

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Felix Maier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss einer Helminthen-Infektion
auf die allergische Sensibilisierung
und das IgE-Repertoire
im murinen Asthmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

von
Michael Liebethuth
aus Bremen

Marburg 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 12.05.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. med. Rolf Felix Maier

Korreferent: Frau Prof. Dr. Dr. Pfefferle

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1 Hygiene-Hypothese und Helminthen	6
1.2 Allergisches Asthma bronchiale	8
1.2.1 Allergenaufnahme und allergische Sensibilisierung	8
1.2.2 Allergische Frühphase-Reaktion	9
1.2.3 Allergische Spätphase-Reaktion und chronische Entzündung	10
1.3 Helminthen-Infektion	11
1.3.1 Evolution des Verhältnisses zwischen Mensch und Helminthen	12
1.3.2 Helminthen induzieren ein antiinflammatorisches Netzwerk	13
1.3.3 Wirkung von Helminthen-Infektionen auf den allergischen Phänotyp in Mausmodellen	1
1.3.4 Mausmodell der Helminthen-Infektion mit <i>L. sigmodontis</i>	20
1.4 B-Zelle und IgE-Repertoire	22
1.4.1 Struktur des IgE-Antikörpers	22
1.4.2 Entstehung und Diversifizierung des Antikörperrepertoires	23
1.4.3 Klassenwechsel	28
1.4.4 Das IgE-Repertoire in Allergie-Mausmodellen und bei Allergikern	29
1.4.5 Das IgE-Repertoire in Helminthen-Mausmodellen und bei Parasiten-infizierten Menschen	29
1.5 Hypothese	30
2. MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 Mausmodell und Tierhaltung	31
2.1.1 Nicht infizierte Kontrolltiere	31
2.1.2 Mit <i>L. sigmodontis</i> infizierte Tiere	31
2.1.3 Murines Asthmodell	31
2.1.4 Blutentnahme	33
2.1.5 Nachweis der Helminthen-Infektion	33
2.2 Bronchoalveoläre Lavage und Zelldifferenzierung	34
2.2.1 Durchführung der bronchoalveolären Lavage	35
2.2.2 Zytozentrifugation und mikroskopische Zelldifferenzierung	35
2.2.3 Zellzählung	35
2.3 Bestimmung von Antikörperkonzentrationen im Serum	36
2.4 B-Zell-Differenzierung mittels Durchflusszytometrie	38
2.4.1 Probengewinnung und Zellaufbereitung der Milz	40
2.4.2 Oberflächenfärbungen mit B-Zell-Antikörpern	40
2.4.3 B-Zell-Differenzierung	40
2.5 Charakterisierung des IgE-Repertoires in der Milz	41
2.5.1 RNA-Extraktion	41
2.5.2 Reverse Transkriptase-PCR für murines IgE	42
2.5.3 Gel-Elektrophorese und DNA-Extraktion	44
2.5.4 Ligation, Transformation und Klonierung	45
2.5.5 Extraktion und Aufreinigung der DNA	46
2.5.6 Inset-Kontrollverdau	47
2.5.7 Sequenzanalyse	47
2.6 Statistik	50

3. ERGEBNISSE	52
3.1 Alle Tiere der Helminthengruppe waren Wurm-infiziert	52
3.2 Infektion mit <i>L. sigmodontis</i> verhinderte eosinophilen Zellinflux in die Atemwege	52
3.3 Der Anteil splenischer Plasmazellen nach allergischer Sensibilisierung war bei Helminthen-infizierten Mäusen deutlich reduziert.....	54
3.4 Sowohl OVA-Sensibilisierung als auch Infektion mit <i>L. sigmodontis</i> waren starke Induktoren einer humoralen Immunantwort.....	55
3.4.1 Gesamt-IgM.....	55
3.4.2 Gesamt-IgE	56
3.4.3 Ovalbumin-spezifisches IgE	58
3.4.4 Gesamt-IgG ₁	58
3.4.5 Ovalbumin-spezifisches IgG ₁	59
3.4.6 Gesamt-IgG _{2a}	60
3.5 Eine Helminthen-Infektion modifizierte das IgE-Repertoire	61
3.5.1 Zuordnung zu V _H -, D- und J _H -Genfamilien	62
3.5.2 D-Leseraster-Präferenz	64
3.5.3 CDR-H3-Komposition.....	65
3.5.4 CDR-H3-Länge.....	66
3.5.5 CDR-H3-Aminosäurefrequenz	67
3.5.6 CDR-H3-Hydrophobizität nach Kyte und Doolittle	68
3.5.7 CDR-H3-Struktur nach Shirai	69
3.5.8 CDR-H3-Variabilität nach Shannon und Kabat und Wu	70
3.5.9 Somatische Mutationsrate.....	70
3.5.10 Antigenselektion	71
3.5.11 Klonotypische Diversität	73
4. DISKUSSION	75
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	75
4.2 Kritische Betrachtung des Tiermodells	76
4.2.1 Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsentszündung	76
4.2.2 Das kombinierte Mausmodell von Helminthen-Infektion und Asthma bronchiale	77
4.3 Eine Helminthen-Infektion schützt vor allergischer Atemwegsentszündung	80
4.4 Eine Helminthen-Infektion „konkurrierte“ mit der allergischen Sensibilisierung	80
4.4.1 Trotz ausgeprägter humoraler Immunantwort: Wenig Plasmazellen in der Milz	81
4.4.2 Die Helminthen-Infektion führte zu einer dauerhaften IgM-Produktion	81
4.4.3 Die <i>IgG₁-Blocking-Hypothese</i> zeigte sich in dem hier verwendeten Modell nicht.....	82
4.4.4 <i>IgE-Blocking-Hypothese</i> : Ein möglicher Schutzmechanismus.....	84
4.5 Eine Helminthen-Infektion veränderte das IgE-Repertoire	85
4.5.1 Veränderter Charakter der CDR-H3	86
4.5.2 Eine Helminthen-Infektion induzierte im Asthmamodell ein oligoklonales IgE-Repertoire durch klassische Affinitätsreifung	88
4.6 Fazit	90
5. DEUTSCHE UND ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG	91
5.1 Inhalt	91
5.2 Summary	92

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
7. ANHANG	96
7.1 Shannon-Entropie und Kabat-Wu-Plot.....	96
8. LITERATURVERZEICHNIS	99
09. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	111
10. DANKSAGUNG	112
11. PUBLIKATIONEN	113

1. Einleitung

1.1 Hygiene-Hypothese und Helminthen

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts beobachtete man einen rasanten Anstieg der Prävalenz von allergischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen in der industrialisierten Welt. So leiden heute über 130 Millionen Menschen an allergischem Asthma bronchiale (ISAAC, 1998; Bach, 2002; Yazdanbakhsh et al., 2002). In Entwicklungsländern hingegen blieb die Prävalenz von Allergien und Autoimmunerkrankungen niedrig. Auch in ländlichen Regionen der Industrieländer erkrankten auffällig weniger Menschen an Allergien als in Städten. David P. Strachan stellte 1989 in Großbritannien eine inverse Korrelation zwischen Familiengröße, Anzahl älterer Geschwister und allergischer Rhinokonjunktivitis fest (Strachan, 1989). Große Familien und insbesondere die Anzahl älterer Geschwister schienen vor Heuschnupfen zu schützen. In diesem Kontext wurde die sog. *Hygiene-Hypothese* entwickelt. Demnach sei die steigende Prävalenz von allergischen Erkrankungen auf stark verbesserte Hygienebedingungen zurückzuführen. „Zu viel Hygiene“ führe zu einer mangelnden Stimulation des kindlichen Immunsystems durch bakterielle Infektionen. Diese gelten als Induktoren einer T-Helfer-Zell (T_H)-1-wendigen Immunantwort. Fällt dieser Reiz weg, so die Hygiene-Hypothese, führe dies zu einer Dysregulation des Immunsystems mit einer Verlagerung hin zu einer T_H 2-wendigen Immunantwort. Das natürliche Gleichgewicht zwischen zwei zentralen Schienen der Immunabwehr sei somit gestört. Die Folge dieser Dysregulation ist eine überschießende und inadäquate Reaktion auf ungefährliche Umweltantigene (**Abb. 1**).

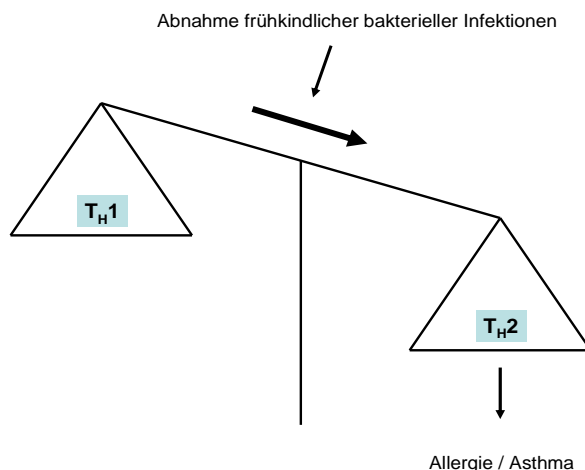


Abb. 1: Dysregulation der Immunantwort

Das natürliche Gleichgewicht zwischen T_H 1- und T_H 2-Immunantwort wird insbesondere durch die Abnahme frühkindlicher bakterieller Infektionen gestört. Es findet eine Verlagerung hin zu T_H 2-Effektormechanismen statt, wodurch das allergische Potential erhöht wird (Hygiene-Hypothese).

Einleitung

Zunächst gar nicht berücksichtigt wurde von Vertretern der Hygiene-Hypothese jedoch die Rolle von humanpathogenen Parasiten. Erst in den vergangenen zehn Jahren gerieten Helminthen verstärkt in den Fokus einer erweiterten Hygiene-Hypothese. Es wird in diesem Zusammenhang argumentiert, dass Helminthen in der menschlichen Evolution schon seit über einer Million Jahren ein ständiger Wegbegleiter gewesen sind und eine Abnahme der Prävalenz parasitärer Infektionen möglicherweise zu einer starken Zunahme der Prävalenz allergischer Erkrankungen geführt habe (Rook, 2008).

Über eine Milliarde Menschen weltweit sind auch heute noch mit Helminthen infiziert, hauptsächlich in Ländern der Dritten Welt (Arruda und Santos, 2005; van Riet et al., 2007). In zahlreichen Studien wird berichtet, dass eine Infektion mit Helminthen vor Allergien schützen könnte. Flohr et al. identifizierten in einer Meta-Analyse 16 jüngere epidemiologische Studien mit einer inversen Korrelation von Wurm-Infektionen und atopischen Erkrankungen (Flohr et al., 2009). Auch das Auftreten von allergischem Asthma bronchiale war in verschiedenen Studien mit Wurm-Infektionen invers korreliert (Scrivener et al., 2001; Dagoye et al., 2003; Medeiros et al., 2003). Einige Studien hingegen zeigten keinen Anhalt für einen Schutz von Wurm-Infektionen gegen Allergien (Cooper et al., 2003; Davey et al., 2005; Cooper et al., 2006). Manche Studien kamen sogar zu dem Ergebnis, dass eine Wurm-Infektion das Risiko für atopische Erkrankungen erhöhe (Buijs et al., 1997; Lynch et al., 1997; Palmer et al., 2002). Diese teils inkonsistente Studienlage ist möglicherweise auf die Unterschiede in der Studienpopulation, wie auch auf unterschiedliche Helminthenspezies zurückzuführen (van Riet et al., 2007).

Wurm-Infektionen haben vielfältige Wirkungen auf ihrem Wirt. So können Infektionen völlig asymptomatisch sein oder mit geringer Beeinflussung der Lebensqualität einhergehen. Oft treten nur leichte gastrointestinale Beschwerden, Dermatitis oder minderschwere Lymphödeme auf. Es sind aber auch schwere Krankheitsbilder wie Darmverschluss (*Ascaris lumbricoides*), Elephantiasis (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*), sekundäre Pneumonie (*Strongyloides stercoralis*), Flussblindheit (*Onchocerca volvulus*), Glottisödem (*Loa loa*) und bakterielle Superinfektion von Hauteintrittsstellen möglich (z. B. *Dracunculus medinensis*: „Guineawurm“) (Hof und Dörries, 2005; Taylor et al., 2010). Ein möglicherweise für Allergien prädisponierter Patient würde demnach natürlich nur von einer asymptomatischen oder allenfalls milden Helminthen-

Einleitung

Infektion „profitieren“, da von Würmern hervorgerufene schwere Krankheitsbilder selbst großes Leiden verursachen.

1.2 Allergisches Asthma bronchiale

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes System zum Schutz des Körpers vor Krankheitserregern. Reagiert das Immunsystem auf ungefährliche Umweltantigene oder körpereigene Proteine mit einer überschießenden Immunreaktion, sind Allergien bzw. Autoimmunerkrankungen die Folge. Eine der möglichen Erkrankungen ist das allergische Asthma bronchiale, welches durch reversible Atemwegsobstruktion, Atemwegsentszündung, Hyperreaktivität der Atemwege und einen Umbau der Atemwege charakterisiert ist (Maddox und Schwartz, 2002). Die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale umfasst Vorgänge, die mit der inhalativen Aufnahme eines Allergens beginnen und über eine T_H2-Immunantwort in der Auslösung der charakteristischen Symptome (Atemwegsobstruktion, -entzündung, -hyperreaktivität, -umbau) enden. Sie beinhaltet die systemische Sensibilisierung, eine allergische Früh- und Spätphase-Reaktion, sowie die chronische Atemwegsentszündung, die letztendlich zu einem Umbau der Atemwege („*remodelling*“) führen kann.

1.2.1 Allergenaufnahme und allergische Sensibilisierung

Am Anfang der allergischen Immunantwort steht die systemische Sensibilisierung auf das Allergen. Im Fall von respiratorischen Allergien wird dieses inhalativ über die Atemwege aufgenommen. Ein natürliches Hindernis für Pathogene ist das intakte Atemwegsepithel. Die Epithelzellen sind durch *tight junctions* miteinander verbunden. Einige Allergene schädigen die *tight junctions* mit ihrer Protease-Aktivität (z.B. das Antigen der Hausstaubmilbe) und ermöglichen so ein Eindringen in den subepithelialen Raum. Andere Allergene wiederum induzieren die Produktion von vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) und erhöhen so die Permeabilität des Atemwegsepithels (Buc et al., 2009).

Im subepithelialen und basolateralen Raum befinden sich dendritische Zellen (DC) und Alveolarmakrophagen, die eine erste Verteidigungslinie gegenüber Pathogenen bilden. Dendritische Zellen haben Zellausläufer, die - ähnlich einem Periskop - in das Lumen

Einleitung

der Atemwege hineinragen und Antigene aufnehmen können. Sie stehen in einem ständigen Kontakt mit aerogenen Antigenen (Buc et al., 2009). Das aufgenommene Antigen wird prozessiert und über Proteine des *major histocompatibility complex (MHC)-II* auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Anschließend erfolgt eine Migration in den nächstgelegenen Lymphknoten wo die MHC-II-Moleküle naiven $CD4^+$ -T-Lymphozyten und naiven B-Zellen präsentiert werden. Ungefährliche Umweltantigene führen in der Regel zu einer Toleranz, wohingegen Pathogene kostimulatorische Signale und die Produktion von Zytokinen mit einer spezifischen Immunantwort zur Folge haben. Allergene, die prinzipiell auch ungefährliche Umweltantigene sind, können im Organismus zu ähnlichen Immunantworten führen. Bei einer allergischen Reaktion findet eine starke Polarisierung der T-Lymphozyten hin zu T_H2 -Zellen statt. T_H2 -Zellen sezernieren daraufhin Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-6 und IL-13. Besonders IL-4 führt zur Aktivierung reifer, naiver B-Zellen und ihrer Ausdifferenzierung zu Plasmazellen. IL-4 und IL-13 führen zudem zum Isotypen-Wechsel der Plasmazelle hin zur Produktion von Allergen-spezifischen Immunglobulin (Ig)-E-Antikörpern (Maddox und Schwartz, 2002; Murphy et al., 2009).

1.2.2 Allergische Frühphase-Reaktion

Sezerniertes Allergen-spezifisches IgE wird von Zellen gebunden, die den $Fc\epsilon$ -Rezeptor (*fragment cristallizable ϵ receptor, Fc ϵ R*) exprimieren. Der hochaffine $Fc\epsilon$ RI wird auf Mastzellen, basophilen Granulozyten und aktivierten eosinophilen Granulozyten exprimiert. Der niedrigaffine $Fc\epsilon$ RII (CD23) wird auf B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten, eosinophilen Granulozyten, Blutplättchen, folliculären dendritischen Zellen und Thymusepithelzellen exprimiert (Murphy et al., 2009).

Mastzellen reifen im Gewebe überall dort, wo eine ausgeprägte Grenzfläche zur Umwelt besteht und daher ein Kontakt mit Fremdanitgenen häufig ist. Die Schleimhäute von Gastrointestinaltrakt und Atemwegstrakt sind daher Gewebe mit hoher Mastzellichte. Die Bindung von IgE durch $Fc\epsilon$ RI und deren Quervernetzung führt zur Degranulierung der Mastzelle mit Freisetzung von toxischen Mediatoren (Histamin, Heparin), Enzymen (u.a. Tryptase), Zytokinen (IL-4, IL-4, IL-5, IL-13; *Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF)*), Chemokinen und Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, *plättchenaktivierender Faktor (PAF)*) (Murphy et al., 2009). Folge ist u.a. eine Kontraktion der glatten

Einleitung

Atemwegsmuskulatur mit Bronchospasmus, Schleimsekretion und Vasodilatation. Erhöhte Gefäßdurchlässigkeit führt zu Plasmaödem in den Atemwegswänden und in den Atemwegen. Das Lumen der Atemwege wird dadurch eingeengt. Zusammen können diese Phänomene zum Vollbild eines Asthma-Anfalls mit akuter Dyspnoe führen. Die sezernierten Interleukine unterhalten die akute und chronische Entzündungsreaktion in einem positiven Rückkopplungsmechanismus. Zudem werden weitere T_H2-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen, eosinophile und basophile Granulozyten zum Ort der Entzündung gelockt. Die allergische Frühphase-Reaktion tritt innerhalb von Minuten nach Allergenkontakt auf (Bousquet et al., 2000; Maddox und Schwartz, 2002; Murphy et al., 2009).

1.2.3 Allergische Spätphase-Reaktion und chronische Entzündung

Sechs bis neun Stunden nach Allergen-Kontakt tritt die Spätphase-Reaktion ein (Bousquet et al., 2000). Eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T_H2-Zellen sind beteiligt an der Unterhaltung der Entzündungsreaktion. Eosinophile Granulozyten spielen dabei eine dominante Rolle und sind wahrscheinlich Hauptverursacher der bei der chronischen Entzündung entstehenden Gewebeschäden (Murphy et al., 2009). Von eosinophilen Granulozyten sezernierte Stoffe sind unter anderem Histamin, das basische Hauptprotein (*major basic protein*), das *kationische Eosinophilen-Protein*, *Eosinophilen-Neurotoxin*, Peroxidasen, Kollagenasen, Leukotriene, PAF, sowie Zytokine und Chemokine (Murphy et al., 2009). Zu letzteren gehören IL-3, IL-5 und GM-CSF. Diese sind Wachstumsfaktoren für die Bildung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, führen aber auch zur Reifung von basophilen Granulozyten und locken weitere Leukozyten an. Aktivierte basophile Granulozyten sezernieren ebenfalls Histamin und scheinen zudem eine Hauptquelle für IL-4 und IL-13 zu sein, die die T_H2-Antwort weiter unterhalten (Buc et al., 2009). Die Spätreaktion führt somit zu ähnlichen Wirkungen wie die Frühreaktion (Bronchospasmus, Obstruktion) und ist durch eine T-Zell-vermittelte zweite Kontraktionsphase der glatten Muskulatur und anhaltende Ödeme gekennzeichnet. Im Gegensatz zur Frühreaktion überwiegt allerdings die Entzündungskomponente. Letztendlich kann es durch kontinuierliche Antigenzufuhr und Aufrechterhaltung der proinflammatorischen Stimuli zur chronischen allergischen Atemwegsentzündung kommen. Diese ist prinzipiell als eine Typ-4-Hypersensitivitätsreaktion zu betrachten, die neben der T_H2-Antwort auch eine T_H1-Antwort und das Vorhandensein

Einleitung

zytotoxischer T-Zellen einschließt (Murphy et al., 2009). Auch proinflammatorische T_H17 -Zellen sind möglicherweise vermehrt zu finden (Buc et al., 2009).

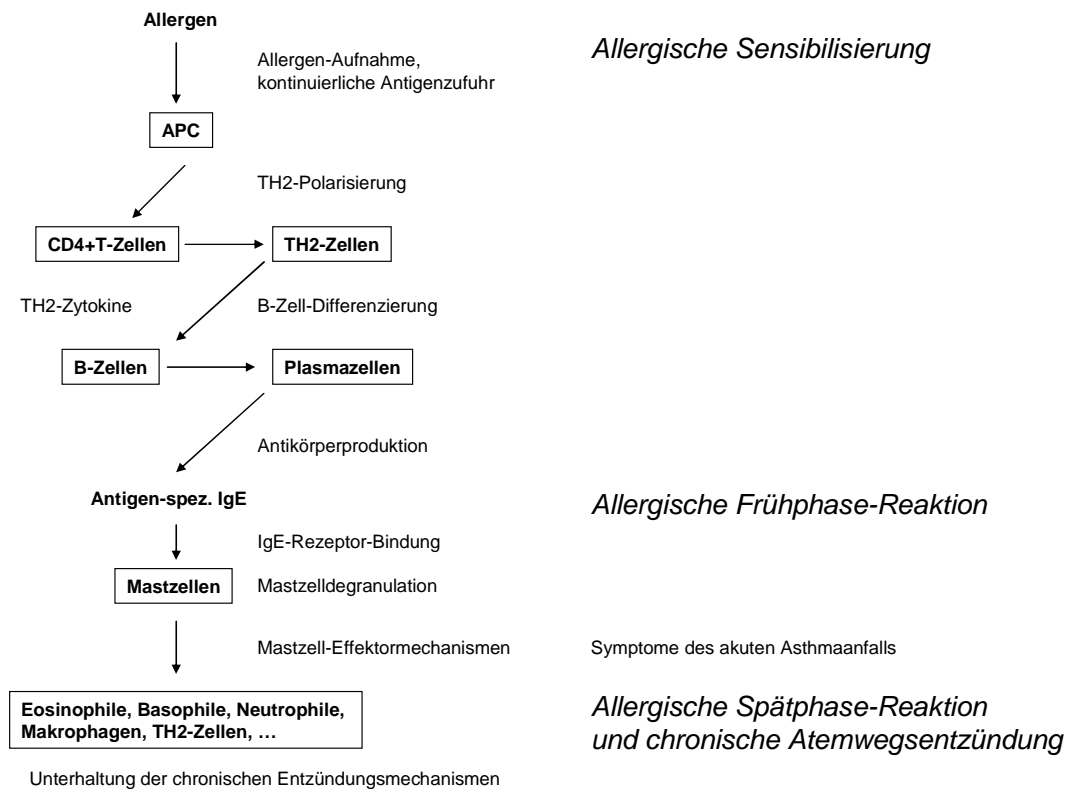


Abb. 2: Von der allergischen Sensibilisierung zur chronischen Atemwegsentzündung

Allergenaufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) führt durch T_H2 -Polarisierung zur Differenzierung von B-Zellen hin zu IgE-produzierenden Plasmazellen (allergische Sensibilisierung). Antigen-spezifisches IgE bindet an den auf Mastzellen exprimierten IgE-Rezeptor (FcεRI), was eine Degranulation der Mastzelle bewirkt. Über verschiedene Effektormechanismen kann es zur Symptomatik der akuten Dyspnoe im Asthma-Anfall kommen. Unter Beteiligung verschiedener Zelltypen beginnt Stunden später die allergische Spätphase-Reaktion mit überwiegender Entzündungskomponente. Durch kontinuierliche Allergenzufuhr und andauernde Sensibilisierung bildet sich im Laufe der Zeit eine chronische Atemwegsentzündung und Umbaumechanismen der Lunge werden initiiert („*airway remodelling*“).

1.3 Helminthen-Infektion

Auch Helminthen sind Induktoren einer starken T_H2 -Antwort im Menschen. Evolutionär betrachtet stellen sie sogar wahrscheinlich das eigentliche Ziel dieser hochspezialisierten Immunantwort und ihrer Effektormechanismen dar (Murphy et al., 2009). Da Helminthen viel größer sind als Viren und Bakterien, können sie nicht

Einleitung

phagozytiert werden. Im Rahmen einer T_H2 -Antwort setzen Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten toxische Metabolite frei (s.o.), um die Parasiten zu bekämpfen. Interessanterweise zeigen diese Effektormechanismen bei einer Helminthen-Infektion jedoch in der Mehrzahl der Fälle kaum Wirkung oder werden gar nicht erst induziert. Ganz im Gegenteil scheinen Helminthen-Infektionen sogar vor einer überschießenden Immunreaktion zu schützen. Dieses „*Helminthen-Paradoxon*“ (Smits et al., 2010), also das antiallergische Potential im Rahmen einer starken T_H2 -Antwort, gilt es zu entschlüsseln. Mit diesem Phänomen befasst sich der folgende Teil der vorliegenden Arbeit.

1.3.1 Evolution des Verhältnisses zwischen Mensch und Helminthen

Fast ein Viertel der Weltbevölkerung ist heute mit Helminthen infiziert (Fallon und Mangan, 2007; Liu et al., 2010b). Ein Großteil dieser Infektionen ist chronisch und asymptomatisch. Aus evolutionärer Sicht scheint dies sinnvoll und die Folge natürlicher Selektion, da der Mensch (bzw. dessen humanoider Vorfahre) seit ca. einer Million Jahren kontinuierlich mit Helminthen konfrontiert worden ist (Rook, 2008). Beide Spezies sind evolutionistisch betrachtet an ihrem eigenen Überleben und ihrer Reproduktion „interessiert“. Demnach war das evolutionär vorrangige Ziel des Menschen seine „Fitness“ zu erhöhen und Helminthen abzutöten. Diese entwickelten jedoch ihrerseits Mechanismen, um dieser Abtötung durch den Wirt zu entgehen. Das Ergebnis ist eine Art Arrangement, in dem Helminthen vom menschlichen Organismus toleriert werden, eine zu starke Vermehrung der Parasiten und Wirtsschädigung jedoch verhindert wird (Rook, 2008). Im Gegensatz zum Kommensalismus, bei dem der Wirt in keiner Weise durch das Vorhandensein eines „Mitessers“ geschädigt wird, muss beim Verhältnis Mensch – Helminthen jedoch immer noch von Parasitismus gesprochen werden, da in vielen Fällen eine Infektion pathologische Auswirkungen haben kann (s.o.). In Fällen, in denen die Infektion nahezu asymptomatisch verläuft, kann man dies zum einen auf ein gut funktionierendes menschliches Immunsystem zurückführen, zum anderen auf das immunmodulatorische Potential des Helminthen, welches eine Abtötung des Parasiten verhindert und nicht auf die Unschädlichkeit des Helminthen per se (Diaz, 2007). Viele der krankmachenden Aspekte einer Helminthen-Infektion entstehen wiederum gar nicht durch Helminthen selbst, sondern durch die starke Immunantwort des Wirts. So z.B. bei der Elefantiasis, einem starken peripheren Lymphödem, das durch die Abstoßung eines Helminthen und die damit verbundenen

Einleitung

Gewebeschäden durch abgetötete Parasiten entsteht (Taylor et al., 2010). Eine immunsuppressive Antwort des menschlichen Organismus auf eine Helminthen-Infektion könnte demnach durch natürliche Selektion bevorzugt worden sein.

Trotzdem induzieren Helminthen eine starke T_H2 -Antwort im menschlichen Organismus. Diese kann zur Limitation der Infektion durch opsonierende Antikörper vom Typ IgG_1 und IgE beitragen (Fallon and Mangan, 2007; McCoy et al., 2008) und schützt so den Wirt vor einer zu starken Infektion. Aber auch der Parasit profitiert, da seine Vermehrung nicht gänzlich erliegt und sein Wirt nicht stirbt. In diesem Zusammenhang wird die Hygiene-Hypothese auch als „*old friends hypothesis*“ formuliert: Die Ko-Evolution von Mensch und (in der Umwelt immer in großen Mengen vorhandenen) Helminthen machte eine Toleranz der Parasiten durch den menschlichen Organismus notwendig (Rook, 2008).

1.3.2 Helminthen induzieren ein antiinflammatorisches Netzwerk

Nachdem nun in den letzten Jahren auch Helminthen-Infektionen in den Fokus einer erweiterten Hygiene-Hypothese gerieten, wurde eine Reihe von Helminthen-Mausmodellen etabliert, um die durch Parasiten hervorgerufene Immunantwort zu charakterisieren. Zudem wurden Helminthen-Mausmodelle mit Asthma-Mausmodellen kombiniert, um direkte Hinweise auf einen möglichen protektiven Einfluss und seinen zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten. Es muss demnach klar unterschieden werden zwischen einer Immunantwort im Rahmen einer reinen Helminthen-Infektion (Wildinfektion) - wie sie in diesem Kapitel dargestellt werden soll - und einer durch eine Infektion veränderten Immunantwort im Allergie-Modell mit „kurativem Ansatz“, welche im darauffolgenden Kapitel thematisiert wird (vgl. Kapitel 1.3.3).

Die im Helminthen-Mausmodell hervorgerufenen immunologischen Mechanismen werden als „modifizierte T_H2 -Antwort“ (Diaz and Allen, 2007) oder „alternative T_H2 -Antwort“ (Yazdanbakhsh et al., 2002) zusammengefasst (**Abb. 3**). Als zentral wird die Induktion eines antiinflammatorischen regulatorischen Netzwerks mit verschiedenen charakteristischen Komponenten betrachtet. Dabei sind Wurm-Infektionen Induktoren einer starken T_H2 -Antwort mit hohen systemischen IgE - und IgG_1 -Konzentrationen (respektive IgG_4 beim Menschen), ähnlich einer allergischen T_H2 -Antwort. Mit einem antiallergischen, antiinflammatorischen Potential assoziiert sind jedoch erhöhte IL-10-

Einleitung

und TGF- β -Konzentrationen, hohe Zahl und Aktivität von regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (*Treg*) und alternativ aktivierten Makrophagen (AAM) (Mingomataj et al., 2006; Wilson and Maizels, 2006; Kreider et al., 2007; Smits et al., 2010). Ein regulatorisches Netzwerk wird jedoch nicht bei jeder Helminthen-Infektion induziert, was auch ein möglicher Grund für die divergente epidemiologische Studienlage sein könnte. Smits et al. formulierten fünf wichtige Faktoren, die den Schutz vor Allergien durch eine Helminthen-Infektion positiv beeinflussen (Smits et al., 2010):

1. Zeitpunkt der ersten Infektion (frühe Kindheit)
2. Dauer der Infektion (langanhaltende, chronische Infektion)
3. Intensität der Infektion (ausreichende Wurmlast)
4. Genetik des Wirts (Nicht-Atopiker)
5. Helminthenspezies

Im Folgenden werden die Schlüsselfiguren eines antiinflammatorischen Netzwerkes besprochen (**Abb. 3, Abb. 4**).

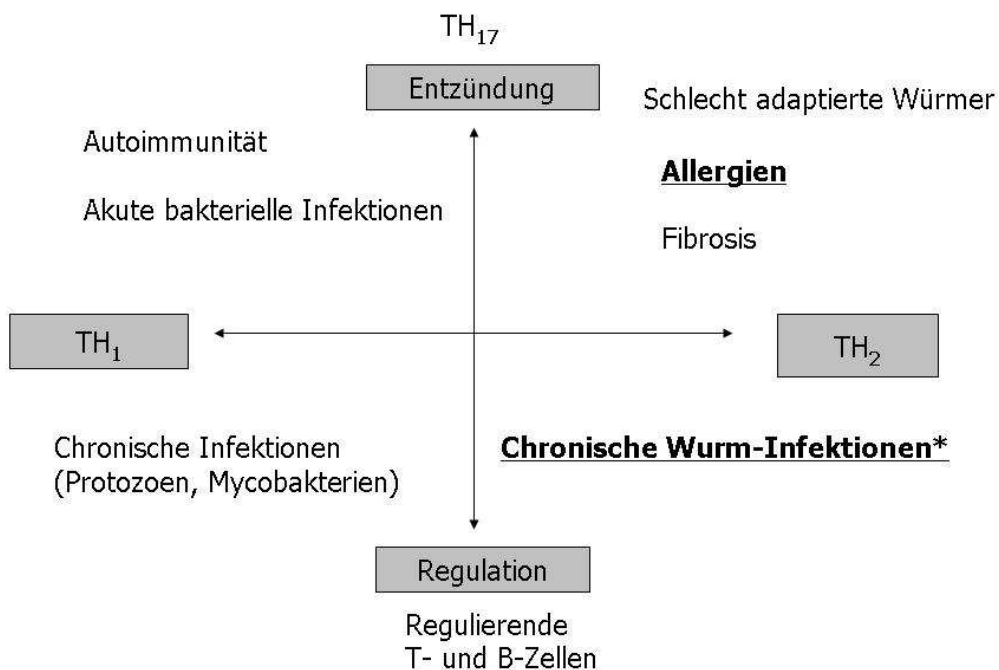


Abb. 3: Modifizierte TH₂-Antwort induziert durch Helminthen-Infektion (mod. nach Diaz und Allen, 2007)

*: Wurm-Infektionen, die den Kriterien nach Smits et al. entsprechen: Infektion in der frühen Kindheit; langanhaltende, chronische Infektion; ausreichende Wurmlast, immunsuppressiv wirksame Helminthenspezies (Smits et al. 2010).

Einleitung

Durch Helminthen sezernierte immunmodulatorische Substanzen

Von Helminthen sezernierte Stoffe können auf verschiedenen Ebenen mit dem Immunsystem des Wirts interagieren, von der initialen Antigenerkennung bis hin zu Effektormechanismen der Immunabwehr (Hewitson et al., 2009). Bekannt ist die Fähigkeit von Schistosomen-Eiern durch Sekretion des Proteins alpha-1, besser bekannt als „IPSE“ (*IL-4 inducing principle of schistosome eggs*), eine robuste T_H2 -Immunantwort zu induzieren (Hewitson et al., 2009). Andererseits können verschiedene Zellklassen inhibiert (z. B. neutrophile Granulozyten, T-Zellen) oder zur Proliferation angeregt werden (z. B. B1-Zellen, AAM, Treg) (Smith et al., 2005; Schnoeller et al., 2008). Häufig nutzen Helminthen dabei Zytokinhomologe, die u. a. an den TGF- β -Rezeptor binden (Hewitson et al., 2009; Grainger et al., 2010). Einigen Helminthen wurde des Weiteren die Fähigkeit zu molekularem Mimikry, der Fähigkeit sich selbst durch Akquirierung von Wirts-Oberflächenmolekülen zu schützen, nachgewiesen (van Riet et al., 2007). Eine der wichtigsten Funktionen der von Helminthen sezernierten Stoffe ist jedoch der Schutz vor toxischen Metaboliten der Wirtsabwehr. Hier spielen Protease-Inhibitoren (Cystatine, Serpine), Antioxidantien, Acetylcholinesterasen und PAF-Hydrolase eine wichtige Rolle (Hewitson et al., 2009).

