mononukleärer Milzzellen mit OVA. Milzzellen der Versuchstiere wurden kultiviert, mit OVA stimuliert und ihre IL-4-Produktion nach 96 Stunden mittels ELISA gemessen. Dargestellt werden die Ergebnisse der Versuchsgruppen (x-Achse) und die Menge an produziertem Zytokin in pg/ml (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt aus 3 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.5.3.2 IL-5

Auch hier konnte bei den mit PBS behandelten Tiere keine oder kaum IL-5 Produktion festgestellt werden (F-PBS: 0 pg/ml; F+/PBS: 10 pg/ml). Die Sensibilisierung der Mäuse mit OVA führte zu einem starken Anstieg der IL-5 Sekretion (F-/ OVA: 1561 pg/ml), dieser Effekt wurde wiederum durch die Filarieninfektion stark um mehr als 2/3 reduziert (F+/OVA: 478 pg/ml).

Alle gemessenen Unterschiede erwiesen sich als hochsignifikant.

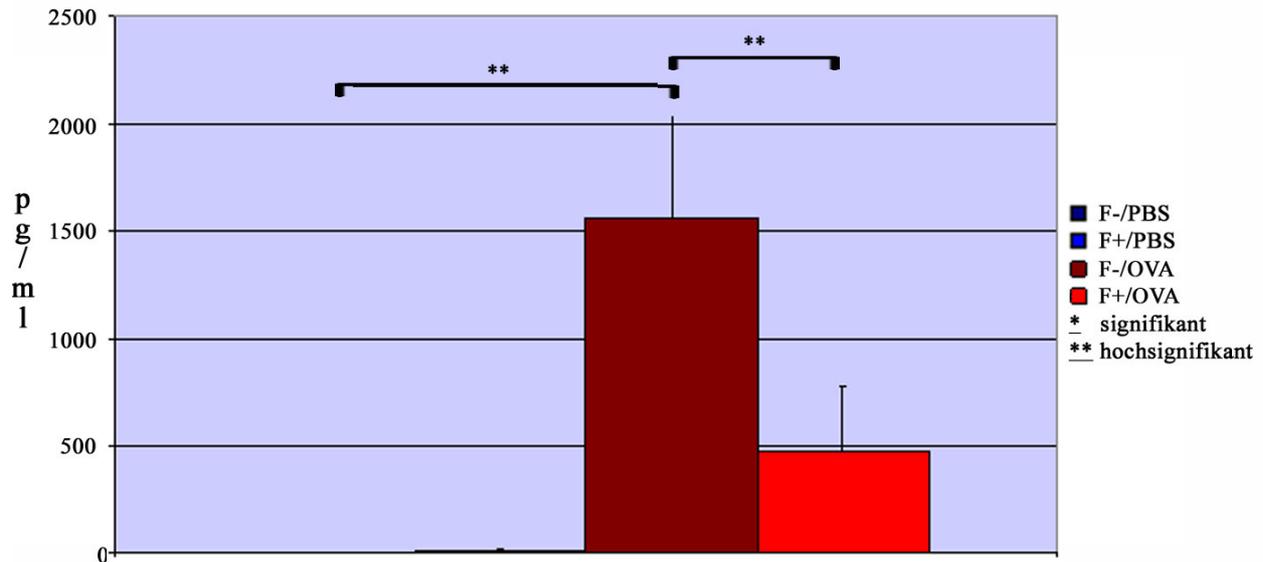


Abb.12: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die IL-5-Produktion nach Stimulation mononukleärer Milzzellen mit OVA. Milzzellen der Versuchstiere wurden kultiviert, mit OVA stimuliert und ihre IL-5-Produktion nach 96 Stunden mittels ELISA gemessen. Dargestellt werden die Ergebnisse der Versuchsgruppen (x-Achse) und die Menge an produziertem Zytokin in pg/ml (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt aus 3 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.5.3.3 IFN- γ

Die Infektion mit *Lsigmo* hatte einen starken Anstieg der INF- γ -Produktion in der PBS-Gruppe zur Folge (F-/PBS: 0 pg/ml; F+/PBS: 506 pg/ml). Auch die reine Behandlung mit OVA hatte eine erhöhte TGF- β -Produktion zur Folge, wenn auch nicht eine so starke (F-/OVA: 196 pg/ml). Diese wurde durch die Filarieninfektion um rund die Hälfte reduziert (F+/OVA: 111 pg/ml). Diese Unterschiede stellten sich als hochsignifikant heraus.

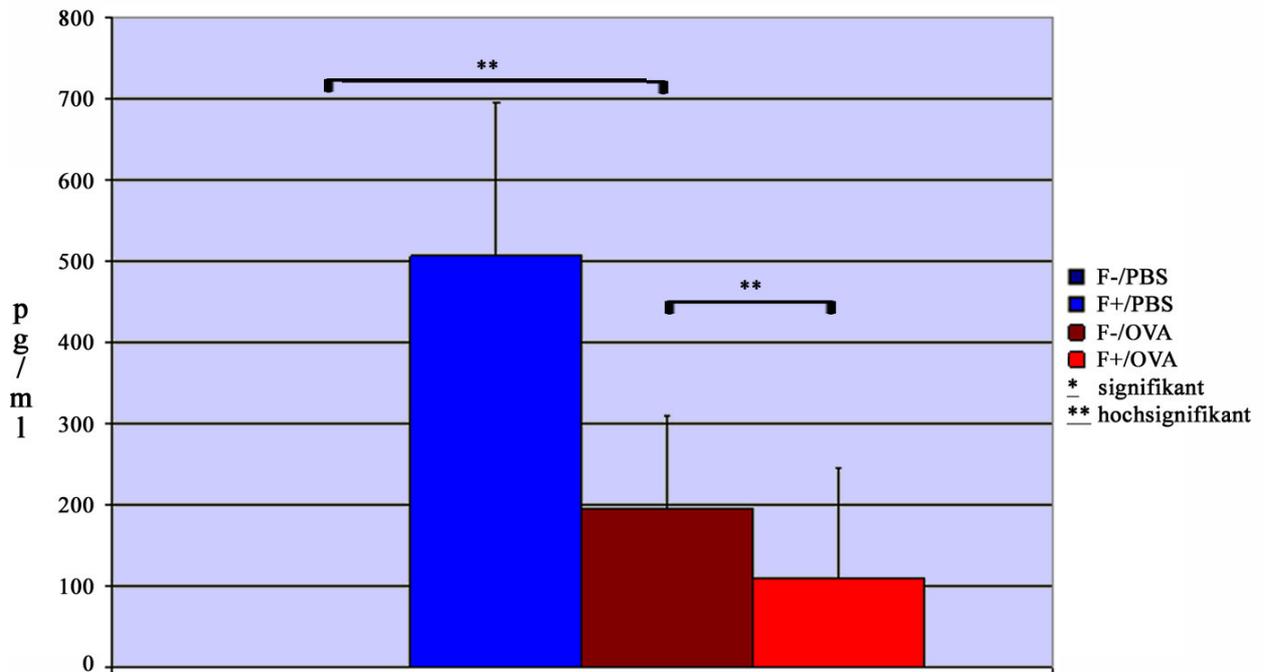


Abb.15: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die INF- γ -Produktion nach Stimulation mononukleärer Milzzellen mit OVA. Milzzellen der Versuchstiere wurden kultiviert, mit OVA stimuliert und ihre INF- γ -Produktion nach 96 Stunden mittels ELISA gemessen. Dargestellt werden die Ergebnisse der Versuchsgruppen (x-Achse) und die Menge an produziertem Zytokin in pg/ml (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt aus 3 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.5.4 Regulatorische Zytokine

Da die in der klassischen Hygienehypothese postulierte Th1/Th2-Imbalance durch die Ergebnisse dieses Experiments nicht nachzuweisen war, wurde die Zytokinuntersuchung um die regulatorischen Zytokine erweitert.

3.5.4.1 IL-10

Die Milzzellen der mit PBS behandelten Tieren zeigten keine IL-10 Produktion (F-PBS und F+/PBS: 0 pg/ml). Dagegen hatte die Behandlung mit OVA einen deutlichen Anstieg der IL-10-Produktion zur Folge (F-/OVA: 1982 pg/ml), die jedoch durch die Filarieninfektion stark reduziert wurde (F+/OVA: 148 pg/ml). Dies entspricht einer Reduktion um den Faktor 13,3.

Beide Unterschiede waren hochsignifikant.

