

**Bedeutung basophiler Granulozyten
für das Zustandekommen einer humoralen
Gedächtnisimmunantwort**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg-**



vorgelegt von

Andrea Johanna Denzel aus Sonthofen

Regensburg im Januar 2010

Promotionsgesuch eingereicht am:

12.01.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Matthias Mack

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Armin Kurtz

1. Gutachter: Prof. Dr. Richard Warth

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Mack

3. Prüfer: Prof. Dr. Jens Schlossmann

**Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2006 bis Januar 2010
in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums
Regensburg.**

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	9
1.1 Das Immunsystem.....	9
1.1.1 Angeborenes Immunsystem.....	9
1.1.2 Adaptives Immunsystem.....	9
1.2 Basophile Granulozyten.....	10
1.2.1 Phänotyp basophiler Granulozyten.....	10
1.2.2 Differenzierung von basophilen Granulozyten.....	11
1.2.3 Identifizierung basophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie.....	12
1.2.4 Stimulation und Aktivierungsmarker von basophilen Granulozyten.....	13
1.2.5 Rekrutierung von basophilen Granulozyten.....	14
1.3 Struktur und Funktion von Fc-Rezeptoren.....	15
1.3.1 Fc-Rezeptoren.....	15
1.3.2 Aufbau und Regulation des FcεRI.....	16
1.3.3 IgE-abhängige Signaltransduktion.....	18
1.4 Beteiligung basophiler Granulozyten an humanen Erkrankungen.....	19
1.4.1 Allergie.....	19
1.4.2 Infektion mit Helminthen.....	20
1.4.3 Autoimmunkrankheiten.....	22
1.5 Das immunologische Gedächtnis.....	22
1.6 Die T _H 2 Immunantwort.....	24
1.7 Basophile Granulozyten als antigenbindende Zellpopulation.....	25
1.8 Beschreibung der verwendeten Tiermodelle.....	26
1.9 Zielsetzung.....	28
2 Material und Methoden.....	30
2.1 Materialien und Geräte.....	30
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.2 Geräte.....	30
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	31
2.1.4 Puffer.....	32

2.1.5	Medienherstellung.....	33
2.1.6	Peptide und Stimulanzen.....	33
2.1.7	Antikörper	34
2.1.8	Sekundäre Antikörper	35
2.1.9	Microbeads.....	36
2.1.10	Enzyme.....	36
2.1.11	Kits	36
2.1.12	Primersonden.....	36
2.1.13	Software	37
2.1.14	Tiere und Haltung.....	37
2.1.15	Anästhesie und Antagonist.....	38
2.1.16	Herstellung des Adjuvans Aluminiumpräzipitat	38
2.1.17	Isolation des Pneumokokken Oberflächenproteins A (PspA).....	39
2.1.18	Statistik.....	39
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	40
2.2.1.1	Präparation von Zellsuspensionen.....	40
2.2.1.2	Präparation von murinen Splenozyten	40
2.2.1.3	Präparation von murinen Knochenmarkzellen.....	41
2.2.1.4	Durchführung einer Peritoneal-Lavage zur Präparation von murinen Peritonealzellen für die FACS-Analyse	41
2.2.1.5	Gewinnung von Blutzellen und Blutplasma aus Mäusen.....	42
2.2.1.6	Präparation von murinen Lymphknoten-Zellen für die FACS-Analyse	42
2.2.1.7	Antikörperfärbung: Oberflächenfärbung, intrazelluläre Färbung	43
2.2.2	Magentische Zellseparation (MACS).....	44
2.2.2.1	Prinzip MACS	44
2.2.2.2	Aufreinigung von murinen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen und CD19 ⁺ B-Zellen aus der Milz.....	46
2.2.2.3	Depletion muriner basophiler Granulozyten aus Knochenmark und Milz ..	47
2.2.2.4	Aufreinigung muriner basophiler Granulozyten aus dem Knochenmark	47
2.2.3	Durchflusszytometrie (FACS).....	48
2.2.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	48
2.2.3.2	FACS-Messung	51
2.2.3.3	Quantitative FACS-Messung mit Caltag Counting Beads.....	51

2.2.4	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	52
2.2.4.1	Prinzip ELISA	52
2.2.4.2	Zytokinnachweis mittels ELISA	54
2.2.4.3	Kombination aus Zellkultur und ELISA	55
2.2.4.4	Antigenspezifischer ELISA	56
2.2.5	Zellkultur	57
2.2.5.1	Quantifizierung und Vitalitätskontrolle	57
2.2.5.2	B-Zell-Proliferation	58
2.2.5.3	Kultivierung von CD4 ⁺ T-Zellen nach in vivo Restimulation	60
2.2.6	Molekularbiologische Methoden	60
2.2.6.1	RNA-Isolation	60
2.2.6.2	Reverse Transkription	62
2.2.6.3	Prinzip der Quantitativen Real-Time PCR	63
2.2.6.4	TaqMan-Assay	66
2.2.7	In vivo Methoden	67
2.2.7.1	Immunisierung	67
2.2.7.2	In vivo Depletion der basophilen Granulozyten / Behandlung der Mäuse mit MAR-1	69
2.2.7.3	Adoptiver Transfer von basophilen Granulozyten	70
3	Ergebnisse	72
3.1	Antigenbindung auf basophilen Granulozyten	72
3.1.1	Basophile Granulozyten können Antigene in vitro binden	72
3.1.2	In vivo Antigenbindung auf basophilen Granulozyten	75
3.2	Aktivierung basophiler Granulozyten	76
3.2.1	Aktivierung von basophilen Granulozyten in vitro	77
3.2.2	In vivo Aktivierung von basophilen Granulozyten	79
3.2.3	Antigen-Stimulation bei FcεRI- oder FcRγ-defizienten Mäusen	81
3.3	Einfluss basophiler Granulozyten auf B- und T-Zellen in vitro	84
3.3.1	Aktivierte basophile Granulozyten verstärken die B-Zell-Proliferation	84
3.3.2	Einfluss von basophilen Granulozyten auf T-Zellen in vitro	85
3.4	Basophile Granulozyten beeinflussen die B-Zell Antwort während einer Gedächtnisimmunreaktion	86
3.4.1	Eine Behandlung mit anti-FcεRI (MAR-1) führt zur Depletion von basophilen Granulozyten	86

3.4.2	Depletion von basophilen Granulozyten resultiert in einer geringeren Anzahl antigenspezifischer Plasma- und B-Zellen	93
3.4.3	Einfluss von basophilen Granulozyten auf die humorale Gedächtnisimmunantwort	94
3.4.3.1	Gedächtnisimmunantwort APC-immunisierter Mäuse	95
3.4.3.2	Gedächtnisimmunantwort PE-immunisierter Mäuse	96
3.4.4	Basophile Granulozyten haben während einer Primärantwort keinen Einfluss auf die Bildung antigenspezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper	98
3.4.5	Gedächtnisimmunantwort in Mastzell-defizienten W/W ^v -Mäusen	100
3.4.6	Gedächtnisimmunantwort in Mastzell-defizienten W ^{SH} -Mäusen	101
3.4.7	Gedächtnisimmunantwort PspA-immunisierter Mäuse	103
3.4.8	Einfluss basophiler Granulozyten bei einem Infektionsmodell	104
3.5	Antigenbindende basophile Granulozyten verstärken eine Gedächtnisimmunantwort	105
3.5.1	CFSE-Markierung	105
3.5.2	Adoptiver Transfer antigenspezifischer Zellen	107
3.5.2.1	Adoptiver Transfer mit Zellen aus APC-immunisierten Spendermäusen..	108
3.5.2.2	Adoptiver Transfer bei Balb/c Mäusen	110
3.6	Rekrutierung von basophilen Granulozyten bei einer Restimulation	112
3.6.1	Antigenspezifische basophile Granulozyten werden aus dem peripheren Blut in die Lymphknoten rekrutiert.....	112
3.6.2	Antigenbindung auf basophilen Granulozyten.....	115
3.6.3	Verteilung von Monozyten und Granulozyten nach einer Restimulation.....	118
3.6.4	Die Rekrutierung antigenspezifischer basophiler Granulozyten ist von der Anwesenheit antigenspezifischer Immunglobuline abhängig.....	121
3.6.5	Zytokinprofil CD4 ⁺ T-Zellen nach einer Restimulation	123
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	125
4	Diskussion	126
4.1	Aktivierung basophiler Granulozyten kann über die Bindung eines Antigens erfolgen.....	126
4.2	Basophile Granulozyten beeinflussen B- und T-Zellen	127
4.3	Basophile Granulozyten beeinflussen eine sekundäre humorale Immunantwort ..	128
4.3.1	Basophile Granulozyten benötigen antigenspezifische Antikörper	128
4.3.2	Depletion basophiler Granulozyten.....	129