Regulatorische T-Zellen, IL-10 und TGF- β

Eine tragende Rolle im regulatorischen Netzwerk wird $CD4^+CD25^+$ „natürlichen“ regulatorischen T-Zellen (Treg) zugeschrieben. Das Vorhandensein von Treg und die durch sie induzierte Immunsuppression zeigte sich für das Überleben von Helminthen im Wirt unverzichtbar (Taylor et al., 2007). Auch andere Arten von regulatorischen T-Zellen, wie Tr1-Zellen oder Th3-Zellen, werden in diesem Zusammenhang diskutiert. Alle drei Zellarten sind in der Lage, IL-10 zu bilden. IL-10 wird die Rolle als zentraler Mediator der Helminthen-induzierten Immunsuppression zugeschrieben. IL-10 hemmt direkt und indirekt (über APC) die Produktion von proinflammatorischen T_H1 -Zytokinen durch T_H1 -Zellen und Monozyten. Auch hemmt es die Antigenprozessierung und Antigenpräsentation von DC bzw. APC, sowie deren Zytokinproduktion und Migration zu den lokalen Lymphknoten. Zudem bewirkt IL-10 eine Herunterregulierung von MHC-II-Molekülen auf DC, Monozyten und Makrophagen (Grütz, 2005; Nakagome et al., 2005; Murphy et al., 2009). IL-10 ist in gewisser Weise der Gegenspieler zu IL-4, einem klassischen T_H2 -Zytokin, das B-Zellen, T-Zellen und Mastzellen aktiviert (Murphy et al., 2009). IL-4-abhängige Effektormechanismen

Einleitung

hielten in einem *L. sigmodontis*-Modell den Wurm in Schach, während IL-10 das Überleben des Wurms sicherte (Specht et al., 2004). *L. sigmodontis*-infizierte Mäuse, die eine Überexpression von IL-10 durch Makrophagen aufwiesen, zeigten dementsprechend eine deutlich erhöhte Wurmlast (Specht et al., 2011b).

CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und Th3-Zellen können außerdem TGF- β bilden, ein Zytokin, das ebenfalls antiinflammatorisches Potential besitzt (Wilson and Maizels, 2006) u. a. durch die Hemmung der Proliferation und Aktivierung naiver T-Zellen, sowie Verstärkung der Treg-Aktivität (Salib and Howarth, 2009). Regulatorische Th3-Zellen sezernieren große Mengen an TGF- β und wirken hemmend auf die T_H1- und T_H2-Immunantwort. Bei dem Wundheilungsprozess in den Atemwegen hat TGF- β eine wichtige koordinierende Rolle inne. Es sorgt für Fibroblastenaktivierung und -proliferation und die Ablagerung extrazellulärer Matrix. Bei der physiologischen Wundheilung wird dieser Prozess rechtzeitig beendet. Bei anhaltend hohen Konzentrationen von TGF- β kann jedoch eine subepitheliale Fibrose die Folge sein (Salib and Howarth, 2009).

Alternativ aktivierte Makrophagen (AAM)

Ebenfalls zentral ist die Rolle von AAM. Diese Abwehrzellen unterscheiden sich von anderen Makrophagen durch die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle und ihrer Eigenschaften. Sie hemmen eine T_H1-vermittelte Entzündung u.a. durch Produktion von IL-10, TGF- β und Phosphodiesterasen. Auch Wundheilung wird durch die Produktion pro-fibrotischer Mediatoren begünstigt (u.a. Arginase, Prolin, Polyamine). Andererseits sorgt diese Zellgruppe auch für eine Begrenzung der Wurmlast, indem sie die lokale Abwehr durch Attraktion von eosinophilen Granulozyten zum Helminthen, Granulombildung und lokaler T_H2-Antwort fördert. AAM werden durch Helminthen gezielt aktiviert. In einem *L. sigmodontis*-Modell wurde nachgewiesen, dass der Nematode IL-4 abhängig vor allem AAM zum Ort der Infektion lockt, hingegen kaum neutrophile Granulozyten und Monozyten (Jenkins et al., 2011). Das Ausmaß der AAM-Aktivität scheint vom Infektionsstatus abhängig zu sein. So hat eine präpatente Infektion nur eine lokale (Lunge) immunsuppressive Wirkung auf CD4⁺ T-Zellen während eine patente Infektion die immunsuppressive Wirkung auch auf die drainierenden thorakalen Lymphknoten ausweitet (Taylor et al., 2006).

Einleitung

Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen erkennen Antigene und werden nach deren Prozessierung im regionalen Lymphknoten zu Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Helminthen-Antigene induzieren die Konversion in einen speziellen Subtyp von DC mit regulatorischem Charakter („*DCreg*“). Dieser sorgt für eine vermehrte Aktivierung von Treg (Rook, 2008). In einem *L. sigmodontis*-Modell sorgen DC über die Sekretion von *CCL17* (*chemokine ligand 17*) für eine Limitierung der Infektion durch Kontrolle der Mastzell-Aktivität. (Specht et al., 2011a).

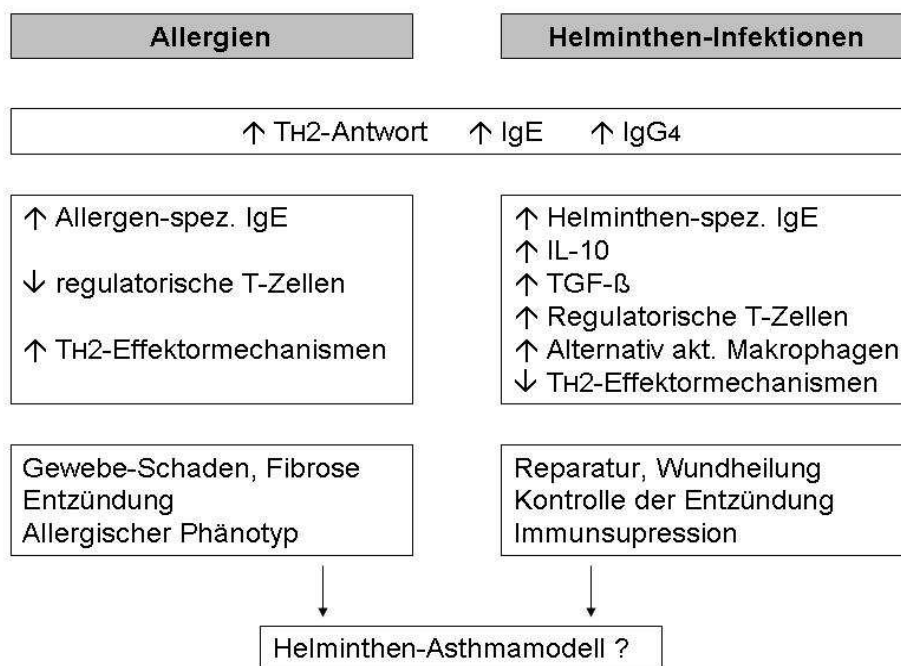


Abb. 4: Immunologische Charakteristika von Allergien und Helminthen-Infektionen

IgG₄

Helminthen-Infektionen beim Menschen gehen mit einer verstärkten Produktion von *IgG₄* (analog *IgG₁* bei der Maus) einher. Dabei zeigte sich, dass vor allem Mikrofilarien für die Induktion einer potenten *IgG₄*-Antwort verantwortlich sind, weniger die adulten Würmer (Adjobimey and Hoerauf, 2010). Bei einer Helminthen-Infektion scheint *IgG₄* den Parasiten vor einer Abtötung durch das Immunsystem zu schützen. *IgG₄* bindet dabei verstärkt an Mikrofilarien und verhindert *IgE*- und *IgG₃*-vermittelte Helminthentoxische Immunreaktionen (Adjobimey and Hoerauf, 2010).

Einleitung

IgE

Die Rolle der IgE-Immunantwort im Rahmen einer Helminthen-Infektion und ihr möglicher Beitrag zu einem antiinflammatorischen Netzwerk sind Gegenstand der aktuellen Diskussion. In erster Linie dient die Produktion von IgE der Degranulation von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, wodurch ein Helminthentoxisches Milieu gebildet wird. Helminthen-Infektionen sind starke Induktoren einer IgE-Antwort mit hohen Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum (Yazdanbakhsh et al., 2002). Dabei gelingt es dem Parasiten nicht selten den IgE-vermittelten Effektorfunktionen auszuweichen bzw. diese zu unterdrücken. Eine Unterdrückung dieser Funktionen könnte durch das Vorhandensein von regulatorischen Zelltypen und IL-10 (s.o.) erklärt werden. Ein anderer Erklärungsansatz wäre ein durch eine Helminthen-Infektion bedingte Alteration des IgE-Repertoires des Wirts mit veränderten Eigenschaften, wie z.B. einer herabgesetzten Potenz zur Induktion von IgE-Effektormechanismen.

Insgesamt bleibt festzustellen, dass die Rolle des IgE im Rahmen einer Helminthen-Infektion nur unzureichend geklärt ist. Eine ausführliche Charakterisierung des IgE-Repertoires von Helminthen-infizierten Mäusen könnte wichtige Hinweise auf die Funktion des IgE in einem antiinflammatorischen Netzwerk liefern.

1.3.3 Wirkung von Helminthen-Infektionen auf den allergischen Phänotyp in Mausmodellen

Die divergente epidemiologische Studienlage, bedingt durch eine Vielzahl möglicher Störgrößen, sowie ethische Bedenken bei Untersuchungen am Patienten, machen die Etablierung von Helminthen-Mausmodellen attraktiv. So wurden in den letzten Jahren zahlreiche Modelle mit unterschiedlichen Helminthenspezies entwickelt

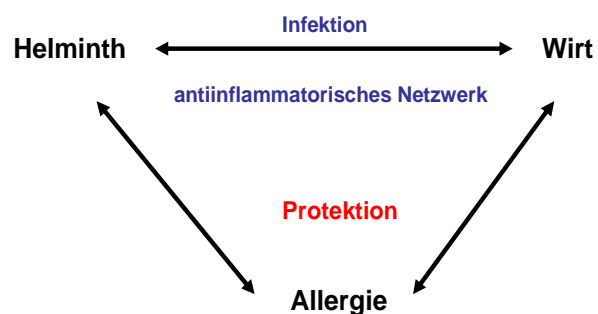


Abb. 5: Experimentelles Helminthen-Mausmodell kombiniert mit Allergie-Mausmodell

Einleitung

und mit Mausmodellen allergischer Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen kombiniert. Hier spricht die Studienlage eindeutig für einen Helminthen-induzierten Schutz vor überschießender Immunreaktion. Die im vorangegangenen Kapitel identifizierten Bestandteile eines antiinflammatorischen Netzwerkes während einer Wildinfektion scheinen auch in den kombinierten Mausmodellen mit Helminthen-Infektion und experimentellem Asthma bronchiale eine wichtige protektive Rolle zu spielen.

IL-10 scheint nicht nur Überleben des Helminthen zu ermöglichen, sondern auch Asthma zu unterdrücken

Murine Helminthen-Asthmamodelle zeigten - analog zu reinen Helminthen-Modellen - hohe IL-10 Konzentrationen bei infizierten Tieren. Depletionsversuche mit anti-IL-10-Antikörpern und mit IL-10-knock-out-Mäusen belegten, dass der Helminthen-induzierte Schutz vor Asthma bronchiale IL-10-abhängig war (Wohlleben et al., 2004; Kitagaki et al., 2006; Smits et al., 2007; Schnoeller et al., 2008). Einige Tierversuche wiesen allerdings auch IL-10-unabhängigen Schutz vor allergischer Atemwegsentzündung nach (Taylor et al., 2005; Trujillo-Vargas et al., 2007).

Allein bestimmte Helminthen-Antigene schützten ohne Infektion vor Asthma

So schützte Cystatin in einem murinen Asthmamodell durch Bildung von IL-10-produzierenden Makrophagen allein und ohne Vorhandensein des Parasiten im Wirtsmechanismus (Schnoeller et al., 2008). Auch die Gesamtheit der von *N. brasiliensis* sezernierten Produkte schützte ohne Anwesenheit des Parasiten vor allergischer Atemwegsentzündung in einem Mausmodell (Trujillo-Vargas et al., 2007).

DC-Transfer schützte auch ohne Präsenz des Wurms

Liu et al. zeigten in einem murinen Asthma-Modell mit *S. japonicum*, dass allein der adoptive Transfer von splenischen DC infizierter Tiere bei dem Empfänger die allergische Atemwegsentzündung drastisch reduziert (Liu et al., 2010a).

Hohe IgG₁-Serumkonzentrationen auch in murinen Helminthen-Asthmamodellen: Funktion als „blocking antibody“?

Dem IgG₄-Antikörper, und analog dem IgG₁-Antikörper in Mausmodellen, werden protektive Eigenschaften im Rahmen allergischer Erkrankungen zugeschrieben. Erhöhte

Einleitung

Konzentrationen von IgG₄ sind im Allgemeinen negativ mit allergischen Symptomen assoziiert (Yazdanbakhsh et al., 2002; Aalberse et al., 2009). Erklärt wird dies mit der Funktion als blockierendem Antikörper („*blocking antibody*“) bei direkter Konkurrenz. Zum einen konkurriert IgG₄ mit Mastzell-gebundenem IgE um das Allergen und blockiert die Mastzell-Degranulation. Zum anderen führt IgG₄-gebundenes Allergen nicht mehr zu einer IgE-vermittelten Antigen-Präsentation durch APC (Aalberse et al., 2009). In welchem Maße IgG₄ bei gleichzeitigem Vorhandensein von Helminthen-Infektion und Allergen-Provokation das immunmodulatorische Potential beeinflusst, bleibt noch zu klären. Möglicherweise spielt auch das Verhältnis der Konzentrationen von IgG₄ zu IgE bzw. zu anderen Immunglobulinen der Klasse G eine Rolle (Adjobimey and Hoerauf, 2010).

Rolle von hohen IgE-Serumkonzentrationen in Helminthen-Asthmamodellen noch unklar

Beim gleichzeitigen Vorhandensein von Allergen-spezifischen IgE-Molekülen im Rahmen einer allergischen Sensibilisierung könnte polyklonales und Helminthen-spezifisches IgE mit diesen um den FcεRI konkurrieren und eine Degranulation vermindern (*IgE-Blocking-Hypothese*) (Carvalho et al., 2006). Allerdings zeigten Mitre et al. *in vitro*, dass extrem hohe Verhältnisse von polyklonalem zu Allergen-spezifischem IgE nötig sind, um eine Basophilen-Degranulation zu blockieren (Verhältnis polyklonales IgE/Allergen-spez. IgE mindestens 500/1) und äußerten Zweifel an der IgE-Blocking-Hypothese. Die Mastzell-Degranulation wurde von Mitre et al. jedoch nicht mit berücksichtigt (Mitre et al., 2005). Bisher existieren keine Studien, die sich explizit mit der Rolle von IgE-produzierenden B-Zellen und dem IgE-Repertoire bei Helminthen-infizierten Mäusen in einem murinen Asthmamodell befassen haben.

1.3.4 Mausmodell der Helminthen-Infektion mit *L. sigmodontis*

L. sigmodontis gehört zum Stamm der *Nemathelminthes* (Rund- und Schlauchwürmer), der Klasse der *Nematoden* (Fadenwürmer) und der Familie der *Filarien*. Der natürliche Wirt von *L. sigmodontis* ist die Baumwollratte (*S. hispidus*), Surrogate können jedoch auch andere Nagetiere sein, wie z. B. BALB/c-Mäuse. Der Lebenszyklus von *L. sigmodontis* ist in **Abbildung 6** dargestellt (mod. nach Hübner et al. 2009). L1-Larven entwickeln sich im natürlichen Vektor, der tropischen Rattenmilbe (*O. bacoti*), zu

Einleitung

infektiösen L3-Larven. Über den Stich der Milbe werden die L3-Larven auf den Wirt übertragen. Innerhalb weniger Tage wandern die Larven über das Lymphsystem in die Pleurahöhle. Hier entwickeln sie sich innerhalb eines Monats über L4-Larven hin zu adulten Würmern. Ca. 50 Tage *post infectionem* (p.i.) produzieren diese wiederum L1-Larven (Mikrofilarien), die in Pleurahöhle und Blutzirkulation nachweisbar sind. Ein chronisches Infektionsstadium ist zu diesem Zeitpunkt erreicht. Bei erneutem Stich durch eine Milbe können wiederum L1-Larven übertragen werden. Nach Weiterentwicklung der L1 über L2 und L3-Larven beginnt der Zyklus erneut (Hübner et al., 2009).

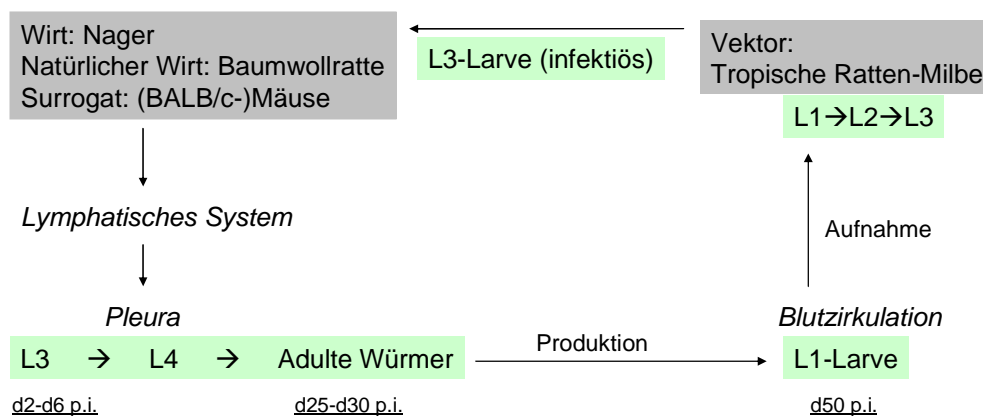


Abb. 6: Lebenszyklus von *L. sigmodontis* (mod. nach Hübner et al. 2009)

L. sigmodontis- Mausmodelle wurden entwickelt, um Wurm-Infektionen mit Filarien beim Menschen zu imitieren. Ebenfalls dieser Familie zugehörig sind die humanpathogenen Filarien *B. malayi* (Elephantiasis), *L. loa* (Augenwurm, Kamerunbeule), *W. bancrofti* (Elephantiasis), *Mansonella spp.* (Hautödem, Dermatitis) und *O. volvulus* (Flussblindheit) (Hof und Dörries, 2005; Westheide und Rieger, 2007). *L. sigmodontis* selbst ist nicht humanpathogen, hat jedoch hohe strukturelle Ähnlichkeiten und zeigt ein hohes Maß an immunologischer Kreuzreaktivität mit seinen oben genannten humanpathogenen Verwandten (Hoffmann et al., 2000). Mäuse können durch *L. sigmodontis* auf natürliche Weise infiziert werden, Larven- und Wurmstadien entwickeln sich weitestgehend analog zu humanen Infektionen mit Filarien und induzieren eine starke T_H2 -Antwort. Es entwickeln sich regelhaft systemische chronische Infektionen mit ausreichender Wurmlast, die durch Mikroskopie von Flüssigkeit aus bronchoalveolärer Lavage (BALF) und Blut einfach nachgewiesen

werden kann (Hoffmann et al., 2000). All dies sind wichtige Gründe für die Wahl des Helminthen-Modells, da die Situation während einer Infektion beim Menschen durch *L. sigmodontis* verwandte Filarien in hohem Maße widerspiegelt wird. Zudem ist durch den Befall der Pleurahöhle mit adulten Würmern eine besondere Situation gegeben: Eine lokale Immunantwort auf Helminthen kann gleichzeitig lokale Auswirkungen auf den allergischen Phänotyp beim Asthma zur Folge haben. Daher sind *L. sigmodontis*-Modelle interessante Kandidaten für die Kombination mit murinen Asthmodellen.

1.4 B-Zelle und IgE-Repertoire

1.4.1 Struktur des IgE-Antikörpers

Der IgE-Antikörper setzt sich aus zwei schweren („heavy“, *H*) und zwei leichten („light“, *L*) Ketten zusammen, die wiederum in Domänen unterteilt sind (**Abb. 7**). Eine schwere Kette besteht aus einer variablen Region und vier konstanten Regionen. Eine leichte Kette setzt sich aus einer variablen Region und einer konstanten Region zusammen. Die konstanten Regionen der schweren Kette C_{H2} , C_{H3} und C_{H4} bilden den Fc-Teil („*crystallizable fragment*“, *kristallines Fragment*) des Antikörpers, der mit den entsprechenden IgE-Rezeptoren interagieren kann. Die konstante Region der schweren Kette C_{H1} , sowie die variable Region der schweren Kette V_H bilden zusammen mit den entsprechenden leichten Ketten C_L und V_L die Antigen-Bindungsstelle (*Fab-Teil*, *Antigen-bindendes Fragment*).

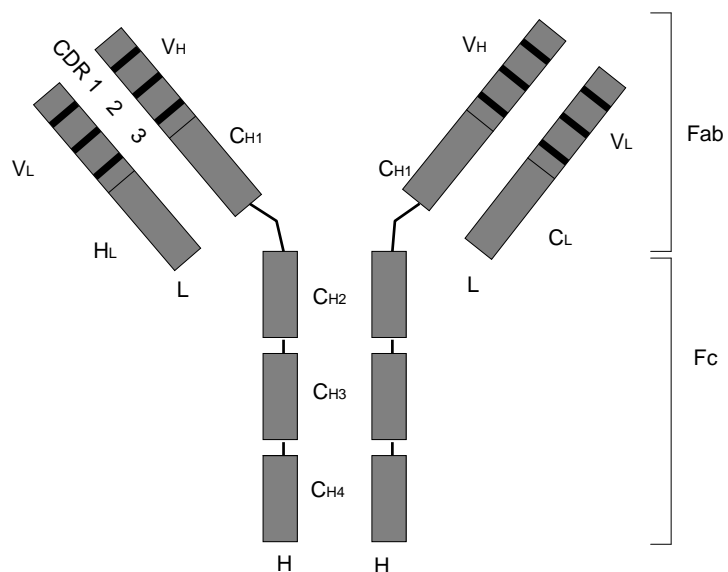


Abb. 7: Struktur des IgE-Antikörper-Moleküls (schematische Darstellung)
 H: schwere Kette; L: leichte Kette; c: konstante Region; v: variable Region; CDR: Komplementarität-bestimmende Region

Es gibt zwei verschiedene leichte Ketten, die eingebaut werden können, die *Kappa*(κ)-*Leichtkette* und die *Lambda*(λ)-*Leichtkette*. Die variablen Regionen definieren die Affinität und Spezifität eines Antikörpers, die sich im Laufe der B-Zell-Entwicklung durch primäre Diversifizierung und durch Antigenkontakt (sekundäre Diversifizierung) verändern können. Sie haben eine Länge von ca. 110 Aminosäuren (Pezzutto et al., 2007). Die variablen Regionen werden weiter unterteilt in vier Gerüstregionen (*frame regions: FR-1 bis FR-4*), sowie in drei hypervariable Regionen (HV1 bis HV3). Die hypervariablen Regionen werden entsprechend ihrer Funktion auch als Komplementaritäts-bestimmende Regionen (*complementarity determining regions, CDR-1 bis CDR-3*) bezeichnet. Die sechs CDR der leichten und schweren Ketten bilden Schleifen-Strukturen während die FR-Regionen β -Faltblatt-Strukturen ausbilden. Die CDR treten bevorzugt in Kontakt mit dem Antigen während die FR als Gerüst fungieren (Murphy et al., 2009). Die besonders variable CDR-3 bildet den „Kern“ der Antigen-Antikörper-Bindung (Davis, 2004).

1.4.2 Entstehung und Diversifizierung des Antikörperrepertoires

Bis eine B-Zelle zur terminal differenzierten Antikörper-produzierenden Plasmazelle wird, werden verschiedene Entwicklungsschritte in den primären und sekundären lymphatischen Organen durchlaufen (**Abb. 8**). Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Diversifizierung der variablen Regionen des Antikörpers, welche letztendlich über dessen Funktionalität (Spezifität, Affinität zum Antigen) entscheidet. Im Folgenden werden die Mechanismen skizziert, die zu der hohen Diversität des humanen und murinen Antikörperrepertoires führen.

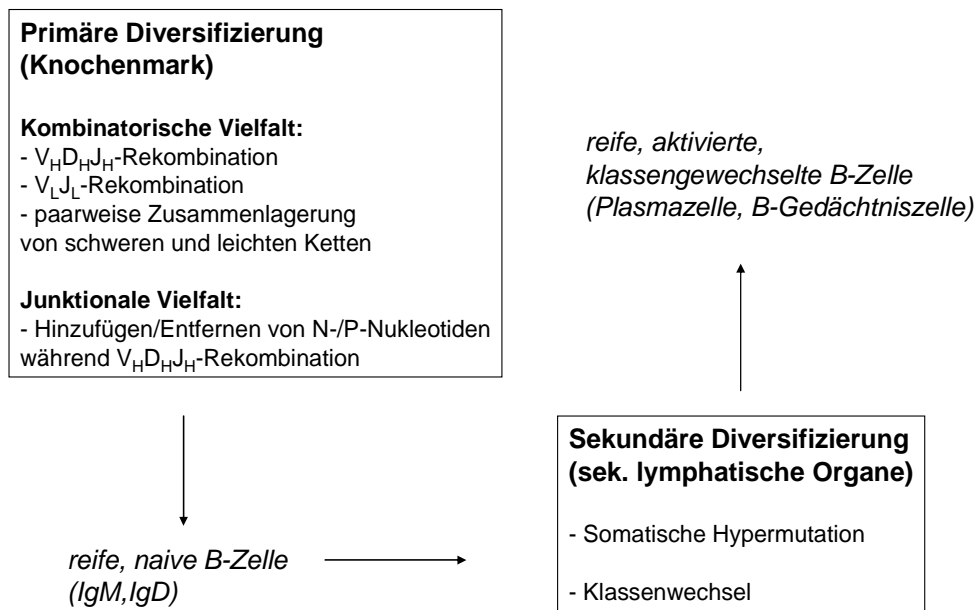


Abb. 8: Diversifizierung des Antikörperrepertoires

Die Diversifizierung des Antikörperrepertoires im Rahmen der B-Zell-Entwicklung gliedert sich in einen primären und einen sekundären Abschnitt. Produkt der primären Diversifizierung ist die reife, naive B-Zelle, die ins Blut abgegeben wird. Nach Antigenkontakt in den sekundären lymphatischen Organen (B-Zell-Follikel in Lymphknoten, Milz) beginnt die sekundäre Diversifizierung. Im Rahmen der positiven Selektion können klassengewechselte aktivierte B-Zellen (Plasmazellen) entstehen.

Die für die variablen Regionen kodierenden Immunglobulin-Gene sind beim Menschen auf Chromosom 14 (schwere Kette), Chromosom 2 (κ -Leichtkette) und Chromosom 22 (λ -Leichtkette) lokalisiert. Bei der Maus gibt es innerhalb verschiedener Spezies Unterschiede in der Lokalisation der entsprechenden Gene. Die BALB/c-Maus ist in der Literatur am besten beschrieben. Die Gene der schweren Kette befinden sich auf Chromosom 12, V_κ -Gene auf Chromosom 6, V_λ -Gene auf Chromosom 16 (Schroeder 2006). Die V-Region der schweren Kette setzt sich aus den Gensegmenten V („Variabilität“), D („Diversität“) und J („joining“, verbindend) zusammen. Das V_H -Gensegment besteht beim Menschen aus ca. 40 Genen, das D_H -Gensegment aus ca. 25 Genen, das J_H -Gensegment aus 6 Genen. Bei der BALB/c-Maus gibt es über 150 V_H -Gene, 13 D_H -Gene und 4 J_H -Gene (Schroeder 2006). Insgesamt kodiert die V-Region für ca. 110 Aminosäuren. Hinzu kommen 9 Gene der C_{H1} -Region beim Menschen und 8 bei der BALB/c-Maus, die für die Klasse des entstehenden Antikörpers kodieren (C_μ , C_δ , $C_\gamma 3$, $C_\gamma 1$, $C_{\alpha 1}$, $C_\gamma 2$, $C_\gamma 4$, C_ϵ , $C_{\alpha 2}$ und C_μ , C_δ , $C_\gamma 1$, $C_\gamma 3$, $C_\gamma 2b$, $C_\gamma 2a$, C_ϵ , C_α). Die V-Region der leichten Ketten besteht nur aus V- und J-Gensegmenten. Es existieren ca. 35 funktionelle V_κ -Gene beim Menschen und 93 bei der BALB/c-Maus. Beim Menschen

Einleitung

gibt es wiederum 35 V_{λ} -Gene, bei der BALB/c-Maus sind es 3 V_{λ} -Gene. Bei Mensch und Maus gibt es 5 J_{κ} -Gene, bei der BALB/c-Maus 3 J_{λ} -Gene. Weiterhin existieren Typen-spezifisierende Gene der konstanten C_L -Region (C_{κ} , $C_{1\lambda}$, $C_{2\lambda}$, $C_{3\lambda}$). Es existiert kein Leichtketten-D-Gen. Besondere Bedeutung kommt der Kodierung der CDR der schweren Kette zu. Während CDR-H1 und CDR-H2 direkt im V_H -Gensegment kodiert sind, wird CDR-H3 aus der gesamten VDJ-Sequenz gebildet, was ein Grund für die besonders hohe Variabilität in dieser Region ist (Pezzutto et al., 2007; Murphy et al., 2009; Schroeder 2006).

Die Erhöhung der Antikörpervielfalt wird primär durch eine Reihe von Gen-Umlagerungen während der B-Zell-Entwicklung (kombinatorische Vielfalt), sowie das zufällige Einfügen und Entfernen von Nukleotiden an den Schnittstellen dieser Gene (junktionale Vielfalt) erreicht. Diese Prozesse finden im Knochenmark statt und münden in der Produktion reifer naiver B-Zellen, die IgM und IgD auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diese Zellen gelangen über die Blutzirkulation in die sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz), wo über APC und Antigenkontakt somatische Hypermutation in der variablen Region, sowie ein Klassenwechsel induziert werden kann (sekundäre Diversifizierung des Antikörperrepertoires; (Murphy et al., 2009). Die B-Zelle hat während ihrer Entwicklungsphasen zwei mögliche Schicksale: Klonale Deletion vs. klonale Proliferation (Goodnow et al., 2010). Durch eine Vielzahl von Kontrollmechanismen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der B-Zell-Entwicklung die Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen überprüft und autoreaktive Zellen apoptotisch (negative Selektion). Gleichzeitig reifen nur jene Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen heran, die eine hochaffine und spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion gewährleisten (positive Selektion) (Rajewsky, 1996). Diese Mechanismen wurden erstmals von Burnet in der klonalen Selektionstheorie zusammengefasst (Burnet, 1959).

VDJ-Rekombination (primäre Diversifizierung)

In hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks liegen die Gene der V-Region noch in der Keimbahnkonfiguration vor. Die VDJ-Rekombination beginnt in der frühen Pro-B-Zelle mit der D-J-Umlagerung (**Abb. 9**). In der späten Pro-B-Zelle findet dann die V-DJ-Umlagerung statt. Aus der neu entstandenen VDJ-Sequenz wird nun eine VDJ- C_{μ} -mRNA abgelesen und ein VDJ- C_{μ} -Protein synthetisiert. So entsteht die große

Einleitung

Prä-B-Zelle, die vollständige schwere Ketten als Teil des Prä-B-Zell-Rezeptors auf ihrer Oberfläche exprimiert. Es folgen Zellproliferation und Zellteilungen (Stadium der kleinen ruhenden Prä-B-Zelle) und die VJ-Umlagerungen der leichten Ketten. Während der V_HDJ_H - und V_LJ_L -Rekombinationen werden zudem an den Enden der kodierenden Sequenzen P- und N-Nukleotide hinzugefügt oder entfernt, was die Diversität des Aminosäurerepertoires noch deutlich erhöht. Nach den V-J-Umlagerungen der leichten Kette kann ein vollständiges IgM- oder IgD-Molekül auf der Zelloberfläche der unreifen B-Zelle exprimiert werden. Findet eine zentrale Toleranz statt, werden die überlebenden reifen naiven B-Zellen in den Blutkreislauf abgegeben. Gleichzeitig werden autoreaktive Zellen negativ selektiert. Ein möglicher Zellverlust kann zudem nach nicht erfolgreichen Gen-Umlagerungen der leichten und schweren Ketten in früheren Entwicklungsstadien auftreten (Pezzutto et al., 2007; Murphy et al., 2009).

Einleitung

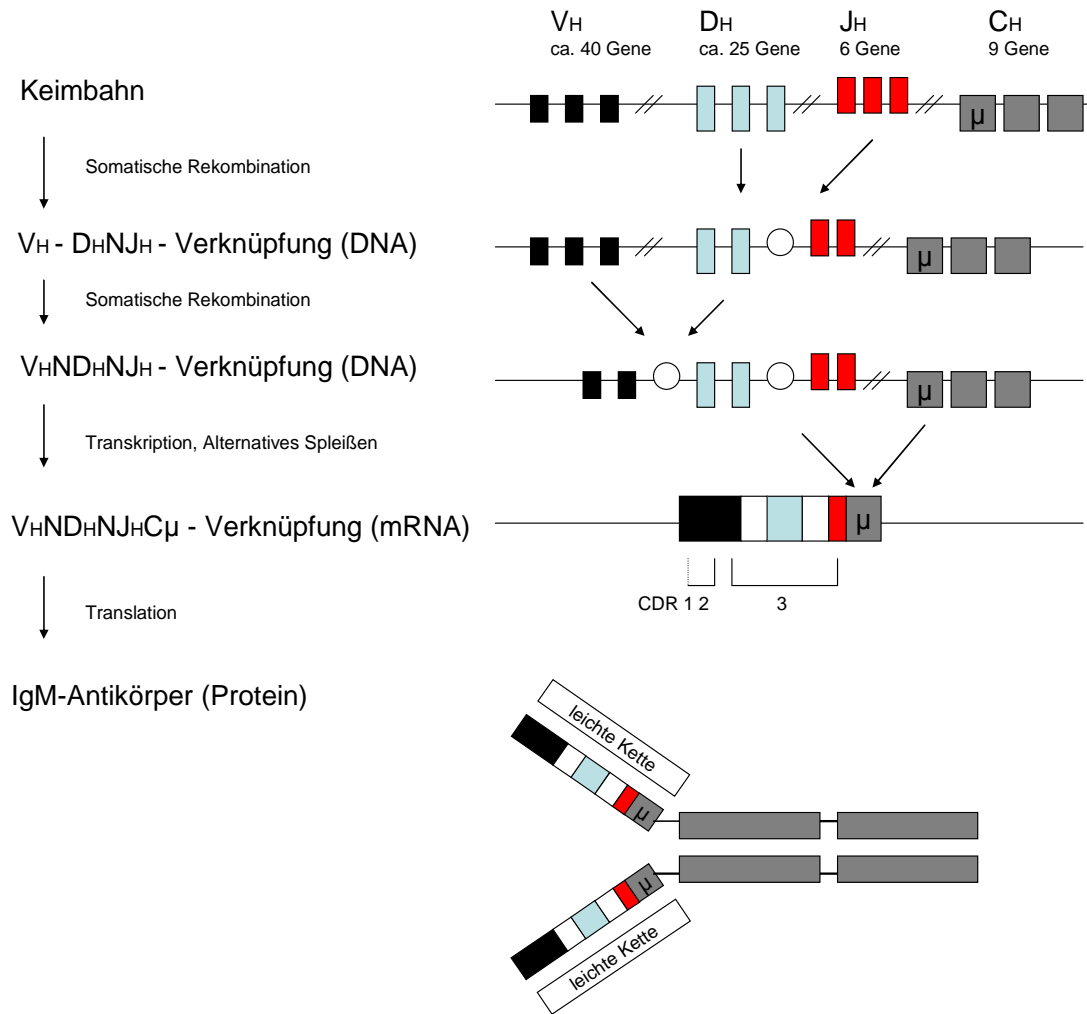


Abb. 9: Somatische Rekombination der Immunglobulin-Gene der schweren Kette, Transkription und Translation des IgM-Antikörpers

variability- (V), diversity- (D), joining- (J) und konstante Gene der schweren Kette werden durch Aneinanderlagerung von D_H - und J_H -Genen und Hinzufügen von N-Nukleotiden durch TdT an den Schnittstellen, sowie Verknüpfung der entstehenden DNJ-Sequenz mit einer V-Sequenz unter Entstehung einer neuen $V_H N D_H N J_H$ -Sequenz somatisch rekombiniert. Nach Transkription, alternativem Spleißen und Translation kann ein IgM- oder IgD-Antikörper auf der Zelloberfläche der B-Zelle exprimiert werden.