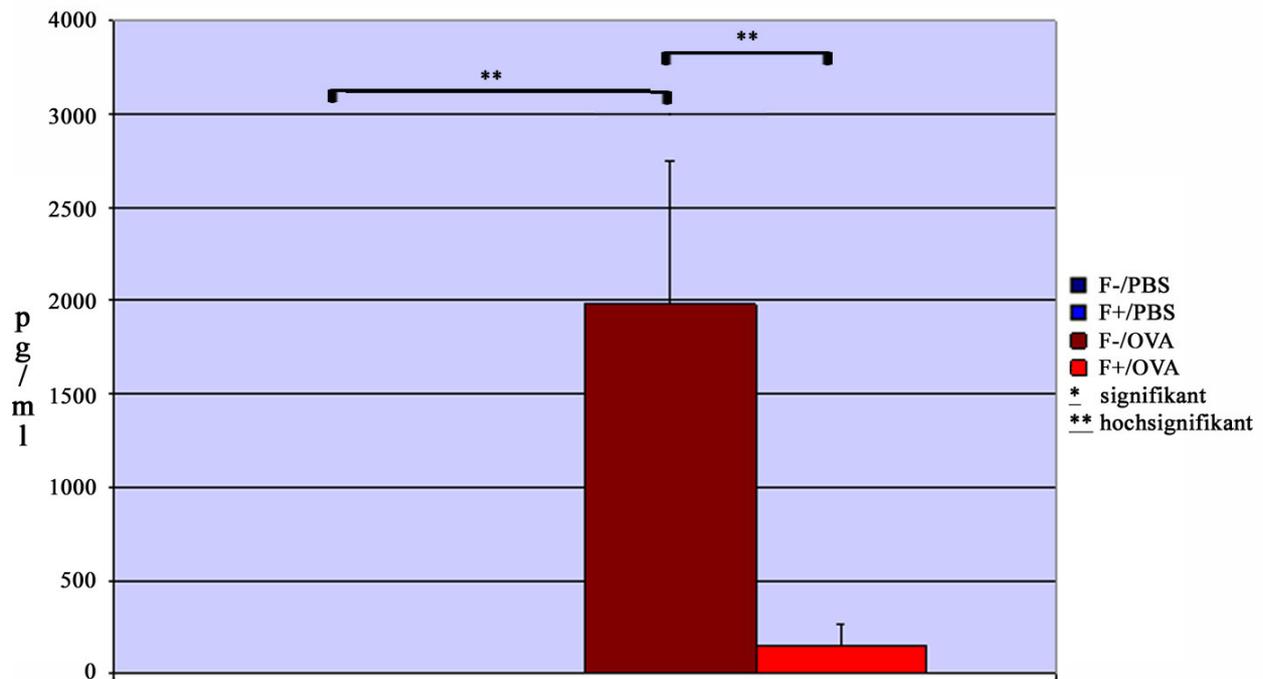


Abb.13: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die IL-10-Produktion nach Stimulation mononukleärer Milzzellen mit OVA. Milzzellen der Versuchstiere wurden kultiviert, mit OVA stimuliert und ihre IL-10-Produktion nach 96 Stunden mittels ELISA gemessen. Dargestellt werden die Ergebnisse der Versuchsgruppen (x-Achse) und die Menge an produziertem Zytokin in pg/ml (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt aus 3 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.5.4.2 TGF- β

Die Infektion mit *Lsigmo* hatte einen starken Anstieg der TGF- β -Produktion zur Folge (F-/PBS: 0 pg/ml; F+/PBS: 2784 pg/ml). Auch die reine Behandlung mit OVA hatte eine TGF- β -Produktion zur Folge, wenn auch nicht eine so starke (F-/OVA: 1010 pg/ml). Diese wurde durch die Filarieninfektion zusätzlich gesteigert (F+/OVA: 1660 pg/ml).

Diese Unterschiede stellten sich als hochsignifikant heraus.

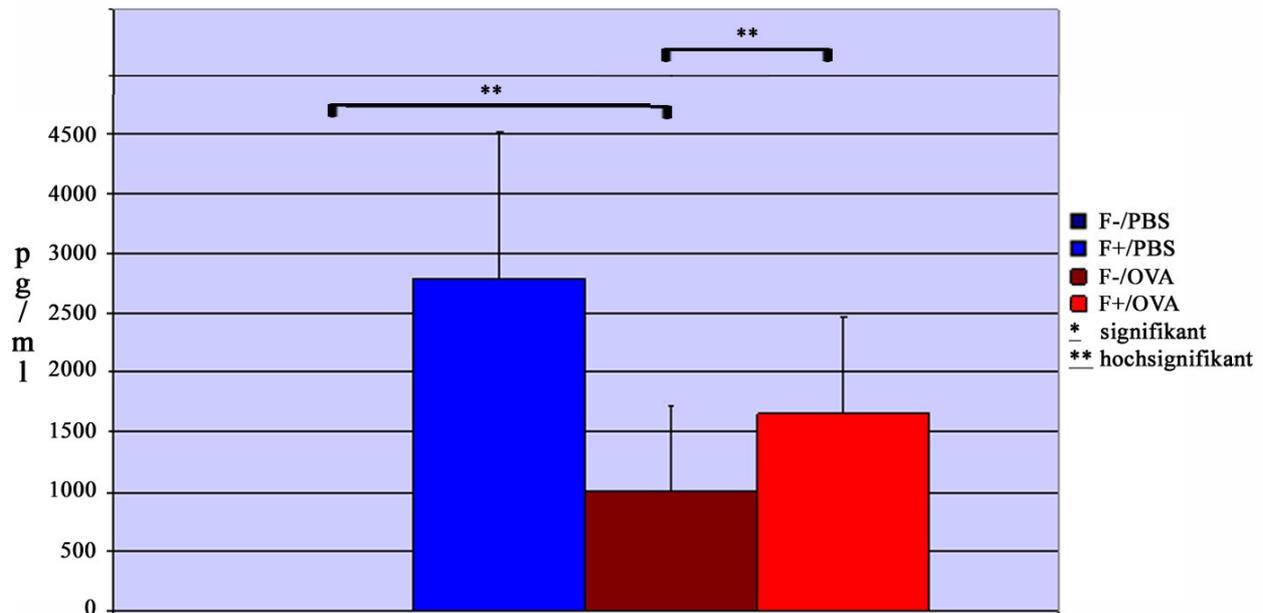


Abb.14: Auswirkungen der Filarieninfektion auf die TGF- β -Produktion nach Stimulation mononukleärer Milzzellen mit OVA. Milzzellen der Versuchstiere wurden kultiviert, mit OVA stimuliert und ihre TGF- β -Produktion nach 96 Stunden mittels ELISA gemessen. Dargestellt werden die Ergebnisse der Versuchsgruppen (x-Achse) und die Menge an produziertem Zytokin in pg/ml (y-Achse). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$. Daten gepoolt aus 3 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 5$ /Gruppe.

3.6 Auswirkungen der Filarieninfektion auf die Leukozytensubpopulationen

Um Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen der oben aufgeführten Zytokinprofile zu gewinnen, wurden die Leukozytensubpopulationen sowohl in der Peritoneallavage (Ort der Infektion mit *Lsigmo*) als auch in der Milz (Ort der systemischen Immunantwort) mittels FACS-Analysen näher gehend untersucht. Dafür wurden die Zellen mit Oberflächenmarkern markiert und in einem Durchflusszytometer quantitativ gemessen.

Im Folgenden werden aus Gründen der Übersicht nicht alle Resultate aufgeführt, sondern nur die für die Fragestellung der Arbeit wichtigsten Befunde.

3.6.1 Peritoneallavage

3.6.1.1 Aktivierte T-Helferzellen

Die Anzahl der aktivierten T-Helferzellen in der mit OVA sensibilisierten Gruppen stieg durch die Infektion mit Filarien deutlich an. So zeigte sich in der ICOS-exprimierenden Gruppe ein Anstieg um den Faktor 10,5 (F-/OVA: 0,8%; F+/OVA: 8,4%).