4.3.3	In Abwesenheit basophiler Granulozyten findet eine verringerte Gedächtnisimmunantwort statt.....	130
4.3.4	Adoptiver Transfer von basophilen Granulozyten verstärkt die Immunantwort	131
4.4	Fehlende Beteiligung von Mastzellen an einer sekundären Immunantwort	131
4.5	Rekrutierung von basophilen Granulozyten nach einer Restimulation.....	132
4.6	Rolle basophiler Granulozyten während einer sekundären Immunantwort - eine Modellvorstellung	134
5	Zusammenfassung.....	136
6	Ausblick.....	138
7	Literaturverzeichnis.....	139
8	Abbildungsverzeichnis	146
9	Anhang	148
9.1	Danksagung.....	148
9.2	Publikationen.....	150

Abkürzungsverzeichnis

A ₄₅₀	Absorption bei 450 nm
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Diammoniumsalz
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
APC	Allophycocyanin
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL	CC-Motiv-Chemokin
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i> ; Oberflächenmerkmale von Zellen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidylester
CRACM1	<i>Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ molecule 1</i>
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
Cy5.5	Cyanin 5.5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
E-NPP3	Ektonukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3 (CD203c)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. und andere)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAM	6-FAM-phosphoramidit, Fluoreszenzfarbstoff der TaqMan-Sonden
Fc	<i>fragment crystallizable</i> , konstanter Anteil eines Immunglobulins
FcR γ	Fc Rezeptor γ -kette
Fc γ RIII	niedrigaffiner IgG-Rezeptor
Fc ϵ RI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum

FL	Detektionskanal eines Durchflusszytometers
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward side scatter</i>) im Durchflusszytometer
GALT	<i>gut associated lymphatic tissue</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulation factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosin-based activation motif</i>
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
KM	Knochenmark
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2)</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	Boten-(<i>messenger</i> -)Ribonukleinsäure
NA/LE	<i>no azid/low endotoxin</i>
NCBI	<i>National Centers for Biotechnology Information</i>
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Psp A	Pneumokokken Oberflächenprotein A (<i>pneumococcal surface protein A</i>)
RANTES	reguliert durch Aktivierung normaler T-Zellen exprimiert und sezerniert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	Farbstoff von TaqMan-Sonde
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
s.c.	subkutan
SEM	mittlerer Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SHIP	SH2-beinhaltende Inositol Phosphatase
SN	Überstand (<i>supernatant</i>)
SPF	spezifisch Pathogen frei, Barrierehaltung
src	<i>sarcoma</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward side scatter</i>) im Durchflusszytometer
STIM	Stromal interagierendes Molekül
syk	<i>spleen tyrosin kinase</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i> , Polymerase
TCR	T-Zell Rezeptor
T _H 2	T-Helfer-Zelle Typ 2
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSLP	thymisches Stromal Lymphopoeting
U	Unit
vol/vol	Volumen pro Volumen
wt/vol	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Funktion des Immunsystems ist bei allen Säugetierarten hoch konserviert. Das Immunsystem kann zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem unterschieden werden und übernimmt die Aufgabe der Erkennung zwischen Eigen- und Fremdproteinen.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem richtet sich gegen eine Vielzahl verschiedener Erreger. Vor allem zelluläre Bestandteile der Erreger lösen eine Immunantwort aus. Zellen wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten erkennen diese als PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*)-bezeichnete Strukturen mit Hilfe einer großen Anzahl als PRR (*pattern recognition receptor*)-bezeichneten Rezeptoren. Die Mikroorganismen werden phagozytiert und intrazellulär abgetötet. Für die Zytotoxizität sind auch natürliche Killerzellen verantwortlich, die Veränderungen auf der Zelloberfläche erkennen und so zum Beispiel von einem Virus befallene Zellen abtöten. Zytokine, Interferone und die Proteine des Komplementsystems sind weitere wichtige Mediatoren dieses Prozesses.

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive oder erworbene Immunsystem ist für die spezifische Abwehrreaktion gegen Antigene verantwortlich. Durch die enorme Vielfalt ihrer Rezeptoren spielen hierbei die B- und T-Zellen die wichtigste Rolle bei der Antigenerkennung und -Abwehr. Antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen können Proteinfragmente endogener und exogener Antigene auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) der Klasse I und II auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Das Antigen wird dafür über Endozytose oder Phagozytose aufgenommen und intrazellulär prozessiert. T-Zellen können MHC-präsentierte Fragmente erkennen und induzieren unter anderem durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen eine Immunantwort.

1.2 Basophile Granulozyten

Die Bedeutung basophiler Granulozyten für das Zustandekommen einer adaptiven Immunantwort wurde erst kürzlich erkannt ^{1,2} und war aufgrund der geringen Zahl und kurzen Lebensdauer von basophilen Granulozyten lange unterschätzt.

1.2.1 Phänotyp basophiler Granulozyten

Granulozyten werden nach den Färbungseigenschaften in der Giemsa-Färbereaktion in drei Gruppen unterteilt. Zusammen mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten bilden die basophilen Granulozyten die Leukozytensubpopulation der Granulozyten. Basophile Granulozyten stellen dabei die kleinste Gruppe der Granulozyten im Blut mit ca. 0,1-1% der Leukozyten dar. Typische Merkmale basophiler Granulozyten sind der Einschluss vieler ungleichmäßiger Granula im Zytoplasma und die gelappte Form des Zellkerns (Abbildung 1). Die Granula beinhalten Mediatoren wie Histamin, Heparin oder Leukotriene C₄ und können mit positiv geladenen basischen Farbstoffen (z.B. Methylenblau oder Hemotoxylit) angefärbt werden. Murine basophile Granulozyten besitzen weniger basophile Granula als humane Zellen ³.

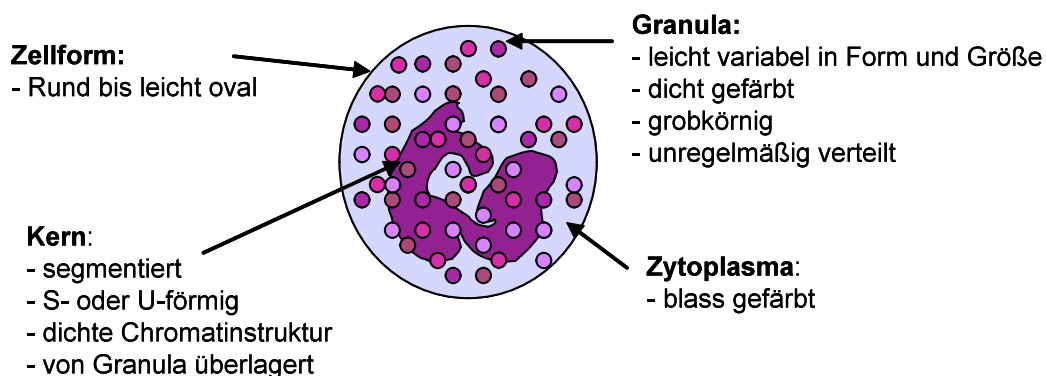


Abbildung 1: Schematischer Aufbau basophiler Granulozyten

(verändert nach Annette Steiger und Dr. Roman Fried)

Die erste Beschreibung basophiler Granulozyten erfolgte vor 130 Jahren durch Paul Ehrlich ⁴ als seltene, zirkulierende Granulozyten. Sie werden aus hämatopoietischen Vorläuferzellen gebildet und verlassen nach vollständiger Reifung das Knochenmark. Basophile Granulozyten sind mit einer Halbwertszeit von ca. 60 h kurzlebige Zellen ⁵,

die in allen Vertebraten auftreten. Bei basophilen Granulozyten ist im Vergleich zu anderen Granulozytenpopulationen die Fähigkeit zur Phagozytose und zur Bildung proteolytischer Enzyme sehr gering. Sie sind unter basalen Konditionen im peripheren Blut, in der Milz, im Knochenmark und in geringem Maß in der Leber nachweisbar.