Somatische Hypermutation (sekundäre Diversifizierung)

Die durch somatische Rekombination im Knochenmark entstandenen reifen naiven B-Zellen zirkulieren solange in Blutbahn und Lymphe, bis sie zu den sekundären lymphatischen Organen gelangen. Hierzu zählen Lymphfollikel enthaltende Strukturen wie Lymphknoten, Milz, Peyersche Plaques in Mukosa und Submukosa des Dünndarms, sowie Tonsillen. In Keimzentren von Sekundärfollikeln präsentieren APC naiven B-Zellen zuvor aufgenommenes und prozessiertes Antigen. Der Antigenkontakt führt während der Proliferation der B-Zellen zu hohen Raten somatischer Hypermutation in den CDR von leichten und schweren Immunglobulin-Genen.

Einleitung

Hierdurch wird die Affinität und Spezifität für durch APC präsentierte Antigene erhöht (Affinitätsreifung bzw. „Immunologisches Lernen“) (Rajewsky, 1996). Mutationen in den FR führen meist zu Störungen in der strukturellen Integrität des produzierten Antikörpers, was wiederum eine negative Selektion zur Folge hat (Murphy et al., 2009). Somatische Hypermutation beinhaltet das schrittweise Einfügen von Nukleotidsubstitutionen in den variablen Immunglobulin-Genregionen über mehrere B-Zell-Generationen eines naiven B-Zell-Klons. Eine einzelne Mutation kann eine Verzehnfachung der Antikörperaffinität zum Antigen zur Folge haben (Gould et al., 2003).

Vielfalt der Antikörper-Diversifizierung

Die Antikörper-Vielfalt, die sich aus den oben beschriebenen Mechanismen beim Menschen summiert, lässt sich wie folgt schätzen: Während der V_HDJ_H -Rekombination sind bei 50 V_H -, 25 D_H und 6 J_H -Segmenten $7,5 \times 10^3$ Kombinationen der schweren Kette möglich ($50 \times 25 \times 7$). Bei der κ -Leichtkette ergeben sich aus 35 V_L - und 5 J_L -Gensegmenten 175 Kombinationen (35×5). Eine ähnliche Zahl wird für die λ -Leichtkette vermutet (Pezzutto et al., 2007). Demnach ergibt sich eine kombinatorische Vielfalt von $2,6 \times 10^6$ ($7,5 \times 10^3 \times 175 \times 2$). Durch Hinzufügen und Entfernen von N- und P-Nukleotiden, sowie durch somatische Hypermutation wird die Vielfalt noch stark erhöht. DiNoia und Neuberger gehen von einer Vielfalt von 10^9 aus, Moura et al. sogar von über 10^{10} (Di Noia und Neuberger, 2007; Moura et al., 2008). Bei der Maus ergeben sich aus 150 V_H -, 13 D_H und 4 J_H -Segmenten rechnerisch $7,8 \times 10^3$ Kombinationen der schweren Kette ($150 \times 13 \times 4$). Durch 93 V_κ -Gene, 3 V_λ -Gene, sowie 5 J_κ -Gene und 3 J_λ -Gene erhöht sich die kombinatorische Vielfalt auf $3,3 \times 10^7$ ($7,8 \times 10^3 \times 93 \times 5 \times 3 \times 3$) (Schroeder 2006).

1.4.3 Klassenwechsel

Der Klassenwechsel von IgM hin zu IgG, IgA oder IgE findet ebenfalls in den Keimzentren der B-Zell-Follikel statt und wird vor allem durch das vorliegende Zytokinmilieu gesteuert (so führt z. B. IL-4 zu einem Klassenwechsel hin zu IgG₄ oder IgE). Grundlegender Mechanismus ist die Neuverknüpfung der V_HDJ_H -Sequenz mit einer neuen stromaufwärts liegenden C_γ -, C_α - oder C_ϵ -Sequenz anstelle der ursprünglichen C_μ - (C_δ -)Sequenz (Kracker und Durandy, 2011). Die fertige rekombinante DNA der V-Region kann nun abgelesen und ein klassengewechseltes

Immunglobulinmolekül synthetisiert werden (Gould et al., 2003; Murphy et al., 2009; Kracker und Durandy, 2011).

1.4.4 Das IgE-Repertoire in Allergie-Mausmodellen und bei Allergikern

Das murine und humane IgE-Repertoire im Rahmen der Allergie-Antwort lässt sich durch eine Vielzahl von Parametern charakterisieren. So zeigten Kerzel et al. in einem murinen Modell der akuten allergischen Atemwegsentzündung, welche fundamentalen Einfluss die Aminosäure-Komposition des IgE-Repertoires und die damit verbundene Hydrophobizität der Antigenbindungsstelle auf die Entwicklung des Asthma-Phänotyps hatte (Kerzel et al., 2009; Kerzel et al., 2011). So war ein überwiegend neutrales Repertoire der CDR-H3 für die Entwicklung eines Asthma-Phänotyps notwendig, ein unnatürlich hydrophobes Repertoire führte zu einem abgeschwächten Asthma-Phänotyp. Rogosch et al. zeigten, dass das Antikörper-Repertoire von IgE-Plasmazellen im Vergleich zum IgM-Repertoire nach allergischer Sensibilisierung durch erhöhte somatische Mutationsraten, einen erhöhten Anteil Antigen-selektierter Sequenzen und eine niedrigere klonale Diversität gekennzeichnet ist (Rogosch et al., 2010). Diese Daten sprechen dafür, dass die entsprechenden Sequenzen durch oben beschriebene klassische Affinitätsreifung entstanden sind und nicht durch alternative Prozesse.

Bei einer großen Sammlung von IgE-Sequenzen aus dem Serum von Kindern mit Asthma fanden Kerzel et al. Belege dafür, dass klassische Affinitätsreifung auch die treibende Kraft bei der Entwicklung des humanen IgE-Repertoires darstellt (Kerzel et al., 2010). Auch Davies und O`Hehir kamen zu einem ähnlichen Ergebnis (Davies und O`Hehir, 2004). Einige andere Autoren kamen allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen und bezweifelten die Relevanz klassischer Affinitätsreifung im Rahmen allergischer Erkrankungen (Snow et al., 1995; Janezic et al., 1998; Dahlke et al., 2006).

1.4.5 Das IgE-Repertoire in Helminthen-Mausmodellen und bei Parasiten-infizierten Menschen

Das IgE-Repertoire Helminthen-infizierter Mäuse wurde bis dato kaum beschrieben. McCoy et al. untersuchten im Rahmen einer Infektion mit *Heligmoïdes polygyrus*, einem Darmparasiten, die Antikörper-Antwort auf wiederholte Infektionen mit dem

Einleitung

Helminthen (McCoy et al., 2008). Sie fanden Hinweise auf eine dauerhaft erhöhte Diversität des IgE-Repertoires bei infizierten Tieren. Anzeichen für klonale Selektion und klassische Affinitätsreifung fanden sich hingegen erst bei wiederholter Infektion mit dem Helminthen nach zwischenzeitlicher Entwurmung.

Erste Hinweise auf das IgE-Repertoire Parasiten-infizierter Menschen lieferten kürzlich Wang et al., die Serumproben aus einem Endemie-Gebiet für parasitäre Infektionen in Papua Neu Guinea untersuchten. Die Autoren fanden Belege für eine erhöhte Diversität des IgE-Repertoires, jedoch kaum Anzeichen für die Entstehung durch klassische Affinitätsreifung (Wang et al., 2011).

Es existieren hingegen bis dato keine Arbeiten, die ein Helminthen-Mausmodell mit einem Allergie-Mausmodell kombiniert und das IgE-Repertoire der Tiere charakterisiert haben. Solch eine Arbeit könnte jedoch neue Erkenntnisse über das protektive Potential von Helminthen-Infektionen liefern und helfen die nicht eindeutige Rolle des IgE-Antikörpers bei Helminthen-Infektion und Allergie zu klären.

1.5 Hypothese

Hintergrund dieser Arbeit ist die erweiterte Hygiene-Hypothese, die neben einer Abnahme bakterieller frühkindlicher Infektionen auch eine Abnahme von parasitären Infektionen mit Helminthen als einen zentralen Faktor für die steigende Zahl allergischer Erkrankungen in den Industrienationen vermutet. Ein Hauptcharakteristikum sowohl bei Helminthen-Infektionen als auch bei allergischen Erkrankungen ist eine starke humorale T_H2 -Immunantwort mit hohen IgE-Serumkonzentrationen.

Hypothese: Eine vorbestehende Helminthen-Infektion mit *L. sigmodontis* beeinflusst die allergische Sensibilisierung und führt zu einem modifizierten IgE-Antikörperrepertoire im murinen Asthmamodell.

2. Material und Methoden

2.1 Mausmodell und Tierhaltung

Für die Durchführung der Tierversuche lag eine entsprechende Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vor (V54-19c 20-15 MR 20/14).

Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen gehalten. Bis zu fünf Tiere teilten sich einen Käfig. Sie erhielten Ovalbumin (OVA)-freies Futter und Wasser nach Belieben. Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation.

2.1.1 Nicht infizierte Kontrolltiere

Verwendet wurden BALB/c-Mäuse. Nicht infizierte Kontroll-Tiere („*ni-Tiere*“) wurden bezogen von Harlan Winkelmann (Borchen, D). Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwei bis drei Monate alt.

2.1.2 Mit *L. sigmodontis* infizierte Tiere

L. sigmodontis-infizierte Tiere („*Lito-Tiere*“) wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Katrin Gentil (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn). Bei den Tieren handelte es sich ebenfalls um BALB/c-Mäuse. Die Tiere wurden im Alter von sechs Wochen mit dem Nematoden infiziert. Die Infektion mit L3-Larven erfolgte dabei wie von Al-Qaoud et al. beschrieben über den natürlichen Infektionsweg durch den Stich des Vektors *O. bacoti* (Tropische Rattenmilbe) (**Abb. 7**) (Al-Qaoud et al., 1997). 60 Tage nach Kontakt der Mäuse mit dem Vektor, d. h. im chronischen Infektionsstadium, begannen die Versuche im murinen Asthmamodell. Im chronischen Infektionsstadium waren adulte Würmer in der Pleura und L1-Larven (Mikrofilarien) im Blut vorhanden. Die Tierhaltung erfolgte analog zu den *ni*-Tieren.

2.1.3 Murines Asthmamodell

Materialien:

Ovalbumin Grad V
Ovalbumin Grad VI

Sigma; Deisenhofen, D
Sigma; Deisenhofen, D

Material und Methoden

InjectAlum (Al(OH) ₃)	Pierce; Rockford (IL), USA
Dulbecco's PBS	PAA; Pasching, A
1 ml-Spritzen	BD; Heidelberg, D
Kanüle 26 G (0,45 x 13 mm)	BD, Heidelberg, D

Geräte:

Plexiglas-Verneblungskammer	Eigenanfertigung
Aerosolgenerator Pariboy	Pari-Werke; Starnberg, D

Im Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsentzündung wurde das Modellallergen Ovalbumin (OVA) verwendet. Die Tiere wurden nach dem Protokoll von Kerzel et al. an den Tagen 1, 14 und 21 intraperitoneal (i. p.) auf OVA sensibilisiert (Kerzel et al., 2003). Hierfür wurden jeweils 10 µg Ovalbumin Grad VI mit 1,5 mg Adjuvans (Aluminiumhydroxid) auf 200 µl sterile PBS langsam i. p. injiziert. Kontrolltiere erhielten 200 µl PBS. An den Tagen 26, 27 und 28 folgte eine aerosolische Provokation mit 1% (w/v) OVA Grad V-Aerosol. Dieses wurde über eine Verneblerkammer aus Plexiglas mithilfe eines Aerosolgenerators über 20 Minuten appliziert. Kontrollgruppen erhielten PBS-Aerosol. An Tag 30 erfolgte die Versuchsauswertung (**Abb. 10, Tab. 1**).

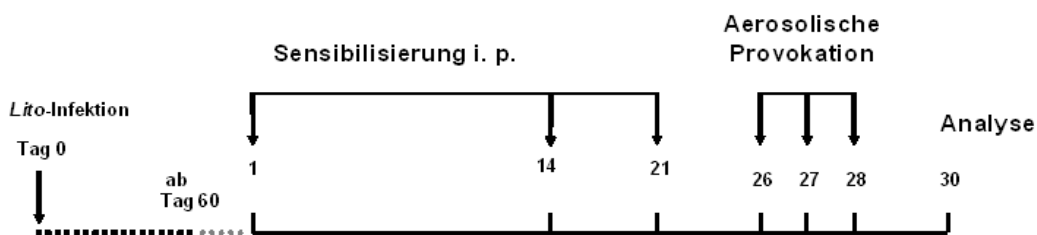


Abb. 10: Versuchsaufbau

Tab. 1: Versuchs- und Kontrollgruppen

Gruppe	Infektion mit <i>L. sigmodontis</i>	OVA-Sensibilisierung	OVA-Provokation	Tierzahl
ni,PBS	-	-	-	12
Lito,PBS	+	-	-	11
ni,OVA	-	+	+	10
Lito,OVA	+	+	+	14

2.1.4 Blutentnahme

Material:

Reaktionsgefäße 1,5 ml

Eppendorf, Hamburg, D

EDTA-Gefäß

Sarstedt; Nümbrecht, D

Geräte:

Blutentnahme-Block

Eigenanfertigung

Zentrifuge (5417R)

Eppendorf; Hamburg, D

Die Blutentnahme erfolgte durch ein Inzision der unteren Schwanzvene und Auffangen der Blutprobe im Eppendorf-Gefäß (Serum) bzw. im EDTA-Gefäß (Nachweis von L1-Larven). Für die Serumgewinnung wurde die Blutprobe mindestens 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei 4000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (das Serum) wurde abpipettiert und bei -20°C bis zur weiteren Untersuchung eingelagert.

2.1.5 Nachweis der Helminthen-Infektion

Materialien:

EDTA-Blutprobe (s.o.)

Hinkelmann'sche Lösung:

0,5 % w/v Eosin Y

Sigma; Deisenhofen, D

0,5 % w/v Phenol

Sigma; Deisenhofen, D

0,185 M Formaldehyd

Sigma; Deisenhofen, D

Material und Methoden

in 500 ml destilliertem Wasser

Geräte:

Zentrifuge (5417R)	Eppendorf; Hamburg, D
Lichtmikroskop	Optech; München, D

Die Infektion mit *L. sigmodontis* wurde auf zwei Arten bestätigt: Zum Einen durch das Aufsuchen von adulten Würmern im Pleuraraum nach Eröffnung des Brustkorbes (makroskopisch und durch Zuhilfenahme der Lupe). Zum Anderen durch den mikroskopischen Nachweis von L1-Larven (Mikrofilarien) in EDTA-Blut nach Anfärbung mit Hinkelmann'scher Lösung. Hierzu wurden 50 µl EDTA-Blut mit 300 µl Hinkelmann'scher Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten bei 1800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 20 µl Restflüssigkeit verworfen. In der Restflüssigkeit wurde das Sediment resuspendiert, auf Objektträger ausgestrichen und unter dem Mikroskop nach Mikrofilarien durchsucht.

2.2 Bronchoalveoläre Lavage und Zelldifferenzierung

Materialien:

Dulbecco's PBS	PAA; Pasching, A
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma; Deisenhofen, D
Proteinase-Inhibitor Complete	Roche; Mannheim, D
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf; Hamburg, D
Kanüle 26 G (0,45 x 13 mm)	BD; Heidelberg, D
Diff-Quick	Dade Behring; Marburg, D
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, D
Casyton Verdünnungslösung	Schärfe System; Reutlingen, D
Casycup	Schärfe System; Reutlingen, D

Geräte:

1 ml Spritzen	BD; Heidelberg, D
---------------	-------------------

Material und Methoden

Casy Cell Counter + Analyser System

(Modell TT)

Schärfe System; Reutlingen, D

Lichtmikroskop

Optech; München, D

Zytozentrifuge ShanDon Cytospin 4

Thermo Scientific; Limburg, D

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) diente der Gewinnung von Probenmaterial (BAL-Flüssigkeit: BALF) aus den peripheren Atemwegen mithilfe einer Spülflüssigkeit. Ziel war die Quantifizierung und Differenzierung von Leukozyten als Indikator der akuten Atemwegsentzündung in der Lunge.

2.2.1 Durchführung der bronchoalveolären Lavage

Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wurde der Brustkorb eröffnet und die Trachea frei präpariert. Anschließend wurde der apikale Teil der Trachea mit einer OP-Klemme abgeklemmt und fixiert. Mithilfe einer 26G-Kanüle und einer 1 ml-Spritze wurde 1 ml einer mit Proteinase-Inhibitor versetzten PBS in Trachea und Lunge gegeben und anschließend die gleiche Menge reaspiriert.

2.2.2 Zytozentrifugation und mikroskopische Zelldifferenzierung

Für die Zytozentrifugation wurden 50 µl der BALF mit 150 µl PBS verdünnt und mittels Zytozentrifugation bei 700 rpm auf Objektträger aufgebracht. Nach mindestens einer Stunde Trockenzeit wurden die Objektträger mithilfe der Diff-Quick-Färbung nach Angaben des Herstellers gefärbt. Es folgte die morphologische Begutachtung unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Pro Probe wurden zweimal 100 Zellen ausgezählt und differenziert.

2.2.3. Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahlen in der BALF wurde mithilfe eines Zell-Zählgerätes (Schärfe System, Reutlingen, D) vorgenommen, das auf dem Prinzip der elektronischen Pulsflächenanalyse beruht. Hierbei lösen in der Messprobe enthaltene Zellen beim Durchtritt durch ein Niederspannungsfeld ein elektrisches Signal aus, das digital registriert und ausgewertet wird. Auf diese Art und Weise können unter anderem Zellgröße und Zellzahl in einer Probe bestimmt werden. Gemessen wurden Zellen im

Material und Methoden

Größenbereich von 5,93 µm bis 15 µm. Zur Messung wurde die Probe aus der BALF 1:2000 in Casyton-Lösung verdünnt. Mit Hilfe der prozentualen Zellanteile (2.2.2) erfolgte die Berechnung der Konzentration spezifischer Zellklassen mit folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} \times \text{Zellklasse in Prozent} / 100$$

2.3 Bestimmung von Antikörperkonzentrationen im Serum

Materialien:

96-well-Flachbodenplatten	Nunc; Wiesbaden, D
Natriumhydrogencarbonat 0,1 M (Na(HCO) ₃)	Merck; Darmstadt, D
PBS	Sigma; Deisenhofen, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma; Deisenhofen, D
Tween20	Sigma; Deisenhofen, D
Streptavidin-Peroxidase	Calbiochem; Bad Soden, D
POD-Substrat BM blue	Roche; Mannheim, D
Schwefelsäure 2 M (H ₂ SO ₄)	Roth; Karlsruhe, D
<i>Primärantikörper/Allergen:</i>	
Anti-murines IgE, IgG ₁ , IgG _{2a} , IgM	BD; Heidelberg, D
Ovalbumin Grad VI	Sigma; Deisenhofen, D
<i>Sekundärantikörper:</i>	
Biotinyliertes anti-murines IgE, IgG ₁ , IgG _{2a} , IgM	BD; Heidelberg, D
<i>Standard:</i>	
Murines IgE, IgG ₁ , IgG _{2a} , IgM	BD; Heidelberg, D
Murines anti-OVA IgE, IgG ₁	Sigma; Deisenhofen, D

Geräte:

Mehrkanalpipette	Eppendorf; Hamburg, D
Rüttler	Bühler; Hechingen, D
Mehrkanal-Washer	ASYS Hitech GmbH; Eugendorf, A
ELISA-Reader	ASYS Hitech GmbH; Eugendorf, A
Reader-Software	Mikrotek; Overath, D

Material und Methoden

Die Messung von Antikörperkonzentrationen im Serum erfolgte mittels *sandwich ELISA* (*enzyme linked immuno sorbent assay*). Diese Methode beruht auf der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen und einer daran gekoppelten enzymatischen Farbreaktion. Die Farbreaktion wird durch Messung der Absorption bei Durchleuchtung mit Licht einer definierten Wellenlänge quantifiziert. Durch das Auftragen von definierten Standardkonzentrationen in einer Standardreihe, kann aus der gemessenen Absorption der Probe eine Konzentration berechnet werden.

Durchführung

Die Verdünnung der verwendeten Primärantikörper und des Allergens erfolgte in 0,1 M $\text{Na}(\text{HCO})_3$, die der restlichen Reagenzien in PBS / 3% BSA. Als Waschpuffer diente PBS, versetzt mit 0,1% Tween. Zunächst wurden 96-Well-Flachbodenplatten mit dem Primärantikörper bzw. dem Allergen beschichtet (50 μl pro Vertiefung) (**Tab. 2**). Nach der Inkubation bei 4°C über Nacht und viermaligem Waschen wurde PBS / 3% BSA als Blockpuffer aufgetragen (150 μl pro Vertiefung) und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Dies diente dem Sättigen freier Proteinbindestellen und der Verhinderung unspezifischer Hintergrundaktivität. Nach wiederholtem Waschen wurden die Standardreihe, sowie die verdünnten Proben aufgetragen (50 μl pro Vertiefung) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden nun die entsprechenden Sekundärantikörper (50 μl pro Vertiefung) aufgetragen und eineinhalb Stunden (bzw. zwei Stunden für den OVA-IgE-ELISA) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde das Enzymkonjugat Streptavidin-Peroxidase (1:1000) aufgetragen (50 μl pro Vertiefung) und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte ein besonders gründlicher Waschgang (acht Mal Waschen), um ungebundenes Enzym zu entfernen. Nun wurden 150 μl Peroxidase-Substrat pro Vertiefung aufgetragen. Die Enzym-Reaktion wurde dann nach maximal 30 Minuten durch Zugabe von 50 μl 2 M-Schwefelsäure gestoppt. Es folgte unmittelbar die Messung der Absorption mithilfe des ELISA-Lesegeräts bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 570 nm. Die Immunglobulin-Konzentrationen wurden mit der ELISA-Reader-Software auf Basis der Standardkurve berechnet.

Tab. 2: Konzentrationen und Verdünnungen der Reagenzien für den Immunglobulin-ELISA

Analyt	[1°-Antikörper] bzw. [Allergen]	[2°-Antikörper]	Enzym - Konjugat	Verdünnung der Proben <i>Infektion / Sensibilisierung?</i>		Standardreihe
				JA	NEIN	
Gesamt-IgE	1 µg/ml	2 µg/ml	1 : 10.000	1 : 5000	1 : 10	100 – 1,6 ng/ml
Gesamt-IgG ₁	2 µg/ml	2,5 µg/ml	1 : 10.000	1 : 1.000.000	1 : 10	250 – 0,3 ng/ml
Gesamt-IgG _{2a}	2 µg/ml	2 µg/ml	1 : 250	1 : 5.000	1 : 10	500 – 0,1 ng/ml
Gesamt-IgM	2 µg/ml	2,5 µg/ml	1 : 10.000	1 : 100.000	1 : 10	500 – 0,1 ng/ml
OVA-spez. IgE	20 µg/ml	2,5 µg/ml	1 : 1.000	1 : 1.000	1 : 10	200 – 0,4 ng/ml
OVA-spez. IgG ₁	100 µg/ml	2,5 µg/ml	1 : 10.000	1 : 1.000.000	1 : 10	100 – 1,6 ng/ml

2.4 B-Zell-Differenzierung mittels Durchflusszytometrie

Material:

CellWash	BD; Heidelberg, D
ZellFix	BD; Heidelberg, D
Zellsiebe 100 µm	Nunc GmbH & Co. KG; Wiesbaden, D
50ml Falconröhrchen	Eppendorf ; Hamburg, D
<i>Stripping Buffer (pH4):</i>	
0,05 M Natriumacetat (NaCH ₂ COOH)	Sigma; Deisenhofen, D
0,01 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma; Deisenhofen, D
0,005 M Kaliumchlorid (KCl)	Sigma; Deisenhofen, D
0,085 M Natriumchlorid (NaCl)	Sigma; Deisenhofen, D
Cytofix/Cytoperm	BD; Heidelberg, D
FACS Röhrchen	BD; Heidelberg, D
FACS Clean	BD; Heidelberg, D
FACS Rinse	BD; Heidelberg, D
FACS Flow	BD; Heidelberg, D
<i>Antikörper:</i>	
CD138 - PE	BD; Heidelberg, D
CD19 - PerCP	BD; Heidelberg, D
CD19 – PE	BD; Heidelberg, D

Geräte:

Zentrifuge 5810R	Eppendorf ; Hamburg, D
FACS Calibur	BD; Heidelberg, D
Mixer Vortex Reax top	Fa. Kobe; Marburg, D
Software CELL Quest Pro	BD; Heidelberg, D

Die Durchflusszytometrie oder auch „FACS“-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine Methode zur quantitativen und qualitativen Charakterisierung von Zellen und Zellpopulationen. Dabei können Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden. Das Messprinzip beruht auf der Anregung der zu untersuchenden Zellen mit einem Laser. Trifft dieser Laser auf Zellen, die durch Antikörper mit Fluorochrom markiert sind, so regt er das Fluorochrom an. Dies hat die Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge (**Tab. 3**) zur Folge. Ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern bündelt und zerlegt das emittierte Licht, was ein spezifisches Signal für dieses Fluorochrom liefert. Beim Durchtritt durch die Messkammer können zudem Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität differenziert werden, da sie das Laserlicht auf charakteristische Weise im Vorwärtsstreulicht (*FSC, forward scatter*) und im Seitwärtsstreulicht (*SCS, side scatter*) teilen. Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und die vier verwendeten Fluorochrome können nach der Messung in einem zweidimensionalen Punktdiagramm (*dot blot*) gegeneinander betrachtet werden. Für diese Arbeit wurde das Gerät FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson verwendet. Für die anschließende computergestützte Analyse wurde die Software Cell Quest Pro von BD genutzt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Fluorochrome

Fluoreszenzkanal	Fluorochrom	Absorptions - maximum	Emissions - maximum	Anregungs - wellenlänge
FL2	PE	480; 565 nm	578 nm	488 nm; 532 nm
FL3	PerCP	482 nm	678 nm	488 nm; 532 nm

2.4.1 Probengewinnung und Zellaufbereitung der Milz

Die Milzen der Versuchstiere wurden umgehend nach Tötung der Tiere freipräpariert, auf Eis gelagert und innerhalb von drei Stunden weiter verarbeitet. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Milzen durch ein Zellsieb der Maschendicke 100 μm gedrückt und in 50 ml PBS / 1% BSA aufgenommen. Anschließend wurden die Proben drei Minuten mit 1 ml CellWash (BD, Heidelberg, D) gewaschen (1500 rpm, 4°C) und der Überstand verworfen. Die zurückgebliebenen Zellen wurden in 1 ml *Stripping Buffer* aufgenommen, eine Minute auf Eis inkubiert und drei Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschgang.

2.4.2 Oberflächenfärbungen mit B-Zell-Antikörpern

Zu den weiter verarbeiteten Milz-Proben wurden 10 μl Anti-Fc γ R-Antikörper (1:500) hinzugegeben und 15 Minuten inkubiert. Dieser Fc-Block diente der Minimierung unspezifischer Bindungen von Fluorochrom-markierten Antikörpern an den Rezeptoren Fc γ RII (CD23) und Fc γ RIII (CD16). So wurden falsch positive Signale reduziert. Im nächsten Schritt wurden je 2 μl Oberflächen-Antikörper hinzugegeben und 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Ein letzter Waschgang entfernte überschüssige Reagenzien. Die Zellen wurden nun in 300 μl CellFix resuspendiert. Es folgte die Kompensation und Messung am FACS-Gerät. Als Oberflächen-Antikörper wurden CD19 PE, CD138 PE, und CD19 PerCP verwendet.

2.4.3 B-Zelldifferenzierung

Lymphozyten wurden zunächst im *Forward-/Sidewardscatter* eingegrenzt (*Lymphozytengate*) (**Abb. 11A**). B-Zellen wurden in CD138⁺ und CD138⁻ CD19⁺ B-Zellen differenziert (**Abb. 11B**). CD138⁺-Zellen wurden analog zu Rogosch et al. als Plasmazellen definiert, CD138⁻ CD19⁺-Zellen als Nicht-Plasmazellen bzw. Gedächtniszellen (Rogosch et al., 2010).

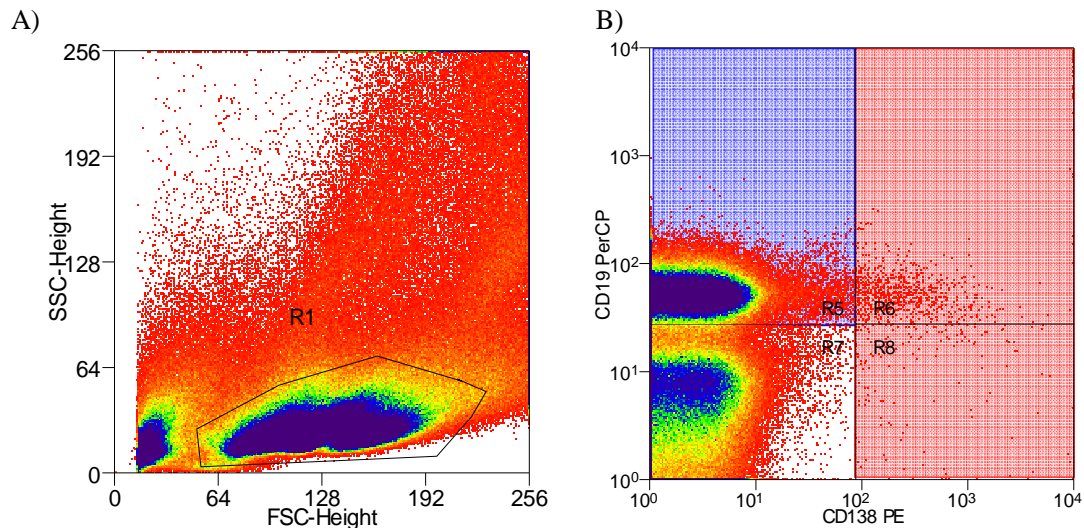


Abb. 11: Lymphozyten Gate, B-Zellmarker CD138 und CD19

A) Identifizierung von Lymphozyten durch charakteristische Streuung im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. B) Differenzierung in CD138⁺ Plasmazellen (rötliche Schattierung) und CD138⁻ CD19⁺ Nicht-Plasmazellen („Gedächtniszellen“, blaue Schattierung).

2.5 Charakterisierung des IgE-Repertoires in der Milz

2.5.1 RNA-Extraktion

Material:

Flüssigstickstoff

Klinikumsapotheke

Universitätsklinikum Marburg;

Marburg, D

RNeasy Mini Kit

Qiagen; Hilden, D

QIAshredder

Qiagen; Hilden, D

RNase freies Wasser

Eppendorf ; Hamburg, D

β-Mercaptoethanol

Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH

Ethanol

Merck KGaA, Darmstadt, D

DNase Zap

Ambion/Applied Biosystem;

Darmstadt, D

Geräte:

Zentrifuge (5417R)

Eppendorf; Hamburg, D

Mixer Vortex Reax top

Heidolph, Schwabach, D

Thermoschüttler HLC

HLC Biotech; Bovenden, D

Durchführung:

Für die RNA-Extraktion aus der Milz wurde das RNeasy Mini Kit (Quiagen; Hilden, D) gemäß Anleitung des Herstellers verwendet. Die Milzen wurden in Flüssigstickstoff tiefgefroren und anschließend mit einer Schere zerkleinert. Dann wurde RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol zwecks Lyse hinzugegeben. Das Lysat wurde auf den Quiashredder überführt und zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde mit 70%igem Ethanol versetzt, auf eine RNeasy Mini-Säule übertragen und zentrifugiert. Es folgten drei weitere Waschgänge mit verschiedenen Puffern. Die in der Säule enthaltene RNA wurde durch Zugabe von RNase-freiem Wasser herausgelöst und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Reverse Transkriptase-PCR für murines IgE

Material:

OneStep RT-PCR Kit	Quiagen; Hilden, D
Taq DNA Polymerase	Quiagen; Hilden, D
MgCl ₂ -Lsg. [50 mM]	invitrogen; Karlsruhe, D
10 x PCR Puffer	invitrogen; Karlsruhe, D
dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	invitrogen; Karlsruhe, D
RNase freies Wasser	invitrogen; Karlsruhe, D
RNase Out	invitrogen; Karlsruhe, D

Geräte:

Thermocycler Applied Biosystems Veriti	Applied Biosystems; Darmstadt, D
--	----------------------------------

Durchführung:

Es wurde eine *semi-nested reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)* genutzt um aus RNA komplementäre DNA (cDNA) herzustellen und zu vervielfältigen. Hierzu wurde das von Rogosch et al. beschriebene Protokoll befolgt (Rogosch et al., 2010). Dabei wurde das One-Step RT-PCR-Kit von Quiagen (Hilden, D) verwendet. **Tabelle 4** zeigt die verwendeten Primer. Die Reaktionsgemische wurden gemäß dem Pipettierschema in **Tabelle 5** und **Tabelle 6** hergestellt. Als Positivkontrolle wurde das GAPDH-Gen amplifiziert. Als Negativkontrolle diente ein RT-PCR Ansatz, dem statt RNA steriles RNase-freies Wasser zugegeben wurde.