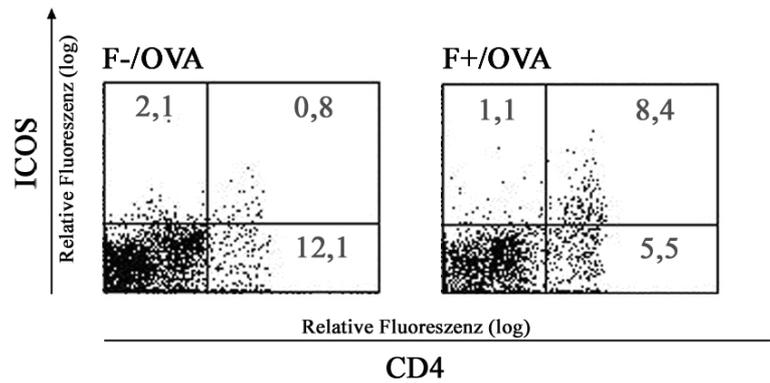
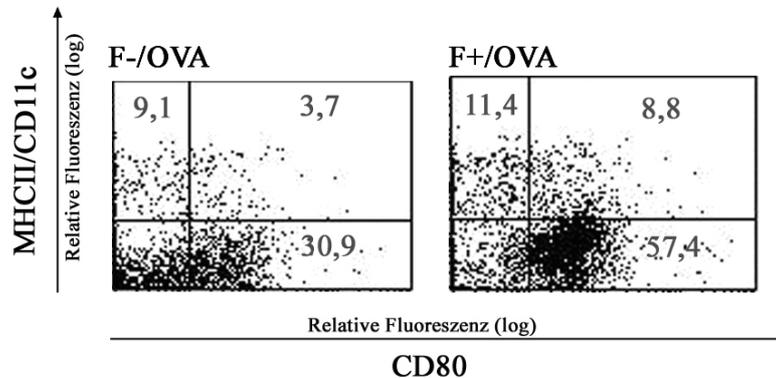


Abb.16: FACS-Analyse des Aktivierungsstatus von T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation in der Peritoneallavage. Gating auf lebendige T-Helferzellen (CD4⁺) und Expression des Aktivierungsmarkers ICOS. Angabe in Prozent, gates in der rechten oberen Ecke zeigt das Vorkommen von Zellen mit beiden Markern. Gezeigt werden repräsentative Darstellungen eines Tieres mit $n \geq 5$ /Gruppe und Versuch.

3.6.1.2 Aktivierte dendritische Zellen

Die Anzahl der aktivierten Dendritenzellen in der mit OVA sensibilisierten Gruppe stieg durch die Infektion mit Filarien deutlich an. So zeigte sich in der CD80-exprimierenden Gruppe ein Anstieg um den Faktor 2,4 (F-/OVA: 3,7%; F+/OVA: 8,8%), in der CD86-exprimierenden Gruppe um den Faktor 2,3 (F-/OVA: 6,4%; F+/OVA: 14,7%) und in der ICOSL-exprimierenden Gruppe um den Faktor 1,3 (F-/OVA: 5,4%; F+/OVA: 7,0%)



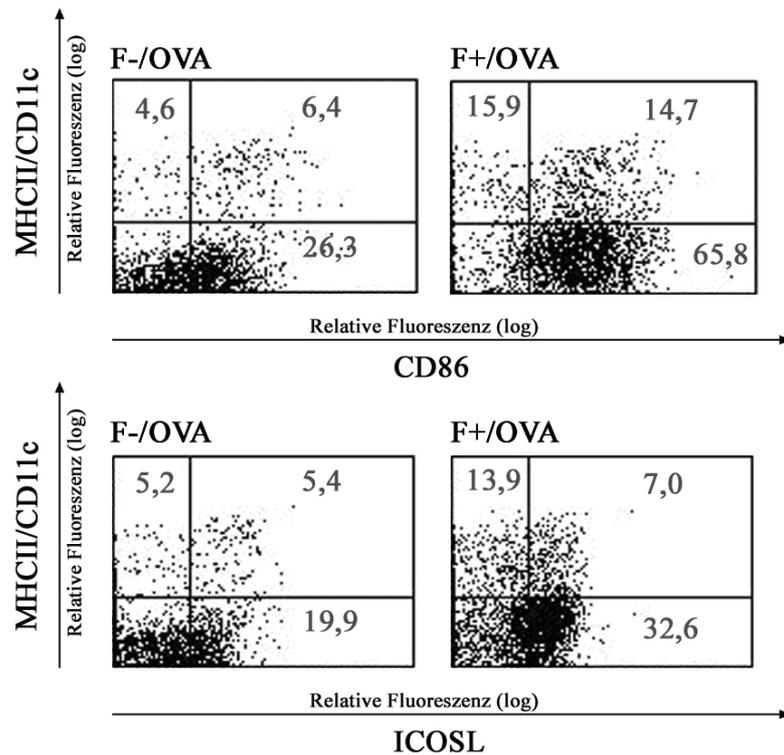


Abb.17: FACS-Analyse des Aktivierungsstatus von dendritischen Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation in der Peritoneallavage. Gating auf lebendige dendritische Zellen (MHCII/CD11c) und Exprimierung von Aktivierungsmarkern (CD80, CD86, ICOSL). Angabe in Prozent, gates in der rechten oberen Ecke zeigt das Vorkommen von Zellen mit beiden Markern. Gezeigt werden repräsentative Darstellungen eines Tieres mit $n \geq 5$ /Gruppe und Versuch.

3.6.2 Milzzellen

Die Milz als Ort der systemischen Immunreaktion bietet einen für die Fragestellungen dieser Arbeit besonders interessanten Einblick in das Immungeschehen, da hier der Hauptkontakt zwischen den eingewanderten antigenpräsentierenden Zellen und den unreifen T-Helferzellen stattfindet.

Gesucht wurde u.a. nach Auffälligkeiten in der Population der dendritischen Zellen sowie der T-Helferzellen, gefunden wurde eine verstärktes Vorkommen von Tregs, insbesondere TGF- β -exprimierender Tregs.

3.6.2.1 Tregs

Die Anzahl der Tregs in den mit OVA sensibilisierten Gruppen stieg durch die Infektion mit Filarien deutlich an. So zeigte sich ein Anstieg um den Faktor 3,3 (F-/OVA: 2,7%; F+/OVA: 7,7%).

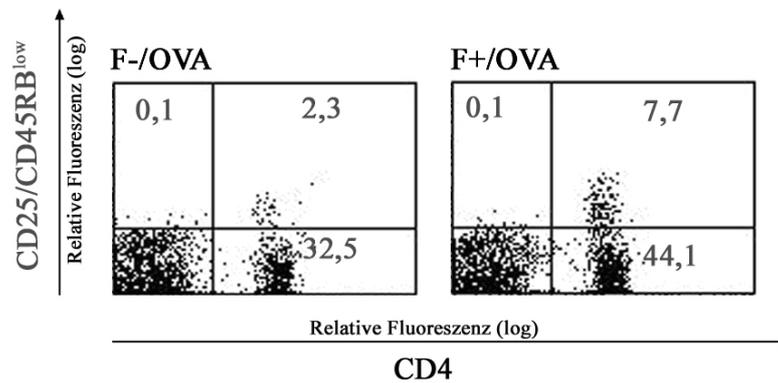


Abb. 18: FACS-Analyse von Tregs innerhalb der Lymphozytenpopulation der Milz. Gating auf lebendige Lymphozyten und Expression der Treg-Marker CD25/CD45RB^{low}. Angabe in Prozent, gates in der rechten oberen Ecke zeigt das Vorkommen von Zellen mit beiden Markern. Gezeigt werden repräsentative Darstellungen eines Tieres mit $n \geq 5$ /Gruppe und Versuch.

3.6.2.2 TGF- β -präsentierende T-Helferzellen

Die Anzahl der TGF- β -präsentierenden T-Helferzellen in den mit OVA sensibilisierten Gruppen stieg durch die Infektion mit Filarien deutlich an. So zeigte sich ein Anstieg um den Faktor 2 (F-/OVA: 1,7%; F+/OVA: 3,4%).

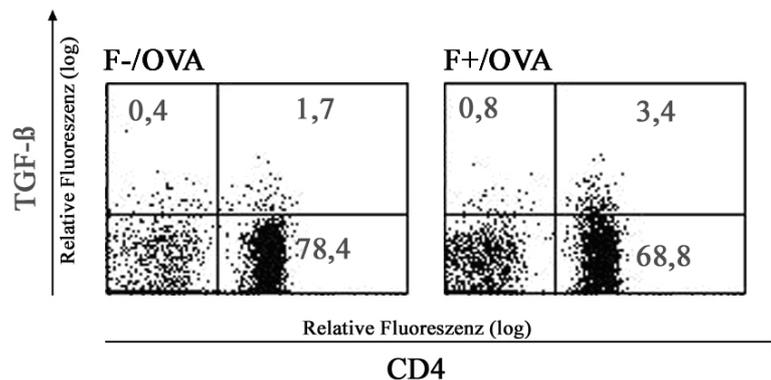


Abb. 19: FACS-Analyse von T-Helferzellen mit TGF- β -Expression innerhalb der Lymphozytenpopulation der Milz. Gating auf lebendige Lymphozyten und Expression von TGF- β auf der Zelloberfläche. Angabe in Prozent, gates in der rechten oberen Ecke zeigt das Vorkommen von Zellen mit beiden Markern. Gezeigt werden repräsentative Darstellungen eines Tieres mit $n \geq 5$ /Gruppe und Versuch.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung des Versuchs

4.1.1 Theoretischer Hintergrund

Auf der Grundlage von den Erkenntnissen epidemiologischer Studien über die negative Korrelation von parasitären Infektionen und allergischen Erkrankungen und ausgehend von der erweiterten Hygienehypothese wurde für diese Arbeit ein bereits in der Arbeitsgruppe Hamelmann etabliertes Mausmodell modifiziert, um die Frage der Beeinflussung allergischer Veränderungen durch eine parasitäre Infektion bestmöglich untersuchen zu können. Die suppressiven Auswirkungen von Helminthen-Infektionen auf allergische Erkrankungen konnten mehrfach im Mausmodell nachgewiesen werden⁶¹⁻⁶⁶. Dabei wurden verschiedene Mechanismen identifiziert, die nahe legen, dass verschiedene Effekte in Abhängigkeit vom verwandten Modell (für die allergische Erkrankung bzw. die parasitäre Infektion) beobachtet werden können^{67, 68, 98, 99, 100, 101, 102}. Dies ermöglichte die Hypothese, dass durch die hier verwandten Modelle (allergische Atemwegsentzündung bzw. *Lsigmo*-Infektion) bisher nicht identifizierte Mechanismen aufgedeckt werden könnten.