1.2.2 Differenzierung von basophilen Granulozyten

Zwischen basophilen Granulozyten und Mastzellen bestehen gewisse Ähnlichkeiten. Mastzellen haben ebenfalls Granula mit ähnlichen Inhaltsstoffen und sind während einer allergischen Reaktion in Geweben anzutreffen. Lange Zeit ist die Theorie vertreten worden, dass basophile Granulozyten und Mastzellen aus der gleichen Vorläuferzelle entstehen⁶. Mittlerweile ist man der Ansicht, dass sich basophile Granulozyten und Mastzellen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entwickeln, die sich wiederum deutlich von FcεRI⁻ eosinophilen Granulozyten-Vorläuferzellen unterscheiden⁷. Wie alle Leukozyten entwickeln sich auch basophile Granulozyten aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark. Diese besitzen eine langzeitige pluripotente Erneuerungseigenschaft und sind negativ für den Marker CD34 (*cluster of differentiation 34*). Aus hämatopoietischen Stammzellen entwickeln sich multipotente CD34⁺ Vorläuferzellen, die für die Differenzierung der lymphoiden oder myeloiden Zell-Linien verantwortlich sind⁸. Lymphoide Zellen kann man anhand der Marker IL-7Rα⁺ Lin⁻ Sca-1^{niedrig} cKit^{niedrig} von den Lin⁻ Sca-1⁻ cKit⁺ myeloiden Vorläuferzellen für Granulozyten, Monozyten und Megakaryozyten unterscheiden^{9,10}. Der Transkriptionsfaktor PU.1 induziert die Differenzierung zu Vorläuferzellen für Granulozyten oder Mastzellen, wohingegen der Transkriptionsfaktor GATA-1 die Differenzierung der Vorläuferzellen für Erythrozyten oder Megakaryozyten einleitet.

Einige Gruppen favorisierten die Theorie einer gemeinsamen Vorläuferzelle für basophile und eosinophile Granulozyten^{11,12}. Dagegen spricht jedoch das Vorhandensein spezifischer Oberflächenmarker für basophile Granulozyten und Mastzellen, die bei eosinophilen Granulozyten nicht exprimiert werden. So sind zum Beispiel die Oberflächenmarker FcεRI, CD203c (Ektonukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3, E-NPP 3), β7-Integrin und T1/ST2 (Interleukin-33-Rezeptor) auf basophilen Granulozyten und Mastzellen detektierbar⁸. Der Marker β7-Integrin ist jedoch bei basophilen Granulozyten weniger stark

exprimiert als bei Mastzellen und dient als Unterscheidungskriterium für die Identifizierung von Mastzellen^{8,13}. Ein weiterer Transkriptionsfaktor gab Hinweise auf die Differenzierung von basophilen Granulozyten. Das *CCAAT-enhancer binding protein* α (C/EBP α) ist für die Differenzierung der Vorläuferzellen von basophilen Granulozyten und Mastzellen essentiell. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Transaktivierung der Myeloperoxidase und des Rezeptors für den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF)¹⁴. In basophilen Granulozyten kann ein hohes Expressionsniveau dieses Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden¹⁵. Die Wirkung von C/EBP α wird vom Transkriptionsfaktor GATA-2 moduliert, der für die Entwicklung von Megakaryozyten und Erythrozyten der Hauptregulator ist. Wird GATA-2 vor C/EBP α exprimiert, so bleibt selbst eine hohe Konzentration von C/EBP α ohne Wirkung¹⁵. Vorläuferzellen von Mastzellen exprimieren GATA-2, nicht jedoch die Vorläuferzellen von Granulozyten. Die Reihenfolge und die Konzentration der Expression von C/EBP α und GATA-2 sind für die Entstehung von basophilen oder eosinophilen Granulozyten verantwortlich¹⁵.

1.2.3 Identifizierung basophiler Granulozyten mittels

Durchflusszytometrie

Die Identifizierung von basophilen Granulozyten wird aufgrund der Ähnlichkeit zu Mastzellen erschwert. Aufgrund mittlerweile identifizierter spezifischer Marker können sie mit Hilfe der Durchflusszytometrie von anderen Zelltypen unterschieden werden. Basophile Granulozyten zeigen in der Durchflusszytometrie eine etwas stärkere Granularität als Lymphozyten. Zudem sind sie positiv für die Oberflächenmarker CD49b und Fc ϵ RI^{16,17}. Murine basophile Granulozyten zeichnen sich durch eine niedrige Expression des Pan-Leukozytenmarkers CD45 aus. Außerdem exprimieren sie den CD40-Liganden, der eine B-Zell-Proliferation induziert¹⁸. In 4get-Mäusen, die in Zellen mit Interleukin- (IL-) 4-Produktion eine gleichzeitige GFP-Expression aufweisen, zeigen basophile Granulozyten eine deutliche Fluoreszenz für GFP (*green fluorescent protein*)¹⁷. Humane basophile Granulozyten können über den IL3-R (CD123) oder nach einer Aktivierung über die Oberflächenmarker CD63 und CD203c identifiziert werden. Für den Mastzellmarker cKit und den Marker neutrophiler Granulozyten GR1 sind basophile Granulozyten negativ.

1.2.4 Stimulation und Aktivierungsmarker von basophilen Granulozyten

Mehrere Stimulatoren, wie Interleukin-(IL-)3¹⁹, IL-5 und der Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) können basophile Granulozyten aktivieren. Eine erfolgreiche Stimulation basophiler Granulozyten kann über die Sekretion von Histamin, IL-4 oder IL-6²⁰ nachgewiesen werden, wobei basophile Granulozyten mehr IL-4 als T-Helfer-Zellen freisetzen^{16,17,21,22}.

IL-3 ist einer der wichtigsten Stimulatoren basophiler Granulozyten. Die Abwesenheit von IL-3 in IL-3^{-/-}-defizienten Mäusen beeinflusst jedoch die Zahl basophiler Granulozyten^{7,23,24} unter basalen Bedingungen nicht. Das Zytokin IL-3 kann sowohl die Anzahl der hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf einem höheren Niveau regulieren²⁵, als auch basophile Granulozyten vor einer Kaspase-regulierten Apoptose schützen, indem es die Schnittstelle der Kaspase-3 auf bcl-2 blockiert⁷. Außerdem ist IL-3 für die optimale Mobilisierung und das Überleben der basophilen Granulozyten nach einer Parasiteninfektion im Gewebe verantwortlich. IL-3 spielt bei Krankheitsmodellen wie kollagen-induzierter Arthritis eine entscheidende Rolle in der Initialphase, da eine Blockierung des Zytokins zu einer Verringerung des Antikörpertiters im Plasma, einer Verringerung der Zahl basophiler Granulozyten im peripheren Blut und einer Verbesserung der Arthritis führt. In der Spätphase der Erkrankung spielt die Blockierung von IL-3 jedoch keine Rolle für den Krankheitsverlauf oder die Zytokinausschüttung²⁰.

Die Interleukine der IL-1-Zytokin-Familie sind weitere Stimulatoren. IL-18 stimuliert basophile Granulozyten zur Sekretion von Zytokinen nach einer Infektion mit Helminthen oder Exposition mit Papain²⁶. Außerdem konnte der IL-18α-Rezeptor auf basophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Nach einer Inkubation mit IL-33 sezernieren basophile Granulozyten die T_H2-spezifischen Interleukine IL-4 und IL-13¹⁷. IL-33 ist der natürliche Ligand des T1/ST2-Rezeptors, der auf Mastzellen und T_H2-Zellen exprimiert wird²⁷.

Eine Zytokin-Ausschüttung ist auch für die Stimulation mittels IL-1, IL-5 und IL-8 beschrieben. Eine wirkungsvolle Stimulation basophiler Granulozyten ist auch die Bindung eines Antigens. Sowohl parasitäre Antigene²⁴, als auch proteolytische

Enzyme wie Papain²⁸ oder einfache Fremdproteine wie Allophycocyanin^{1,29} können eine Zytokin-Ausschüttung bewirken. Dabei werden über spezifische oder unspezifische Bindungen Immunglobuline und damit IgE- oder IgG-Rezeptoren auf der Oberfläche vernetzt. Dies löst eine Signaltransduktion aus^{21,30}. Weitere Stimuli sind zum Beispiel die Chemokine CCL-2, CCL-11 und CCL-5, oder CXCL-8, CXCL1-3 oder die Komplementfaktoren C5a und C3a³⁰, wobei aktivierte basophile Granulozyten entsprechende Rezeptoren exprimieren⁷.

Für basophile Granulozyten sind einige Aktivierungsmarker bekannt. Bei Aktivierung von humanen basophilen Granulozyten werden die Oberflächenmarker CD63 und CD203c stärker exprimiert. CD63 ist der Marker für das granuläre Protein Tetraspanin, das auf Monozyten, Makrophagen und basophilen Granulozyten nachweisbar ist³¹. Der Oberflächenmarker CD203c auf humanen basophilen Granulozyten weist das transmembrane Ektoenzym E-NPP3 nach und wird wie CD63 bei einer Degranulierung von basophilen Granulozyten nach Aktivierung verstärkt exprimiert³². Eine Aktivierung von basophilen Granulozyten kann auch über Protein-Antigene, wie zum Beispiel Allophycocyanin, stattfinden. Diese Aktivierung folgt dem Fc-abhängigen (vor allem dem hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI) Signalweg, wobei die Anwesenheit antigenspezifischer Immunglobuline der IgE Klasse absolut notwendig ist¹.