Tab. 4: Verwendete Primer für die murine IgE-RT-PCR

Primer	Sequenz	T_m
Cε1-21r (antisense)	5'-CCT TTA CAG GGC TTC AAG GGG TAG-3'	64,4°C
Cε1-232r (antisense)	5'-TTC GTT GAA TGA TGG AGG ATG TGT-3'	59,3°C
V _H all (sense)	5'-AGG T(GC)(AC) A(AG)C TGC AG(GC) AGT C(AT)G G-3'	64,0°C
Murine GAPDH 459 1	5'-GGG GTG AGG CCG GTG CTG AGT AT-3'	71,4°C
Murine GAPDH 459 2	5'-CAT TGG GGG TAG GAA CAC GGA AGG-3'	

T_m: „temperature-melting“, Schmelztemperatur

Tab. 5: Primäramplifikation von RNA (Pipettierschema)

Reagenzien	Volumen (µl)
RNase-freies Wasser	12,85
Qiagen 5 x Puffer	5
dNTPs [10 mM]	1
Primer: Cε1-232r [10 pmol/µl]	1,5
Primer: V _H all [10 pmol/µl]	1,5
Enzym-Mix	1
RNaseOut [40 U/µl]	0,15
RNA	2
Gesamtreaktionsvolumen	25

Tab. 6: Reamplifikation des Primäramplifikats (Pipettierschema)

Reagenzien	Volumen (µl)
RNase-freies Wasser	10,8
dNTPs [10 mM]	1
Qiagen 10x Puffer	2,5
Q solution 5 x	5
MgCl ₂ [25 mM]	1
Primer: Cε1-21r [10 pmol/µl]	1,5
Primer V _H all [10 pmol/µl]	1,5
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2
Primär-Amplifikat	1,5
Gesamtreaktionsvolumen	25

Material und Methoden

Für die Primäramplifikation durchliefen die Proben folgendes Thermocycler-Programm:

- 1.) Reverse Transkription von RNA in cDNA für 30 Minuten bei 50°C
 - 2.) Initiale Denaturierung bei 94°C für 15 Minuten
 - 3.) Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden
 - 4.) Primer-Anlagerung bei 60°C für 30 Sekunden
 - 5.) Elongation bei 72°C für eine Minute
- Schritte 3.) bis 5.) wurden 40 Mal wiederholt.
- 6.) Terminale Elongation bei 72°C für zehn Minuten
 - 7.) Kühlung auf 4°C

Nach Ansetzung des Reaktionsgemisches für die Reamplifikation und Zugabe des Primäramplifikats durchliefen die Proben im Thermocycler folgendes Programm:

- 1.) Initiale Denaturierung bei 94 °C für zweieinhalb Minuten
 - 2.) Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden
 - 3.) Primer-Anlagerung bei 60°C für 30 Sekunden
 - 4.) Elongation bei 72°C für eine Minute
- Schritte 2.) bis 4.) wurden 35 Mal wiederholt.
- 5.) Terminale Elongation bei 72 °C für zehn Minuten
 - 6.) Kühlung auf 4°C

2.5.3 Gel-Elektrophorese und DNA-Extraktion

Material:

LE GP Agarose	Biozym; Hessisch Oldendorf, D
100 Base-Pair Ladder	Amersham; Braunschweig, D
6 x Orange Loading Dye Solution	Fermentas; St. Leon-Rot, D
Ethidiumbromid	Sigma; Deisenhofen, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen; Hilden, D
<i>1 x TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer:)</i>	
in 500 ml destilliertem Wasser gelöst:	
5,4 g Tris Base	Acros Organics; Geel, Belgien

Material und Methoden

2,75 g Borsäure Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe,
D

0,465 g EDTA Sigma; Deisenhofen, D

Geräte:

Gelkammer owl; Portsmouth, USA

Spannungsquelle (E143) onsort; Turnhout, GB

Fotoeinheit (06 133390) Vilber Lourmat; Eberhardzell, D

Durchführung:

Bei der Gel-Elektrophorese wurden die RT-PCR-Produkte nach Länge aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Hierfür wurde ein 1,5% Agarose-Gel in TBE-Puffer mit 0,012 µl Ethidiumbromid/ml hergestellt. 16 µl Probe wurden mit 4 µl Ladepuffer gemischt und aufgetragen. Als Referenz diente eine 100 bp-Leiter. Die IgE-Bande wurde unter UV-Licht an der erwarteten Länge (400 bp) ausgeschnitten und die DNA mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen; Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerangaben extrahiert.

2.5.4 Ligation, Transformation und Klonierung

Material:

TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter Invitrogen; Karlsruhe, D

E. coli-Zellen Invitrogen; Karlsruhe, D

LB Agar Sigma; Steinheim, D

LB Broth Base Sigma; Steinheim, D

Ampicillin Sigma; Steinheim, D

X-Gal Promega; Mannheim, D

Geräte:

Thermomixer HLC; Bovenden, D

Brutschrank (B15) Heraeus; Hanau, D

Die extrahierten DNA-Amplifikate wurden mithilfe des TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) gemäß Herstellerangaben in ein Plasmid (PCR-TOPO-Vektor) ligiert und in kompetente *E. coli* transfiziert. Für die

Material und Methoden

Transformation wurden der Ligationsansatz und die *E. coli*-Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann für genau 30 Sekunden in ein Wasserbad bei 42°C gegeben. Dies führte zur Permeabilisierung der Membranen. Es folgte eine Inkubation auf Eis für zwei Minuten und eine Inkubation in Nährmedium (LB-Medium) für eine Stunde bei 37°C. Die transfizierten *E. coli*-Zellen wurden dann auf speziellen Nährböden (LB-Agarplatten) ausgestrichen. Diese Nährböden waren zuvor mit Ampicillin (100 µl / 100 ml) versetzt und mit *X-Gal* (35 µl / LB-Agarplatte) bestrichen worden. Dies diente der Selektionierung der heranwachsenden Kolonien. Da das Plasmid ein Gen für eine Ampicillinresistenz beinhaltetete, wuchsen somit nur Bakterienzellen mit erfolgreicher Transfektion des Plasmids. Auch ein Insert für das *lacZ-Gen*, als Bestandteil des *lac-Operons* der Bakterienzelle, war im Plasmid enthalten. Das *lacZ-Gen* kodiert für das Enzym β -Galaktosidase. Wurde das Plasmid mit dem Insert in das *lacZ-Gen* eingebaut, so konnte dieses kein Enzym mehr herstellen, so dass transfizierte Zellen die Indikatorsubstanz *X-Gal* nicht mehr abbauen konnten. Die Kolonien zeigten sich weiß. Nicht erfolgreich transfizierte Zellen spalteten mithilfe der β -Galaktosidase *X-Gal* auf, die Kolonie färbte sich blau (sogenanntes *Blue/White-Screening*). Pro PCR-Produkt wurden 40 – 50 Kolonien gepickt und in LB-Medium über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

2.5.5 Extraktion und Aufreinigung der DNA

Material:

QIAprep Spin Miniprep Kit

Qiagen; Hilden, D

Geräte:

Zentrifuge (5417R)

Eppendorf; Hamburg, D

Die Extraktion und Aufreinigung der vervielfältigten DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerangaben vorgenommen.

2.5.6 Insert-Kontrollverdau

Materialien:

destilliertes Wasser

Enzym EcoR1 (20 U/ μ l)

New England Biolabs; Frankfurt, D

NE Puffer EcoR1

New England Biolabs; Frankfurt, D

Geräte:

Brutschrank

Heraeus; Hanau, D

Durchführung:

Der Insert-Kontrollverdau diente der Bestätigung, dass das Plasmid tatsächlich das gewünschte DNA-Amplifikat enthielt. Hierfür wurde mithilfe des Enzyms EcoR1 das Plasmid aufgeschnitten und das Amplifikat herausgelöst. Durch Gel-Elektrophorese (s.o.) wurde überprüft ob eine DNA-Sequenz gewünschter Länge im Plasmid eingebaut war. Nur dann folgte eine Sequenzierung der entsprechenden Proben. Im Reaktionsgemisch enthalten waren 1 μ l EcoR1 (20 U/ μ l), 1 μ l NE Puffer EcoR1, 17 μ l destilliertes Wasser, 4 μ l Probe. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 15 Minuten und eine Elektrophorese mit 2 μ l Ladepuffer im Agarosegel bei 110 V für 30 Minuten. Befand sich anschließend eine Bande bei 420 bp (400 bp Insert plus 20 bp Plasmidüberhang), so wurde die Probe zur Sequenzierung eingeschickt.

2.5.7 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde durch einen kommerziellen Anbieter (GATC; Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Zum Einsatz kam dort eine modifizierte Kettenabbruchmethode nach Sanger. Genutzt wurde dabei der Primer T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG). Eine Beispielsequenz zeigt **Abbildung 12**. Die Nukleotidsequenzen wurden mit der Keimbahnsequenz aller bekannten V_HDJ_H-Gen-Segmenten abgeglichen. Dabei wurde die Vquest-Software und die IMGT/V-Quest-Datenbank im Zeitraum von Oktober 2009 bis Oktober 2010 genutzt (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=mouseIg). Der Abgleich mit Vquest ist ebenfalls in **Abbildung 12** dargestellt. Die hieraus gewonnenen Daten

Material und Methoden

Nutzung von V_H-, D-, J_H-Gen-Segmenten

Mithilfe der IMGT/V-Quest-Datenbank wurden die Sequenzen auf ihre Nutzung von V_H-, D- und J_H-Gen-Segmenten untersucht. Zur Identifizierung eines D-Genes waren minimal sechs nicht mutierte Nukleotide mit mindestens zwei nicht mutierten Nukleotiden an den Enden nötig. Nur ein D-Genesegment pro Sequenz wurde zugelassen.

Charakterisierung der CDR-H3

Die CDR-H3 wurde definiert als das Stück zwischen dem konservierten Cystein (C104) der FR-H3 und dem konservierten Tryptophan (W118) der FR-H4. Die Länge der CDR-H3, sowie deren Komposition aus V_H-, D- und J_H-Gen-Segmenten wurde charakterisiert. Mithilfe der IMGT/V-Quest-Datenbank wurden die kodierenden Sequenzen der CDR-H3 in Aminosäuren übersetzt. Die absolute Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren, der Anteil der Aminosäuren, die an gegebener IMGT-Position auftraten, sowie die Aminosäure-Variabilität wurden registriert. Hierfür wurde die Shannon-Entropie (Shannon, 1949; Stewart et al., 1997) und die Variabilität nach Kabat-Wu (Wu and Kabat, 1970) an gegebener Aminosäureposition bestimmt.

Zudem erfolgte die Berechnung der Hydrophobizität nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982). Schleifen wurden ab einem Kyte-Doolittle-Index <0,700 als geladen eingestuft, bei >0,6 galten sie als hydrophil.

Mithilfe einer von Shirai et al. entwickelten Methode (Shirai et al., 1999) konnte wurde die Tertiärstruktur der für die CDR-H3 kodierenden Sequenzen als Modell vorhergesagt. Diese Methode bezieht die Primärsequenz, die Lokalisation der Aminosäuren, ihre Hydrophobizität und die Größe ihrer Seitenketten in die Berechnung ein.

Somatische Mutationsrate

Gemessen wurde die somatische Mutationsrate in CDR-H1, FR-2, CDR-H2 und FR-H3 gegenüber der Keimbahnsequenz des korrespondierenden V_H-Gens. Mutationen können eingeteilt werden in sogenannte *silent* Mutationen (S) und in *Replacement*-Mutationen (R). Nur *Replacement*-Mutationen führen zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Die Summe aller Mutationen in oben genannter Region geteilt durch die Gesamtzahl an Nukleotiden wurde als somatische Mutationsrate definiert. Zur Ermittlung des Taq-

Material und Methoden

Polymerase-Fehlers wurde eine Mutationsanalyse von 20 Nukleotiden der konstanten Region C_{Hε1} durchgeführt.

Antigenselektion

Um zu analysieren, ob die IgE-Sequenzen unter dem Einfluss einer Antigenselektion entstanden sind, wurde die Methode von Lossos et al. (Lossos et al., 2000) in der modifizierten Form von Kerzel et al. genutzt (Kerzel et al., 2010). Mit diesem statistischen Modell kann die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Anhäufung von *Replacement*- Mutationen in der V_H-Region errechnet werden. Die tatsächlichen Mutationen wurden hierzu in Relation gesetzt. Mithilfe der Methode von Chang und Casali (Chang und Casali, 1994) wurden die 95% Konfidenzintervalle für die Anreicherung von *Replacement*-Mutationen in den CDR errechnet. Diese sind in **Abbildung 35** als hellgraue Flächen dargestellt. Ein Datenpunkt außerhalb dieses Konfidenzintervalls repräsentiert eine Sequenz die so viele *Replacement*-Mutationen in den CDR enthält, dass die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Anhäufung kleiner 5% ist. Eine solche Sequenz wurde als signifikant antigenselektiert bewertet.

Klonotypische Diversität und phylogenetische Bäume

Zur Charakterisierung der Diversität des sekundären Antikörperrepertoires wurde die Anzahl der Klonotypen zu der Anzahl an funktionellen Sequenzen ins Verhältnis gesetzt. Um die klonale Expansion graphisch darzustellen, wurden phylogenetische Bäume mithilfe der Programme Clustal X (www.clustal.org) (Larkin et al., 2007) und TreeDyn (www.treedyn.org, Chevenet et al., 2006) erstellt.

2.6 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, wurden Ergebnisse als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnow-Test überprüft. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde für normalverteilte Werte mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben nach Student überprüft. Lag keine Normalverteilung vor, wurde die statistische Signifikanz mit dem U-Test nach Mann-Whitney untersucht. Kategorische Daten wurden mittels Chi²-Test mit *post-hoc*-Analyse untersucht. p-Werte < 0,05

Material und Methoden

wurden als signifikant bewertet („*“). In den Abbildungen werden folgende Symbole für die Signifikanzniveaus verwendet: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

3. Ergebnisse

3.1 Alle Tiere der Helminthengruppe waren Wurm-infiziert

Zur Überprüfung der erfolgreichen Wurm-Infektion wurden die Tiere der Lito-Gruppe auf den Befall mit *L. sigmodontis* untersucht. Bei allen analysierten Mäusen gelang ein Nachweis der Helminthen-Infektion. Interessanterweise korrelierte eine hohe Anzahl an L1-Larven im Blut nicht immer mit einer hohen Anzahl adulter Würmer in der Pleura.

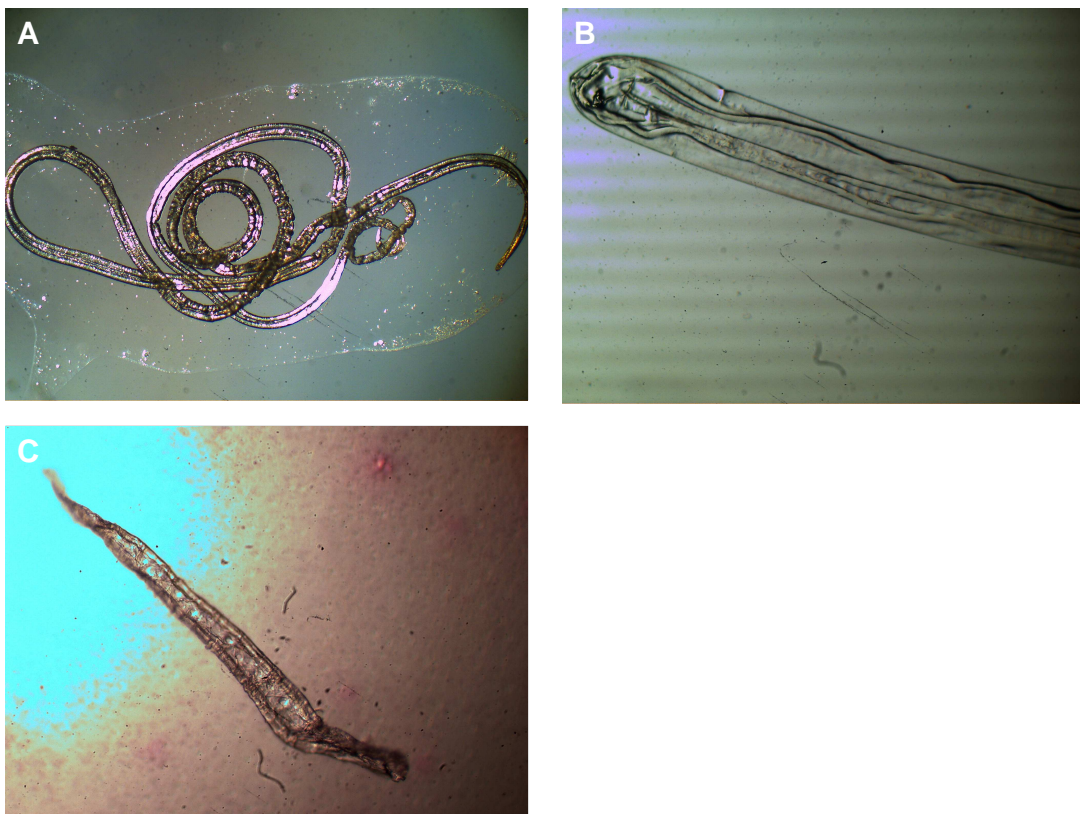


Abb. 13: *L. sigmodontis*

A) Adulter Wurm aus dem Pleuraraum, makroskopische Betrachtung, **B)** Adulter Wurm aus dem Pleuraraum. 400-fache Vergrößerung. **C)** L1-Larve nach Anfärbung mit Hinkelmann-Lösung bei 400-facher Vergrößerung.

3.2 Infektion mit *L. sigmodontis* verhinderte eosinophilen

Zellinflux in die Atemwege

Die BALF diente der Beurteilung der allergischen Atemwegsentzündung. Hierfür typisch ist ein Influx an eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten in die Atemwege, was eine Erhöhung der Gesamtzellzahlen in der BALF zur Folge hat. Erwartungsgemäß waren nicht sensibilisierte Kontrolltiere („*ni,PBS-Tiere*“) durch niedrige

Ergebnisse

Gesamtzellzahlen charakterisiert. Nicht infizierte, OVA-sensibilisierte Tiere („*ni,OVA-Tiere*“) hingegen zeigten im Vergleich eine starke Zellzahlerhöhung ($+450\% \pm 62\%$, $p < 0,0001$). Bei den *L. sigmodontis*-infizierten Tieren zeigten OVA-sensibilisierte Tiere („*Lito,OVA-Tiere*“) im Vergleich zu Kontrolltieren („*Lito,PBS-Tiere*“) keine signifikant erhöhten Zellzahlen ($p = 0,36$). Im direkten Vergleich der OVA-sensibilisierten Untersuchungsgruppen zeigten nicht infizierte Tiere fast dreifach höhere Zellzahlen als Lito-infizierte Tiere ($+262\% \pm 40\%$, $p < 0,0001$) (**Abb.14**).

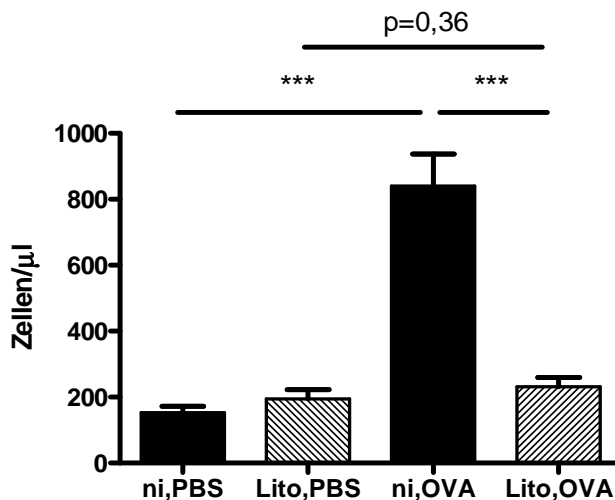


Abb. 14: Gesamtzellzahlen in der bronchoalveolären Lavage

Bei nicht infizierten Tieren führte eine OVA-Sensibilisierung und Provokation zu einer starken Zellzahlerhöhung ($p < 0,0001$). Bei Lito-infizierten Tieren (Lito,OVA) blieb die Zellzahlerhöhung aus ($p = 0,36$). Lito-infizierte Tiere hatten nach OVA-Sensibilisierung deutlich niedrigere Gesamtzellzahlen verglichen mit nicht infizierten sensibilisierten Tieren ($p < 0,0001$).

In der Zelldifferenzierung der BALF prägten Alveolarmakrophagen das Zellbild bei ni,PBS-Tieren. Gleiches galt für Lito,PBS- und Lito,OVA-Tiere (**Abb. 15A**). Weiterhin zeigte sich, dass die deutlich erhöhten Zellzahlen bei ni,OVA-Tieren auf einen starken Influx von eosinophilen Granulozyten zurückzuführen waren ($p < 0,0001$ vs. ni,PBS) (**Abb. 15C**). Dieser starke Influx blieb bei Lito,OVA-Tieren völlig aus ($p < 0,0001$ vs. ni,OVA). Auch die Zahl der Lymphozyten stieg bei nicht infizierten Tieren nach OVA-Sensibilisierung signifikant an ($p < 0,05$ vs. ni,PBS) (**Abb. 15D**), während sie zwischen Lito,OVA-Tieren und Lito,PBS-Kontrollgruppe nicht differierte ($p = 0,83$). Verglichen mit der ni,OVA-Gruppe hatte die Lito,OVA Gruppe keine signifikante Änderung der Lymphozytenzahlen ($-67\% \pm 42\%$, $p = 0,13$). In den Kontrollgruppen zeigten Lito-infizierte Tiere jedoch signifikant höhere Zahlen an Lymphozyten in der BALF (Lito,PBS vs. ni,PBS: $+334\% \pm 126\%$, $p < 0,05$). Die Zahl der neutrophilen Granulozyten unterschied sich nicht signifikant zwischen den Untersuchungsgruppen.

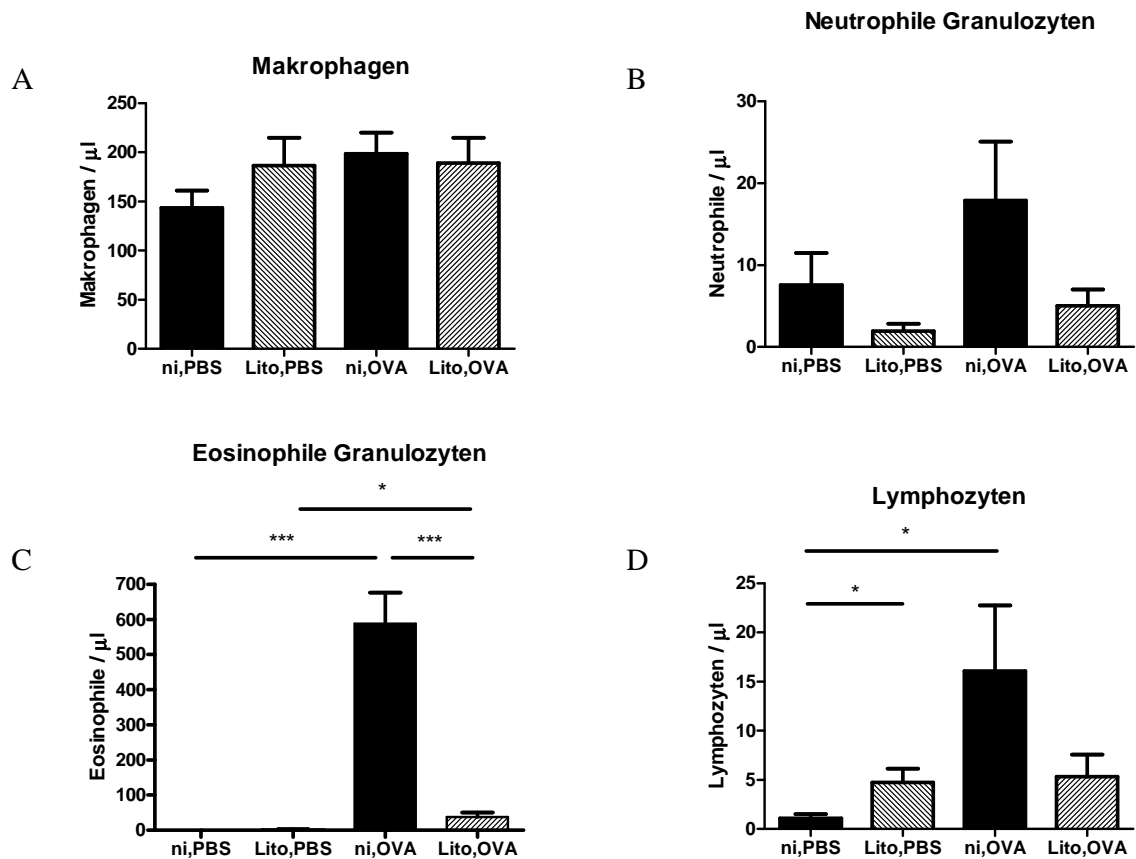


Abb. 15: Differenzierung der Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage (absolute Zahlen).

Die Sensibilisierung und Provokation mit OVA führte bei nicht infizierten Tieren zu einer Dominanz von eosinophilen Granulozyten. Bei Lito-infizierten Tieren prägen Makrophagen auch nach Sensibilisierung das Zellbild. ni,OVA-Tiere zeigten einen starken Influx an eosinophilen Granulozyten ($p < 0,0001$) und eine signifikante Erhöhung der Lymphoztenzahlen ($p < 0,05$) im Vergleich zu Kontrolltieren. Bei Lito,OVA-Tieren fand zwar auch ein Influx an eosinophilen Granulozyten statt ($+27\% \pm 11\%$ verglichen mit Lito,PBS, $p < 0,05$), dieser war jedoch um ein Vielfaches geringer als bei ni,OVA-Tieren ($-94\% \pm 14\%$, $p < 0,0001$).

3.3 Der Anteil splenischer Plasmazellen nach allergischer Sensibilisierung war bei Helminthen-infizierten Mäusen deutlich reduziert

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Splenozyten ergab in allen untersuchten Gruppen ähnlich hohe Anteile an $\text{CD138}^- \text{CD19}^+$ -Zellen (Nicht-Plasmazellen) im Lymphozyten-Gate. Etwa die Hälfte der splenischen Lymphozyten waren Nicht-Plasmazellen. Anders verhielt es sich mit CD138^+ -Zellen. Während bei ni,OVA-Tieren 4,6% der splenischen Lymphozyten Plasmazellen darstellten, zeigten Lito-infizierte Tiere hier nur geringe Anteile von weniger als einem halben Prozent ($p < 0,001$).

Tab. 7: B-Zell-Differenzierung von Lymphozyten aus der Milz in Plasmazellen und Nicht-Plasmazellen

Färbung	ni,PBS	Lito,PBS	ni,OVA	Lito,OVA
CD138⁺ (Plasmazellen)	0,73%	0,33%	4,6%	0,46%
CD138⁺CD19⁻ (Nicht-Plasmazellen)	47%	50%	47%	55%

(Anteile an allen gemessenen Lymphozyten in der Milz)

3.4 Sowohl OVA-Sensibilisierung als auch Infektion mit *L. sigmodontis* waren starke Induktoren einer humoralen Immunantwort

3.4.1 Gesamt-IgM

IgM ist der Antikörper, der vom Immunsystem in der Frühphase einer Infektion gebildet wird. Nach einigen Wochen kommt es meist zum Isotypen-Wechsel, bei Vorhandensein von Gedächtniszellen auch früher. Interessant sind die IgM-Konzentrationen im Hinblick auf die Helminthen-Infektion als Marker eines akuten Infektionsgeschehens. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns waren mindestens 60 Tage nach Stich durch den Vektor vergangen (**Abb. 6**). Im verwendeten Modell hatten Lito-infizierte Tiere zu diesem Zeitpunkt hohe IgM-Konzentrationen verglichen mit nicht infizierten Tieren ($p < 0,0001$). Anschließend zeigten sich bei Lito-Tieren in der Zeitspanne von 60 - 90 Tagen post infectionem keine signifikanten Änderungen der IgM-Konzentrationen (Lito,PBS: $p = 0,2$; Lito,OVA: $p = 0,14$) (**Abb. 16A**). Bei nicht infizierten Tieren hingegen stiegen die IgM-Konzentrationen nach Sensibilisierung stark an ($+576\% \pm 158\%$, $p < 0,01$). Letztendlich kamen infizierte und nicht infizierte Tiere nach OVA-Sensibilisierung auf ähnlich hohe Gesamt-IgM-Konzentrationen ($p=0,49$) (**Abb. 16B**).

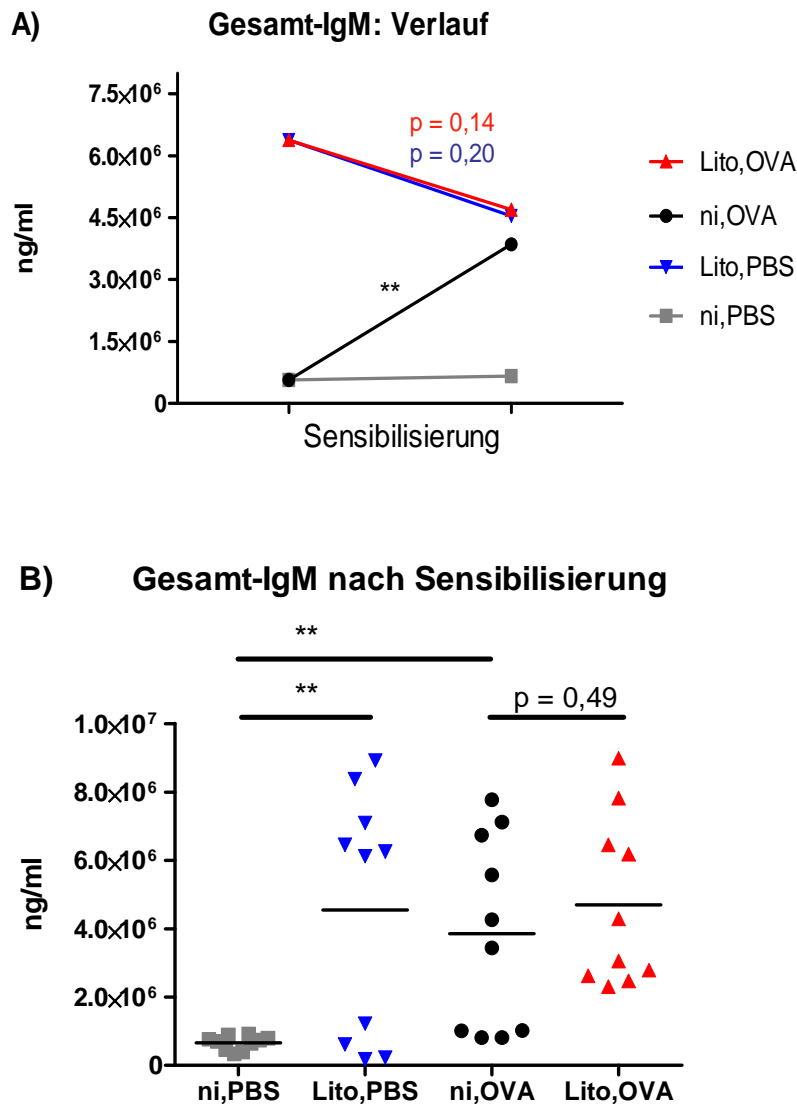


Abb. 16: Gesamt-IgM-Konzentration

A) Verlauf: Vor der Sensibilisierung hatten Lito-infizierte Tiere bereits hohe IgM-Konzentrationen, verglichen mit nicht infizierten Tieren ($+1018\% \pm 137\%$, $p < 0,0001$). Bei nicht infizierten Tieren kam es nach Sensibilisierung zu einem starken Anstieg der IgM-Konzentration ($+576\% \pm 158\%$, $p < 0,01$). Fand keine OVA-Sensibilisierung statt, so blieben die Konzentrationen konstant niedrig (ni,PBS, $p = 0,47$). Bei Lito-infizierten Tieren kam es im Laufe der Sensibilisierung mit OVA zu keiner signifikanten Änderung der IgM-Konzentrationen ($-26\% \pm 17\%$, $p = 0,14$). Auch in der Lito,PBS-Kontrollgruppe änderten sich die IgM-Konzentrationen nicht ($-29\% \pm 21\%$, $p = 0,20$).

B) nach Sensibilisierung: Sowohl die Lito-Infektion (Lito,PBS und Lito,OVA) als auch die OVA-Sensibilisierung bei nicht infizierten Tieren (ni,OVA) führten zu vergleichbaren IgM-Konzentrationen im Serum.

3.4.2 Gesamt-IgE

Bereits vor Sensibilisierung zeigten sich bei Lito-Tieren stark erhöhte IgE-Konzentrationen ($+4516\% \pm 995\%$ verglichen mit ni, $p < 0,0001$). Nach OVA-Sensibilisierung waren diese Konzentrationen noch weiter angestiegen ($+165\% \pm 29\%$, $p < 0,0001$) (**Abb. 17A**). Ein analoger Verlauf zeigte sich auch bei der Lito,PBS-Gruppe

Ergebnisse

(+159% \pm 52, $p < 0,01$). (**Abb. 17B**). Nicht infizierte Tiere zeigten im Rahmen der allergischen Sensibilisierung auf OVA eine starke Erhöhung der Gesamt-IgE-Konzentration (+3894% \pm 815%, $p < 0,0001$), wie dies für Balb/c Mäuse in verwendeten murinen Asthmamodellen beschrieben ist (Kerzel et al., 2003). Diese Erhöhung blieb bei der nicht-sensibilisierten ni,PBS-Gruppe erwartungsgemäß aus. Interessant ist, dass die IgE-Konzentrationen von Lito-infizierten Tieren deutlich über denen von nicht-infizierten aber OVA-sensibilisierten Tieren lagen (+206% \pm 37%, $p < 0,0001$) (**Abb.17B**).

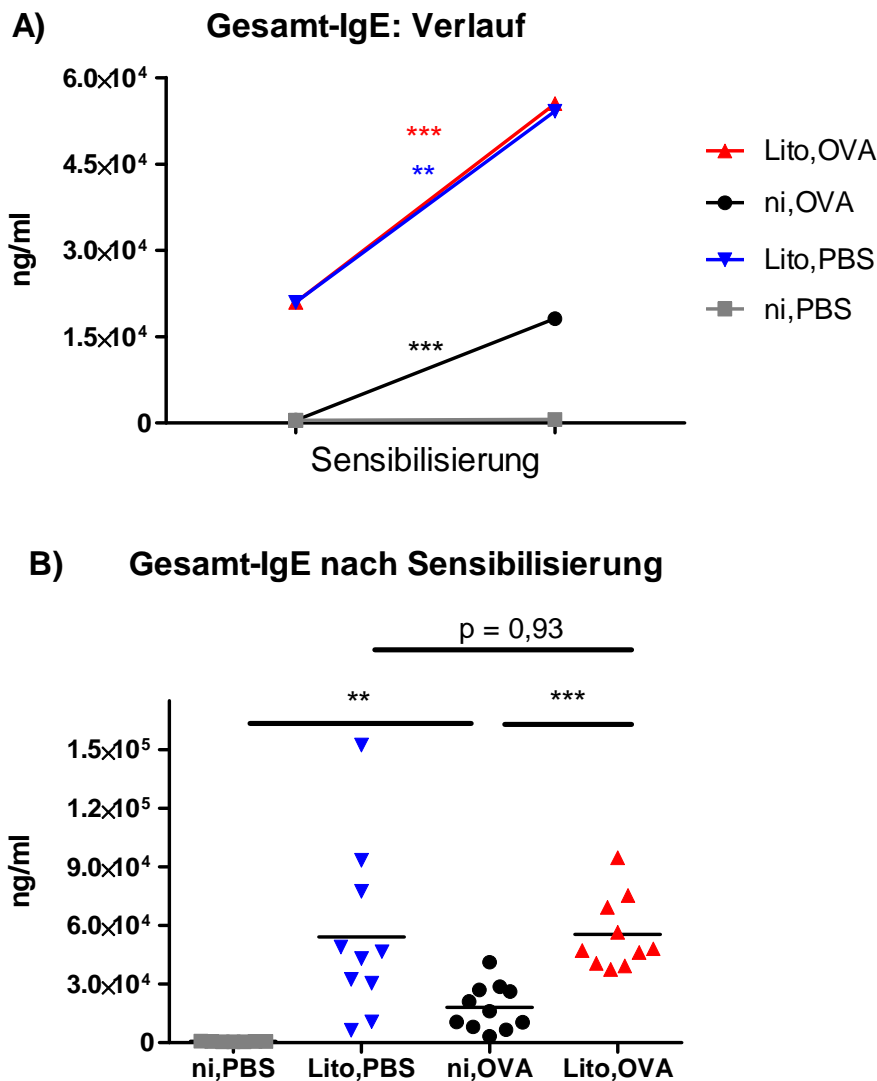


Abb. 17 : Gesamt-IgE-Konzentration

A) Verlauf: Lito-Tiere zeigten schon vor Beginn der OVA-Sensibilisierung sehr hohe Gesamt-IgE-Konzentrationen. Diese stiegen im Verlauf noch weiter an – unabhängig von einer Behandlung mit OVA oder PBS. Auch die Sensibilisierung von nicht infizierten Tieren mit dem Modellallergen OVA führte zu einem starken Anstieg der IgE-Konzentration. **B) nach Sensibilisierung:** Lito-infizierte Tiere zeigten vergleichbare Gesamt-IgE-Konzentrationen in der Lito,OVA- und der Lito,PBS-Gruppe ($p = 0,93$). Bei den ni-Tieren kam es nach OVA-Sensibilisierung zu einem deutlichen Anstieg der Gesamt-IgE-Konzentrationen ($p < 0,0001$). Diese lagen jedoch immer noch unter den IgE-Konzentrationen beider Lito-infizierten Gruppen ($p < 0,01$).