In dem modifizierten Modell wurden 2 Versuchsgruppen operativ mit Filarien der Gattung *Litomosoides sigmodontis* infiziert und 2 Versuchsgruppen einer Sham-Operation unterzogen. Jeweils eine Gruppe der beiden Behandlungsgruppen wurde mit dem Allergen OVA sensibilisiert und ihre Bronchialsysteme im weiteren Verlauf mit OVA provoziert. Anschließend wurden die Auswirkungen der Infektion auf den asthmatischen Phänotyp untersucht. Den Ergebnissen und der Frage nach den determinierenden Faktoren folgend wurde im nächsten Arbeitsschritt nach Veränderungen des Immunsystems nach Kontakt mit sowohl dem Allergen als auch den Filarien gesucht (IgE und IgG Level im Serum; FACS, Proliferationsverhalten und Zytokinprofile der Milzzellen).

4.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass:

- die Infektion mit *Lsigmo* alle Aspekte des asthmatischen Phänotyps im hier verwendeten Mausmodell unterdrückt (Atemwegshyperreagibilität, spezifische IgE-Produktion,

Inflammation der Atemwege mit Eosinophilie, erhöhte Mukuszellaktivität sowie das Vorkommen von Entzündungszellen in der broncheo-alveolären Lavage)

- die Unterdrückung des asthmatischen Phänotyps mit der Unterdrückung der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 korreliert
- die Unterdrückung des asthmatischen Phänotyps mit einer Heraufregulierung des regulatorischen Zytokins TGF- β korreliert
- die Unterdrückung des asthmatischen Phänotyps und der Th2-Zytokine nicht mit einer gleichzeitigen Heraufregulierung des Th1-Zytokins IFN- γ einhergeht
- die Infektion mit *Lsigmo* in sensibilisierten und provozierten Tieren zur Zunahme und Induktion von Tregs, insbesondere TGF- β produzierender, in der Milz führt.

4.2 Interpretation der Einzelresultate und Literaturvergleich

4.2.1 Anmerkungen zum Literaturvergleich

Wie bereits erwähnt konnten die suppressiven Auswirkungen von Helminthen-Infektionen auf allergische Erkrankungen schon mehrfach nachgewiesen werden.

Alle bisherigen *in vivo* Modelle unterscheiden sich in Behandlungsprotokoll, gewählten Parasiten, Infektionsmethoden, Sensibilisierungsmethoden, Wahl der Read-Outs und der Methodik. Versuche mit *Strongyloides venezuelensis* zum Beispiel haben eine Migration der Larven durch das Lungengewebe zur Folge⁹⁹ – eine Tatsache, die das Lungengewebe direkt betrifft und daher die Aussagemöglichkeiten bezüglich der systemischen Immunreaktion beschränkt.

Dies gestaltet den Vergleich mit vorhandener Literatur mitunter schwierig, Ergebnisse können nicht immer mit ausreichend vergleichbaren Daten abgeglichen werden.

Im Folgenden werden die Literaturvergleiche anhand der Einzelergebnisse geführt.

4.2.2 Versuchsaufbau, Tier- und Parasitenwahl

Für diese Arbeit wurde ein etabliertes Mausmodell der Arbeitsgruppe Hamelmann gewählt, das schon seit beinahe 10 Jahren zur Gewinnung unterschiedlicher allergiespezifischer Daten bei Mäusen benutzt wird.

Des Weiteren wurden BALB/c-Mäuse gewählt, die seit langem in der Tübinger Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Hoffmann für experimentelle Infektionen mit den Filarien *Lsigmo* benutzt werden, da diese in BALB/c-Mäusen den kompletten Entwicklungszyklus durchlaufen können, die Infektion daher den *in vivo* Bedingungen sehr nahe kommt und die Infektion mit *Lsigmo* bei

Mäusen außerdem große Ähnlichkeit mit den parasitologischen Auswirkungen von humanen Filariosen aufweist^{69,103,104}.

Die langjährige Erfahrung beider Arbeitsgruppen mit den jeweiligen Modellen hat den Vorteil, dass bereits viele Basisparameter bekannt und daher die Auswirkungen der Filarieninfektion gut zu charakterisieren sind.

Durch diesen Versuchsaufbau, die Wahl der Versuchstiere wie auch der Parasiten wurde sichergestellt, dass die beobachteten Effekte den Vorgängen *in vivo* möglichst nahe kommen und daher möglichst valide Erklärungsansätze für die bekannte negative epidemiologische Korrelation zwischen Parasiteninfektionen und allergischen Erkrankungen liefern kann.

4.2.3 Die Infektion mit *Lsigmo* induziert eine lokale und systemische Immunreaktion

Durch die Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Infektion mit *Lsigmo* erfolgreich verlaufen war. Die infizierten Versuchgruppen wiesen im Einklang mit der Literatur^{92,94,103} folgende Veränderungen auf, die als klare Auswirkungen der Infektion zu werten sind: Durch die Infektion mit *Lsigmo* fand ein klarer Einstrom von Entzündungszellen statt (insbesondere neutrophilen Granulozyten, begleitet durch eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen/Dendritenzellen). Dies zeigt eine aktive zelluläre Reaktion am Infektionsort. Die Proliferationszunahme der Milzzellen nach Recall-Proliferation mit Filarien-Antigen beweist die Induktion einer systemischen Gedächtnisfunktion des betroffenen Immunsystems.

Zwar könnten jene Befunde auch trotz eines vorzeitigen Absterbens der Filarien zu finden sein, dem steht aber entgegen, dass bei der Autopsie der Versuchstiere lebende Filarien in den Peritonealhöhlen gefunden wurden und im peripheren Blut eine Mikrofilariämie zu verzeichnen war.

4.2.4 Die Infektion mit *Lsigmo* supprimiert den asthmatischen Phänotyp

4.2.4.1 Suppression der Atemwegsinfektion

Sowohl die Reduktion der Entzündungszellzahl (insb. der eosinophilen Granulozyten, die hauptverantwortlich für die Lungengewebsdestruktion und -umwandlung beim Asthma bronchiale sind, als auch der Lymphozyten) in der broncho-alveolären Lavage als auch die Reduktion der gewebständigen eosinophilen Granulozyten (MBP-Färbung) und der aktiven Mukuszellen (PAS-Färbung) in den Lungen der mit Filarien infizierten Versuchstiere belegt

deutlich den supprimierenden bzw. protektiven Effekt, die die Filarieninfektion auf das inflammatorische Geschehen in den Lungen der Versuchstiere hat.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden vorhergehender Versuche, in denen verschiedene parasitäre Infektionen bzw. Antigene ähnliche Effekte hervorriefen, wie zum Beispiel *Schistosoma japonicum*¹⁰⁵, *Nippostrongylus brasiliensis*¹⁰⁶ bis hin zu rekombinanten Filarien-Cystatin¹⁰⁷.

Mucusproduktion und Eosinophilie werden nach heutigem Wissenstand von verschiedenen Faktoren stimuliert (s. Kap 1.2). Hauptsächlich sind dafür die Interleukine IL-4 und IL-5 verantwortlich^{11,12,108,109}. Wie in diesem Versuch nachgewiesen wurde, wird in dem hier verwendeten Modell die Produktion eben jener Zytokine durch die Infektion mit *Lsigmo* herunterreguliert (s. Kapitel 3.7.1). Dies weist darauf hin, dass die Infektion mit *Lsigmo* nicht direkt auf eosinophile Granulozyten und Mukuszellen Einfluss nimmt, sondern diejenigen Mediatoren beeinflusst, die Eosinophile und Mukuszellen rekrutieren bzw. aktivieren.

Die Reduktion der Eosinophilie könnte im Hinblick auf den Patienten darauf hinweisen, dass auch die durch die (u.a.) Eosinophilie ausgelösten Spätfolgen (Umbau des Lungengewebes, chronische Hyperreagibilität durch gewebständige Eosinophile) durch die parasitäre Infektion reduziert werden, was hier allerdings nicht näher untersucht wurde. Auch das stünde im Einklang mit vorherigen Experimenten⁶⁶.