Ein Merkmal für die Aktivierung basophiler Granulozyten ist auch die Freisetzung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF), der die vaskuläre Permeabilität zehntausendfach stärker als Histamin erhöht. Basophile Granulozyten stellen eine Hauptquelle für PAF dar³³. Nach einer Stimulation erfolgt die rasche Freisetzung von IL-4, so dass basophile Granulozyten in der Frühphase einer Gedächtnisimmunreaktion im Wesentlichen für die IL-4-Produktion verantwortlich sind. In der Spätphase übernehmen andere Zellen, insbesondere CD4⁺ T-Zellen die Produktion von IL-4³⁴.

1.2.5 Rekrutierung von basophilen Granulozyten

Über die Migration von basophilen Granulozyten während einer Immunantwort ist bislang wenig bekannt. Unter basalen Bedingungen treten basophile Granulozyten im Knochenmark und der Milz auf und zirkulieren in der Blutbahn. Bei allergischen

Reaktionen und bei der Abwehr parasitärer Erreger findet eine Migration der basophilen Granulozyten zum Entzündungsort in den Geweben statt. Bei einer allergischen Entzündung konnte in der Spät-Phase eine Rekrutierung von basophilen Granulozyten ins Gewebe einer allergischen Entzündung beobachtet werden ^{2,7,20,23}. Außerdem wurde berichtet, dass basophile Granulozyten vier Tage nach der Injektion von Papain in geringer Konzentration (0,03%) in den Lymphknoten nachweisbar waren, nach weiteren 24 h jedoch aus den Lymphknoten verschwanden. In der T-Zell-Zone der Lymphknoten befinden sich basophile Granulozyten, nachdem Mäuse mit der allergenen Protease Papain, die basophile Granulozyten direkt aktivieren kann, immunisiert wurden ^{28,35}. Aber auch andere Antigene induzieren eine Migration basophiler Granulozyten in die Lymphknoten und Gewebe ^{14,20,36}. Zudem wurde gezeigt, dass aus dem Knochenmark isolierte basophile Granulozyten das *lymphnode-homing*-Molekül CD62L (CD34) exprimieren ^{33,37}. Basophile Granulozyten besitzen demnach die Fähigkeit zur Wanderung in die Lymphknoten.

Im Knochenmark wurde ein weiterer Effekt beobachtet, bei dem die Zahl der basophilen Granulozyten nach einer Infektion mit *Nippostrongylus* Würmern anstieg. Ob die vermehrte Zellzahl auf eine erhöhte Produktion, eine Rekrutierung oder auf eine längere Lebensdauer der Zellen zurückzuführen ist, blieb jedoch ungeklärt ³⁸. Die Stimulation der Migration basophiler Granulozyten ist in der Literatur erwähnt. Basophile Granulozyten werden durch Prostaglandin D₂ (PGD₂) oder dem PGD₂-Agonisten Indomethacin bei einer Chemotaxis-Untersuchung angezogen ³⁹. Eine Stimulation mit IL-3 induzierte *in vitro* eine Bindung basophiler Granulozyten an humane Endothelien. Dabei wurde sowohl eine Zunahme des „rolling“ als auch der Adhärenz beschrieben ⁴⁰. Der genaue Ablauf der Rekrutierung und Migration basophiler Granulozyten ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.3 Struktur und Funktion von Fc-Rezeptoren

1.3.1 Fc-Rezeptoren

Es gibt fünf verschiedene Fc-Rezeptoren, die nach ihrer Spezifität für die schweren Ketten der Immunglobulin Isotypen eingeteilt werden. Zudem können mehrere

Varianten eines Rezeptors auftreten, die in der Affinität zu den Liganden variieren. Die Fc-Rezeptoren Fc α R, Fc ϵ R und Fc γ R sind sehr gut untersucht und sind die Rezeptoren für IgA, IgE und IgG. Die Rezeptoren für IgM (Fc μ R) und IgD (Fc δ R) sind beim Menschen nachgewiesen, die Identifizierung der DNA-Sequenz ist indessen für den Fc μ R erst 2009⁴¹ und für den IgD-Rezeptor noch nicht gelungen. Fc-Rezeptoren sind auf allen Zellen des Immunsystems exprimiert und stellen die Verbindung von humoraler Antigen-Antikörper-Interaktion und zellulärer Effektorfunktion dar.

1.3.2 Aufbau und Regulation des Fc ϵ RI

Der erwähnte hochaffine IgE-Rezeptor Fc ϵ RI besteht aus drei Untereinheiten, jeweils einer α - und β -Untereinheit und einem Paar aus Disulfid gebundenen γ -Untereinheiten (Abbildung 2). Dieser Rezeptor wird beim Menschen auf allen Granulozyten wie auch in geringem Maß auf Monozyten, dendritischen Zellen und Langerhans Zellen exprimiert. Von der Expression auf glatten Muskelzellen⁴² und Nervenzellen⁴³ wurde berichtet. Im Gegensatz zu murinen Zellen konnte Fc ϵ RI auf humanen Zellen ohne β -Untereinheit nachgewiesen werden⁴⁴. Die Erhaltung der Funktionalität wird bei humanen Fc ϵ RI durch die extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit ermöglicht. Beim Menschen ist das Verhältnis von Fc ϵ R- β zu Fc ϵ R- α variabel⁴⁵. Fc ϵ R- β besitzt eine bessere Chaperon-Funktion als Fc ϵ R- γ , die Fc ϵ R- α vor Degradation während der Internalisierung schützt²⁵. Wie bei B- und T-Zell-Rezeptoren trägt der intrazelluläre Anteil des Rezeptors ein Immunrezeptor-Tyrosin-basierendes Aktivierungsmotiv (ITAM).

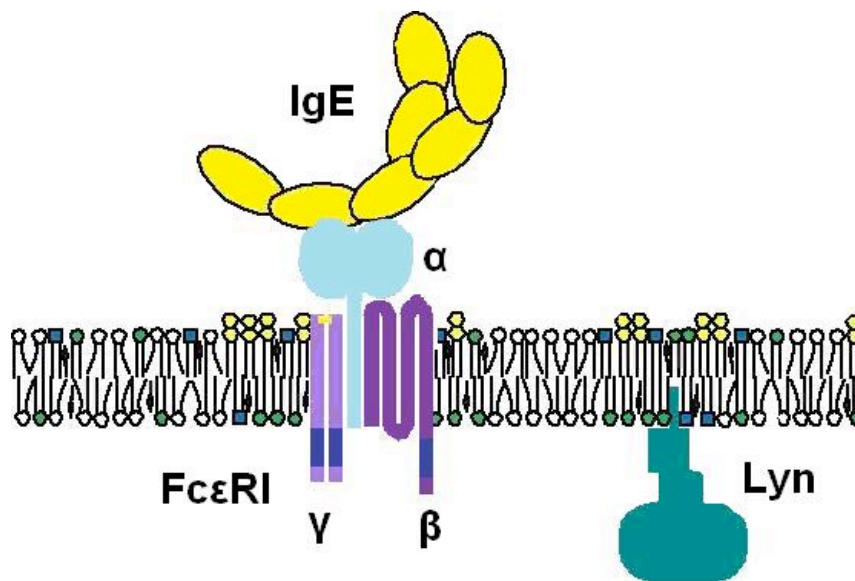


Abbildung 2: FcεRI mit gebundenem IgE

Der IgE-Rezeptor FcεRI ist in der Zellmembran aus unterschiedlichen Lipidmolekülen verankert und kann IgE (gelb) binden. Die α-Domäne (hellblau) ragt extrazellulär aus der Membran. β- (dunkel violett) und γ- (hell violett) Domänen besitzen intrazelluläre ITAMs (dunkel blau). Die *Lyn*-Kinase befindet sich in unmittelbarer Nähe. (verändert nach Erin Sheets, Pennsylvania State University)

Die Halbwertszeit eines ungebundenen Rezeptors auf der Zelloberfläche ist mit 24 h relativ kurz ⁴⁶, gebundene Rezeptoren werden dagegen länger auf der Oberfläche stabilisiert. Die Anwesenheit von IL-3 verringert zudem die Degradation internalisierter Rezeptoren und unterstützt eine wiederholte Präsentation an der Zelloberfläche ²⁵. In Mäusen wurde von einer IL-10-abhängigen Regulation des FcεRI berichtet ⁴⁷.

Auf Transkriptionsebene erfolgt die Regulation durch die Transkriptionsfaktoren PU.1 und E1f-1. Der Faktor PU.1 unterstützt die Transkription von FcεR-α, wohingegen E1f-1 die Promotor-Aktivität von FcεR-α hemmt, indem E1f-1 mit PU.1 um die Bindungsstellen im FcεR-α Promotor konkurrieren ⁴⁸. Bei immunisierten Wildtyp Mäusen wurde eine zehnfach höhere Konzentration von IgE im Plasma gemessen. In Mastzellen wurde eine verstärkte Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors auf der Zelloberfläche durch diese IgE-Moleküle ermöglicht ⁴⁹.