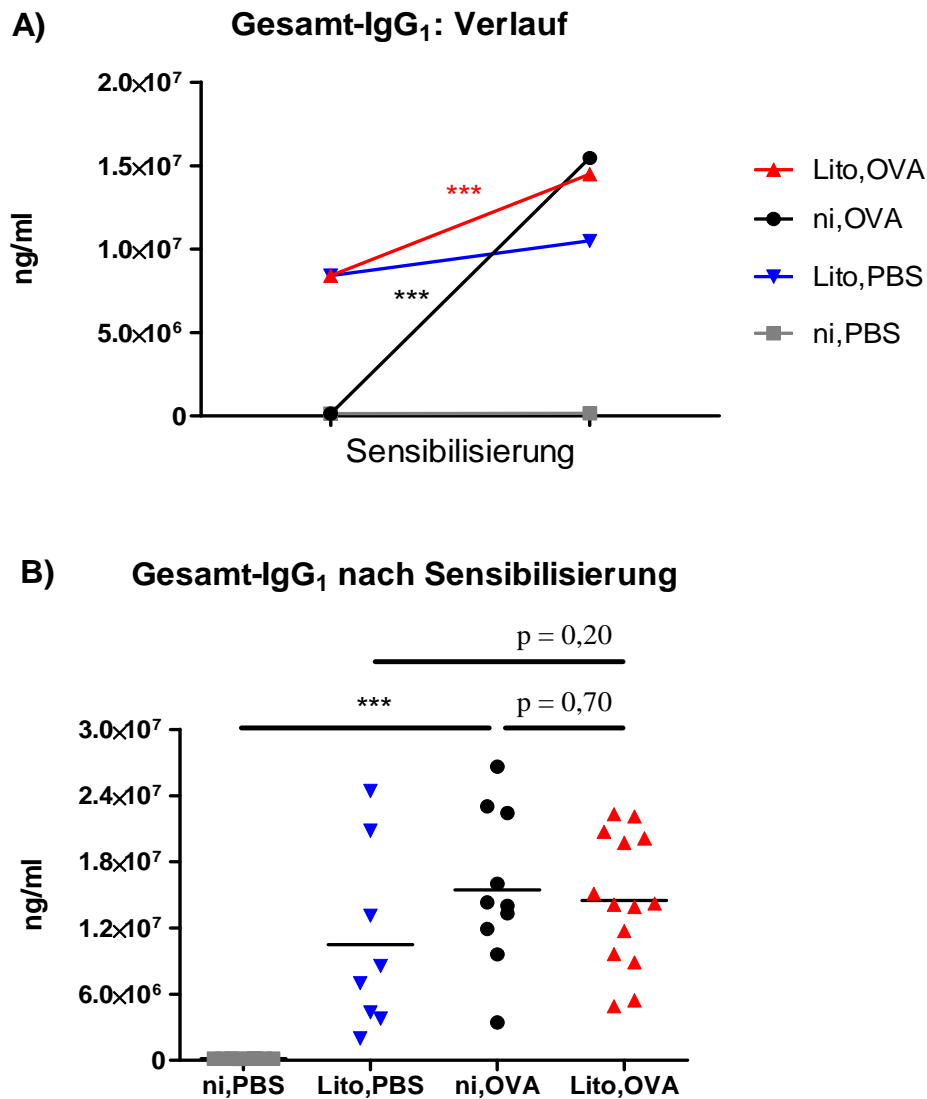


Abb. 19 : Gesamt-IgG₁-Konzentration

A) Verlauf: Lito-infizierte Tieren zeigten vor OVA-Sensibilisierung deutlich erhöhte Gesamt-IgG₁-Konzentrationen ($p < 0,0001$). Nicht infizierte Tiere zeigten erst nach OVA-Sensibilisierung einen starken Anstieg der Konzentration ($p < 0,0001$). Auch bei Lito,OVA-Tieren stiegen die Konzentrationen noch einmal signifikant an ($p < 0,001$). Der Anstieg in der Lito,PBS-Gruppe war nicht signifikant ($p = 0,30$). **B) nach Sensibilisierung:** Nach OVA-Sensibilisierung hatten Lito-infizierte und nicht infizierte Tiere vergleichbare Gesamt-IgG₁-Konzentrationen ($p = 0,70$).

3.4.5 Ovalbumin-spezifisches IgG₁

Nach OVA-Sensibilisierung kam es sowohl in Lito-infizierten als auch in nicht infizierten Tieren zu einer starken Induktion von OVA-spezifischem IgG₁, wobei der Anstieg bei den Lito-infizierten Mäusen im Vergleich zu ni,OVA-Tieren geringer ausfiel ($p < 0,05$) (**Abb. 20**). Bei Vergleich der OVA-spezifischen mit den Gesamt-IgG₁-Konzentrationen fällt auf, dass die OVA-spezifischen IgG₁-Konzentrationen bei

Ergebnisse

Lito,OVA-Tieren um den Faktor 1,4 und bei ni,OVA-Tieren um den Faktor 3,1 über den Gesamt-IgG₁-Konzentratiomm lagen. Bei den hier vorliegenden hohen Antikörperkonzentrationen (Verdünnung 1:1.000.000) sind aus methodischen Gründen die Möglichkeiten zur exakten Bestimmung der Absolutwerte limitiert. Es kann jedoch für beide Untersuchungsgruppen davon ausgegangen werden, dass die IgG₁-Konzentrationen nach Sensibilisierung nahezu vollständig aus OVA-spezifischen Antikörpern bestanden.

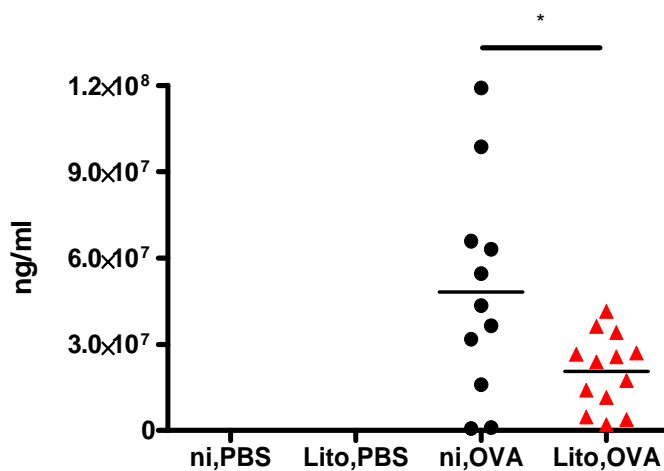


Abb. 20: OVA-spezifisches IgG₁ nach Sensibilisierung

Sowohl Lito-infizierte Tiere als auch nicht infizierte Tiere zeigten nach OVA-Sensibilisierung einen starken Anstieg der OVA-spezifischen IgG₁-Konzentration gegenüber nicht sensibilisierten Tieren ($p < 0,0001$), wobei der Anstieg in der Lito-Gruppe geringer ausfiel ($p < 0,05$).

3.4.6 Gesamt-IgG_{2a}

Vor Sensibilisierung hatten Lito-infizierte und nicht infizierte Tiere vergleichbar hohe Gesamt-IgG_{2a}-Konzentrationen ($p = 0,56$) (**Abb. 21**). Eine OVA-Sensibilisierung bewirkte bei beiden Gruppen einen signifikanten Abfall um mehr als ein Drittel des Ausgangswerts (Lito,OVA: $-38\% \pm 16\%$, $p < 0,05$; ni,OVA: $-42\% \pm 20\%$, $p < 0,05$). Die jeweiligen PBS-Kontrollgruppen hingegen zeigten keine signifikante Änderung der Gesamt-IgG_{2a}-Konzentrationen (Lito,PBS: $+40\% \pm 41\%$, $p = 0,34$; ni,PBS: $+115\% \pm 57\%$, $p = 0,06$). Nicht infizierte OVA-Tiere zeigten nach Sensibilisierung niedrigere Konzentrationen als die jeweiligen PBS-Tiere ($-73\% \pm 26\%$, $p < 0,05$). Lito,OVA-Tiere hingegen zeigten keine signifikant erniedrigten Konzentrationen verglichen mit Lito,PBS ($-56\% \pm 27\%$, $p = 0,06$).

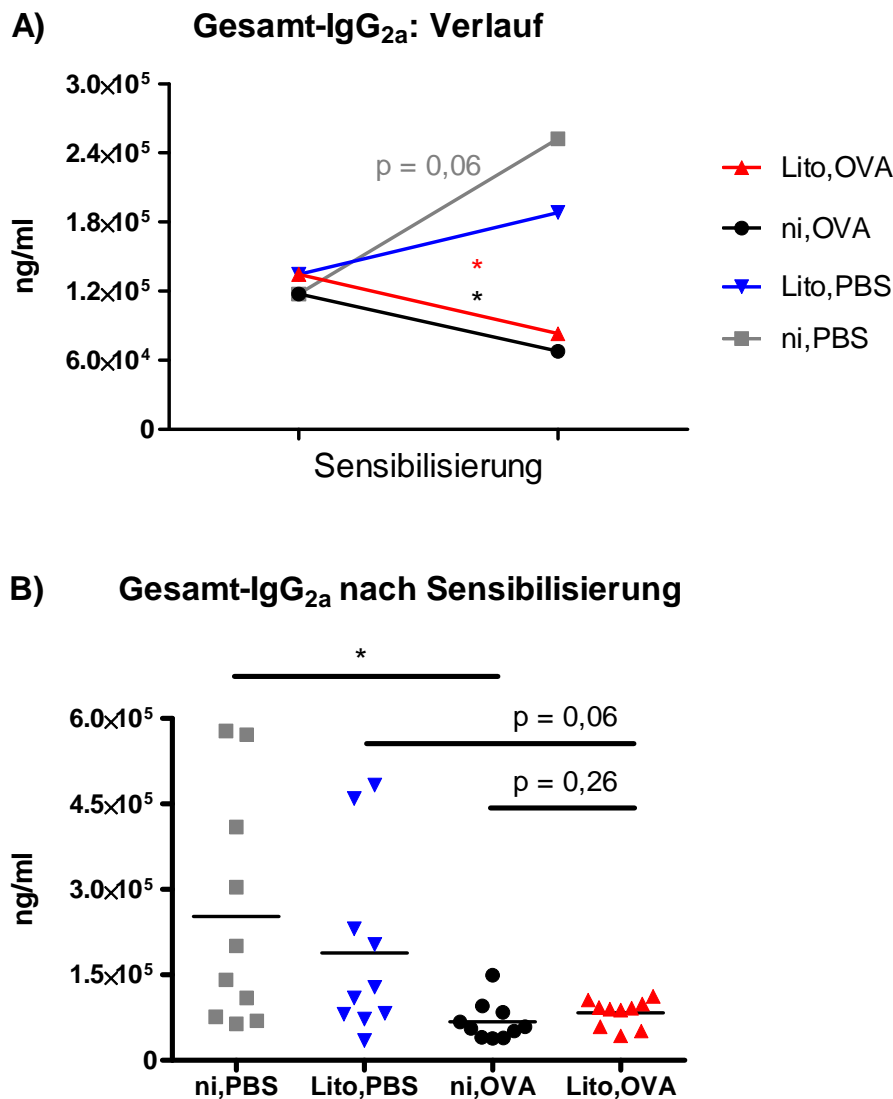


Abb. 21: Gesamt-IgG_{2a}

A) Verlauf: Sowohl Lito-infizierte Tiere ($p < 0,05$), als auch nicht infizierte Tiere ($p < 0,05$) zeigten nach OVA-Sensibilisierung signifikant erniedrigte Gesamt-IgG_{2a}-Konzentrationen.

B) nach Sensibilisierung: Die beiden OVA-Gruppen zeigten im direkten Vergleich nach Sensibilisierung keine signifikanten Unterschiede. ni,OVA-Tiere zeigten, jedoch signifikant erhöhte Konzentrationen, verglichen mit ni,PBS-Tieren, Lito,OVA-Tiere hingegen zeigten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede verglichen mit Lito,PBS.

3.5 Eine Helminthen-Infektion modifizierte das IgE-Repertoire

Die beiden OVA-sensibilisierten Gruppen ni,OVA und Lito,OVA, sowie die Lito,PBS-Gruppe zeigten nach IgE-RT-PCR einen Bandenschmear bei 400 bp in der Gel-Elektrophorese (**Abb. 22**). 400 bp entsprach der Länge des PCR-Amplifikats der V_H-

Ergebnisse

Region des IgE-Antikörpers. In der ni,PBS-Gruppe konnten keine IgE-Banden festgestellt werden.

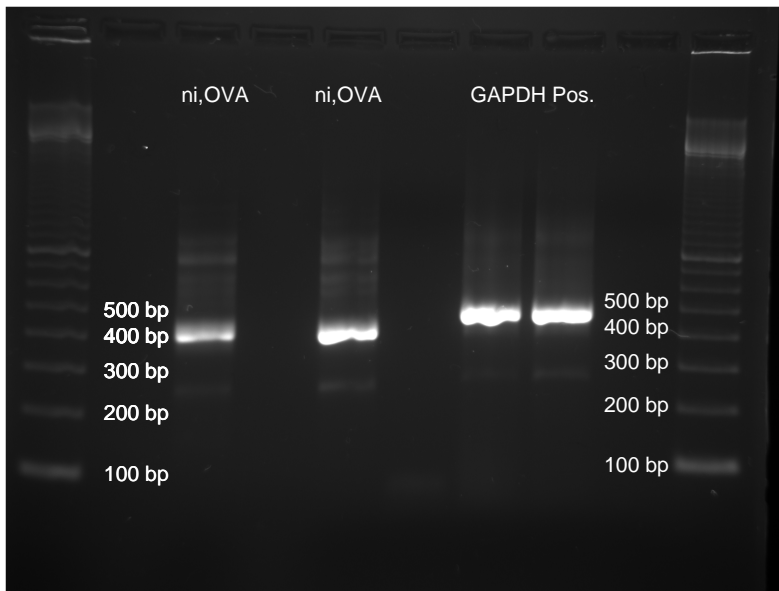


Abb. 22: IgE-Gel-Elektrophorese

Abgebildet ist die Gelelektrophorese einer IgE-RT-PCR von ni,OVA-Tieren. Es zeigten sich IgE-Banden bei 400 bp. Als Positivkontrolle diente die Amplifikation von GAPDH (positive Bande bei 450 bp). Leerwerte wurden mit Wasser titriert. bp: Basenpaare.

In der Lito,OVA-Gruppe konnten aus zwei Milzen 85 Sequenzen gewonnen werden, wovon 81 funktionell waren. Aus drei ni,OVA-Milzen wurden 136 Sequenzen gewonnen, davon 126 funktionell. Aus zwei Lito,PBS-Milzen wurden 73 Sequenzen gewonnen, davon 71 funktionell.

3.5.1 Zuordnung zu V_H -, D- und J_H -Genfamilien

Die Komposition des V_H -Gensegments setzt sich in der Regel aus den fünf häufigsten Gen-Familien V1, V2, V3, V5 und V14 zusammen. **Abbildung 23** zeigt die Komposition der V_H -Gensegmente in den Untersuchungsgruppen. Die Komposition des D-Gensegments setzt sich in der Regel aus den Gen-Familien D1 bis D6 zusammen (**Abb. 24**). **Abbildung 25** zeigt die Komposition des J_H -Gensegments, mit den Gen-Familien J1 bis J4.

Ergebnisse

Im Chi²-Test mit Post-Hoc-Analyse zeigten sich in der V_H-, D- und J_H-Familiennutzung keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen.

V1 war bei allen drei Gruppen die am stärksten genutzte Genfamilie (Lito,OVA: 71%; Lito,PBS: 58%; ni,OVA: 42%). V3 wurde von keiner untersuchten Gruppe genutzt. ni,OVA-Tiere wiesen zudem gar keine Nutzung von V2 auf, während diese von Lito-infizierten Tieren immerhin noch mit ca. 3% genutzt wurden (Lito,OVA: 3,2%, Lito,PBS: 2,9%).

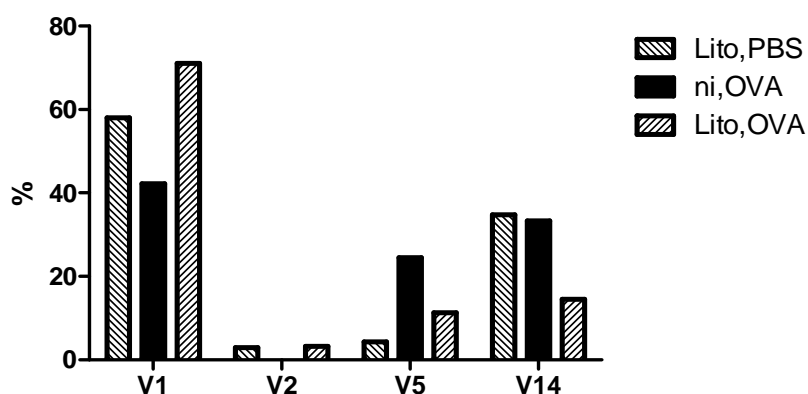


Abb. 23: Nutzung von V_H-Genfamilien

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Nutzung der V_H-Genfamilien.

Bei der Nutzung des D-Gensegments zeigten die Sequenzen aller Untersuchungsgruppen eine Präferenz für D1 (Lito,PBS 26%, ni,OVA 24%, Lito,OVA 18%) und D2 (Lito,PBS: 47%, ni,OVA 28%, Lito,OVA 31%). In Lito,PBS-Sequenzen wurde zudem auch D6 genutzt (Lito,PBS 3%).

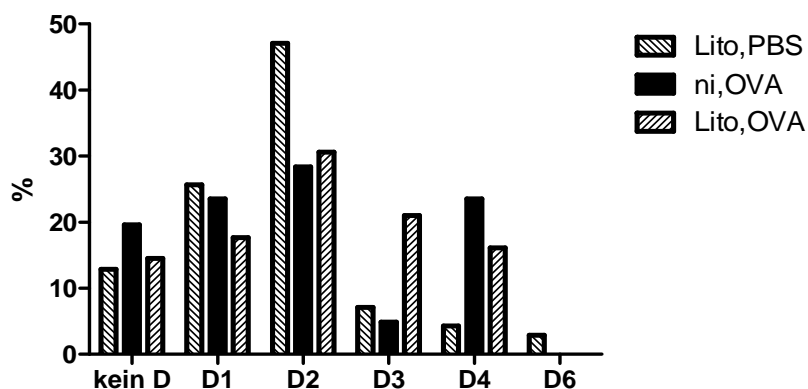


Abb. 24: Nutzung von D-Genfamilien

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Nutzung der D-Genfamilien.

Ergebnisse

Bei der Komposition des J_H -Gensegments zeigten alle drei Gruppen eine Präferenz für die Genfamilie J3 (Lito,PBS 34%, ni,OVA 46%, Lito,OVA 36%).

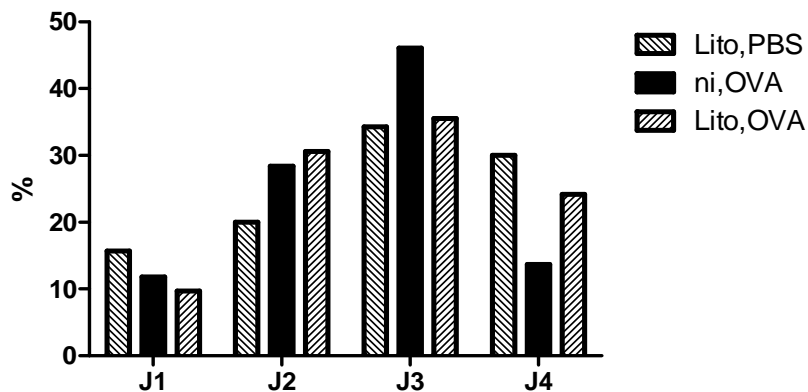


Abb. 25: Nutzung von J_H -Genfamilien

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Nutzung der J_H -Genfamilien.

3.5.2 D-Leseraster-Präferenz

Betrachtet man RNA, aus der die Sequenzen ursprünglich abgeleitet wurden, gibt es drei mögliche Leseraster oder auch *reading frames* (RF) für die Translation in Aminosäuren, gemäß den drei Nukleotiden in einem Basentriplet. Gibt es ein Start-Codon (AUG) und eine Anzahl an Aminosäuren, die ein Vielfaches von drei ergeben, so existiert ein *open reading frame* (ORF) und eine Translation ist möglich. Die Analyse, ob eine Präferenz für RF1, RF2 oder RF3 vorlag, zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Chi²-Test mit post-hoc-Analyse).

Sequenzen aller 3 Untersuchungsgruppen zeigten eine Präferenz von RF1 (Lito,PBS 82%, ni,OVA 43%, Lito,OVA 64%).

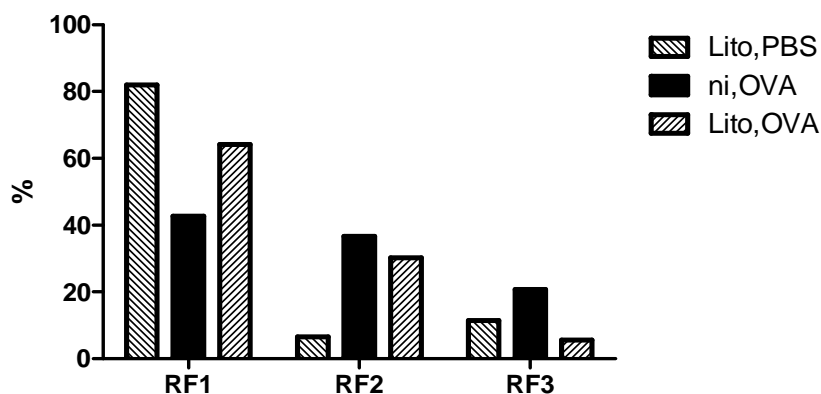


Abb. 26: D-Leseraster-Präferenz

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der DH-Leseraster-Präferenz.
RF: reading frame, Leseraster

3.5.3 CDR-H3-Komposition

Abbildung 27 zeigt die absolute Komposition der CDR-H3-Sequenzen aus V_H, D, J_H-Gensegmenten, sowie von während der somatischen Rekombination eingefügten N- und P-Nukleotiden. Lito,OVA-Sequenzen wiesen, verglichen mit ni,OVA-Sequenzen, signifikant kürzere V-Segmente auf (p = 0,0321). Bei Sequenzen der Lito,PBS-Gruppe war dieser Befund noch ausgeprägter (p = 0,0065 verglichen mit ni,OVA). Zudem wurden in Lito,OVA-Sequenzen signifikant weniger P-Nukleotide zwischen dem V-Segment und dem D-Segment eingebaut (p = 0,0021). Auch bei Lito,PBS-Sequenzen war der Einbau von P-Nukleotiden zwischen V-Segment und D-Segment verringert (p < 0,0001 verglichen mit ni,OVA; p = 0,05 verglichen mit Lito,OVA). Zuletzt zeigten Lito,OVA-Sequenzen einen stärkeren Einbau von N-Nukleotiden zwischen dem D-Segment und dem J-Segment verglichen mit nicht infizierten Tieren (p = 0,0012) und Lito,PBS-Sequenzen (p = 0,0009). Die Betrachtung der Komposition ergab zudem, dass die im Durchschnitt längeren CDR-H3 bei Lito,PBS-Tieren (**s.u. Abb. 28**) primär aufgrund eines verstärkten Einbaus von N-Nukleotiden zwischen dem V-Segment und dem D-Segment (p < 0,0001 verglichen mit ni,OVA; p = 0,0001 verglichen mit Lito,OVA), längerer D-Segmente (p = 0,0314 verglichen mit ni,OVA; p = 0,006 verglichen mit Lito,OVA), und längerer J-Segmente (p = 0,0549 verglichen mit ni,OVA; p = 0,029 verglichen mit Lito,OVA) zustande kamen. Bei ni,OVA-Tieren wurde in 19,61% der Sequenzen kein D-Segment eingebaut. Bei Lito,OVA-Tieren betrug dieser Anteil 14,52%, bei Lito,PBS-Tieren 12,86%.

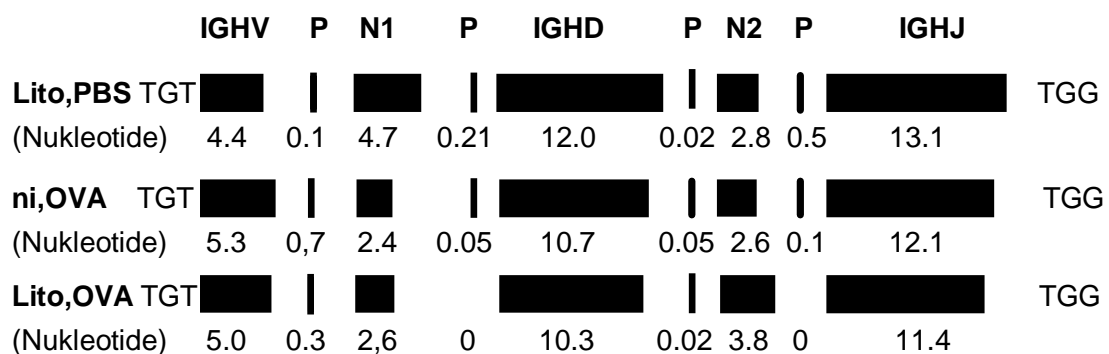


Abb. 27: CDR-H3-Komposition

Ergebnisse

Lito,OVA-Tiere zeigten kürzere V-Segmente ($p < 0,05$), einen geringeren Einbau von P-Nukleotiden zwischen V- und D-Segment ($p < 0,01$), sowie einen verstärkten Einbau von N-Nukleotiden zwischen D- und J-Segment ($p < 0,01$), verglichen mit ni,OVA-Tieren. Signifikant längere CDR-H3-Regionen bei Lito,PBS-Tieren kamen primär aufgrund eines verstärkten Einbaus von N-Nukleotiden zwischen V- und D-Segment, längeren D-Segmenten und längeren J-Segmenten zustande. In dieser Abbildung wurden nur die Sequenzen berücksichtigt, die überhaupt ein D-Segment in ihre CDR-H3-Region einbauten. Bei ni,OVA-Tieren wurde in 80,39% der Sequenzen das D-Segment genutzt, bei Lito,OVA-Tieren in 85,48%, bei Lito,PBS-Tieren in 87,14%.

3.5.4 CDR-H3-Länge

Sequenzen von Lito-infizierten Tieren zeigten im Vergleich zu nicht infizierten Tieren eine vergleichbare absolute Länge der CDR-H3 ($p = 0,34$). Sequenzen von Lito,PBS-Tieren hingegen zeigten signifikant längere CDR-H3 (vs. ni,OVA: $p = 0,0004$; vs. Lito,OVA: $p = 0,0028$) (**Abb. 28**). In **Abbildung 29** ist das Verteilungsmuster der unterschiedlichen CDR-H3-Längen dargestellt. Lito,PBS- und Lito,OVA-Tiere zeigten keine signifikant verstärkte Nutzung einer bestimmten CDR-H3-Länge im direkten Vergleich. Lito,OVA-Tiere zeigten verglichen mit ni,OVA-Tieren einen signifikant stärkeren Einbau einer CDR-H3-Länge von 24 Nukleotiden ($p < 0,01$). Lito,PBS-Sequenzen hatten häufiger eine CDR-H3-Länge von 42 Nukleotiden zu verzeichnen als ni,OVA-Sequenzen ($p < 0,05$).

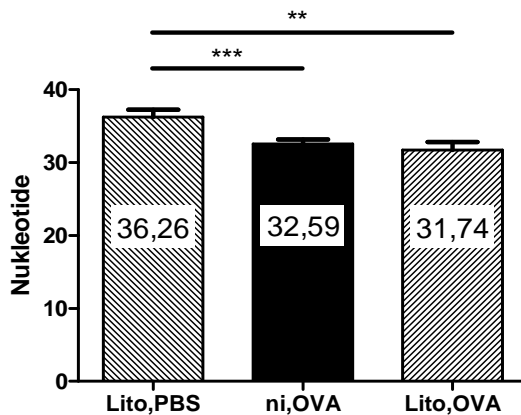


Abb. 28: CDR-H3-Länge

Lito,OVA-Sequenzen unterschieden sich in ihrer durchschnittlichen CDR-H3-Länge nicht signifikant von ni,OVA-Sequenzen ($p=0,34$). Sequenzen von nicht sensibilisierten Lito-Tieren hingegen hatten signifikant längere CDR-H3-Regionen in ihrem Antikörperrepertoire (vs. ni,OVA: $p = 0,0004$; vs. Lito,OVA: $p = 0,0028$).

Ergebnisse

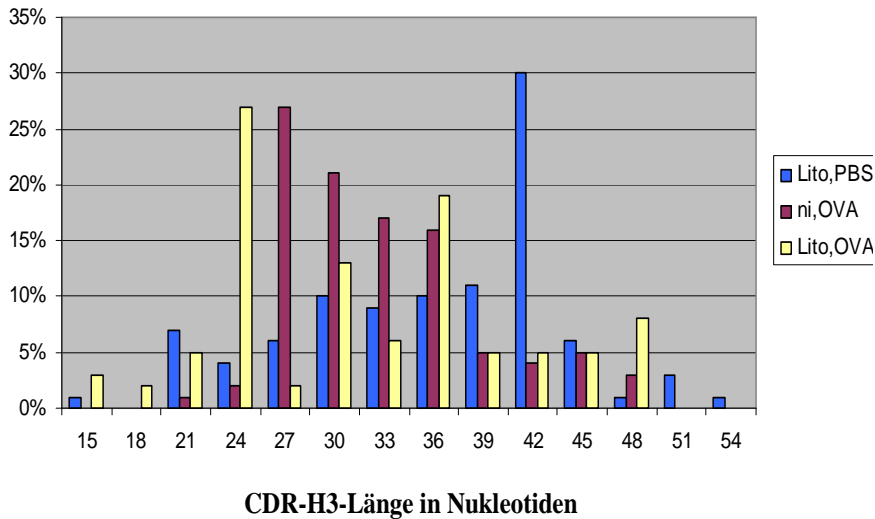


Abb. 29: CDR-H3-Längen-Verteilungsmuster

Lito,PBS- und Lito,OVA-Tiere zeigten keine signifikant verstärkte Nutzung einer bestimmten CDR-H3-Länge im direkten Vergleich. Lito,OVA-Tiere zeigten verglichen mit ni,OVA-Tieren einen signifikant stärkeren Einbau einer CDR-H3-Länge von 24 Nukleotiden ($p < 0,01$). Lito,PBS-Sequenzen hatten häufiger eine CDR-H3-Länge von 42 Nukleotiden zu verzeichnen als ni,OVA-Sequenzen ($p < 0,05$).

3.5.5 CDR-H3-Aminosäurefrequenz

Bei der Analyse der relativen Aminosäurefrequenz in der CDR-H3-Region zeigte sich, dass in allen Untersuchungsgruppen primär neutrale Aminosäuren eingebaut wurden (Lito,OVA 67%, Lito,PBS 63%, ni,OVA 48%). Die neutralen Aminosäuren Tyrosin und Glycin waren bei allen Untersuchungsgruppen überrepräsentiert (**Abb. 30**). Ein signifikant verstärkter Einbau einer bestimmten Aminosäure konnte nur für die neutralen Aminosäuren Tyrosin und Prolin bei Lito,PBS-Tieren nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Weitere Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Ergebnisse

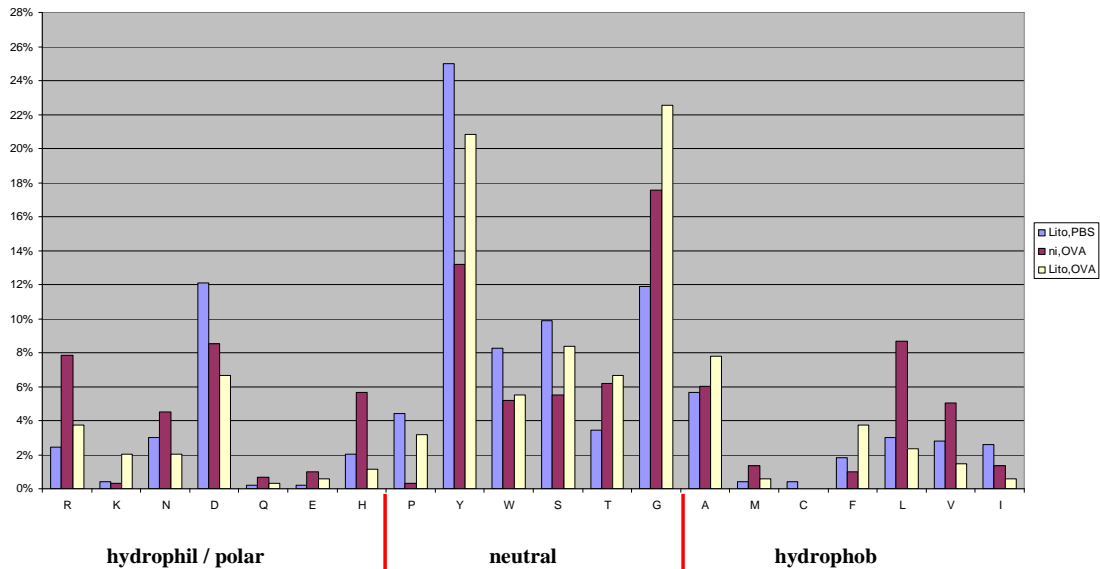


Abb. 30: Aminosäurefrequenz in CDR-H3 (relative Häufigkeiten)

Identifizierung der Aminosäuren gemäß dem Einbuchstaben-Code in steigender Hydrophobizität von links nach rechts. In allen Untersuchungsgruppen wurden primär neutrale Aminosäuren eingebaut.