4.2.4.2 Reduktion der Atemwegshyperreagibilität

Bezüglich der Atemwegshyperreagibilität zeigten sich wichtige Unterschiede in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Dies ist v.a. deshalb bedeutsam, da die Messung der AHR den einzigen klinischen Parameter in dieser Arbeit darstellt, der physiologische Veränderungen erfasst und evtl. einen Rückschluss auf die Beeinflussung klinischer Symptome beim Patienten zulässt. Zunächst war relevant, dass die mit OVA behandelten Tiere deutlich stärker auf die Provokation als die PBS-behandelten Tiere reagierten, was darauf schließen lässt, dass die Behandlung mit OVA (Sensibilisierung und Inflammationsinduktion) erfolgreich war und sich ein Korrelat zu klinischen Symptomen des Asthma bronchiale in den Mäusen induzieren ließ.

Der fehlende Unterschied zwischen den beiden mit PBS behandelten Gruppen zeigt, dass die alleinige Infektion mit *Lsigmo* zu keiner erhöhten AHR führt.

Die deutliche Reduktion der AHR durch die Infektion mit *Lsigmo* in den mit OVA behandelten Versuchsgruppen schließlich zeigt, dass die Infektion mit *Lsigmo* die AHR um mehr als ein Drittel zu senken in der Lage ist. Dies geht einher mit den Ergebnissen vorheriger Experimente⁶¹⁻

⁶⁶, wobei allerdings auch gegenteilige Befunde existieren, so zum Beispiel bei der Infektion mit *Toxocara canis*, die in einem Mausmodell zu einer Exacerbation einer allergischen Atemwegsinfektion führte¹¹⁰. Die überwiegende Mehrheit der Versuche jedoch zeigt eine Reduktion der AHR.

Allerdings ist festzuhalten, dass nur die Unterschiede innerhalb der mit OVA behandelten Gruppe bei einer MCH-Konzentration von 50mg/ml statistisch signifikant waren. Die Gründe hierfür könnten darin liegen, dass die maximale Penh-Veränderung in labortechnischen Messungen erst nach 25 Minuten erreicht werden – und somit für die ersten Messdurchgänge noch nicht ausreichend Zeit für die Ausprägung der Symptomatik blieb¹¹¹.

4.2.4.3 Suppression der humoralen Immunantwort

In Übereinstimmung mit dem bekannten Phänomen, dass parasitäre Infektionen große Mengen von polyklonalem IgE induzieren, wurde in diesem Versuch ebenfalls ein deutlicher (wenn auch nicht statistisch relevanter) Trend zur Gesamt-IgE-Stimulation gefunden.

Statistisch hochsignifikant zeigte sich allerdings die Reduktion des OVA-spezifischen IgEs und des IgG1 sowie ein (statistisch nicht signifikanter) Trend zur Reduktion des IgG2a durch die Infektion mit *Lsigmo*. IgE und IgG1 werden hauptsächlich Th2-vermittelt produziert. Helmintheninfektionen, z.B. durch Filarien, induzieren jedoch ebenfalls eine Th2-polarisierte Immunantwort. Die Reduktion dieser Immunglobuline spricht daher gegen die Vorstellung, dass allergieprotektive Faktoren durch einen Th1-Shift wirken, wie es in der einfachen Hygienehypothese postuliert wird. Vielmehr stärken diese Daten die Ansicht der erweiterten Hygienehypothese, die von einer Induktion regulatorischer Elemente durch Infektionen ausgeht, welche wiederum allergischen Reaktionen entgegenwirken. Unterstützt wird dies durch den in dieser Arbeit festgestellten Trend zur gleichzeitigen Reduktion des Th-1 vermittelten IgG2a, was zu der Vermutung führt, dass die Filarieninfektion eher eine allgemeine Reduktion der antigenspezifischen Immunglobulinproduktion als ein Ungleichgewicht in der Th-1/Th-2-Gewichtung zur Folge hat.

4.2.5 Die Infektion mit *Lsigmo* supprimiert die zellulären Immunreaktion

4.2.5.1 Reduktion der Proliferationsrate mononukleärer Milzzellen

Die isolierten Milzzellen wurden mit ConA sowie mit OVA stimuliert. Dabei zeigte sich sowohl eine statistisch signifikante antigenspezifische Proliferationshemmung (F-/OVA vs. F+/OVA) durch die Infektion mit Filarien als auch der Trend zur antigenunspezifischen

Proliferationshemmung (F-/PBS vs. F+/PBS). Letztere Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen vorheriger Studien, die mit Hilfe verschiedener parasitärer Membrananteile die Proliferationshemmung induzieren konnten^{112,113,114}.

Diese Erkenntnis ist hilfreich, um mögliche Therapieansätze zu identifizieren.

Außerdem lieferte sie wichtige Hinweise auf den Mechanismus der Immunsuppression, allerdings war dafür eine weitergehende Analyse der Milzlymphozyten nötig. Daher wurden in diesem Experiment eine Untersuchung ihrer Zytokinproduktion angeschlossen, um herauszufinden, ob sich hierbei ebenfalls eine generelle oder eine zytokinspezifische Auswirkung zeigte.

4.2.5.2 Supprimierung der Th1- und Th2-Zytokine außer TGF- β

Durch die Provokation mit OVA (antigen-spezifische Stimulation) wurden die gemessenen Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 sowie das Th1-Zytokin IFN- γ deutlich herunterreguliert. Das einzige heraufregulierte Zytokin war TGF- β .

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus Atemwegshyperreagibilität und Lungenhistologie: IL-4 und IL-5 sind maßgeblich für die Produktion von allergenspezifischem IgE durch B-Zellen beteiligt, welches wiederum an der Entstehung der Pathomechanismen in der Lunge eine tragende Rolle innehat.

In der Literatur waren in vorausgegangenen Studien nicht immer IL-4 und IL-5 gleichzeitig reduziert: teilweise wurde in Studien IL-4 in unveränderten oder auch erhöhten Mengen nachgewiesen – allerdings nach einer Infektionen mit *Brugia malayi*¹¹⁵ bzw. *Schistosoma mansoni*⁶⁴⁴. Dies könnte bedeuten, dass die Reduktion von IL-4 nicht unbedingt notwendig für die Immunsuppression ist. Weitere Studien müssten dies nachweisen.

Zur Bedeutung der Reduktion von IL-10 und der Heraufregulierung von TGF- β wird im nächsten Kapitel detaillierter eingegangen.

Des Weiteren unterstützt die gemessene Zytokinprofiländerung die Schlussfolgerung aus der Immunglobulinmessung: Es findet kein Ungleichgewicht in der Th-1/Th-2-Gewichtung statt, vielmehr betrifft die Reduktion der Zytokinproduktion beide Linien.

4.2.5.3 Regulatorische Zytokine: TGF- β , nicht IL-10, ist für die Immunsuppression verantwortlich

Eine entscheidende Frage dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen der Immunsuppression durch eine Filarieninfektion. IL-10 und TGF- β sind beide für ihre immunsupprimierenden Eigenschaften bekannt und gelten als so genannte regulatorische Zytokine. Besonderes Augenmerk lag in den vergangenen Jahren auf IL-10, das lange Zeit als

der maßgebliche Faktor für Immunsuppression gehandelt wurde^{28,63}. Tatsächlich wurde in der Mehrheit der Publikationen bisher die Wichtigkeit von IL-10 nachgewiesen, und zwar sowohl bei der Verwendung von anderen als den hier benutzten Parasiten¹⁰², als auch bei der Verwendung von rekombinanten Filarien-Cystein¹⁰⁷.

Insgesamt wird die Funktion von IL-10 beim Asthma bronchiale kontrovers diskutiert^{116,117,118}. Bezüglich der immunmodulierenden Mechanismen parasitärer Infektionen konnte gezeigt werden, dass Immunsuppression durch Helmintheninfektionen auch vollkommen unabhängig von IL-10 auftreten kann¹¹⁹. Diesbezüglich konnte auch gezeigt werden, dass Tregs sowohl mittels IL-10 als auch mittels TGF- β suppressierenden Einfluss auf die Immunreaktion nehmen¹²⁰.

Die Tatsache, dass TGF- β als einziges Zytokin durch die Filarieninfektion hochreguliert wurde (im Gegensatz zur Reduktion aller sonstigen untersuchten Zytokine), spricht für eine zentrale Rolle von TGF- β in der antigen-spezifischen Immunsuppression.