1.3.3 IgE-abhängige Signaltransduktion

Wie bereits erwähnt besitzen basophile Granulozyten den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI. Bei einer Bindung zwischen IgE aus dem Serum und dem IgE-Rezeptor wird die Endozytose des FcεRI verhindert und die Lebensdauer auf der Zelloberfläche verlängert. Die Zahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird daraufhin erhöht. Diese Stabilisierung ist unabhängig von der weiteren Signaltransduktion, da das Fehlen der syk-Kinase (*spleen tyrosin kinase*) und der Kinasen aus der src-Familie diesen Effekt nicht beeinflussen²⁵.

Auf der intrazellulären Domäne der β-Untereinheit des humanen FcεRI befindet sich ein ITAM-Motiv. Dieses Motiv besitzt eine Tyrosin-X-X-Leucin (YXXL) -Sequenz als Phospho-Akzeptorstelle, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht und die Unterbrechung sieben bis zwölf Aminosäuren lang sein kann. Durch die simultane Phosphorylierung mittels Tyrosin-Kinasen der src- (*sarcoma*-)Familie werden syk-Kinasen aktiviert. Die Kinase *Lyn* ist dabei für die Initiierung des Signals verantwortlich, indem sie eine Transphosphorylierung der benachbarten β-Untereinheit ermöglicht. Die Phosphorylierung führt zu einer Verstärkung der *Lyn*-Aktivität, so dass anschließend auch die γ-Untereinheit des FcεRI phosphoryliert wird. Daraufhin folgt eine Rekrutierung und Aktivierung der syk-Kinase. Die Aktivität von *Lyn* wird in murinen Zellen durch weitere Kinasen der src-Familie reguliert. *Fyn* besitzt eine stärkere Aktivität als *Lyn*^{25,50}, wird jedoch von *Lyn* negativ reguliert. Dagegen hat *Hck*, ebenfalls eine Kinase der src-Familie, einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von *Lyn*, wobei die Inhibition von *Fyn* verringert wird⁵¹. Die Anzahl der Kinasen und zum Teil deren Bedeutung ist in den verschiedenen Spezies unterschiedlich²⁵ und bedarf noch weiterer Aufklärung.

Für die IgE-abhängige Signaltransduktion sind weitere Faktoren notwendig. Der Gehalt des intrazellulären Kalziums muss für eine erfolgreiche Signalweiterleitung erhöht sein. Dabei reguliert das Stromal-interagierende Molekül 1 (STIM1) als Sensorprotein des endoplasmatischen Retikulums den Kalziumeinstrom durch den Kalzium-Kanal CRACM1 (*Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ molecule 1*) in Mastzellen⁵². Das Protein SHIP (SH2-beinhaltenende Inositol Phosphatase) scheint ebenfalls die Signaltransduktion zu beeinflussen, da SHIP-*knockout*-Mäuse eine leicht induzierbare Degranulierung von Mastzellen aufweisen²⁵.

Eine Signalweiterleitung vermittelt die Degranulierung und Ausschüttung der Mediatoren, sowie die Sezernierung von Zytokinen.

1.4 Beteiligung basophiler Granulozyten an humanen Erkrankungen

Bei diversen Krankheiten ist die Zahl aktivierter basophiler Granulozyten von Bedeutung. Die Zahl basophiler Granulozyten ist bei Arzneimittel- oder Nahrungsmittel-Überempfindlichkeit⁵³, Urtikaria⁵⁴, rheumatoider Arthritis oder nach Splenektomie im Blut erhöht.

Im folgenden Abschnitt wird die Bedeutung basophiler Granulozyten bei einigen humanen Erkrankungen bzw. murinen Krankheitsmodellen vorgestellt.

1.4.1 Allergie

Basophile Granulozyten wurde lange Zeit vor allem im Bezug auf allergische Reaktionen untersucht^{55,56}. Zusammen mit Mastzellen sind basophile Granulozyten die Hauptakteure einer Allergie. Ihre Bedeutung im Verlauf einer allergischen Reaktion ist relativ gut verstanden.

Als Allergie wird eine immunologische Reaktion auf normalerweise harmlose Umweltstoffe bezeichnet. Stoffe in Nahrungsmitteln oder Kontaktallergene sind weit verbreitete Auslöser, die schon im Nanogrammbereich eine Reaktion vermitteln. Die Überempfindlichkeitsreaktion ist HLA-assoziiert und durch einen erhöhten IgE-Gehalt, der aber vor allem gebunden vorliegt, gekennzeichnet. Antikörper der IgE Klasse sind hauptsächlich für die Abwehr von Wurm- und Parasitenbefall verantwortlich. Es wird vermutet, dass ein Rückgang des Parasitenbefalls das Immunsystem auf harmlose Strukturen wie Nahrungsmittel oder Pflanzenpollen lenkt⁵⁷. In der Sensibilisierungsphase einer Allergie wird das Allergen über dendritische Zellen aufgenommen und über MHC-II Moleküle den T-Zellen präsentiert. B-Zellen können nach dem Allergenkontakt auf aktivierte T-Helfer-Zellen treffen. Dies führt zu einer Produktion und Sezernierung von Zytokinen und IgE-Antikörpern. Das IgE bindet auf Mastzellen und basophilen Granulozyten an den hochaffinen IgE-Rezeptor

FcεRI, so dass es nach Antigen-Kontakt zu einer Quervernetzung der IgE-Rezeptoren kommt.

Die allergische Reaktion bedarf bei erneutem Kontakt mit dem Allergen in der Effektorphase eine Kreuzvernetzung monomerischer IgE-Moleküle auf der Zelloberfläche. Diese Kreuzvernetzung führt zu einer Degranulierung und Ausschüttung der Entzündungsmediatoren aus Mastzellen und basophilen Granulozyten. Die Mediatoren sind unter anderem Histamin, Proteasen, Chemokine wie RANTES (reguliert durch Aktivierung normaler T-Zellen, exprimiert und sezerniert) und Eotaxin, aber auch Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)-α, GM-CSF und die T_H2-typischen Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. So sind basophile Granulozyten z.B. bei einer allergischen Entzündung der Atemwege die Hauptproduzenten für IL-4⁵⁸. Die Freisetzung dieser Mediatoren führt zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, einer Erschlaffung der glatten Muskelzellen und zum Teil einer Stimulation *kutaner* Nervenendigungen. Eine positive Rückkopplung der allergischen Reaktion erfolgt durch die Hochregulation des CD40-Liganden auf basophilen Granulozyten^{55,59}, die IL-4-Sekretion und die vermehrte Expression des IgE-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Allergen-spezifische T-Zellen, die eine chemotaktische Rekrutierung von Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten an den Entzündungsort veranlassen, werden in der Spätphase der allergischen Reaktion aktiviert. Basophile Granulozyten wurden für die Entwicklung einer IgE-vermittelten chronischen allergischen Entzündung im Mausmodell beschrieben¹⁸.

Die Anaphylaxis ist eine Steigerung der allergischen Reaktion, bei der Spuren des Antigens eine spontane und fatale systemische Reaktion auslösen. Basophile Granulozyten haben jedoch eher über den IgG-vermittelten Signalweg einen Einfluss auf eine anaphylaktische Reaktion. In Mäusen können basophile Granulozyten eine systemische Anaphylaxis über die FcγR-vermittelte Aktivierung und die Freisetzung des Plättchen aktivierenden Faktors (PAF) induzieren³³

1.4.2 Infektion mit Helminthen

Eine weitere Funktion basophiler Granulozyten ist die Abwehr parasitärer Erreger²⁴. Die immunologische Reaktion bei einer Infektion mit Helminthen ist ein