3.5.6 CDR-H3-Hydrophobizität nach Kyte und Doolittle

Die Hydrophobizität der CDR-H3-Bindungsstelle wurde mithilfe des normalisierten Kyte-Doolittle-Index charakterisiert. Der durchschnittliche Kyte-Doolittle-Index unterschied sich nicht signifikant zwischen den Untersuchungsgruppen (Lito,OVA: -0,04, ni,OVA: -0,05, Lito,PBS: -0,13) (**Abb. 31**).

Betrachtete man allerdings die Verteilungen der Indices, so zeigte sich, dass ein nicht unbedeutender Teil der Lito,OVA-Sequenzen nach Kyte und Doolittle für hydrophobe CDR-H3-Schleifen kodierte ($> 0,600$). In 8,34% der Lito-Sequenzen wurde dieser Definition entsprochen. Lito,PBS-Sequenzen kamen immerhin noch auf einen Anteil von 2,9%. ni,OVA-Sequenzen hingegen kodierten gar nicht für hydrophobe CDR-H3-Schleifen. Lito,OVA- und Lito,PBS-Sequenzen kodierten zudem in sehr geringem Maße für geladene CDR-H3-Schleifen ($< -0,700$) (Lito,OVA: 1,67%; Lito,PBS: 1,45%). Bei nicht infizierten Tieren war dies nicht der Fall.

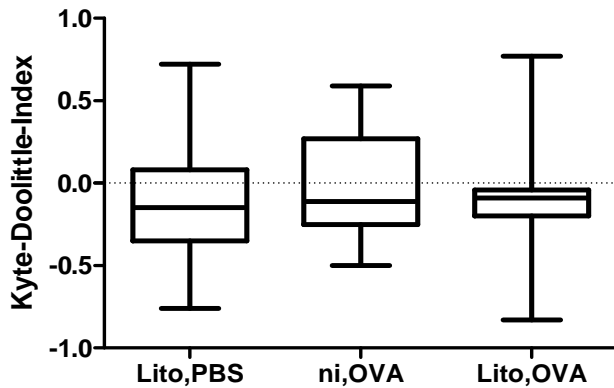


Abb. 31 Durchschnittlicher Kyte-Doolittle-Index

Die durchschnittliche Hydrophobizität unterschied sich nicht signifikant zwischen Lito,OVA- und ni,OVA-Sequenzen: Lito, OVA vs. ni,OVA $-0,05$, $p = 0,52$; Lito,PBS vs. ni,OVA, $p = 0,06$; Lito,PBS vs. Lito,OVA $p = 0,15$.

3.5.7 CDR-H3-Struktur nach Shirai

Entsprechend den Regeln von Shirai et al. war eine Strukturvorhersage für die CDR-H3-Basis möglich (Shirai et al., 1999; Kuroda et al., 2008). Die Vorhersage ergab für alle Untersuchungsgruppen eine Präferenz für gebogene („*kinked*“: *k*), weniger für geknickte („*extra-kinked*“: *k+*) oder gestreckte („*extended*“: *E*) Basis-Strukturen. Bei Lito,OVA-Sequenzen war jedoch der Anteil an gestreckten Basis-Strukturen deutlich erhöht (32,26% vs. 1,96% bei ni,OVA; $p < 0,001$). Weitere Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (**Abb. 32**).

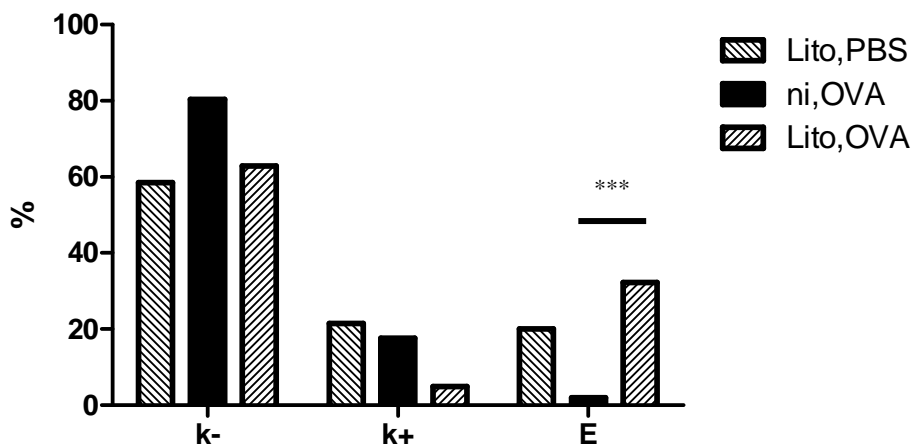


Abb. 32: CDR-H3-Struktur nach Shirai

CDR-H3-Basis gebogen („*kinked*“: *k*-), geknickt („*extra-kinked*“: *k+*), gestreckt („*extended*“: *E*). Lito,OVA-Tiere zeigten einen signifikant erhöhten Anteil von gestreckten CDR-H3-Basisstrukturen im Vergleich zu nicht infizierten Tieren ($p < 0,001$).

Ergebnisse

Unterschiede in Anteilen an deformierten Haarnadelstrukturen und intakten Wasserstoff-Bindungsleitern waren statistisch nicht signifikant (**Abb. 33A und Abb. 33B**).

A) Deformierte Haarnadelstrukturen B) Intakte Wasserstoff-Bindungsleiter

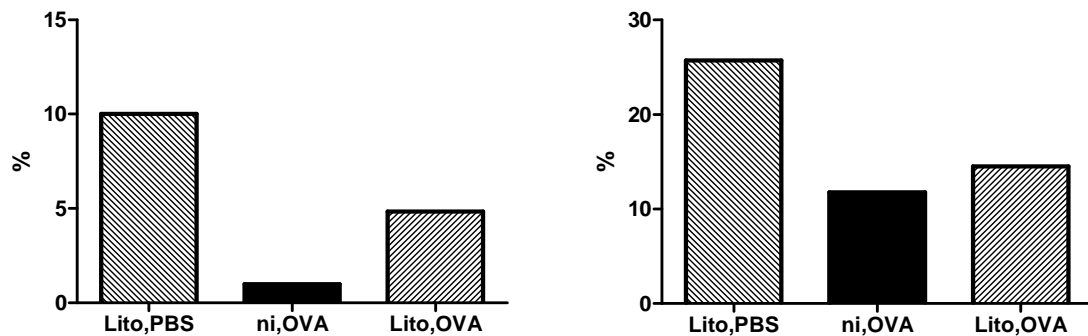


Abb. 33: CDR-H3-Struktur nach Shirai

A) und B) Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in Anteilen deformierter Haarnadelstrukturen und intakter Wasserstoff-Bindungsleitern.

3.5.8 CDR-H3-Variabilität nach Shannon und Kabat und Wu

Es erfolgte ein Vergleich von CDR-H3, die sieben bis 16 Aminosäuren lang waren (**siehe Anhang**). Dies entspricht dem gesamten CDR-H3-Längen-Repertoire von ni,OVA-Sequenzen und ist ein Ausschnitt aus dem größeren Längen-Repertoire von Lito-Tieren (s.o.). Die höchste Variabilität an gegebener Stelle wurde mithilfe einer Rangfolge (Rang eins bis drei, Daten nicht abgebildet) für jede einzelne CDR-H3-Länge, die sich aus den einzelnen Shannon-Entropien ergab, bewertet. Diese Ergebnisse wurden zu einer gesamten Rangfolge zusammengefasst ((Rang X bei gegebener CDR-H3-Länge) / Anzahl der zu bewertenden CDR-H3-Längen).

Es zeigten sich im direkten Vergleich der Lito-Gruppen keine signifikant veränderten Shannon-Entropien. Beide Lito-Gruppen wiesen jedoch erhöhte Shannon-Entropien auf verglichen mit ni,OVA-Tieren (Lito,PBS vs. ni,OVA: $p < 0,01$; Lito,OVA vs. ni,OVA: $p < 0,05$).

3.5.9 Somatische Mutationsrate

Sequenzen von Lito-infizierten Tieren zeigten nach OVA-Sensibilisierung eine signifikant höhere Mutationsrate in CDR-H1 bis FR-H3 als Sequenzen nicht infizierter

Ergebnisse

Tiere (38,48 Mutationen / 1000 Nukleotide vs. 27,34 Mutationen /1000 Nukleotide, $p < 0,01$) (**Abb. 34**). Sequenzen der Lito,PBS-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant von der Lito,OVA-Gruppe (42,59 Mutationen / 1000 Nukleotide, $p = 0,38$).

Die Fehlerrate der Taq-Polymerase betrug 3,09 Nukleotide (nt) pro 1000 nt bei Lito,OVA-Tieren, 2,78 nt pro 1000 nt bei ni,OVA-Tieren und 0,7 nt pro 1000 nt bei Lito,PBS-Tieren.

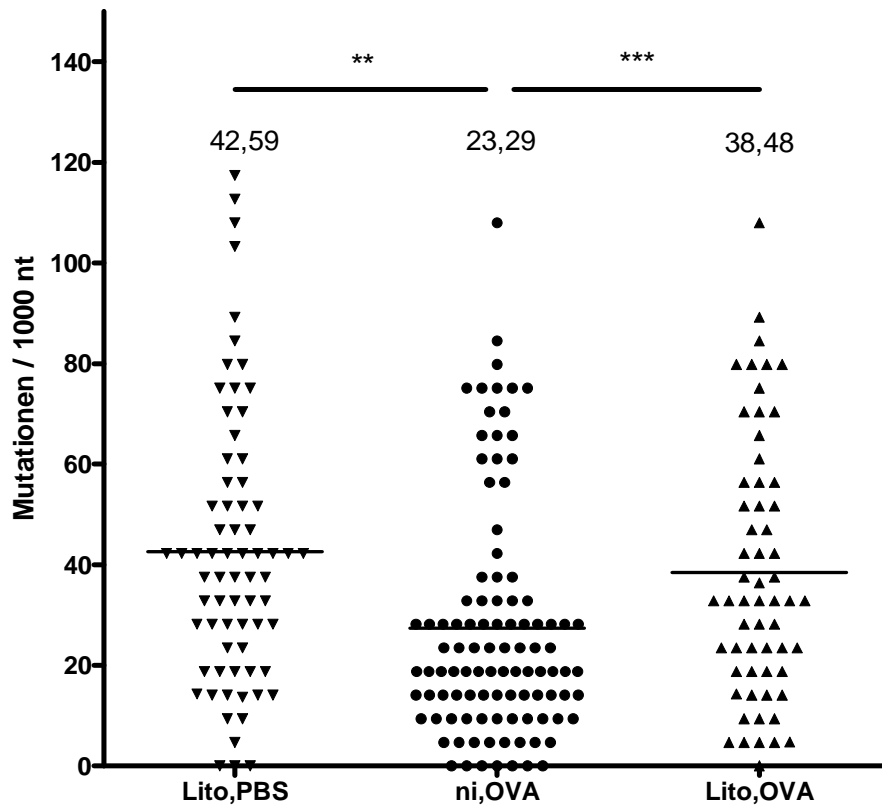


Abb. 34: Somatische Mutationsrate (CDR1-FR3)

Lito-infizierte Tiere zeigten im murinen Asthmamodell signifikant erhöhte somatische Mutationsraten verglichen mit nicht infizierten Tieren (Lito,PBS vs. ni,OVA, $p < 0,01$; Lito,OVA vs. ni,OVA $p < 0,0001$) Balken repräsentieren den Mittelwert, der zusätzlich als Zahl angegeben ist.

3.5.10 Antigenselektion

Mit der vorgegebenen Definition (siehe 2.5.7) zeigte sich, dass bei Lito,OVA-Tieren 11,29% der IgE-Sequenzen unter Antigenselektion entstanden waren. Bei Lito,PBS-Sequenzen entstanden 8,57% der Sequenzen unter Antigenselektion. ni,OVA-Tiere hingegen zeigten in 5,88% der Fälle einen Antigen-Selektionsdruck (**Abb. 35**). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

Ergebnisse

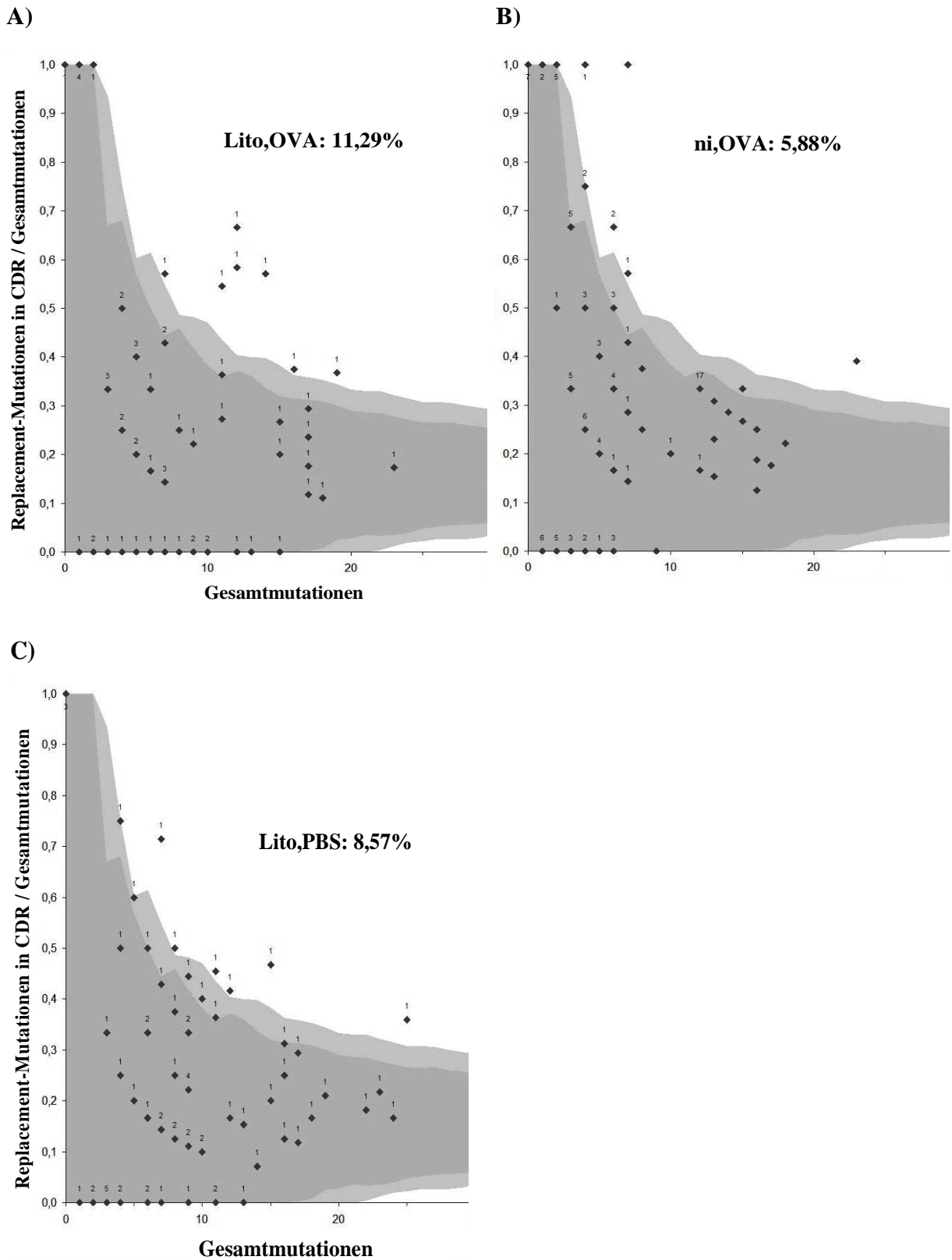


Abb. 35: Antigen Selektion

Antigen-selektierte Sequenzen, statistisch ermittelt mithilfe der Methoden von Chang und Casali (Chang and Casali, 1994) und Lossos (Lossos et al., 2000). Die hellgrauen Bereiche repräsentieren das 95%-Konfidenzintervall, die dunkelgrauen Bereiche das 90%-Konfidenzintervall. Jenseits dieser Bereiche (weiße Fläche) gelten Sequenzen als Antigen-selektiert. Die Nummern an den Datenpunkten zeigen die Anzahl der Sequenzen, die dieser Datenpunkt repräsentiert.

3.5.11 Klonotypische Diversität

Die klonotypische Diversität der Untersuchungsgruppen kann Tabelle 8 entnommen werden. Die klonotypische Diversität von Lito,PBS-Sequenzen war signifikant gegenüber der von ni,OVA-Tieren erhöht (Lito,PBS 68% vs. ni,OVA 53%, $p < 0,001$). Die klonotypische Diversität von Lito,OVA-Tieren war gegenüber ni,OVA-Tieren nicht signifikant erhöht (Lito,OVA 53% vs. ni,OVA 42%, $p = 0,26$). Zwischen Lito,PBS-Sequenzen und Lito,OVA Sequenzen bestand kein Unterschied ($p = 0,25$).

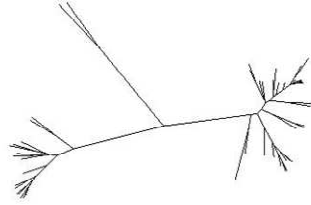
Tab. 8: Gewonnene Sequenzen und klonotypische Diversität.

	Lito,PBS	ni,OVA	Lito,OVA
Anzahl Tiere	2	3	2
Anzahl Sequenzen	73	136	85
- davon funktionell	71	126	81
- davon einmalig	70	102	62
- Anzahl Klonotypen	48	53	43
Klonotypische Diversität (Klonotypen / funktionelle Sequenzen):	68%	42%	53%

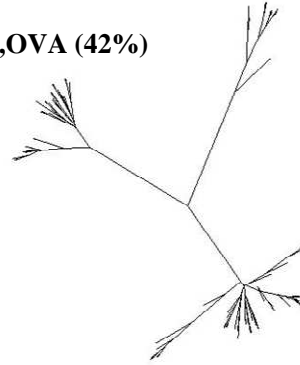
Die klonale Expansion ist in **Abbildung 36** mithilfe von phylogenetischen Bäumen graphisch dargestellt. Die Untersuchungsgruppen waren durch ähnliche klonale Expansionsmuster charakterisiert. Als Referenz dienten die Sequenzen von IgM-Plasmazellen (189 Sequenzen, 94% klonale Diversität, (Rogosch et al., 2010).

Ergebnisse

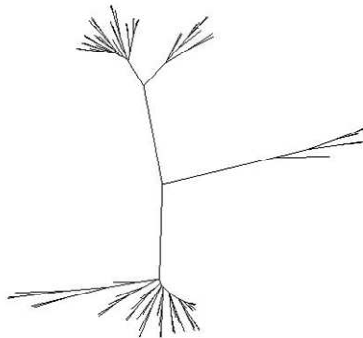
A) Lito,PBS (68%)



B) ni,OVA (42%)



C) Lito,OVA (53%)



D) IgM (94%)

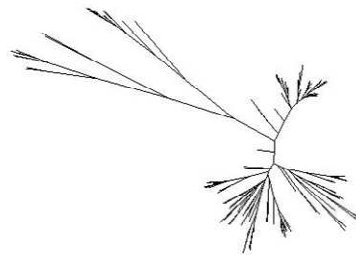


Abb. 36: Phylogenetische Bäume

Die IgE-Transkripte der drei Untersuchungsgruppen zeigen ein ähnliches klonales Expansionsmuster. Als Referenz diente IgM mit einer sehr stark polyklonalen Expansion (94% klonale Diversität).

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die gewonnenen Erkenntnisse über eine Infektion mit *L. sigmodontis* in dem verwendeten murinen Asthmodell lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Infektion verhinderte einen für die allergische Atemwegsentszündung typischen Influx an eosinophilen Granulozyten in der Lunge verglichen mit nicht infizierten Tieren..

Die Infektion bewirkte eine starke humorale Immunantwort des Wirts. Bereits vor Versuchsbeginn zeigten Lito-Tiere stark erhöhte IgM-, IgG₁- und IgE-Serumkonzentrationen verglichen mit nicht infizierten Tieren.

Die Infektion modifizierte die allergische Sensibilisierung des Wirts. Bei nicht infizierten Tieren bewirkte eine Sensibilisierung und Provokation mit dem Allergen OVA eine starke humorale Immunantwort. Wurden hingegen infizierte Tiere mit OVA sensibilisiert, so führte dies zu keiner weiteren Induktion einer IgE-Antwort. Der Prozess der allergischen Sensibilisierung wurde durch die Helminthen-Infektion größtenteils „überschattet“. Zwar wurden auch bei infizierten Tieren OVA-spezifische IgE-Antikörper gebildet – sogar mehr als bei nicht infizierten Tieren - jedoch in zu geringem Maße, um die Gesamt-IgE-Konzentration signifikant zu verändern. Anders verhielt es sich mit IgG₁-Antikörpern. Hohe Gesamt-IgG₁-Konzentrationen waren sowohl mit einer Helminthen-Infektion assoziiert als auch mit einer allergischen Sensibilisierung auf OVA bei nicht infizierten Tieren. Wurden jedoch Lito-Tiere sensibilisiert, erhöhten sich die Gesamt-IgG₁-Konzentrationen signifikant durch Bildung OVA-spezifischer IgG₁-Antikörper.

Weniger Plasmazellen und mehr Gedächtniszellen in der Milz infizierter Tiere. Bei der FACS-Analyse zeigten sich bei infizierten Tieren weniger Plasmazellen in der Milz.

*Das murine IgE-Antikörperrepertoire wurde durch eine Infektion mit *L. sigmodontis* modifiziert.* In Sequenzen von infizierten Tieren wurden erhöhte somatische

Mutationsraten nachgewiesen. Die CDR-H3 wurde signifikant verändert. Lito,PBS-Tiere hatten längere CDR-H3 als ni,OVA und als Lito,OVA. ni,OVA-Gruppen und Lito,OVA-Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in der Länge der CDR-H3-Sequenzen. Eine Infektion führte auch zu einer größeren Anzahl genutzter CDR-H3-Längen. Die CDR-H3-Komposition änderte sich durch die Bildung kürzerer V-Segmente, den Einbau weniger P-Nukleotide zwischen dem V- und dem D-Segment und den vermehrten Einbau von N-Nukleotiden zwischen D- und J-Segment.

Die CDR-H3 war bei Lito,PBS-Tieren durch einen verstärkten Einbau von Tyrosin und Prolin charakterisiert; die Aminosäure-Variabilität der CDR-H3 war nach Shannon und Kabat-Wu bei den Lito-Gruppen erhöht, verglichen mit nicht infizierten Tieren, zudem konnten bei Lito,OVA-Tieren mehr gestreckte CDR-H3-Basis-Strukturen nachgewiesen werden als bei ni,OVA-Tieren.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den IgE-Repertoires hinsichtlich Diversität, klonalem Expansionsmuster, Antigen-Selektion, Hydrophobizität der CDR-H3 nach Kyte-Doolittle, der Leseraster-Präferenz und der V_H-,D- und J_H-Genfamilien-Nutzung.

4.2 Kritische Betrachtung des Tiermodells

4.2.1 Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsentzündung

Zahlreiche Mausmodelle der akuten allergischen Atemwegsentzündung wurden in den vergangenen Jahren etabliert, erfordern aber eine kritische Betrachtung. Mäuse entwickeln natürlicherweise kein allergisches Asthma bronchiale. Dennoch kann experimentell durch Sensibilisierung auf ein Allergen und anschließende inhalative Provokation ein Asthma-ähnlicher Phänotyp hervorgerufen werden, der mit eosinophiler Atemwegsentzündung, Atemwegshyperreaktivität, Schleimhypersekretion in den Atemwegen, *airway remodelling* und hohen systemischen IgE-Konzentrationen einhergeht (Epstein, 2004). Eine Übertragung der im Mausmodell gewonnenen Daten auf den Menschen gelingt nicht immer. So muss beachtet werden, dass es sich beim allergischen Asthma bronchiale um eine chronische Krankheit handelt, die durch Modelle der akuten allergischen Atemwegsentzündung nur bedingt simuliert werden kann. Bewährt haben sich etablierte Modelle bei der Untersuchung von beteiligten Zelltypen und Entzündungsmediatoren (Nials und Uddin, 2008). Das Modell-Allergen

Ovalbumin ist zwar klinisch als Inhalationsallergen irrelevant, induziert aber in BALB/c-Mäusen zuverlässig eine T_H2-Antwort und oben genannte Charakteristika des allergischen Asthma bronchiale. Insgesamt lässt sich sagen, dass Mausmodelle der akuten allergischen Atemwegsentzündung zwar Schwächen bei einer Übertragung auf das chronische Asthma bronchiale beim Menschen haben, aber als Modelle etabliert sind, um grundlegende Immunpathomechanismen zu entschlüsseln. Nichtsdestotrotz kann ein Mausmodell nur beispielhaft grundlegende Aspekte der komplexen und chronischen Krankheit Asthma bronchiale beleuchten (Nials und Uddin, 2008)

Bei der kritischen Interpretation der Ergebnisse der Sequenzierung von IgE-mRNA-Transkripten zeigt sich, dass die Genkomposition der betroffenen Gensegmente zwischen Mensch und Maus im Allgemeinen sehr ähnlich aufgebaut ist. Auch die Mechanismen der Antikörper-Diversifizierung gleichen sich im Prinzip. Im Detail zeigen sich jedoch leichte Unterschiede (Schroeder 2006). So unterscheiden sich z.B. die Anzahl der an der Diversifizierung beteiligten Gene oder die CDR-H3-Längen-Distribution und -komposition zwischen Mensch und Maus. In zunehmendem Alter nehmen die Unterschiede zu. Bei Mensch und Maus wird die Diversität des B-Zell-Repertoires in der Ontogenese reguliert und ist kein reines Zufallsprodukt von Gen-Rearrangements (Schroeder 2006, Zemlin 2003).

4.2.2 Das kombinierte Mausmodell von Helminthen-Infektion und Asthma bronchiale

In 1.3.2 wurde die Induktion eines antiinflammatorischen und antiallergischen Netzwerks durch Helminthen beschrieben. Es kommt jedoch nicht in jedem Fall zur Ausbildung eines solchen Netzwerks. In bestimmten Fällen können Helminthen eine starke Immunreaktion mit Ausbildung eines inflammatorischen und den Wirt schädigenden Phänotyps induzieren. Damit dies nicht passiert und das antiallergische Potential von Helminthen in der Mensch-Helminthen-Beziehung zum Tragen kommt, sind folgende essentielle Faktoren von Bedeutung (vgl. 1.3.2, Smits et al., 2010):

1. Zeitpunkt der ersten Infektion (frühe Kindheit)
2. Dauer (langanhaltende, chronische Infektion)
3. Intensität der Infektion (ausreichende Wurmlast)

4. Genetik des Wirts (Nicht-Atopiker)

5. Helminthenspezies

Im Folgenden wird diskutiert, in wie weit diese Faktoren im verwendeten Modell berücksichtigt wurden.

Beginn, Dauer und Intensität der Infektion: Die Versuchstiere wurden im Alter von sechs Wochen mit dem Helminthen *L. sigmodontis* auf natürliche Weise durch den Stich des Vektors (tropische Ratenmilbe) infiziert. Nach weiteren 60 Tagen wurde mit dem Versuch begonnen. Der Zeitpunkt der Infektion lag also deutlich vor Beginn des Versuchs. Durch das zweimonatige Zuwarten nach Infektion konnte eine chronische Infektion unterstellt werden (siehe 1.3.4) (**Abb. 6**). Zu diesem Zeitpunkt sollte also eine systemische, chronische Infektion mit adulten Würmern in der Pleura, sowie L1-Larven (Mikrofilarien) im Blutkreislauf vorliegen. Der Infektionsstatus wurde zu Ende des Versuchs anhand von mikroskopischen und makroskopischen Methoden verifiziert. Eine systemische Infektion konnte bei allen Tieren sicher nachgewiesen werden.

Helminthenspezies und Wirt: BALB/c-Mäuse stellen einen Surrogat-Wirt für *L. sigmodontis* dar. Der natürliche Wirt ist die Baumwollratte (*S. hispidus*). Der Entwicklungszyklus des Nematoden lässt sich jedoch verlässlich in Labortieren nachvollziehen (Hübner et al., 2009). Aus evolutionsbiologischer Sichtweise zeigt das Verhältnis zwischen *L. sigmodontis* und seinem murinen Wirt und das Verhältnis zwischen humanpathogenen Helminthen und Mensch deutliche Parallelen. Es hat sich wahrscheinlich über ähnliche Zeiträume entwickelt und bietet sich somit für die Forschung an. Zudem zeigt der Nematode hohe strukturelle Ähnlichkeiten mit humanpathogenen Helminthen, was eine mögliche Übertragbarkeit des murinen Modells auf den Menschen erleichtert (Hoffmann et al., 2000). Des Weiteren zeigte *L. sigmodontis* in vorherigen Studien das Potential zur Induktion eines regulatorischen antiinflammatorischen Netzwerks (Taylor et al., 2005; Dittrich et al., 2008) und nicht etwa zur Exazerbation eines experimentellen Asthmas wie sie in anderen Helminthen-Modellen u.a. mit *Toxocara canis* nachgewiesen wurde (Pinelli et al., 2008).

Bei kritischer Betrachtung des Modells muss ebenfalls der Aspekt des Infektionsweges berücksichtigt werden. Es gibt verschiedene Methoden um Mäuse mit Helminthen zu

Diskussion

infizieren. Dittrich et al. wählten die Implantation von adulten Würmern in die Peritonealhöhle (*L. sigmodontis*), Hübner et al. und Taylor et al. die subcutane Injektion von L3-Larven (*L. sigmodontis*). Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode entspricht dem natürlichen Infektionsweg bei der Maus (s.o.). Bei der Implantation von adulten Würmern ist das Stadium der infektiösen L3-Larve im infizierten Organismus nicht aufzufinden. Natürlicherweise durchwandern L3-Larven Gewebe und Lymphsystem bis in die Pleurahöhle. Diese „Gewebedurchseuchung“ fällt in den genannten Modellen weg. Inwieweit bei der Injektion von L3-Larven ggf. nur bestimmte Lymphbahnen und Gewebe durchseucht werden, ist fraglich. Jedoch kann bei den Implantations- und Injektionsverfahren in jedem Fall eine vorher definierte Menge von Infektionsmaterial appliziert werden. Bei der natürlichen Infektion ist die Anzahl der durch Milbenstich applizierten L3-Larven nicht genau zu verifizieren und könnte von Tier zu Tier variieren. Auf den ersten Blick mag dies als nachteilig gewertet werden. Die hier verwendete Methode ist der kontrollierten subkutanen Applikation jedoch zumindest gleichwertig und führte trotz möglicher Schwankungen der initialen L3-Larven-Last zu einem Schutz vor allergischer Atemwegsentzündung. Außerdem dürfte eine Variation der Wurmlast bei Versuchstieren eher der Übertragbarkeit des Modells auf den Menschen zuträglich sein. Prinzipiell ist die Übertragbarkeit des verwendeten kombinierten Mausmodells auf den Menschen begrenzt (s.o.). Es stellt jedoch eine sinnvolle Ergänzung zu klinischen Studien dar, um in einem überschaubaren, weitgehend kontrollierten Versuchsaufbau das antiallergische Potential von Helminthen-Infektionen zu untersuchen.

In Industrieländern gestaltet sich die erfolgreiche Rekrutierung geeigneter Probanden mit einer Helminthen-Infektion und klinischem Asthma bronchiale als schwierig. Epidemiologische Studien zeigen, dass in Entwicklungsländern mit einer entsprechenden Helminthen-Durchseuchung eine inverse Relation zwischen Helminthen-Infektion und allergischen Erkrankungen besteht (vgl. 1.1). Somit ist es in diesen Ländern schwieriger Patienten mit allergischen Erkrankungen für Studien zu rekrutieren. Die rein deskriptive Beschreibung durch ökologische Studien, die den Zusammenhang zwischen Helminthen-Infektionen und allergischen Erkrankungen untersuchen, wird durch eine Vielzahl von Störfaktoren beeinflusst, welche unter Laborbedingungen nicht zum Tragen kommen (u. a. Parallel-Infektionen mit Bakterien, Viren und Parasiten; Mangelernährung; Impfungen; Antibiotika).

4.3 Eine Helminthen-Infektion schützt vor allergischer Atemwegsentzündung

Charakteristisch für die akute allergische Atemwegsentzündung ist ein massiver Influx von eosinophilen Granulozyten in das Lungengewebe. Dieses Phänomen blieb bei infizierten Tieren fast vollständig aus. Daraus lässt sich schließen, dass eine Infektion mit *L. sigmodontis* die allergische Atemwegsentzündung im verwendeten akuten Asthma-Modell signifikant unterdrückte. Dabei ging die Infektion an sich schon mit erhöhten Lymphozytenzahlen in der BALF einher. Dies suggeriert, dass eine Helminthen-Infektion keineswegs nur mit unspezifischer lokaler Immunsuppression gleichzusetzen ist, sondern vielmehr eine lokale Immunmodulation beinhaltet. Trotzdem wurde eine durch OVA-Sensibilisierung hervorgerufene signifikante Erhöhung der Lymphozytenzahlen durch die Infektion verhindert. Die gewonnenen Ergebnisse sind kohärent mit verschiedenen Studien, die in den letzten Jahren mit murinen Helminthen-Asthmamodellen durchgeführt wurden (vgl. 1.3.3). Neu ist in diesem Zusammenhang das verwendete Infektionsprotokoll mit *L. sigmodontis*, welches ebenso, wie die vorherigen Methoden (s.o.) zuverlässig im Asthmamodell schützte. Insgesamt stützen diese Ergebnisse die in der erweiterten Hygiene-Hypothese diskutierten Überlegungen zum mechanistischen Zusammenhang.

4.4 Eine Helminthen-Infektion „konkurrierte“ mit der allergischen Sensibilisierung

Die natürliche Infektion mit *L. sigmodontis* zeigte sich als ein hochpotenter Induktor einer T_H2-Immunantwort in den Wirtstieren. Die Antikörperkonzentrationen fast aller Klassen lagen deutlich über denen von nicht infizierten Tieren. Erst eine OVA-Sensibilisierung und –Provokation löste bei ni,OVA-Tieren eine ähnlich starke Antikörperproduktion aus. Diese unterschied sich jedoch in ihrem Charakter immer noch deutlich von den Lito-Tieren. Bei Lito,PBS-Tieren konnte man weiterhin die Immunantwort des Wirts auf den Parasiten verfolgen, während bei Lito,OVA-Tieren nun zwei Prozesse parallel abliefen und miteinander um die Immunantwort

konkurrierten: Zum einen das Infektionsgeschehen, zum anderen die allergische Sensibilisierung.

4.4.1 Trotz ausgeprägter humoraler Immunantwort: Wenig Plasmazellen in der Milz

Die Analyse von Plasmazellen und *Nicht-Plasmazellen* (Gedächtniszellen) in der Milz zeigte, dass beide Zelltypen in allen Untersuchungsgruppen nachweisbar waren. Bei Lito-infizierten Tieren zeigten sich nur sehr geringe Anteile von Plasmazellen an allen gemessenen Lymphozyten in der Milz ($< 1\%$). ni,OVA-Tiere hingegen zeigten signifikant mehr Plasmazellen in der Milz und kamen auf einen Anteil von 5%. Sowohl ni,OVA-Tiere, als auch die Lito-Gruppen zeigten im Serum jedoch eine ausgeprägte humorale Immunantwort. Bei Lito-infizierten Tieren befanden sich die Antikörper produzierenden Plasmazellen möglicherweise vermehrt in anderen Organen. Denkbar wäre eine vermehrte lokale - dem Infektionsgeschehen nahe - Antikörperproduktion (z.B. Pleuraraum, Lymphgewebe). Um diese Frage zu klären, sind weitere Versuche notwendig.