Auch eine etwa zeitgleich zu diesem Versuch durchgeführte Studie mit ähnlichem Versuchsaufbau liefert Hinweise, dass IL-10 eventuell nicht der vorherrschende Mediator bei der Immunsuppression durch Parasiten ist: in einem Transferversuch mit Tregs konnte die Suppression der allergischen Atemwegsinfektion in den Empfängertieren erreicht werden, obwohl die Spendertiere IL-10-defizient waren¹²¹.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass unsere Ergebnisse klar eine (mit)führende Rolle von TGF- β bei der Immunsuppression unterstützen.

Diesen Überlegungen folgend galt es Ansätze dafür zu finden, welche Subtypen der Milzlymphozyten für TGF- β -Produktion verantwortlich waren. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass TGF- β der entscheidende Faktor bei der Aktivierung von Tregs ist (Induktion des Transkriptionsfaktors Foxp3)⁵¹.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit TGF- β für die Transformation von CD25⁺-T-Helferzellen in Tregs mit suppressierenden Fähigkeiten (CD25⁺/CD45RB^{low}/CD4/TGF- β ^{surface}) verantwortlich ist⁵².

Aus diesem Gründen wurde den bisherigen Untersuchungen eine FACS-Analyse der Milz- und PL-Zellen angeschlossen.

4.2.6 Die Infektion mit *Lsigmo* verändert die Lymphozyten-Subpopulationen

4.2.6.1 Aktivierung der Lymphozyten und im speziellen Dendritenzellen am Ort der Infektion

Wie erwartet hatte die Filarieninfektion eine Aktivierung der Lymphozyten und der dendritischen Zellen in der mit OVA behandelten Gruppe zur Folge. Auffällig war sowohl die Expression von ICOS in den CD4⁺-Zellen als auch die Expression des zugehörigen Liganden ICOSL in den dendritischen Zellen. Deren Interaktion wurde bereits als notwendig für die Reduktion der Atemwegshyperreagibilität nachgewiesen¹²².

Daraus lässt sich ableiten, dass der Kontakt mit dem Antigen *Lsigmo* bereits die erste Weiche für die in unserem Versuch nachgewiesene Reduktion der Atemwegshyperreagibilität stellt. Weiter galt es zu klären, welche Auswirkungen die Einwanderung der ICOSL-exprimierenden dendritischen Zellen in den Ort der systemischen Immunreaktion zur Folge hatte (s.u.).

4.2.6.2 Vermehrtes Auftreten von Tregs und TGF-β-exprimierenden Lymphozyten am Ort der systemischen Immunreaktion

Auffällig war das stark erhöhte Vorkommen von Tregs in der Milz. Gleichzeitig konnte eine starke Erhöhung der TGF-β-exprimierenden CD4⁺-Zellen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse decken sich mit verschiedenen Experimente anderer Arbeitsgruppen. So wurden zum Beispiel nach der Infektion mit *Heligosomoides polygyrus*, der einen ähnlichen Lebenszyklus wie *Lsigmo* aufweist und ebenfalls allergiesupprimierende Eigenschaften aufweist, ebenfalls vermehrt Tregs gefunden¹²³.

Es wäre hilfreich gewesen, in anschließenden Versuchen herauszufinden ob die Gruppen der Tregs und die der TGF-β-exprimierenden identisch sind, bzw. ob die TGF-β-exprimierenden Zellen tatsächlich für die erhöhte Produktion von TGF-β der mononukleären Milzzellen verantwortlich ist. Dies konnte in dieser Arbeit allerdings nicht realisiert werden, nachfolgende Untersuchungen bestätigten durch Blockade bzw. Depletionsstudien jedoch die Relevanz dieser löslichen bzw. zellulären Mediatoren¹²⁴.

In einer der bereits erwähnten Studien konnte ebenfalls mit Hilfe des bereits erwähnten Transferversuchs¹²¹ gezeigt werden, dass die Suppression der allergischen Atemwegsinfektion von induzierten Tregs abhängig ist.

Zusammengenommen konnten also weiterführende Versuche unserer Arbeitsgruppe, aber auch anderer Arbeitsgruppen die in diesem Versuch aufgestellte Hypothese untermauern, dass TGF-β-exprimierende Tregs eine wichtige Rolle bei der Immunsuppression durch parasitäre Infektionen innehaben.

4.3 Abschlussthese und Ausblicke

4.3.1 Abgeleitete These: TGF- β ⁺-Tregs werden durch die Filarieninfektion aktiviert und unterdrücken die Entwicklung des asthmatischen Phänotyps

Entsprechend der Grundlage der erweiterten Hygienehypothese reduziert die Infektion mit Filarien den asthmatischen Phänotyp.

Aus dem Versuch und allen bisher genannten Überlegungen lässt sich folgende Theorie ableiten: Die Infektion mit *Lsigmo* hat den Kontakt zwischen dendritischen Zellen und Parasiten bzw. deren Bestandteilen zur Folge. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, werden neben allgemeinen Aktivierungsmarkern auch spezifische Liganden zur Interaktion mit T-Zellen (hier: ICOSL) heraufreguliert. Die derart "Helminthen-modulierten" dendritischen Zellen wandern in die Milz, den Drainageort der Infektion und Ort der systemischen Immunreaktion, ein. Dort aktivieren sie antigen-spezifische, undifferenzierte Th0 Zellen. Diesbezüglich zeigen unsere Versuche, dass entweder vorhandene natürliche Tregs mit supprimierenden Eigenschaften aktiviert werden oder dass es durch TGF- β zur Umwandlung von CD25⁺-T-Helferzellen in supprimierende TGF- β exprimierender Tregs kommt. Die Vermehrung TGF- β exprimierender Tregs könnte direkt oder indirekt für die Suppression der Th1 und Th2 Differenzierung verantwortlich sein. Hierdurch kommt es insgesamt zu einem Verschieben des Gleichgewichtes zwischen regulatorischen und proinflammatorischen T-Zellen, was sich in unseren Ergebnissen an einer Verschiebung des Zytokinegleichgewichtes zugunsten regulatorischer Zytokine deutlich zeigen lässt. Die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps wird im Folgenden reduziert bis gehemmt.

4.3.2 Ausblicke

Die gewonnenen Einblicke bieten Ansätze für weitere Studien und Überlegungen. Insbesondere könnten folgende Aspekte weiter verfolgt werden:

- Die Rolle von TGF- β und IL-10 müsste noch differenzierter evaluiert werden. Da nachgewiesen wurde, dass beide Zytokine wichtige Rollen in der Immunsuppression einnehmen, müssten sowohl die genauen Interaktionsmuster als auch die Frage, ob eines der beiden Zytokine dem anderen hierarchisch übergeordnet ist, geklärt werden.
- Die Rolle von IL-4 bleibt nach dem Literaturvergleich weiter unklar. Auch hier müsste die Abhängigkeit von anderen Zytokinen (z.B. IL-5) weiter abgeklärt werden.

-
- Die Beteiligung TGF- β -exprimierender Tregs müsste noch weiter verfolgt werden, auch im Hinblick auf mögliche Therapieansätze (z.B. Aktivierung von autologen Tregs *in vitro* mit anschließendem Retransfer in den Spenderorganismus).
 - Für die Transaktion der erhobenen Befunde in eine auch für humane Patienten anwendbare Behandlungsstrategie ist sicherlich erforderlich, den genauen Wirkmechanismus noch besser darzustellen. Insbesondere ist die Frage entscheidend, welche parasitären Komponenten (Oberflächenmerkmale, sezernierte Produkte, etc.) für den immunregulatorischen Mechanismus verantwortlich sind. Die Weiterentwicklung dieser so gefundenen Komponenten könnte dann zu neuen Medikamenten oder neuen Impfstrategien führen, die in ersten klinischen Studien eingesetzt werden könnten.