Zusammenspiel aus angeborenem und adaptivem Immunsystem. Helminthen induzieren eine starke T_H2 -Antwort, die durch einen hohen IgE-Gehalt und eine vermehrte Anzahl an T_H2 -Zellen, Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten charakterisiert ist. Basophile Granulozyten können nach einer Infektion mit Helminthen schnell mobilisiert und zum Infektionsort rekrutiert werden. Die erste Aktivierung von basophilen Granulozyten erfolgt über die Erkennung von pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) oder durch Zytokin-Freisetzung von Komponenten des angeborenen Immunsystems²⁸. Das Chitin, eine strukturelle Komponente der Würmer, ist ein weiterer möglicher Aktivierungsmechanismus während der Helminthen-Infektion, weil es die Rekrutierung basophiler Granulozyten ins Gewebe induziert³⁶. Von Helminthen stammende Proteasen können basophile Granulozyten direkt aktivieren und verursachen eine Histamin-Ausschüttung und IL-4 Produktion²⁸. Die Wirkung der Proteasen ist jedoch von der Helminthenart abhängig. Die T_H2 -assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13, die nicht nur von basophilen Granulozyten sondern auch von T-Zellen oder Mastzellen produziert werden können, sind sowohl bei der Initiierung als auch bei der effektiven Abwehr der Helminthen beteiligt⁶⁰. Basophile Granulozyten sind sogar die Hauptverantwortlichen der IL-4-Sekretion nach einer parasitären Infektion im Mausmodell¹⁶. Die Prozessierung und Präsentation des Antigens über MHC-II Moleküle wurde in basophilen Granulozyten während einer Infektion mit dem Peitschenwurm *Trichuris muris* untersucht. Die Anwesenheit basophiler Granulozyten war dabei für eine Abwehr gegen diese Helminthen notwendig und die Anwesenheit von dendritischen Zellen alleine nicht ausreichend⁶¹. In anderen Studien wurde jedoch die Hilfe von dendritischen Zellen für die protektive Abwehr gegen Helminthen benötigt⁶². Mehrere Faktoren regulieren die Abstoßung der Helminthen. Die Produktion der T_H2 -typischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 durch basophile Granulozyten spielt dabei eine besondere Rolle. IL-5 erhöht die Mobilität von eosinophilen Granulozyten und stimuliert ihre Wanderung aus dem Knochenmark. Für den Schutz vor Parasiten sind hingegen die Zytokine IL-4 und IL-13 verantwortlich. Dieser wird durch die Bindung der Zytokine IL-4 und IL-13 an den Rezeptor gewährleistet, indem der Transkriptionsfaktor Stat6 aktiviert wird und nach einer Translokation in den Zellkern die Expression von Effektormolekülen reguliert. So ist Stat6 für die Differenzierung von alternativ aktivierten Makrophagen und deren Enzymproduktion verantwortlich. Die IL-4/IL-13-abhängigen Mechanismen führen zu einer Störung der Parasiten im Darmtrakt, so dass der Ausstoß der

Helminthen erleichtert wird²⁸. Basophile Granulozyten nehmen folglich eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung parasitärer Erreger durch das Immunsystem ein.

1.4.3 Autoimmunkrankheiten

Autoimmunerkrankungen werden als immunologische Reaktion gegen körpereigene Antigene definiert. Die Komponenten des Immunsystems sind dabei nicht in der Lage, das Antigen aus dem Körper zu entfernen, so dass eine chronische Entzündungsreaktion mit massiver Gewebeschädigung entstehen kann. Als Beispiel für eine systemische Autoimmunerkrankung wird hier die Rolle basophiler Granulozyten für den Krankheitsverlauf einer rheumatoiden Arthritis vorgestellt.

Insbesondere IL-1, IL-6 und der Tumornekrosefaktor (TNF)- α sind in den betroffenen Geweben verstärkt vorhanden. Bei Mäusen kann eine Arthritis durch die Immunisierung mit Typ II Kollagen induziert werden und ist durch synoviale Hyperplasie und Infiltration von Zellen in das Gewebe gekennzeichnet. Der Prozess ist dabei IgG- und Fc γ R-abhängig. Eine Aktivierung von basophilen Granulozyten über IgE führte zu einer Verschlimmerung des Krankheitsverlaufes⁶³. Eine Stimulierung basophiler Granulozyten über IL-3 induziert die Sezernierung von IL-4 und IL-6 und führt zur Verstärkung der Arthritis²⁰. IL-3 wird von aktivierten kollagen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen produziert und kann basophile Granulozyten sehr effektiv aktivieren. Die Behandlung der Mäuse mit einem blockierenden IL-3-Antikörper in der Frühphase der Erkrankung führt zu einer Verbesserung des Entzündungsprozesses im Synovialgewebe und einer Reduzierung basophiler Granulozyten im Blut. Außerdem wurde gezeigt, dass in der Frühphase einer kollagen-induzierten Arthritis hohe Konzentrationen an IL-3 sowie eine erhöhte Anzahl basophiler Granulozyten im Synovialgewebe vorliegt²⁰. Der proarthritische Effekt von IL-3 könnte somit über die Aktivierung basophiler Granulozyten vermittelt werden.

1.5 Das immunologische Gedächtnis

Die Gedächtnisimmunantwort, die durch eine kontinuierliche Anwesenheit von Antikörpern und langlebiger Gedächtnis-B- und -T-Zellen vermittelt wird, ist eine wichtige Reaktion auf Antigene^{64,65}. Bei einer primären Immunantwort werden Antigene über unspezifische Mechanismen des angeborenen Immunsystems erkannt

und den T-Zellen präsentiert. Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen sind dabei professionelle antigenpräsentierende Zellen. Dendritische Zellen nehmen das Antigen auf, prozessieren es und präsentieren Fragmente über MHC-II Moleküle an naive $CD4^+$ T-Zellen. Beim Vorhandensein adäquater Kostimulation und entsprechender Zytokine entwickeln sich T_H2 -Zellen. Diese können unter anderem in einem CD40/CD40Ligand-abhängigen Signalweg B-Zellen aktivieren und die Bildung von Immunglobulinen anregen. Nach dem Erstkontakt mit einem Antigen ist die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses, das eine schnellere und größere Antikörperproduktion als Reaktion auf jeden weiteren Kontakt mit dem Antigen ermöglicht, von besonderer Bedeutung. Für die sekundäre Immunreaktion sind die Gedächtnis-B-Zellen, die Plasmazellen und Gedächtnis-T-Zellen verantwortlich.

Langlebige Gedächtnis-B-Zellen teilen sich nur sehr langsam und verbleiben in den lymphatischen Kompartimenten, vor allem der Milz und den Lymphknoten. Sie zeichnen sich durch die Expression membrangebundener Immunglobuline der IgG-, IgE- und IgA-Klasse aus, die ihnen eine schnelle Antigen Erkennung und Reaktion ermöglicht ⁶⁶. Gedächtnis-B-Zellen setzen jedoch selbst nur eine geringe Menge Antikörper frei, benötigen aber für die sekundäre Immunantwort die Anwesenheit freier Antigene, die nicht von Antikörpern neutralisiert wurden. IgG-Antikörper-Komplexe können aber naive B-Zellen durch eine Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors mit dem Fc-Rezeptor FcγRII inhibieren ⁶⁷.

Die Gedächtnis-T-Zellen besitzen eine verlängerte Lebensdauer und können bei Stimulation schnell und verstärkt Zytokine ausschütten, zum Beispiel Interferon-γ (IFN-γ), IL-4 und IL-5. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen reagieren auf die empfindliche Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit einem Anstieg des CD40-Liganden (CD40L) und besitzen den Chemokin-Rezeptor CCR7. Die Anzahl antigenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen ist im Vergleich zum basalen Wert erhöht und besteht lebenslang.

$CD138^+$ Plasmazellen sind ein weiterer wichtiger Bestandteil der sekundären Immunantwort. Sie entsprechen ausdifferenzierten B-Zellen, befinden sich im

Knochenmark und produzieren über einen langen Zeitraum große Mengen hochaffiner Antikörper⁶⁸.

Zusätzlich werden während der Gedächtnisimmunantwort weitere B- und T-Zellen aktiviert. B-Zellen nehmen bei einem Überschuss das Antigen auf und präsentieren das prozessierte Antigen auf MHC-II-Komplexen an T-Helferzellen. So können höher affine Gedächtnis-B-Zellen und T-Zellen stimuliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen basophilen Granulozyten und der humoralen Gedächtnisimmunantwort gezeigt werden¹. Basophile Granulozyten und antigenspezifische B-Zellen sind nach einer Immunisierung die einzigen Leukozyten-Populationen, die erhebliche Mengen eines intakten Antigens auf ihrer Oberfläche binden können^{1,1,26,29}.

1.6 Die T_H2 Immunantwort

Die Immunantwort von $CD4^+$ T-Zellen kann nach ihrer Wirkungsweise in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. T_H1 -Zellen induzieren bei einer zellulären Immunantwort Makrophagen zur Abwehr intrazellulärer Bakterieninfektionen. T_H17 -Zellen sind bei der IL-17-vermittelten antimikrobiellen Immunität und Autoimmunkrankheiten beteiligt.

Die T_H2 -Zellen sind hingegen für die Bekämpfung extrazellulärer Erreger und die Aktivierung von B-Zellen bei einer humoralen Immunantwort verantwortlich. Die spezifischen zellulären Mediatoren und Faktoren zur Initiierung einer T_H2 -Antwort sind noch weitgehend unbekannt⁶⁹. Die Polarisierung von $CD4^+$ T-Zellen zu einem T_H2 -Phänotyp ist von Zytokinen abhängig und kann durch basophile Granulozyten sowohl *in vitro*^{35,70,71} als auch *in vivo*² induziert werden.