Gedächtniszellen wurden bei einer Helminthen-Infektion gebildet und waren in Splenozyten infizierter Tiere nachweisbar. Eine Infektion mit *L. sigmodontis* scheint somit die Bildung von Gedächtniszellen in der Milz in ähnlichem Maße anzuregen, wie eine Allergen-Sensibilisierung. Eine mögliche Aufgabe der Gedächtniszellen wäre die Produktion von Helminthen-spezifischen Antikörpern, wie sie Mitre und Nutman Jahre nach eradizierter Infektion mit *Brugia malayi* nachgewiesen haben (Mitre and Nutman, 2006).

4.4.2 Die Helminthen-Infektion führte zu einer dauerhaften IgM-Produktion

Die Produktion von polyklonalen IgM-Antikörpern mit niedriger Affinität und Spezifität sind Ausdruck der unspezifischen primären Immunantwort. In der Regel folgt ein Klassenwechsel hin zu anderen Antikörperklassen. Bei den meisten Infektionskrankheiten sind hohe IgM-Konzentrationen ein Marker für frühe Infektionsstadien. Im verwendeten Modell zeigten infizierte Tiere noch hohe IgM-Konzentrationen im chronischen Stadium (60 Tage p. i.), die sich bis Versuchsende 90 Tage p. i. nicht signifikant veränderten. Es spielte hierbei keine Rolle, ob die infizierten

Tiere mit OVA sensibilisiert worden waren oder nicht. Demnach scheint die Infektion mit *L. sigmodontis* zu einer anhaltenden Stimulierung der unspezifischen Immunantwort mit Produktion von niedrigaffinen IgM-Antikörpern zu führen. Möglicherweise ist dieses Phänomen Ausdruck einer Defizienz des Wirts, eine spezifischere und effektivere Immunantwort durch Klassenwechsel herbeizuführen. Die Verhinderung des Klassenwechsels könnte jedoch auch einen weiteren evolutionären aktiven Schutzmechanismus von Helminthen gegenüber dem Menschen (und der Maus) darstellen. Auch eine wechselnde Expression von *L. sigmodontis*-Antigenen durch immer neue Produktion und Wachstum von Mikrofilarien und Würmern könnte die dauerhaft erhöhte IgM-Konzentration erklären. Auf der anderen Seite kommt auch der unspezifischen IgM-Antwort eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Infektion und dem Schutz vor Exazerbation zu (Ehrenstein und Notley, 2010). So führte eine IgM-Defizienz in einem *Brugia phalangi*-Modell zu einer erhöhten Parasitämie (Rajan et al., 2005). Auch in einem *Trypanosoma evansi*-Modell zeigten sich Überlebensraten des Wirts und Kontrolle der Parasitämie nach Infektion als kritisch abhängig von der IgM-Antwort (Baral et al., 2007). In einem *Trypanosoma brucei*-Modell andererseits wurde dem IgM-Antikörper nur eine limitierte Rolle in der Kontrolle der Parasitämie zugewiesen (Magez et al., 2008). Der Stellenwert von IgM-Antwort und Klassenwechsel hin zu anderen höher-affinen Antikörperklassen könnte somit auch von der Helminthenspezies abhängig sein.

4.4.3 Die *IgG₁*-Blocking-Hypothese zeigte sich in dem hier verwendeten Modell nicht

Die Rolle von humanem IgG₄ bzw. murinem IgG₁ im Rahmen von Helminthen-Infektionen und Asthma bronchiale ist nicht eindeutig geklärt. In einem *L. sigmodontis*-Asthma-Mausmodell wurde von Dittrich et al. erhöhte IgG₁- und OVA-spezifische IgG₁-Konzentrationen nachgewiesen (Dittrich et al., 2008). In einem *H. polygyrus*-Mausmodell einer enterischen Helminthen-Infektion wurde gezeigt, dass IgG₁ die Infektion limitierte (McCoy et al., 2008). Andererseits scheint IgG₄ beim Menschen Mikrofilarien und adulte Würmer zu opsonieren und sie dadurch vor der Abtötung durch das Immunsystem zu schützen (Adjobimey und Hoerauf 2010). Anscheinend werden durch die Opsonierung Abwehrmechanismen ausgelöst, die stark genug sind, die Infektion zu limitieren, die Helminthen jedoch auch vor einer effektiveren

Diskussion

Immunantwort, z.B. durch Helminthen-spezifisches IgE, das zu einer Mastzell-Degranulation führt, zu schützen (Adjobimey und Hoerauf, 2010). Als stärkste Induktoren von IgG₄ gelten Mikrofilarien (Adjobimey und Hoerauf, 2010).

Im hier verwendeten Helminthen-Mausmodell zeigte sich *L. sigmodontis* als starker Induktor einer IgG₁-Antwort. Die Gesamt-IgG₁-Konzentrationen blieben bei Lito,PBS-Tieren auf konstant hohem Niveau, während sie bei Lito,OVA-Tieren signifikant anstiegen. Es zeigte sich, dass dieser Anstieg durch die Produktion von OVA-spezifischem IgG₁ (OVA-IgG₁) bedingt war. Nahezu die gesamte IgG₁-Antwort bei Lito,OVA-Tieren bestand nach Sensibilisierung aus OVA-IgG₁. Auch bei nicht infizierten Tieren führte eine OVA-Sensibilisierung analog zu einer starken OVA-IgG₁-Produktion. Während also IgG₁-Antikörper bei Lito-Tieren vor Sensibilisierung ausschließlich durch den Parasiten induziert waren, so zeigte sich nach der Sensibilisierung ein völlig anderes Bild. Sämtliches IgG₁ war nun gegen das Allergen gerichtet. Diese Ergebnisse lassen verschiedene Überlegungen zu:

Die IgG₁-Blocking-Hypothese postuliert, dass IgG₁-Antikörper - z.B. induziert durch eine Helminthen-Infektion - durch Kreuz-Reaktionen mit Allergen-spezifischem IgE und durch Konkurrenz mit Allergen-spezifischem IgE um den FcεRI auf Mastzellen und basophilen Granulozyten allergische Effektormechanismen verhindert (Carvalho et al., 2006).

Die Versuchsergebnisse legen nahe, dass nach einer OVA-Sensibilisierung auch bei mit Helminthen infizierten Tieren nahezu das gesamte IgG₁ im Serum OVA-spezifisch ist. Somit wäre kein Helminthen-spezifisches oder polyklonales IgG₁ mehr übrig, um an einem IgG₁-Blocking mitzuwirken. Bei vergleichbaren IgG₁-Konzentrationen nach Sensibilisierung waren Lito,OVA-Tiere vor Asthma geschützt, ni,OVA-Tiere hingegen nicht. Mit Helminthen infizierte Tiere scheinen also andere, nicht IgG₁-vermittelte Schutzmechanismen entwickelt zu haben (z.B. eine modifizierte IgE-Antwort mit ausbleibenden Effektormechanismen, vgl. 4.4.4 unten).

Da das Allergen OVA bei Lito,OVA-Tieren zu einer ausschließlichen Bildung von OVA-IgG₁ geführt hat, war zu diesem Zeitpunkt kaum noch Helminthen-spezifisches bzw. polyklonales IgG₁ im Serum vorhanden. Den Ergebnissen von McCoy et al. und Spencer et al. folgend hätte dies theoretisch zu einer Exazerbation der Wurminfektion führen müssen, da diese insbesondere durch die Produktion Helminthen-spezifischer und polyklonaler IgG₁-Antikörper limitiert werde (Spencer et al., 2003; McCoy et al.,

2008). Anzeichen für eine Exazerbation der Infektion waren mit den hier verwendeten Untersuchungsmethoden nicht nachweisbar. Infizierte OVA-sensibilisierte Mäuse zeigten im Beobachtungszeitraum keine erhöhten Sterberaten verglichen mit ni-Tieren und keine erhöhte Wurmlast. Möglicherweise war hierfür aber auch der Beobachtungszeitraum zu kurz und die Fallzahl zu niedrig. Es wäre möglich, dass eine Exazerbation der *L. sigmodontis*-Infektion durch Mangel an Helminthen-spezifischen und polyklonalen IgG₁-Antikörpern zugunsten von OVA-IgG₁ in einem Modell der *chronischen Atemwegsentzündung* zum Tragen käme. Andererseits könnte ein Wegfallen von Helminthen-spezifischem und polyklonalem IgG₁ durch die bereits beschriebene dauerhaft starke IgM-Antwort kompensiert worden sein.

4.4.4 IgE-Blocking-Hypothese: Ein möglicher Schutzmechanismus

Infizierte Tiere zeigten bereits vor Sensibilisierung sehr hohe IgE-Konzentrationen. Diese stiegen zwar nach OVA-Sensibilisierung noch signifikant an, allerdings galt dies analog auch für die Lito,PBS-Gruppe. Der Faktor Zeit schien hier im Rahmen des Infektionsgeschehens die entscheidende Rolle zu spielen. Es handelte sich um den Zeitraum acht bis zwölf Wochen post infectionem. Denkbar wäre die schubweise und möglicherweise in diesem Zeitraum verstärkte Produktion von L1-Larven durch adulte Würmer und die Abgabe der Larven in den Blutkreislauf. L1-Larven gelten als starke Induktoren der IgE- und IgG₁-Antwort bei der Maus (McCoy et al., 2008; Adjobimey und Hoerauf, 2010).

Murine oder humane IgE-Antikörper, die sich gegen Helminthen-Antigene richten, können sowohl polyklonal, als auch Helminthen-spezifisch konfiguriert sein. Bei der Formulierung „Helminthen-spezifisch“ ist allerdings Vorsicht geboten. Man darf dabei nicht von einem einzigen Helminthen-Antigen ausgehen. Die relativ großen Parasiten zeigen meist eine Vielzahl von Oberflächen-Antigenen oder sezernierten als Antigen wirkende Stoffe. Art und Zahl variieren von Spezies zu Spezies (McCoy et al. 2008). Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Studie ni,OVA-Tiere nur mit OVA konfrontiert. Lito,OVA-Tiere wurden mit Helminthen-Antigenen und OVA konfrontiert. Interessanterweise zeigten Lito,OVA-Tiere signifikant höhere OVA-spezifische IgE-Antikörper-Konzentrationen als ni,OVA-Tiere. Dies verwundert allerdings nicht, wenn man bedenkt, dass die Helminthen-Infektion im Wirtsorganismus eine potente, „globale“ T_H2-Antwort auslöst (Yazdanbakhsh 2002). In diesem

Zusammenhang scheint es plausibel, dass auch die Allergen-spezifische B-Zell-Antwort „getriggert“ bzw. verstärkt wurde. Dennoch wurde die allergische Atemwegsentzündung in der Lunge verhindert. Demnach scheint die Höhe von Allergen-spezifischem IgE allein nicht ausschlaggebend für die Entwicklung eines Asthma-Phänotyps zu sein. Möglicherweise werden die Effektormechanismen, die der Produktion von Allergen-spezifischem IgE folgen, durch andere Mechanismen verhindert. Aufgrund der hohen Gesamt-IgE-Konzentration liefert die *IgE-Blocking-Hypothese* hier eine mögliche Erklärung (Carvalho et al., 2006). Es könnten Helminthen-spezifische Antikörper die IgE-Rezeptoren der Effektorzellen blockiert haben.

Andererseits wiesen McCoy et al. nach, dass polyklonales Helminthen-spezifisches IgE und IgG₁ entscheidend zur Limitierung der Infektion beitragen, indem die Eierproduktion und das Wachstum adulter Würmer in einem *Heligomosoides polygyrus*-Modell gehemmt wurden (McCoy et al., 2008). Spencer et al. zeigten zudem in einem *Brugia malayi*-Modell, dass *IgE-Knockout-Mäuse* eine verschlechterte *Wurm-Clearance* während einer Primärinfektion aufwiesen. In einer Sekundärinfektion zeigten infizierte IgE-Knockout-Tiere allerdings schon eine verbesserte Clearance (Spencer et al., 2003).

Man könnte mit der IgE-Antwort somit zwei Aspekte assoziieren: Zum einen erfüllt sie ihre natürliche Rolle, nämlich Schutz des Wirts vor der Exazerbation einer Helminthen-Infektion (bei manchen Helminthen-Arten führt diese Immunantwort womöglich auch zu einer Eradikation des Parasiten); andererseits wird der Helminth- durch eine von ihm herbeigeführte Modulation der IgE-Antwort - mittels IgE-Blocking geschützt.

4.5 Eine Helminthen-Infektion veränderte das IgE-Repertoire

Es ist wenig bekannt über das IgE-Antikörperrepertoire nach Helminthen-Infektion. Erste Arbeiten im *Heligomosoides polygyrus*-Mausmodell deuten auf die Induktion eines Repertoires mit sowohl polyklonalem als auch Helminthen-spezifischem Charakter hin (McCoy et al., 2008). Rogosch et al. wiesen eine erhöhte klonotypische Diversität bei *L. sigmodontis*-infizierten Tieren nach (Rogosch et al., 2010). Wang et al.

untersuchten humane IgE-Transkripte gewonnen aus Blutproben von Probanden aus Papua-Neuguinea, die in einem Endemiegebiet für Parasiten lebten. Eine genaue Differenzierung der Parasiten blieb jedoch aus. Verschiedene Helminthen-Arten, aber auch Malaria sind dort endemisch. Eine Testung auf eine vorhandene Infektion blieb aus. Die IgE-Transkripte der Probanden zeigten eine erhöhte Diversität des IgE-Repertoires und hohe somatische Mutationsraten bei gleichzeitig wenig Anzeichen für Antigenselektion (Wang 2011). Die vorliegende Dissertation beschreibt erstmals das IgE-Antikörperrepertoire Helminthen-infizierter Mäuse. Es war möglich für Lito,PBS-, Lito,OVA- und ni,OVA-Gruppen IgE-Transkripte zu gewinnen. In ni,PBS-Tieren fand sich, durchaus erwartungsgemäß, keine nachweisbare IgE mRNA.

4.5.1 Veränderter Charakter der CDR-H3

In der Tat zeigte sich, dass die CDR-H3 in Lito,PBS-Sequenzen signifikant länger war als bei Lito,OVA- und ni,OVA-Sequenzen. Es ist bekannt, dass bestimmte Typen von Antigenen ein charakteristisches CDR-Längen- und Sequenzmuster hervorrufen (Johnson und Wu, 1998; Collis et al., 2003). CDR-H3-Länge und -Sequenz haben starke strukturelle Konsequenzen für den Aufbau der Antigenbindungsstelle. Letztendlich können Taschen, Rillen, Auswüchse oder flache Bindungsstellen geformt werden. Lange CDR-H3-Schleifen tendieren dazu, große Antigene mit einer flachen oder auswüchsigen Bindungsstelle zu binden. Kurze CDR-H3-Schleifen hingegen neigen zur Bindung kleinerer Antigene durch Formung von Taschen oder Rillen (Collis et al., 2003). Die Vorhersage der räumlichen CDR-H3-Struktur nach Shirai et al. zeigte, dass die CDR-H3-Basis bei infizierten Tieren viel häufiger gestreckt war. Mit einer somit längeren CDR-H3-Schleife wäre das IgE-Molekül in der Lage, größere Antigene zu binden (Shirai et al., 1999). Möglicherweise handelt es sich bei den Helminthen-Antigenen in einer *L. sigmodontis*-Infektion um größere Moleküle als das Antigen OVA.

Interessant sind in diesem Zusammenhang nicht nur die Unterschiede zwischen Lito,PBS-Sequenzen - die ja nur die Immunantwort auf das Infektionsgeschehen darstellten - und ni,OVA-Sequenzen, sondern auch Unterschiede zwischen Lito,PBS- und Lito,OVA-Sequenzen. Die Sensibilisierung auf das Allergen OVA scheint auch in der CDR-H3 des IgE-Repertoires infizierter Tiere strukturelle Spuren zu hinterlassen. Abgesehen von der durchschnittlichen CDR-H3-Länge zeigte sich auch die

Diskussion

Längenvariabilität bei infizierten Tieren erhöht, es wurde also ein breiteres Spektrum an möglichen CDR-H3-Längen und strukturellen CDR-H3-Konfigurationen abgedeckt (Lito,PBS und Lito,OVA > ni,OVA). Ein Grund hierfür könnte das vermutlich breitere Antigenpektrum sein, mit dem die Versuchstiere während der Helminthen-Infektion konfrontiert wurden. Eine breitere Antigenstimulation hätte demnach ein breiteres CDR-H3-Längen-Spektrum zur Folge – entsprechend einer oligoklonalen Immunantwort auf mehrere Helminthen-Antigene.

Die Untersuchung der CDR-H3-Komposition zeigte, dass bei Lito,PBS-Tieren längere CDR-H3 vorkamen. Dies ist zum einen dem verstärkten Einbau von N-Nukleotiden (zwischen V- und D-Segment) geschuldet, aber auch längeren D- und J-Segmenten. Der vermehrte Einbau von N-Nukleotiden zwischen V- und D-Segment, längere D- und J-Segmente kompensierten die Nutzung von signifikant kürzeren V-Segmenten. Auch Lito,OVA-Sequenzen hatten signifikant kürzere V-Segmente. Die Nutzung kürzerer V-Segmente und eine verstärkte N-Nukleotid-Addition zwischen V- und D-Segment sind Phänomene, die von Rogosch et al. bei der Untersuchung von IgE-Plasmazellen im Vergleich zu IgE-Nicht-Plasmazellen (IgE-Gedächtniszellen) und IgM produzierenden Zellen festgestellt wurden (Rogosch et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für die Strukturveränderungen wäre, dass Sequenzen von Lito-Tieren in größerem Maße die Sequenzen von IgE-Plasmazellen dargestellt haben als das bei nicht infizierten Tieren der Fall gewesen ist.

Eine Helminthen-Infektion führte zu einem signifikant erhöhten Einbau der neutralen Aminosäuren Tyrosin und Prolin, während sich die Gesamt-Hydrophobizität der CDR-H3 nicht signifikant änderte. Die Aminosäurezusammensetzung und die Polarität haben starke Auswirkungen auf die Immunfunktion. Sie scheinen sogar eine wichtigere Rolle einzunehmen als der Grad der Diversität. So zeigten Schelonka et al., dass eine Limitierung der Diversität durch Reduktion auf ein einzelnes normales D_H -Segment unter Beibehaltung des Polaritätsgrads des Aminosäurerepertoires (*ΔD -DFL-Tiere*) eine robuste humorale Immunfunktion mit normalen B-Zell-Zahlen im Mausmodell zur Folge hat (Schelonka et al., 2005). Auch die Entwicklung eines allergischen Phänotyps ist mit reduzierter Diversität und neutralem Aminosäurerepertoire bei *ΔD -DFL-Tieren* möglich (Kerzel et al., 2011). Eine Veränderung der Aminosäurefrequenz hingegen, die die Polarität hin zu einem hydrophoben Aminosäurerepertoire unter Beibehaltung des

RF verschiebt, führt zu einer eingeschränkten B-Zell-Entwicklung und Antikörperbildung (Ippolito et al., 2006). Im murinen Asthmodell haben solche *ΔD-ID-Tiere* eine eingeschränkte Fähigkeit zur Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung und akuten Atemwegsentzündung (Kerzel et al., 2009). Bestätigt wurde die Relevanz der Polarität des Aminosäurerepertoires zudem durch die Untersuchung von *ΔD-DuFS-Mausstämmen*. Aufgrund eines *frameshifts* von RF1 hin zu RF2 unter Verwendung eines einzelnen mutierten D-Segments exprimierten diese weniger Tyrosin und Glycin zugunsten von Valin. Dadurch wurde ebenfalls ein hydrophobes Aminosäurerepertoire generiert, was zu reduzierten Zahlen von reifen B-Lymphozyten in Knochenmark und Milz, sowie einer abgeschwächten Antigen-spezifischen Antikörper-Produktion führte (Schelonka et al., 2008; Zemlin et al., 2008). Im hier vorgestellten Versuch zeigte sich, dass alle Untersuchungsgruppen ein zum größten Teil neutrales und somit funktionelles Aminosäure-Repertoire ausbildeten.

4.5.2 Eine Helminthen-Infektion induzierte im Asthmodell ein oligoklonales IgE-Repertoire durch klassische Affinitätsreifung

In Lito-IgE-Transkripten mit und ohne Sensibilisierung wurden signifikant erhöhte somatische Mutationsraten nachgewiesen. Eine somatische Hypermutation ist Ausdruck einer starken sekundären Diversifizierung des Antikörperrepertoires im Rahmen der Antikörperreifung in den sekundären lymphatischen Organen. Als Ergebnis dieses Prozesses entstehen Antigen-selektierte Sequenzen. Im hier verwendeten Modell zeigten alle Untersuchungsgruppen Anzeichen für Antigenselektion nach Lossos et al. (Lossos et al., 2000). Als Referenz kann hierzu das IgM-Repertoire herangezogen werden, welches von unreifen, naiven B-Zellen nach primärer Diversifizierung gebildet wird. Das IgM-Repertoire zeigte nach Rogosch et al. mit 0,6% kaum Anzeichen für Antigenselektion (Rogosch et al., 2010). Antigenselektion kann im Rahmen einer Helminthen-Infektion als eine fokussierte und gut auf den Helminthen eingestellte Immunabwehr interpretiert werden. Auch die erhöhte Aminosäurevariabilität an angegebener IMGT-Position (Shannon-Entropie) ist Ausdruck einer gut adaptierten Immunantwort. Die hier erhobenen Daten unterstützen in diesem Sinne Ergebnisse, die dem IgE-Antikörperrepertoire eine hohe Bedeutung bei der Limitierung der Helminthen-Infektion beimessen. Nur mit optimal „passenden“ Helminthen-spezifischen, affinitätsgereiften Antikörpern dürfte eine erfolgreiche Limitierung der

Diskussion

Infektion möglich sein. Auch die Funktion als *blocking antibody* im Rahmen der *IgE-Blocking-Hypothese* lässt sich mit den Ergebnissen vereinbaren (s.o.).

Hohe somatische Mutationsraten und Anzeichen für Antigenselektion sprechen für eine klassische Affinitätsreifung während der sekundären Diversifizierung des Antikörperrepertoires. Alternativ denkbar wäre auch die Aktivierung durch Superantigene. Die vorliegenden Ergebnisse sind vereinbar mit einer klassischen Affinitätsreifung, sowohl als Folge der Lito-Infektion als auch durch reine OVA-Sensibilisierung. In Anbetracht hoher somatischer Mutationsraten und Anzeichen klassischer Affinitätsreifung scheint eine Infektion mit *L. sigmodontis* mitnichten nur eine „unspezifische“ IgE-Antwort zur Folge zu haben. Vielmehr gibt es deutliche Belege für eine spezifische und gerichtete oligoklonale IgE-Antwort.

Gleichzeitig war die klonale Diversität bei Lito,PBS-Tieren gegenüber ni,OVA-Tieren erhöht. Dies spricht für eine polyklonale Immunantwort bei diesen Tieren. Aber auch in Lito,PBS-Transkripten waren somatische Mutationsraten gegenüber ni,OVA-Tieren erhöht, was ein Anzeichen für klassische Affinitätsreifung ist. Möglicherweise wurden letztlich in diesem Prozess trotz der hohen somatischen Mutationsraten weniger Transkripte Antigen-selektiert, so dass eine gewisse Polyklonalität erhalten blieb.

Bei der Beurteilung von Poly- und Oligoklonalität bei Transkripten von infizierten Tieren muss beachtet werden, dass es sich hier um eine unklare Anzahl von relevanten Antigenen handelte, während bei ni,OVA-Tieren nur ein Antigen eine Rolle spielte. Es ist unklar, wann und in welchem Maße diese Antigene exprimiert wurden. So könnte das IgE-Repertoire von infizierten Tieren auch im Laufe einer Infektion variieren. Zudem handelt es sich hier um ein reines *L. sigmodontis*-Modell. Die Expression von Antigenen in anderen Tiermodellen mit anderen Helminthenspezies kann ein gänzlich anderes IgE-Repertoire induzieren.

4.6 Fazit

Eine Infektion mit *L. sigmodontis* beeinflusst die allergische Sensibilisierung und schützt vor allergischer Atemwegsentzündung im Mausmodell.

Das IgE-Repertoire infizierter Tiere zeichnet sich durch eine veränderte CDR-H3-Komposition und -struktur, klassische Affinitätsreifung und oligoklonalen Charakter aus.

Die Ergebnisse sind kompatibel mit der Theorie des „*IgE-Blocking*“ bei Helminthen-Infektion. Diese postuliert, dass Helminthen-spezifische IgE-Antikörper durch Kreuz-Reaktion mit Allergen-spezifischem IgE oder Konkurrenz um den FcεR1 eine Effektorzell-Degranulation verhindern. Die Theorie des „*IgG₁-Blocking*“, welche Helminthen-spezifischem IgG₁ diese Eigenschaften zuschreibt, scheint in diesem Modell unwahrscheinlich.

5. Deutsche und englische Zusammenfassung

5.1 Inhalt

Die Hygiene-Hypothese identifizierte vor über 20 Jahren u. a. humanpathogene Helminthen als möglichen Schutzfaktor gegenüber dem Auftreten allergischer Erkrankungen. Viele epidemiologische Studien zeigten eine inverse Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer Helminthen-Infektion und der Prävalenz allergischer Erkrankungen, wie z. B. Asthma bronchiale. In den letzten Jahren wurden zunehmend Mausmodelle eingesetzt, um wichtige Faktoren, die für das antiallergische und immunmodulatorische Potential von Helminthen verantwortlich sind, zu identifizieren. Die durch eine chronische Helminthen-Infektion induzierte Immunantwort wird auch als alternative T_H2 -Antwort bezeichnet (Yazdanbakhsh et al., 2002). Meist liegt – ähnlich wie bei allergischen Erkrankungen - eine starke T_H2 -Antwort mit hohen systemischen IgE-Konzentrationen vor, jedoch fehlt jegliche Pathologie und Symptomatik. Dieses „*Helminthen-Paradoxon*“ (Smits et al., 2010) und insbesondere die Rolle der IgE-Antikörper-Antwort gilt es zu entschlüsseln. Hierfür wurden BALB/c-Mäuse mit *L. sigmodontis* über den Biss des natürlichen Vektors - der Tropischen Rattenmilbe (*O. bacoti*) - infiziert. Der Phänotyp der Mäuse wurde anschließend in einem etablierten Modell der akuten allergischen Atemwegsentzündung untersucht und mit nicht infizierten Mäusen verglichen. Fraglich war, ob die Wurm-Infektion im verwendeten Modell vor Asthma schützen würde und welche Auswirkungen sie auf den Prozess der allergischen Sensibilisierung und den Charakter des IgE-Antikörper-Repertoires haben würde. Die vorliegende Arbeit charakterisiert erstmals das IgE-Repertoire von Helminthen-infizierten Tieren in einem murinen Asthmodell. Hierfür wurde splenische RNA extrahiert, umgeschrieben und mit einer RT-PCR amplifiziert. Das Produkt wurde in ein Plasmid ligiert, welches wiederum in kompetente *E. coli*-Zellen transferiert und kloniert wurde. Das monoklonale DNA-Amplifikat, das für die variable Region der schweren Kette des IgE-Moleküls kodierte, wurde von einem kommerziellen Anbieter sequenziert und anschließend durch einen etablierten Algorithmus analysiert. Zudem wurden Antikörper-Serumkonzentrationen mittels ELISA bestimmt, splenische B-Zellen mittels Durchflusszytometrie differenziert und als Indikator der allergischen Atemwegsentzündung der Influx eosinophiler

Granulozyten in die Lunge mittels maschineller und mikroskopischer Zelldifferenzierung. gemessen. Während nicht infizierte Tiere einen starken Influx an eosinophilen Granulozyten in die Lunge zeigten, waren *L. sigmodontis*-infizierte Tiere - analog zu der erweiterten Hygiene-Hypothese - vor allergischer Atemwegsentzündung geschützt. Sie zeigten eine robuste T_H2 -wendige Immunantwort, viel stärker als bei nicht infizierten OVA-sensibilisierten Tieren. Die Immunantwort auf OVA wurde von der Helminthen-Infektion moduliert. Das IgE-Repertoire unterschied sich von dem Repertoire nicht infizierter Tiere in der CDR-H3-Komposition, durch längere CDR-H3, vermehrte Nutzung von gestreckten CDR-H3-Basisstrukturen und durch höhere Variabilität. Es konnten erhöhte somatische Mutationsraten und Anzeichen für Antigenselektion nachgewiesen werden. Dies spricht für eine oligoklonale Immunantwort, hervorgerufen durch klassische Affinitätsreifung. Es zeigt sich demnach, dass eine Infektion mit *L. sigmodontis* in dem hier genutzten Mausmodell vor Asthma bronchiale schützt und das IgE-Repertoire in Struktur und Funktion beeinflusst. Die Ergebnisse sind kompatibel mit der „IgE-Blocking-Hypothese“, welche postuliert, dass Helminthen-spezifische IgE-Antikörper durch Kreuz-Reaktion mit Allergen-spezifischem IgE oder Konkurrenz um den $Fc\epsilon R1$ eine Effektorzell-Degranulation verhindern.

5.2 Summary

Twenty years ago the hygiene hypothesis was introduced identifying pathogenic helminths as potential protectors against allergic disease. Epidemiologic studies showed an inverse relationship between helminth infection and the prevalence of allergic disease such as allergic bronchial asthma. During the last few years the intention was to identify key players responsible for immunomodulation and antiallergic potential during helminth infection. The immune response induced by chronic helminth infection has been proposed as alternative T_H2 -response which is characterized by high systemic levels of IgE antibodies yet without pathology and symptoms (Yazdanbakhsh et al., 2002). This “*helminth paradoxon*” (Smits et al., 2010) remains to be solved. Especially the role of IgE is uncertain. For this reason BALB/c mice were infected with L3 larvae of the nematode *L. sigmodontis* by bite of the natural vector *O. barcoti*. The phenotype of infected mice was then being investigated in a well established model of acute

allergic airway inflammation. The first question was whether infection with *L. sigmodontis* would protect against allergic asthma. Secondly the effect of infection on the process of allergic sensitization and the character of the IgE repertoire was to be determined. This study is the first to describe the IgE repertoire of helminth infected animals in a murine model of allergic asthma. For this reason splenic RNA was extracted, transcribed and amplified using RT-PCR for a defined area of murine IgE including the variable region of the H-chain. The amplification product was further ligated into a plasmid which was transferred to fully competent *E. coli* cells and being cloned later on. The monoclonal IgE amplifications were sequenced by a commercial provider and analyzed by an established algorithm. Furthermore serum antibody levels were measured by means of ELISA, splenic b cells were counted and characterized by means of FACS and allergic influx of eosinophils was measured by automatic cell counting and microscopic differentiation of BALF. Non-infected animals showed a strong influx of eosinophils indicating allergic airway inflammation. *L. sigmodontis* infection however – as predicted by the hygiene hypothesis – protected against airway inflammation. These animals showed a much stronger T_H2 response than non-infected OVA-sensitized animals. The immune response to OVA was overshadowed by helminth infection. The IgE repertoire of infected animals differed with respect to CDR-H3 composition, longer CDR-H3, enhanced use of extended CDR-H3 base structures and higher variability. There were also higher rates of somatic mutation and signs of antigen selection indicating an oligoclonal immune response driven by classic affinity maturation. One can conclude that an infection with *L. sigmodontis* protected against allergic asthma in this specific mouse model influencing the IgE repertoire in structure and function. The results support the “*IgE blocking hypothesis*” which postulates that helminth specific IgE antibodies act as competitor for FcεR1 with allergen specific IgE thereby prohibiting effector cell degranulation.