5 Referenzen

- 1 Woodruff TJ, Axelrad DA, Kyle AD et al.; „Trends in Environmentally Related Childhood Illnesses”; *Pediatrics* 2004; 113(4):1133-40
- 2 The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee; “Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC)”; *Eur Respir J* 1998; 12:315-335
- 3 Sears MR; “Descriptive epidemiology of asthma”; *Lancet*. 1997; 350(9083):1015-20
- 4 Institute of Medicine of the National Academy of Sciences; “Clearing the Air: Asthma and Indoor Air Exposures”; National Academy Press 2000
- 5 Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz; Pressemitteilung 28. Juni 2005, Nr. 353/05
- 6 Yemaneberhan H, Bekele Z, Venn A et al.; “Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia”; *Lancet*, July 1997; 350(9071):85-90
- 7 Holgate ST, Davies DE, Murphy G et al.; “ADAM 33: just another asthma gene or a breakthrough in understanding the origins of bronchial hyper-responsiveness?”; *Thorax* 2003; 58:466-61
- 8 Kluge F, Seebold E; „Etymologisches Wörterbuch der deutschen Sprache”; De Gruyter Verlag, 24. Auflage
- 9 Pubmed Definitions; <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000812.htm#Definition>; Stand: 21.03.2009
- 10 Gell PGH, Coombs RRA.; “Clinical Aspects of Immunology”; London: Blackwell 1963, S. 317
- 11 Romagnani S; “Lymphokine production by human T cells in disease states”; *Annu Rev Immunol* 1994; 12:227–257.
- 12 Akdis CA, Blaser K, Akdis M; “Genes of tolerance”; *Allergy* 2004; 59:897–913.
- 13 Till S, Durham S, Dickason R et al.; “IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN- γ expression”; *Immunology* 1997; 91:53–57
- 14 Kay AB; “Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects”; *J Exp Med* 1991; 173:775–778
- 15 Robinson DS, Hamid Q, Ying S et al.; „Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma“; *N Engl J Med* 1992; 326:298–304
- 16 Johansson SG, Bieber T, Dahl R et al., „Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization”; *Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113(5):832-6
- 17 Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ et al.; “Global strategy for asthma management and prevention”; NIH Publication 2002; 02–3659.
- 18 Bethesda MD; “Expert panel report 2: Guidelines for the diagnosis and management of asthma”; NIH Publication 1997; 55–4051
- 19 Gerth van Wijk R, van Cauwenberge PB, Johansson SG; “Revised terminology for allergies and related conditions”; *Ned. Tijdschr Geneesk* 2002; 146(48):2289-93
- 20 Holgate ST et al.; “The cellular and mediator basis of asthma in relation to natural history”; *Lancet* 1997; 350(2): SII5-SII9
- 21 Hakonarson H; “Bi-directional activation between human airway smooth muscle cells and T lymphocytes: role in induction of altered airway responsiveness”; *J. Immunol.* 2001; 166, 293-303
- 22 de Vries JE; “Receptors and cytokines involved in allergic TH2 cell responses”; *J Allergy Clin Immunol* 1998; 103:S492–S496
- 23 O’Garra A, Arai N; “The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation”; *Trends Cell Biol.* 2000, 10(12):542-50
- 24 Street NE, Mosmann R; “Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns”, *FASEB J.* 1991 Feb;5(2):171-7
- 25 Romagnani S; „Th1/Th2 cells”, *Inflamm Bowel Dis.* 1999; (4):285-94
- 26 O’Garra A, Vieira P; “Regulatory T cells and mechanisms of immune system control”; *Nature Medicine* 2004, 10:801-805
- 27 Piccirillo CA, Shevach EM; “Naturally-occurring CD4+CD25 and immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance“; *Semin Immunol.* 2004; (2):81-8
- 28 Powrie F, Leach MW, Mauze S et al.; “Phenotypically distinct subsets of CD4+T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice”; *Int. Immunol.* 1993; 5:1461–1471
- 29 Wood KJ, Sakaguchi S; „Regulatory T cells in transplantation tolerance“ *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:199–210.
- 30 Qin S, Cobbold SP, Pope H et al.; “Infectious transplantation tolerance”; *Science* 1993; 259:974–977
- 31 Belckaid Y, Rouse BT; “CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity”; *Nature* 2002; 420:502–507

- [32](#) Bluestone JA, Abbas AK; "Natural versus adaptive regulatory T cells"; *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:253–257
- [33](#) Fontenot JD, Rudensky AY; "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the Forkhead family transcription factor Foxp3"; *Nat. Immunol.* 2005; 6:331–337
- [34](#) Thornton AM, Shevach EM; „CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production“; *J. Exp. Med.* 1998; 188:287
- [35](#) Shevach EM; "CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers"; *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2:389
- [36](#) Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M et al.; "Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood"; *J. Exp. Med.* 2001; 193:1285
- [37](#) Thornton AM, Shevach EM et al.; "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific"; *J. Immunol.* 2000; 164:183
- [38](#) Kemper C, Chan AC, Green JM et al.; "Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype" *Nature* 2003; 421:388
- [39](#) Groux HA, O'Garra A, Bigler M et al.; "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis"; *Nature* 1997; 389:737
- [40](#) Levings MK, Bacchetta R, Schulz U et al.; "The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory cells"; *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002; 129:263
- [41](#) Groux H; "Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses"; *Transplantation* 2003; 75:8S
- [42](#) Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C; "Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells"; *J. Exp. Med.* 2001; 193:F5
- [43](#) Weiner HL; "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-gamma-secreting Th3 regulatory cells"; *Immunol. Rev.* 2001; 182:207
- [44](#) Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J et al.; "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis"; *Science* 1994; 265:1237
- [45](#) Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ et al.; "Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-gamma-1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients"; *J. Clin. Invest.* 1996; 98:70
- [46](#) Weiner HL; "The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and TR1 and TH3 regulatory cells"; *Nat. Immunol.* 2001; 2:671.
- [47](#) Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N et al.; "Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance"; *J Immunol.* 1999; 162:5317–26
- [48](#) Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL et al.; "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor"; *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765
- [49](#) Gorelik L, Flavell RA; "Transforming growth factor-beta in T-cell biology"; *Nat Rev Immunol* 2002; 2:46-53
- [50](#) Gorelik L, Constant S, Flavell RA; "Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 2002; 195:1499-1505
- [51](#) Heath VL, Murphy EE, Crain C et al.; "TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression"; *Eur J Immunol* 2000; 30:2639-264
- [52](#) Chen W, Jin W, Hardegen N et al.; "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3" *J Exp Med.* 2003; 198:1875-86.
- [53](#) Zeller J.C, Panoskaltis-Mortari A, Murphy WJ et al.; "Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta"; *J Immunol.* 1999; 163:3684–3691.
- [54](#) Akdis M, Verhagen J, Taylor A et al.; "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T-helper 2 cells"; *J Exp Med* 2004, 199:1567–1575
- [55](#) Ling EM, Smith T, Nguyen XD et al.; "Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease"; *Lancet* 2004, 363:608–615
- [56](#) Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT et al.; "Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma"; *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119(5):1258-66
- [57](#) Thunberg S, Akdis M, Akdis CA et al.; „Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls“; *Clin Exp Allergy.* 2007; 37(8):1127-36
- [58](#) Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR et al.; "Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa"; *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jun;121(6):1467-72
- [59](#) Umetsu DT, DeKruyff RH; "The regulation of allergy and asthma"; *Immunol Rev* 2006, 212:38–255
- [60](#) Elliott DE, Urban JF JR, Argo CK et al.; "Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease?"; *Faseb* 2000; J14: 1848-1855
- [61](#) Lynch NR, Hagel I, Perez M et al.; "Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum"; *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:404-411

- [62](#) Lynch NR, Hagel IA, Palenque ME et al.; "Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment"; *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 217-221
- [63](#) Van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC et al.; "Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10"; *Lancet* 2000; 356: 1723-1727.
- [64](#) Araujo MI, Hoppe BS, Medeiros M Jr et al.; "*Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases"; *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(5 Suppl 1):27-32.
- [65](#) Pinto LA, Pitrez PM, Fontoura GR et al.; "Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin"; *Parasite Immunol* 2004; 26: 151-155
- [66](#) Lima C, Perini A, Garcia ML et al.; "Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma"; *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1659-1666
- [67](#) Wilson MS, Taylor MD, Balic A et al.; "Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells"; *Exp Med*. 2005; 202(9):1199-212.
- [68](#) Bashir ME, Andersen P, Fuss IJ et al.; "An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen"; *J. Immunol*. 2002; 169:3284–3292.
- [69](#) Petit G, Diagne M, Maréchal P et al.; "Maturation of the filaria *Litomosoides sigmoin* BALB/c mice; comparative susceptibility of nine other inbred strains"; *Ann Parasitol Hum Comp*. 1992; 67(5):144-50
- [70](#) Taubert A, Zahner H; "Cellular immune responses of filaria (*Litomosoides sigmodontis*) infected BALB/c mice detected on the level of cytokine transcription"; *Parasite Immunology* 2001; 23: 453-462
- [71](#) Kung TT, Jones H, Adams GK 3rd et al.; "Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation"; *Int. Arch. Allergy Immunol*. 1994; 105:83–90
- [72](#) Upham JW, Holt PG; "Environment and development of atopy"; *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005; 2:167-72
- [73](#) von Mutius E; "Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma"; *J Allergy Clin Immunol*.2002; 109:525 –532
- [74](#) Zeiger RS, Heller S; "The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance"; *J Allergy Clin Immunol*.1995; 95:1179–1190
- [75](#) Strachan DP, Harkins LS, Johnston ID et al.; "Childhood antecedents of allergic sensitization in young British adults"; *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99:6 –12
- [76](#) McGeady SJ; "Immunocompetence and allergy"; *Pediatrics* 2004; 13:1107-1113
- [77](#) Strachan DP; "Hayfever, hygiene and household size"; *Br Med J* 1989; 299: 1259-1260
- [78](#) Matricardi PM et al.; "Mimicking microbial 'education' of the immune system: a strategy to revert the epidemic trend of atopy and allergic asthma?"; *Respir Res*. 2000; 3:129-32
- [79](#) Matricardi PM, Bonini S; "Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: an epidemiological study"; *Br Med J* 2000; 320:412–7.
- [80](#) Svanes C, Jarvis D, Chinn S et al.; "Childhood environment and adult atopy: results from the European Community Respiratory Health Survey"; *J Allergy Clin Immunol*.1999; 103:415–420
- [81](#) Alm JS, Swartz J, Lilja G et al. "Atopy in children with an anthroposophic style of life"; *Lancet* 1999; 353:1484–8.
- [82](#) Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U et al.; "Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children"; *New Engl J Med* 2002; 347:869–77
- [83](#) Romagnani S; "Regulation of Th2 development in allergy"; *Curr Opin Immunol* 1994; 6:838–46
- [84](#) Martinez FD; "The coming-of-age of the hygiene hypothesis"; *Respir Res* 2001; 2:129–32
- [85](#) Liu AH; "Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox"; *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109:379 –392
- [86](#) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S et al.; "The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder" *Science* 1997; 275 :77 –79
- [87](#) Bach JF; "The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases"; *N Engl J Med* 2002; 347: 911-920
- [88](#) Stene LC et al; "Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma"; *Lancet*. 2001; 357(9256):607-8
- [89](#) Scrivener S, Nafstad P; "Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study"; *Lancet* 2001; 358: 1493-1499
- [90](#) Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM; "Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease"; *Trends Immunol*. 2001; 22(7):372-7
- [91](#) Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R; "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis"; *Science*. 2002; 296(5567):490-4
- [92](#) Pfaff AW, Schulz-Key H, Soboslay PT et al., "Litomosoides sigmodontis cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis"; *International Journal for Parasitology* 2002; 32:171–178