Die Immunantwort zum Beispiel gegen Helminthen veranlasst in den Lymphknoten die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu T_H2 -Zellen. Dieser Prozess wird vor allem durch IL-4 ausgelöst. Basophile Granulozyten sind dabei die Hauptquelle für das in der Frühphase der Immunantwort gebildete IL-4. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch das von basophilen Granulozyten produzierte thymische Stromal

Lymphopoetin (TSLP) für die T_H2-gerichtete Polarisierung der T-Zellen verantwortlich ist ^{2,35,70}. Bei einer T_H2-Immunsierung erhöhte sich die IL-4 Produktion nach der Restimulation um das hundertfache ⁷². Vier Tage nach der Immunsierung mit Papain konnte jedoch eine verringerte Zahl T_H2-Zellen gemessen werden ². In einer T_H2-Antwort wird die Fähigkeit professioneller antigenpräsentierender Zellen (z.B. dendritische Zellen), das Antigen B-Zellen zu präsentieren, von basophilen Granulozyten übertroffen ⁶⁹. Aufgrund der Produktion der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-6 gerät die Bedeutung basophiler Granulozyten für die T_H2-Polarisierung zunehmend in den Focus weiterführender Untersuchungen.

1.7 Basophile Granulozyten als antigenbindende Zellpopulation

Im Jahr 2000 publizierten McHeyzer-Williams und Kollegen ⁷³ eine neue B-Zellpopulation, die negativ für die charakteristischen B-Zellmarker B220 und CD19 waren. Diese Zellen wurden im Knochenmark als dominierende antigenbindende Population beschrieben, konnten aber auch in Milz und peripherem Blut nachgewiesen werden. Diese Zellpopulation teilt charakteristische Eigenschaften mit Gedächtnis-B-Zellen, wie den positiven Nachweis von CD11b und IgG auf der Zelloberfläche, hypermutierende VL-Gene und die Möglichkeit der Übertragung eines immunologischen Gedächtnisses auf naive Empfänger durch adoptiven Transfer der Zellen, nicht aber durch Transfer von Serum. Aufgrund dieser Eigenschaften nannten die Autoren diese unbekannte Zellpopulation „neue B220⁻ Gedächtnis-B-Zellen“ („*novel b220⁻ memory B-cells*“).

Bell und Gray konnten drei Jahre später zeigen, dass es sich bei dieser unbekanntenen Zellpopulation nicht um B-Zellen handelt ⁷⁴. Sie zeigten, dass die B-Zell-typischen Kriterien, wie eine eigenständige Produktion von Immunglobulinen, nicht gewährleistet sind. Stattdessen konnten diese Zellen zufällig Antikörper über den hochaffinen Fc-Rezeptor CD64 binden. Der Nachweis für Oberflächen-IgG fiel demnach positiv aus. In dieser Publikation war die CD11b Expression der Zellen eher auf einem geringen Niveau. Zudem waren die Zellen negativ für die B-Zell typischen Marker CD19, B220, IgM und CD138. Bell und Gray beschrieben ebenfalls die durchflusszytometrischen Eigenschaften der Zellen für die Größe und Granularität

und ordneten sie in die für Lymphozyten typische Abgrenzung (Gate) ein. Die Zellen waren jedoch etwas stärker in der Granularität als typische B- oder T-Zellen. Die Autoren konnten ausschließen, dass es sich dabei um Gedächtnis-B-Zellen handelt. Eine weitere Einteilung der Zellen konnten sie aber nicht erbringen. Sie nannten die Zellpopulation „Antigen-fangende Zellen“ („*antigen-capturing cells*“).

Unserer Arbeitsgruppe gelang es im Jahr 2005 diese Zellpopulation genauer zu charakterisieren ²⁹. Die Identifizierung als basophile Granulozyten erfolgte über den Nachweis der IgE-abhängigen Antigenbindung und das Vorhandensein der Oberflächenmarker IgE, IL-3-Rezeptor, CD45, CD16/32 und den Chemokin-Rezeptor CCR2. Eine Vernetzung der Oberflächen IgE-Moleküle führte zu einer IL-4- und IL-6-Sekretion.

Die Entdeckung basophiler Granulozyten als antigenbindende Zellen und wichtige IL-4-Produzenten führte zu einem gesteigerten Interesse an dieser Zellpopulation. Seit 2007 haben neue Methoden der *in vivo* Depletion und Aufreinigung von basophilen Granulozyten die Untersuchungen erleichtert und neue richtungweisende Informationen geliefert. Hierbei sollen vor allem drei Publikationen erwähnt werden, die die Erkenntnisse über basophile Granulozyten erweiterten. Zum Einen wurde die führende Rolle basophiler Granulozyten bei der Entstehung einer Dermatitis aufgeklärt ⁷⁵, zum Anderen wurde eine T_H2-dominierte Entzündung auf Grund einer Beteiligung basophiler Granulozyten untersucht ^{2,52}. Die dritte, von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studie beschreibt die Förderung einer humoralen Gedächtnisimmunantwort durch basophile Granulozyten ¹.

1.8 Beschreibung der verwendeten Tiermodelle

Die Maus ist als Tiermodell für immunologische Fragestellungen gut geeignet. Ein *knockout*-Mausmodell, in dem ausschließlich basophile Granulozyten fehlen, wäre für die Untersuchung der Bedeutung basophiler Granulozyten bei immunologischen Reaktionen hilfreich. Dieses Mausmodell ist jedoch nicht vorhanden, so dass auf alternative Tiermodelle ausgewichen werden musste.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Mastzell-defiziente W/W^V - als auch W^{SH} -Mäuse als Hilfsmittel eingesetzt, eine Analyse eines Mastzell-Effekts ermöglichen²³. Die Bedeutung des Zytokins IL-4 konnte in IL-4-defizienten Mäusen untersucht werden.

Die pathologische Relevanz basophiler Granulozyten im Verlauf einer Gedächtnisimmunantwort kann durch die Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* ermittelt werden. Die Mäuse werden bei einem Kontakt mit infektiösen Streptokokken durch die vorherige Immunisierung gegen das Pneumokokken-Oberflächenprotein A (PspA) über eine antikörper-vermittelte Immunität vor einer starken Ausprägung der Erkrankung und einer Sepsis geschützt⁷⁶⁻⁷⁸.

Eine Immunisierung mit Aluminiumpräzipitat und hitze-inaktiviertem *Bordetella pertussis* Erreger unterstützt die Entwicklung einer humoralen Immunantwort und bereitet B-Zellen für die Antigenaufnahme vor. Inaktivierte *Bordetella pertussis* Erreger haben eine Adjuvans-Wirkung und aktivieren die Komplementkaskade. Die gramnegativen Stäbchen besitzen Adhärenzfaktoren und Exotoxine, auf die das humorale Immunsystem reagiert. Eine Präzipitierung des Antigens mit Aluminiumhydroxid ermöglicht die Antigen-Persistenz durch einen Depot-Effekt und erhöht die Antigenaufnahme von dendritischen Zellen⁷⁹. Zudem werden Komplementsystem⁸⁰, Mastzellen und Makrophagen aktiviert⁸¹. Adjuvantien basierend auf Aluminium-Salzen sind für einige humane Impfstoffe zugelassen und verstärken die humorale Immunantwort.

Die Modellantigene Allophycocyanin und Phycoerythrin eignen sich besonders für die Untersuchung basophiler Granulozyten, da beide Proteine in der Durchflusszytometrie auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden können und keine weiteren spezifischen Oberflächenmarker für den Nachweis der Antigenbindung benötigt werden.

1.9 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit sollte die Beziehung zwischen basophilen Granulozyten und den Zellen des immunologischen Gedächtnisses untersucht werden. Der Fokus der Arbeit lag hierbei auf der Interaktion mit Gedächtnis-B-Zellen. Die Fähigkeit basophiler Granulozyten intakte Antigene *in vitro* zu binden warf die Frage auf, ob basophile Granulozyten durch die Bindung des Antigens aktiviert werden. Die Hypothese, dass es sich dabei um einen Fc-abhängigen Aktivierungsmechanismus handelt, sollte durch Untersuchung FcεRI- und FcRγ-defizienter Mäuse nach einer Restimulation analysiert werden. Des Weiteren sollte der Einfluss basophiler Granulozyten auf B- und T-Zellen experimentell untersucht werden. Hierfür sollten Versuche zur Proliferationseigenschaften von B-Zellen und die Analyse der Zahl antigenspezifischer Plasma- und B-Zellen in An- und Abwesenheit aktivierter basophiler Granulozyten durchgeführt werden.