6. Abkürzungsverzeichnis

AAM	Alternativ aktivierte Makrophagen
AID	Aktivierungs-induzierte Deaminase
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APE 1	Apurinische/apyrimidinische Endonuclease 1
BAL(F)	bronchoalveoläre Lavage(-flüssigkeit)
BALB/c	Mausstamm
Breg	regulatorische B-Zellen
CCL17	chemokine ligand 17
DC	dendritic cell(s), dendritische Zellen
DCreg	regulatorische dendritische Zellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FcR	fragment crystallizable receptor, Fc-Rezeptor
FIZZ1	found in inflammatory zone 1
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
Lito,OVA	Mit <i>L. sigmodontis</i> infizierte BALB/c-Mäuse, die mit OVA sensibilisiert wurden
Lito,PBS	Mit <i>L. sigmodontis</i> infizierte BALB/c-Mäuse, die mit PBS behandelt wurden
Lito-Tiere	Mit <i>L. sigmodontis</i> infizierte BALB/c-Mäuse
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP12	Matrix-Metallopeptidase 12
ni,OVA	nicht infizierte BALB/c-Mäuse, die mit OVA sensibilisiert wurden
ni,PBS	nicht infizierte BALB/c-Mäuse, die mit PBS behandelt wurden
ni-Tiere	nicht infizierte BALB/c-Mäuse
PAF	platelet activating factor
PD	Phosphodiesterase
p.i.	post infectionem

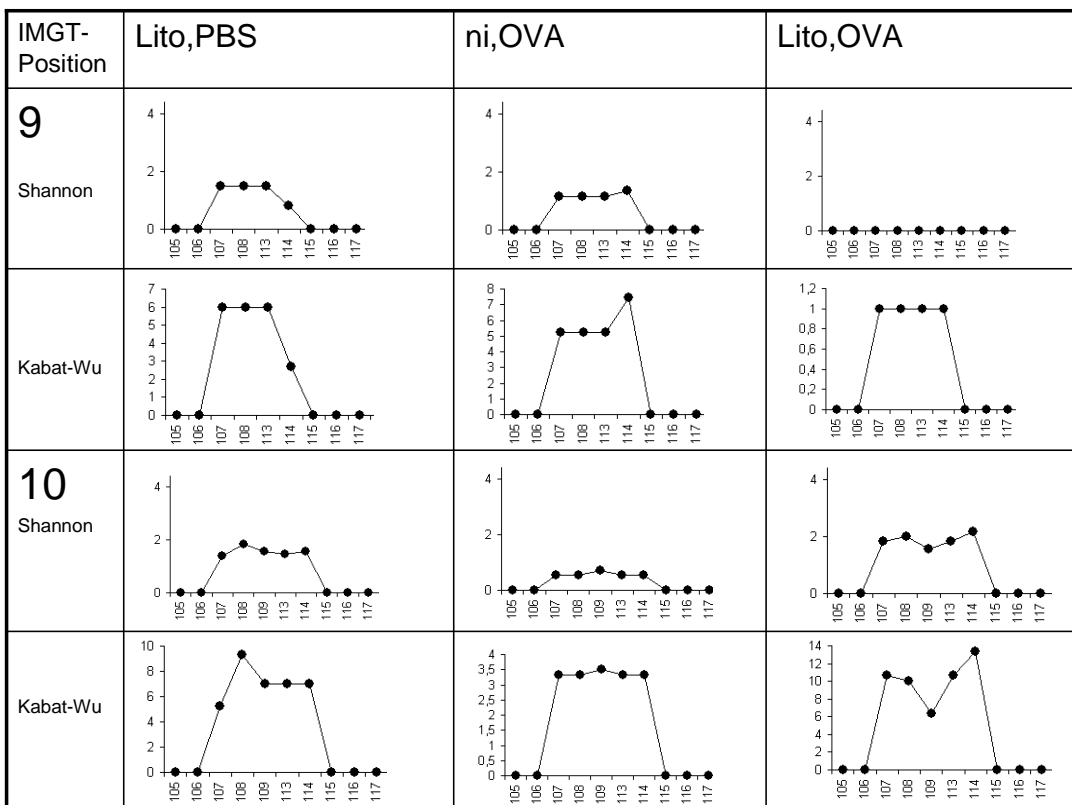
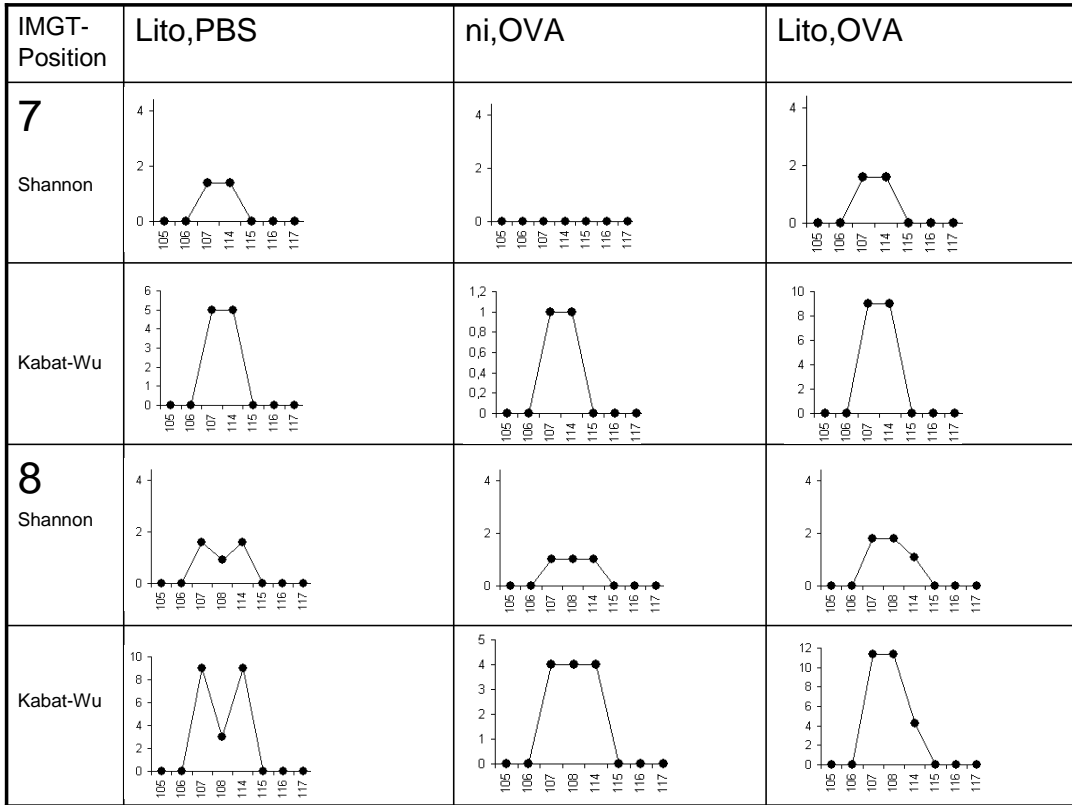
Abkürzungsverzeichnis

RELM α	resistin-like molecule α
smCKBP	schistosoma mansoni chemokine binding protein
TGF	tumor growth factor
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
Treg	regulatorische T-Zellen
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase
VEGF	vascular endothelial growth factor

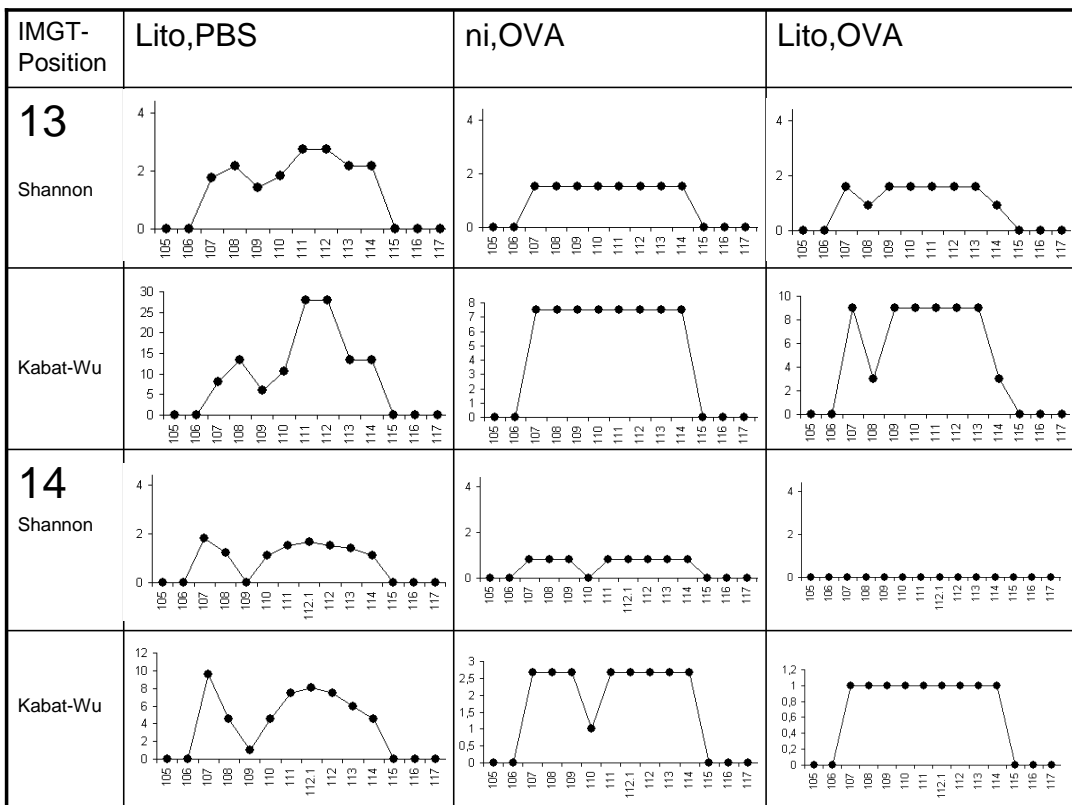
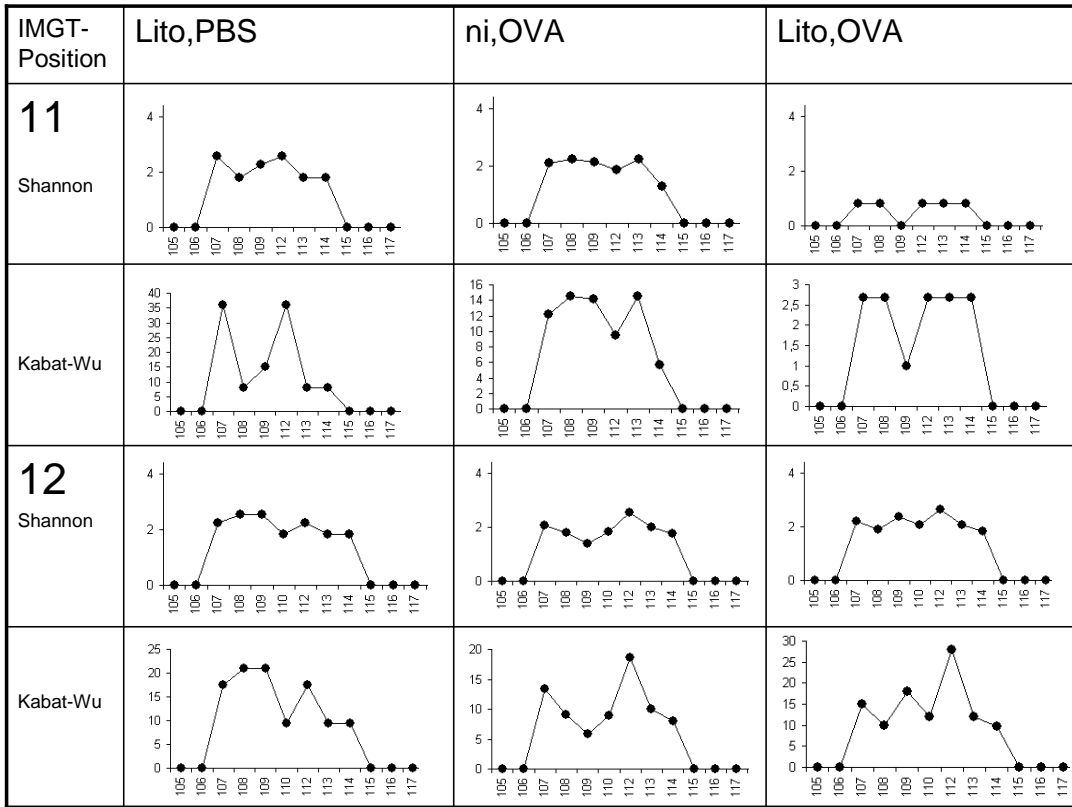
.

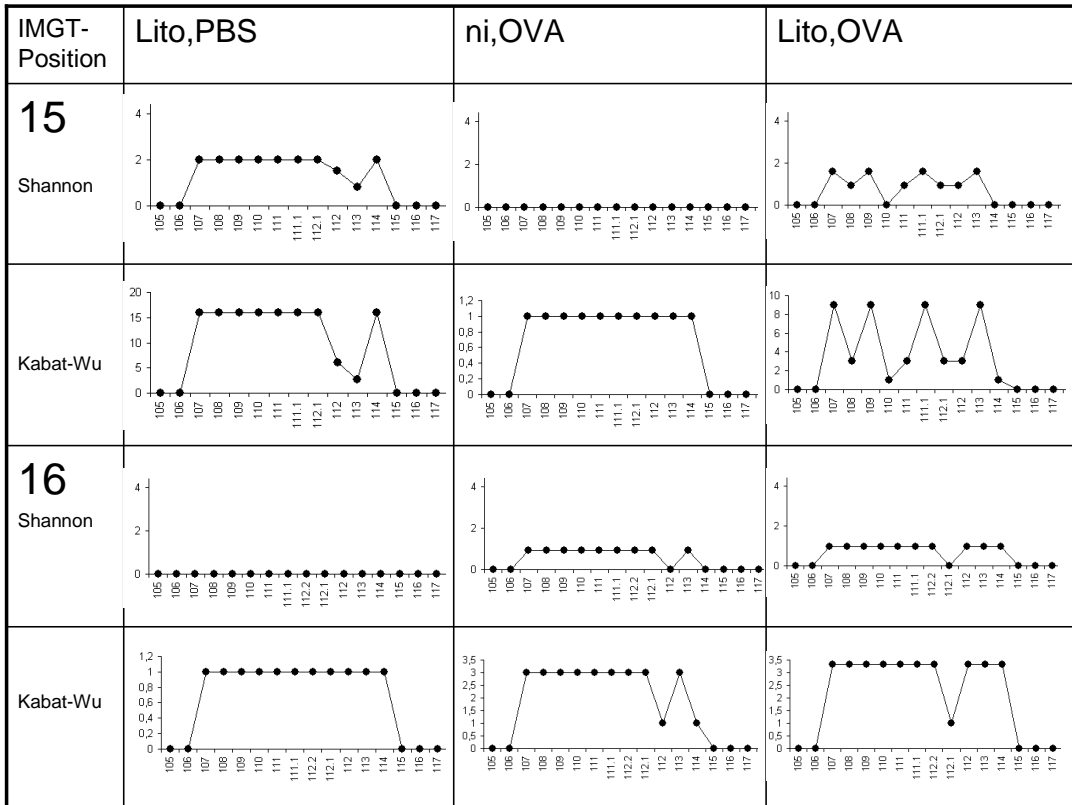
7. Anhang

7.1 Shannon-Entropie und Kabat-Wu-Plot



Anhang





Shannon-Entropie und Kabat-Wu-Plot

Abgebildet sind CDR-H3, die sieben bis 16 Aminosäuren lang waren. Dies entsprach allen verfügbaren CDR-H3-Längen von ni,OVA-Tieren. Lito-infizierte Tiere verfügten über ein erweitertes CDR-H3-Längen-Repertoire (nicht abgebildet).

8. Literaturverzeichnis

- Aalberse, R.C., Stapel, S.O., Schuurman, J., Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 39, 469-477.
- Adjobimey, T., Hoerauf, A. (2010). Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation. *Ann Trop Med Parasitol* 104, 455-464.
- Al-Qaoud, K.M., Taubert, A., Zahner, H., Fleischer, B., Hoerauf, A. (1997). Infection of BALB/c mice with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis*: role of CD4+ T cells in controlling larval development. *Infect Immun* 65, 2457-2461.
- Arruda, L.K., Santos, A.B. (2005). Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5, 399-402.
- Bach, J.F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347, 911-920.
- Baral, T.N., De Baetselier, P., Brombacher, F., Magez, S. (2007). Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. *J Infect Dis* 195, 1513-1520.
- Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., Vignola, A.M. (2000). Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1720-1745.
- Buc, M., Dzurilla, M., Vrlik, M., Bucova, M. (2009). Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp* 57, 331-344.
- Buijs, J., Borsboom, G., Renting, M., Hilgersom, W.J., van Wieringen, J.C., Jansen, G., Neijens, J. (1997). Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. *Eur Respir J* 10, 1467-1475.
- Burnet, F.M. (1959). *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Vanderbilt University Press Tennessee; Cambridge University Press.

Literaturverzeichnis

- Carvalho, E.M., Bastos, L.S., Araujo, M.I. (2006). Worms and allergy. *Parasite Immunol* 28, 525-534.
- Chang, B., Casali, P. (1994). The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today* 15, 367-373.
- Chen, C., Stenzel-Poore, M.P., Rittenberg, M.B. (1991). Natural auto- and polyreactive antibodies differing from antigen-induced antibodies in the H chain CDR3. *J Immunol* 147, 2359-2367.
- Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A.L., Jacq, B., Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7, 439.
- Cohn, M. (2008). A hypothesis accounting for the paradoxical expression of the D gene segment in the BCR and the TCR. *Eur J Immunol* 38, 1779-1787.
- Collins, A.M., Sewell, W.A., Edwards, M.R. (2003). Immunoglobulin gene rearrangement, repertoire diversity, and the allergic response. *Pharmacol Ther* 100, 157-170.
- Collis, A.V., Brouwer, A.P., Martin, A.C. (2003). Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J Mol Biol* 325, 337-354.
- Cooper, P.J., Chico, M.E., Bland, M., Griffin, G.E., Nutman, T.B. (2003). Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med*, 313-317.
- Cooper, P.J., Chico, M.E., Vaca, M.G., Moncayo, A.L., Bland, J.M., Mafla, E., Sanchez, F., Rodrigues, L.C., Strachan, D.P., Griffin, G.E. (2006). Effect of albendazole treatments on the prevalence of atopy in children living in communities endemic for geohelminth parasites: a cluster-randomised trial. *Lancet* 367, 1598-1603.
- Dagoye, D., Bekele, Z., Woldemichael, K., Nida, H., Yimam, M., Hall, A., Venn, A.J., Britton, J.R., Hubbard, R., Lewis, S.A. (2003). Wheezing, allergy, and parasite infection in children in urban and rural Ethiopia. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1369-1373.

Literaturverzeichnis

Dahlke, I., Nott, D.J., Ruhno, J., Sewell, W.A., Collins, A.M. (2006). Antigen selection in the IgE response of allergic and nonallergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1477-1483.

Davey, G., Venn, A., Belete, H., Berhane, Y., Britton, J. (2005). Wheeze, allergic sensitization and geohelminth infection in Butajira, Ethiopia. *Clin Exp Allergy* 35, 301-307.

Davies, J.M., O'Hehir, R.E. (2004). VH gene usage in immunoglobulin E responses of seasonal rhinitis patients allergic to grass pollen is oligoclonal and antigen driven. *Clin Exp Allergy* 34, 429-436.

Davis, M.M. (2004). The evolutionary and structural 'logic' of antigen receptor diversity. *Semin Immunol* 16, 239-243.

Di Noia, J.M., Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76, 1-22.

Diaz, A., Allen, J.E. (2007). Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur J Immunol* 37, 3319-3326.

Dittrich, A.M., Erbacher, A., Specht, S., Diesner, F., Krokowski, M., Avagyan, A., Stock, P., Ahrens, B., Hoffmann, W.H., Hoerauf, A., (2008). Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol* 180, 1792-1799.

Ehrenstein, M.R., Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*, 778-786.

Epstein, M.M. (2004). Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int Arch Allergy Immunol* 133, 84-100.

Fallon, P.G., Mangan, N.E. (2007). Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7, 220-230.

Flohr, C., Quinnell, R.J., Britton, J. (2009). Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease? *Clin Exp Allergy* 39, 20-32.

Literaturverzeichnis

- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* 11, 681-688.
- Gould, H.J., Sutton, B.J., Bevil, A.J., Bevil, R.L., McCloskey, N., Coker, H.A., Fear, D., Smurthwaite, L. (2003). The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 21, 579-628.
- Grainger, J.R., Smith, K.A., Hewitson, J.P., McSorley, H.J., Harcus, Y., Filbey, K.J., Finney, C.A., Greenwood, E.J., Knox, D.P., Wilson, M.S., (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *J Exp Med*, 2331-2341.
- Grütz, G. (2005). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 77, 3-15.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol*, 1-11.
- Hof, H., Dörries, R. (2005). *Medizinische Mikrobiologie, Duale Reihe, 3. Auflage*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hoffmann, W., Petit, G., Schulz-Key, H., Taylor, D., Bain, O., Le Goff, L. (2000). *Litomosoides sigmodontis* in mice: reappraisal of an old model for filarial research. *Parasitol Today* 16, 387-389.
- Hübner, M.P., Torrero, M.N., McCall, J.W., Mitre, E. (2009). *Litomosoides sigmodontis*: a simple method to infect mice with L3 larvae obtained from the pleural space of recently infected jirds (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol* 123, 95-98.
- Ippolito, G.C., Schelonka, R.L., Zemlin, M., Ivanov, II, Kobayashi, R., Zemlin, C., Gartland, G.L., Nitschke, L., Pelkonen, J., Fujihashi, K., (2006). Forced usage of positively charged amino acids in immunoglobulin CDR-H3 impairs B cell development antibody production. *J Exp Med*, 1567-1578.
- ISAAC (1998). Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*, 1225-1232.

Janezic, A., Chapman, C.J., Snow, R.E., Hourihane, J.O., Warner, J.O., Stevenson, F.K. (1998). Immunogenetic analysis of the heavy chain variable regions of IgE from patients allergic to peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 101, 391-396.

Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., Allen, J.E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, 1284-1288.

Johnson, G., Wu, T.T. (1998). Preferred CDRH3 lengths for antibodies with defined specificities. *Int Immunol* 10, 1801-1805.

Kerzel, S., P ath, G., Nockher, W.A., Quarcoo, D., Raap, U., Groneberg, D.A., Dinh, Q.T., Fischer, A., Braun, A., Renz, H. (2003). Pan-neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 170-178.

Kerzel, S., Rogosch, T., Struecker, B., Maier, R.F., Zemlin, M. (2010). IgE transcripts in the circulation of allergic children reflect a classical antigen-driven B cell response and not a superantigen-like activation. *J Immunol* 2253-2260.

Kerzel, S., Rogosch, T., Wagner, J., Preisser, K., Yildirim, A., Fehrenbach, H., Garn, H., Maier, R.F., Schroeder, H.W., Zemlin, M. (2011). A single d(h) gene segment is sufficient for the establishment of an asthma phenotype in a murine model of allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 156, 247-258.

Kerzel, S., Wagner, J., Rogosch, T., Yildirim, A.O., Sikula, L., Fehrenbach, H., Garn, H., Maier, R.F., Schroeder, H.W., Jr., Zemlin, M. (2009). Composition of the immunoglobulin classic antigen-binding site regulates allergic airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 591-601.

Kitagaki, K., Businga, T.R., Racila, D., Elliott, D.E., Weinstock, J.V., Kline, J.N. (2006). Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol* 177, 1628-1635.

Kracker, S., Durandy, A. (2011). Insights into the B cell specific process of immunoglobulin class switch recombination. *Immunol Lett.* 97-103.

Literaturverzeichnis

- Kreider, T., Anthony, R.M., Urban, J.F., Jr., Gause, W.C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol* 448-453.
- Kuroda, D., Shirai, H., Kobori, M., Nakamura, H. (2008). Structural classification of CDR-H3 revisited: a lesson in antibody modeling. *Proteins* 73, 608-620.
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 105-132.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Liu, P., Li, J., Yang, X., Shen, Y., Zhu, Y., Wang, S., Wu, Z., Liu, X., An, G., Ji, W., (2010a). Helminth infection inhibits airway allergic reaction and dendritic cells are involved in the modulation process. *Parasite Immunol* 32, 57-66.
- Liu, Z., Liu, Q., Bleich, D., Salgame, P., Gause, W.C. (2010b). Regulation of type 1 diabetes, tuberculosis, and asthma by parasites. *J Mol Med* 88, 27-38.
- Lossos, I.S., Tibshirani, R., Narasimhan, B., Levy, R. (2000). The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol* 165, 5122-5126.
- Lynch, N.R., Palenque, M., Hagel, I., DiPrisco, M.C. (1997). Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situation. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 50-54.
- Maddox, L., Schwartz, D.A. (2002). The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med* 477-498.
- Magez, S., Schwegmann, A., Atkinson, R., Claes, F., Drennan, M., De Baetselier, P., Brombacher, F. (2008). The role of B-cells and IgM antibodies in parasitemia, anemia, and VSG switching in *Trypanosoma brucei*-infected mice. *PLoS Pathog* 4, e1000122.
- Marone, G., Spadaro, G., Liccardo, B., Rossi, F.W., D'Orio, C., Detoraki, A. (2006). Superallergens: a new mechanism of immunologic activation of human basophils and mast cells. *Inflamm Res* 55 Suppl 1, S25-27.

McCoy, K.D., Stoel, M., Stettler, R., Merky, P., Fink, K., Senn, B.M., Schaer, C., Massacand, J., Odermatt, B., Oettgen, H.C. (2008). Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. *Cell Host Microbe*. 362-373.

Medeiros, M., Figueiredo, J.P., Almeida, M.C., Matos, M.A., Araújo, M.I., Cruz, A.A., Atta, A.M., Rego, M.A., de Jesus, A.R., Taketomi, E.A. (2003). *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111, 947-951.

Mingomataj, E.C., Xhixha, F., Gjata, E. (2006). Helminths can protect themselves against rejection inhibiting hostile respiratory allergy symptoms. *Allergy* 61, 400-406.

Mitre, E., Norwood, S., Nutman, T.B. (2005). Saturation of immunoglobulin E (IgE) binding sites by polyclonal IgE does not explain the protective effect of helminth infections against atopy. *Infect Immun* 4106-4111.

Mitre, E., Nutman, T.B. (2006). IgE memory: persistence of antigen-specific IgE responses years after treatment of human filarial infections. *J Allergy Clin Immunol* 117, 939-945.

Moura, R., Agua-Doce, A., Weinmann, P., Graca, L., Fonseca, J.E. (2008). B cells from the bench to the clinical practice. *Acta Reumatol Port* 33, 137-154.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie*, 7. Auflage Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Nakagome, K., Dohi, M., Okunishi, K., Komagata, Y., Nagatani, K., Tanaka, R., Miyazaki, J., Yamamoto, K. (2005). In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 174, 6955-6966.

Nials, A.T., Uddin, S. (2008). Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech* 1, 213-220.

- Palmer, L.J., Celedón, J.C., Weiss, S.T., Wang, B., Fang, Z., Xu, X. (2002). *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1489-1493.
- Pezzutto, A., Ulrichs, T., und Burmester, G.-R. (2007). *Taschenatlas der Immunologie*, 2. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Pinelli, E., Brandes, S., Dormans, J., Gremmer, E., van Loveren, H. (2008). Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 38, 649-658.
- Rajan, B., Ramalingam, T., Rajan, T.V. (2005). Critical role for IgM in host protection in experimental filarial infection. *J Immunol* 1827-1833.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Rogosch, T., Kerzel, S., Hoi, K.H., Zhang, Z., Maier, R.F., Ippolito, G.C., Zemlin, M. (2012). Immunoglobulin Analysis Tool: A Novel Tool for the Analysis of Human and Mouse Heavy and Light Chain Transcripts. *Front Immunol* 3, 176.
- Rogosch, T., Kerzel, S., Sikula, L., Gentil, K., Liebetruh, M., Schlingmann, K.P., Maier, R.F., Zemlin, M. (2010). Plasma cells and nonplasma B cells express differing IgE repertoires in allergic sensitization. *J Immunol* 184, 4947-4954.
- Rook, G.A. (2008). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology* 126, 3-11.
- Salib, R.J., Howarth, P.H. (2009). Transforming growth factor-beta in allergic inflammatory disease of the upper airways: friend or foe? *Clin Exp Allergy* 1128-1135.
- Schelonka, R.L., Ivanov, II, Jung, D.H., Ippolito, G.C., Nitschke, L., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Pelkonen, J., Alt, F.W., Rajewsky, K., (2005). A single DH gene segment creates its own unique CDR-H3 repertoire and is sufficient for B cell development and immune function. *J Immunol*, 6624-6632.
- Schelonka, R.L., Tanner, J., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Zemlin, M., Schroeder, H.W., Jr. (2007). Categorical selection of the antibody repertoire in splenic B cells. *Eur J Immunol* 37, 1010-1021.

Literaturverzeichnis

Schelonka, R.L., Zemlin, M., Kobayashi, R., Ippolito, G.C., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Szalai, A., Fujihashi, K., Rajewsky, K., Schroeder, H.W., Jr. (2008). Preferential use of DH reading frame 2 alters B cell development and antigen-specific antibody production. *J Immunol*, 8409-8415.

Schnoeller, C., Rausch, S., Pillai, S., Avagyan, A., Wittig, B.M., Loddenkemper, C., Hamann, A., Hamelmann, E., Lucius, R., Hartmann, S. (2008). A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *J Immunol* 180, 4265-4272.

Schroeder, H.W. Jr (2006). Similarity and divergence in the development and expression of the mouse and human antibody repertoires. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 119-135.

Schroeder, H.W., Mortari, F., Shiokawa, S., Kirkham, P.M., Elgavish, R.A., Bertrand, F.E. (1995). Developmental regulation of the human antibody repertoire. *Ann N Y Acad Sci* 764, 242-260.

Scrivener, S., Yemaneberhan, H., Zebenigus, M., Tilahun, D., Girma, S., Ali, S., McElroy, P., Custovic, A., Woodcock, A., Pritchard, D. (2001). Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet* 358, 1493-1499.

Shannon, C.E. (1949). *A Mathematical Theory of Communication*, University of Illinois Press, Illinois.

Shirai, H., Kidera, A., Nakamura, H. (1999). H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Lett*, 188-197.

Smith, P., Fallon, R.E., Mangan, N.E., Walsh, C.M., Saraiva, M., Sayers, J.R., McKenzie, A.N., Alcami, A., Fallon, P.G. (2005). *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J Exp Med* 202, 1319-1325.

Smits, H.H., Everts, B., Hartgers, F.C., Yazdanbakhsh, M. (2010). Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep* 10, 3-12.

Literaturverzeichnis

Smits, H.H., Hammad, H., van Nimwegen, M., Soullie, T., Willart, M.A., Lievers, E., Kadouch, J., Kool, M., Kos-van Oosterhoud, J., Deelder, A.M., (2007). Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *J Allergy Clin Immunol* 120, 932-940.

Snow, R.E., Chapman, C.J., Frew, A.J., Holgate, S.T., Stevenson, F.K. (1995). Analysis of Ig VH region genes encoding IgE antibodies in splenic B lymphocytes of a patient with asthma. *J Immunol* 154, 5576-5581.

Specht, S., Frank, J.K., Alferink, J., Dubben, B., Layland, L.E., Denece, G., Bain, O., Forster, I., Kirschning, C.J., Martin, C. (2011a). CCL17 controls mast cells for the defense against filarial larval entry. *J Immunol*, 4845-4852.

Specht, S., Taylor, M.D., Hoeve, M., Allen, J.E., Lang, R., Hoerauf, A. (2011b). Over expression of IL-10 by macrophages overcomes resistance to murine filariasis. In *Exp Parasitol*, Elsevier Inc., 90-96.

Specht, S., Volkmann, L., Wynn, T., Hoerauf, A. (2004). Interleukin-10 (IL-10) counterregulates IL-4-dependent effector mechanisms in Murine Filariasis. *Infect Immun* 6287-6293.

Spencer, L.A., Porte, P., Zetoff, C., Rajan, T.V. (2003). Mice genetically deficient in immunoglobulin E are more permissive hosts than wild-type mice to a primary, but not secondary, infection with the filarial nematode *Brugia malayi*. *Infect Immun* 71, 2462-2467.

Stewart, J.J., Lee, C.Y., Ibrahim, S., Watts, P., Shlomchik, M., Weigert, M., Litwin, S. (1997). A Shannon entropy analysis of immunoglobulin and T cell receptor. *Mol Immunol*, 1067-1082.

Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259-1260.

Taylor, M.D., Harris, A., Babayan, S.A., Bain, O., Culshaw, A., Allen, J.E., Maizels, R.M. (2007). CTLA-4 and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo. *J Immunol*, 4626-4634.

Literaturverzeichnis

- Taylor, M.D., Harris, A., Nair, M.G., Maizels, R.M., Allen, J.E. (2006). F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. *J Immunol*, 6918-6927.
- Taylor, M.D., LeGoff, L., Harris, A., Malone, E., Allen, J.E., Maizels, R.M. (2005). Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol* 174, 4924-4933.
- Taylor, M.J., Hoerauf, A., Bockarie, M. (2010). Lymphatic filariasis und onchocerciasis. *Lancet* 376, 1175-1185.
- Trujillo-Vargas, C.M., Werner-Klein, M., Wohlleben, G., Polte, T., Hansen, G., Ehlers, S., Erb, K.J. (2007). Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 336-344.
- van Riet, E., Hartgers, F.C., Yazdanbakhsh, M. (2007). Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology* 212, 475-490.
- Wang, Y., Jackson, K.J., Chen, Z., Gaëta, B.A., Siba, P.M., Pomat, W., Walpole, E., Rimmer, J., Sewell, W.A., Collins, A.M. (2011). IgE sequences in individuals living in an area of endemic parasitism show little mutational evidence of antigen selection. *Scand J Immunol* 73, 496-504.
- Westheide, W., Rieger, R. (2007). Nematoda, Fadenwürmer. In *Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und wirbellose Tiere*. Hrsg. Elsevier GmbH, München, 732-747.
- Wilson, M.S., Maizels, R.M. (2006). Regulatory T cells induced by parasites and the modulation of allergic responses. *Chem Immunol Allergy* 90, 176-195.
- Wohlleben, G., Trujillo, C., Muller, J., Ritze, Y., Grunewald, S., Tatsch, U., Erb, K.J. (2004). Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 16, 585-596.
- Wu, T.T., Kabat, E.A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132, 211-250.

Literaturverzeichnis

Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G., van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296, 490-494.

Zemlin, M., Klinger, M., Link, J., Zemlin, C., Bauer, K., Engler, J.A., Schroeder, H.W., Jr., Kirkham, P.M. (2003). Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures. *J Mol Biol*, 733-749.

Zemlin, M., Schelonka, R.L., Ippolito, G.C., Zemlin, C., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Nitschke, L., Pelkonen, J., Rajewsky, K., Schroeder, H.W., Jr. (2008). Regulation of repertoire development through genetic control of DH reading frame preference. *J Immunol* 181, 8416-8424.

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

in Marburg:

die Damen und Herren Adamkiewicz, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bien, Bolm, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eilers, Ellenrieder, Engenhardt-Cabilic, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geldner, Glorius, Görg C., Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Hadji, Hermann-Lingen, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Kann, Kill, Kim-Berger, Kircher, Klenk, Klose, Knipper, Koch, Köhler, Kolb-Niemann, Koolman, Krieg, Krüger, Leonhardt, Lill, Liss, Loew von, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Maisner, Mandrek, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Mooy de, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Petz, Plant, Pries, Ramaswamy, Rausch, Renz, Rey del, Richter, Roelcke, Rogosch, Röhm, Roeßler, Rolfes, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Sahmland, Schade, Schmidt, Schoner, Schu, Schwarz, Seitz, Sekundo, Stauth, Steiniger, Steinkamp, Stiller, Stempel, Suske, Teymoortasch, Vassiliou, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf, Wündisch, Yu, Zemlin, Zettl, Zovko.

in Bad Wildungen :

die Damen und Herren Bitter, Brather, Hohoff, Lotz, Tigiser.

in Frankenberg:

die Damen und Herren Berg, Cassebaum, Gabriel, Gratz, Kotzian, Ludolph, Wagner, Schmid, Zeier.

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rolf Felix Maier, dass er ausgezeichnete Rahmenbedingungen für diese Arbeit geschaffen und mir somit meine Dissertation ermöglicht hat.

Ich danke Dr. Sebastian Kerzel, Dr. Tobias Rogosch, Dr. Melanie Abrams und Prof. Dr. Michael Zemlin für die exzellente Betreuung in der AG Zemlin. Ich lernte hier wissenschaftliches Denken in einem herzlichen, menschlichen Rahmen. Jederzeit war jemand für mich da, wenn (so häufig) Hilfe nötig war. Ich bin stolz darauf von diesen Menschen gelernt zu haben.

Insbesondere danke ich Dr. Sebastian Kerzel für die intensive Unterstützung dieser Arbeit und all die guten Denkanstöße, die er mir gegeben hat.

Ich danke Sabine Jennemann und Regina Stöhr für die tatkräftige Hilfe beim Erlernen der Laborarbeit, die Motivation und gute Laune, die sie mir - wie vielen anderen Doktoranden zuvor - im Labor gegeben haben.

Ich danke meinen Eltern Jutta und Wilfried, meinen Schwestern Nadine, Imke und Dörte, sowie meiner Großmutter Erika, dafür, dass sie immer für mich da waren und da sind - ohne sie wäre ich nicht der geworden der ich heute bin und hätte nicht die Kraft und Ausdauer gehabt, diese Arbeit zu vollenden.

11. Publikationen

Kongressbeitrag (Poster-Präsentation):

Liebetruth, M., Rogosch, T., Gentil, K., Maier, R.F., Zemlin, M., Kerzel, S. Eine Infektion mit *L. sigmodontis* reduziert die allergische Atemwegsentzündung im murinen Asthma-Modell. Poster-Präsentation auf der 59. Jahrestagung der Süddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, 19.-21. März 2010, Marburg.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Rogosch, T., Kerzel, S., Sikula, L., Gentil, K., Liebetruth, M., Schlingmann, K.P., Maier, R.F., Zemlin, M. (2010). Plasma cells and nonplasma B cells express differing IgE repertoires in allergic sensitization. *J Immunol* 184, 4947-4954.