-
- [93](#) Oshiba A, Hamelmann E, Takeda K et al.; "Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice"; *J Clin Invest.* 1996; 97(6):1398-408
- [94](#) Hoffmann WH, Pfaff AW, Schulz-Key H et al.; "Determinants for resistance and susceptibility to microfilaraemia in *Litomosoides sigmo filariasis*"; *Parasitology* 2001; 122(Pt 6):641-9
- [95](#) Larson KA, Horton MA, Madden BJ et al.; "The identification and cloning of a murine major basic protein gene expressed in eosinophils"; *J Immunol.* 1995; 155(6):3002-12
- [96](#) Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K et al.; "Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography"; *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:766-75
- [97](#) Witzentrath M, Ahrens B, Kube SM et al.; "Detection of allergen-induced airway hyperresponsiveness in isolated mouse lungs"; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 291(3):L466-72
- [98](#) Bashir ME, Andersen P, Fuss IJ et al.; "An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen"; *J Immunol.* 2002; 169:3284-92
- [99](#) Negrão-Corrêa D, Silveira MR, Borges CM et al.; "Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation"; *Inf. Imm.* 2003; 71:2607-14
- [100](#) Mangan NE, Fallon RE, Smith P et al.; "Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells"; *J Immunol.* 2004; 173:6346-56
- [101](#) Wohlleben G, Trujillo C, Müller J et al.; "Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation". *Int Immunol.* 2004; 16:585-96
- [102](#) Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N et al.; "Helminth parasites- masters of regulation"; *Immunological Reviews* 2004; 201, 89-116
- [103](#) Hoffmann WH, Petit G, Schulz-Key H et al.; "Litomosoides sigmodontis in Mice: Reappraisal of an Old Model for Filarial Research"; *Parasitology Today* 2000; 16:387-389
- [104](#) Ohki Y, Tokuyama K, Mayuzumi H et al.; "Characteristic Features of Allergic Airway Inflammation in a Murine Model of Infantile Asthma"; *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138:51-58
- [105](#) Mo HM, Lei JH, Jiang ZW et al.; "Schistosoma japonicum infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation in mice"; *Parasitol Res.* 2008; 103:5, 1183-1189
- [106](#) Reece JJ, Siracusa MC, Southard TL et al.; "Hookworm-induced persistent changes to the immunological environment of the lung"; *Infect Immun.* 2008; 76(8):3511-24
- [107](#) Schnoeller C, Rausch S, Pillai S et al.; "A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages"; *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):4265-72
- [108](#) Hamelmann E, Takeda K, Schwarze J et al.; "Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires Interleukin-5 but not Immunoglobulin E or B Lymphocytes"; *Am J Respir Clin Mol Biol* 1999; 21: 480-489
- [109](#) Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ et al.; "Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity and lung damage in a mouse asthma model"; *J Exp Med* 1996; 183: 195-201
- [110](#) Pinelli E, Brandes S, Dormans J et al.; "Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation"; *Clin Exp Allergy.* 2008; 38(4):649-58
- [111](#) Nakaya M, Dohi M, Okunishi K et al.; "Noninvasive system for evaluating allergen-induced nasal hypersensitivity in murine allergic rhinitis"; *Laboratory Investigation* 2006 86, 917-926
- [112](#) Deehan MR, Frame MJ, Parkhouse RM et al.; "A phosphorylcholine-containing filarial nematode-secreted product disrupts B lymphocyte activation by targeting key proliferative signaling pathways"; *J Immunol.* 1998; 160:2692-9.
- [113](#) Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM et al.; "Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase"; *J Immunol.* 1999; 163:6403-12
- [114](#) Atochina O, Daly-Engel T, Piskorska D et al.; "A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism"; *J Immunol.* 2001; 167:4293-302
- [115](#) Sartono E, Kruize YC, Kurniawan A et al.; "Depression of antigen-specific interleukin-5 and interferon-gamma responses in human lymphatic filariasis as a function of clinical status and age"; *J Infect Dis* 1997; 175:1276-1280
- [116](#) Colavita AM, Hastie AT, Musani AI et al.; "Kinetics of IL-10 production after segmental antigen challenge of atopic asthmatic subjects"; *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106:880-6
- [117](#) Grunstein MM, Hakonarson H, Leiter J et al.; "Autocrine signaling by IL-10 mediates altered responsiveness of atopic sensitized airway smooth muscle"; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281:L1130-7

-
- [118](#) Heaton T, Rowe J, Turner S et al.; “An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children”; *Lancet* 2005; 365:142-9
- [119](#) Maizels RM, Sartono E, Kurniawan A et al.; “T-cell activation and the balance of antibody isotypes in human lymphatic filariasis”; *Parasitol Today* 1995; 11:50-56.
- [120](#) Doetze A, Satoguina J, Burchard G et al.; “Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. In. *Immunol* 2000; 12: 623-630
- [121](#) Wilson MS, Taylor MD, Balic A et al.; „Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells”; *Exp Med.* 2005; 202(9):1199-212
- [122](#) Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH et al.; “Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity”; *Nat. Med.* 8 (2002): 1024–1032
- [123](#) Kitagaki K, Businga TR, Racila D et al.; „Intestinal helminths protect in a murine model of asthma“; *J Immunol.* 2006; 177(3):1628-35
- [124](#) Dittrich AM, Erbacher A, Specht S et al.; “Helminth Infection with *Litomosoides sigmodontis* Induces Regulatory T Cells and Inhibits Allergic Sensitization, Airway Inflammation, and Hyperreactivity in a Murine Asthma Model“; *J Immunol.* 2008; 180(3):1792-9

6 Appendizes

6.1 Lebenslauf

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

6.2 Publikationsliste

Anna MD, Dittrich AM, Erbacher A, Specht S, Diesner F, Krokowski M, Avagyan A, Stock P, Ahrens B, Hoffmann WH, Hoerauf A, Hamelmann E.; "Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T-cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation and hyperreactivity in a murine asthma model"; J Immunol. 2008; 180(3):1792-9

6.3 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Felix Diesner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Infektion mit *Litomosoides sigmodontis* induziert regulatorische T-Helferzellen und supprimiert den asthmatischen Phänotyp in einem Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagungen

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. med. Eckard Hamelmann für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Beratung und Begleitung.

Ganz besonders Frau Dr. med. Anna-Maria Dittrich für ihre freundliche, unermüdliche und motivierende Betreuung und Beratung sowie die wissenschaftliche Begleitung meiner Arbeit.

Frau Christine Seib für ihre methodische und moralische Unterstützung, Hilfe und Rettung in allen Laborlagen.

Der gesamten ehemaligen Forschungsgruppe Hamelmann aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité für das sehr angenehme und unterstützende Arbeitsklima und die schöne Zeit.

Herrn Dipl. Biol. Wolfgang Hoffmann und seiner Arbeitsgruppe Feldforschung des Instituts für Tropenmedizin in Tübingen für die Bereitstellung und Implantation der Filarien.

Meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Geduld auf diesem Weg.