Die Daten sollten *in vivo* im Rahmen einer Gedächtnisimmunantwort bestätigt werden, wobei eine Methode zur Depletion basophiler Granulozyten *in vivo* etabliert werden sollte. Ein Ziel der Arbeit war die Untersuchung, ob die Abwesenheit basophiler Granulozyten eine verringerte Bildung antigenspezifischer Immunglobuline des T_H2-Typs mit sich brachte. Basophile Granulozyten sollten auch während einer Primärantwort analysiert werden. Mastzell-defiziente Mäuse sollten als Modell dienen, um die Rolle von Mastzellen bei einer humoralen Gedächtnisimmunantwort auszuschließen. Die Ergebnisse sollten daraufhin auf ein Infektionsmodell mit *Streptococcus pneumoniae* übertragen werden. Ferner war die Untersuchung der Übertragbarkeit von Eigenschaften antigenspezifischer basophiler Granulozyten auf naive Mäuse mittels adoptiven Transfers ein Ziel der Arbeit.

Die Beteiligung basophiler Granulozyten an einer humoralen Gedächtnisimmunantwort führte zu der Frage, ob basophile Granulozyten während einer Reaktion rekrutiert werden. Das Verteilungsmuster basophiler Granulozyten sollte kurze Zeit nach einer Restimulation in unterschiedlichen Organen untersucht werden. Dabei sollten die Ergebnisse in Abhängigkeit einer vorherigen Immunisierung und im Vergleich zu anderen Granulozyten- und Monozytenpopulationen ermittelt werden. Die Anwesenheit basophiler Granulozyten in den Lymphknoten lässt die Hypothese

zu, dass in diesem Organ mögliche Interaktionspartner von basophilen Granulozyten lokalisiert sind. Für die Analyse sollte die Untersuchung des Zytokinprofils CD4⁺ T-Zellen nach einer Restimulation in An- oder Abwesenheit basophiler Granulozyten folgen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Einmalspitzen (100, 1000 µl); Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml); Sarstedt, Nürnberg
Filterspitzen (100, 1000 µl); Biozym, Hessisch Oldendorf
Glasware; Schott, Mainz
Handschuhe Peha soft; Hartmann, Heidenheim
Heparinisierte Glaskapillaren, Brandt, Wertheim
Maxisorp S96; Nunc/Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Nylonsiebe (Cell Strainer 40, 70 µm); BD Falcon, Le Port de Claix, Frankreich
Polystyrolröhrchen für FACS-Analyse; BD Falcon, Le Port de Claix, Frankreich
Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2,0 ml); Eppendorf, Hamburg
Separation: *PreSeparationfilter*; Säulen (MS, LS, LD *Columns*); Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Skalpell (No. 10); pfm, Köln
Spritzen: Tuberkulinspritzen (1 ml); Einmalspritzen (2, 10 ml); Kanülen BD Microlance 3 (27G, 26G, 23G); BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturplatten (96-Loch), Petrischalen; Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml); Sarstedt, Nürnberg

2.1.2 Geräte

ABI PRISM 7900 HAT Detection system (Taqman); Applied Biosystems, Darmstadt
Analysewaage; Satorius, Göttingen
Autoklav; Technorama, Fernwald
Brutschränke Hera Cell; Heraeus, Hanau
Chirurgische Instrumente; Fine Science Tools, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 25; Zeiss, Jena

ELISA Reader EMax® precision microplate reader; MWG Biotech, Ebersberg
Kreisschüttler AS250 3; IKA Labortechnik, Staufen
Magnet OctoMACS, QuadroMACS, Separator; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
NanoDrop®; Pegglab, Erlangen
Neubauer Zählkammer; Brandt, Wertheim
pH-Meter CG840; Schott Instruments, Mainz
Pipetten (Gilson P10, P20, P100, P1000); Gilson, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu; ISB Integra Biosciences; Chur, Schweiz
Stereomikroskop; Leitz, Wetzlar
Sterilbank; Heraeus, Nürnberg
Thermomixer; Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex RK255; Bandelin Schalltec, Mörfelden-Walldorf
Vortexer REAX 2000; Heidolph, Schwabach
Wasseraufbereitungsanlage; Millipore, Eschborn
Wasserbad; GFL, Burgwedel
Zentrifugen; Heraeus, Nürnberg

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol; Sigma Aldrich, Taufkirchen
ABTS Peroxidase Substrat; Roche, Mannheim
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, Sigma Ultra; Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin (BSA); Sigma Aldrich, Taufkirchen
Carboxyfluorescein diacetat succinimidylester (CFSE); Invitrogen, Karlsruhe
Caltag *Counting Beads*; Invitrogen, Karlsruhe
CytoFix/CytoPerm, Perm/Wash, FACSLysing Solution; BD Biosciences, Heidelberg
dNTP-Mix, NatuTec, Frankfurt am Main
Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Roche Diagnostics, Mannheim
Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat; Roth, Karlsruhe
Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer; Invitrogen, Karlsruhe
PeqGold Trifast; Pegglab, Erlangen
TMB Tabletten, Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypanblaulösung; Fluka/Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 20; Merck, Darmstadt
Zitronensäure Monohydrat, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Narkosemittel: Flumazenil-Hameln; Inresa GmbH, Freiburg
 Naloxon; Inresa GmbH, Freiburg
 Midazolam; Ratiopharm, Ulm
 Fentanyl; DeltaSelect, Pfulling
 Dormitor; Pfizer, Berlin
 Antisedan; Pfizer, Berlin

Natriumpyruvat; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
 Nicht-essentielle Aminosäuren; Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Puffer

ABTS-Puffer; Roche, Mannheim
 FACSClean, FACSTFlow, FACSRinse; BD Biosciences, Heidelberg
 RPMI 1640 Medium; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
 Penicillin/Streptomycin; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
 Trypanblaulösung; Sigma Aldrich, Taufkirchen
 Türk'sche Lösung; Merck, Darmstadt
 PBS *ad injectabilia*; Braun, Melsungen
 NaCl 0,9% *ad injectabilia*; Braun, Melsungen

ELISA-Waschpuffer: 0,05% Tween 20
 in PBS

ELISA-Blockpuffer: 2% BSA
 in PBS

MACS-Puffer: 2 mM EDTA
 0,5% BSA
 in PBS

Phosphat buffered saline (10 x PBS), pH 7,4: 1,8 mM KH_2PO_4
 10,3 mM Na_2HPO_4
 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl_2
 in *Aqua dest*

Coating-Puffer (pH 9,5): 0,1 M Natriumcarbonat
in *Aqua dest*

TMB-Puffer: 25,7 ml Na₂HPO₄
24,3 ml Zitronensäure
50 ml *Aqua dest*

2.1.5 Medienherstellung

Das fötale Kälberserum (FKS) wurde vor dem Gebrauch durch Hitzeeinwirkung bei 56 °C für 30 min inaktiviert.

RPMI-Medium mit Zusatz: RPMI 1640 Medium
10% (vol/vol) FKS

Zellkultur-Medium: RPMI 1640 Medium
10% (vol/vol) FKS
1% (vol/vol) Penicillin/Streptomycin
1% (vol/vol) Nicht-essentielle Aminosäuren
1% (vol/vol) HEPES
1 mM Natriumpyruvat
50 µM β-Mercaptoethanol

2.1.6 Peptide und Stimulanzen

Murines IL-3; PreproTech EC, London, GB

PhycoPro *cross-linked* Allophycocyanin, R-Phycoerythrin; ProZyme, San Leandro, USA

PspA; Herstellung von S. Hollingshead und D.E. Briles, *University of Alabama, Birmingham* (USA)

Bordetella pertussis Suspension, hitze-inaktiviert, BD Bioscience, San Jose, USA

Fötale Kälberserum (FKS), Bovines Serum Albumin (BSA); PAA Laboratories, Linz, Österreich

2.1.7 Antikörper

Tabelle 1: Antikörperliste

<i>Spezifität</i>	<i>Klon</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Hersteller</i>
CD3	145-2C11	Armenian Hamster	NA/LE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD4	RM4-5	Ratte	Cy5	BD Biosciences, San Jose, USA
CD4	RM4-5	Ratte	APC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD8a	53-6.7	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD8a	53-6.7	Ratte	Cy5	BD Biosciences, San Jose, USA
CD11b	M1/70	Ratte	FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD11b	M1/70	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD11c	HL3	Armenian Hamster	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD16/32	2.4G2	Ratte	NA/LE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD19	1D3	Ratte	Cy5.5	eBioscience, San Diego, USA
CD19	1D3	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD45	30-F11	Ratte	FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD45	30-F11	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD49b	HMa2	Armenian Hamster	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD49b	DX5	Ratte	APC	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD115	AFS98	Ratte	PE	eBioscience, San Diego, USA
CD117 (ckit)	2B8	Ratte	PE	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
CD138	281-2	Ratte	Biotin	BD Biosciences, , San Jose, USA
CD138	281-2	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD154 (CD40L)	MR11	Armenian Hamster	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
FcεR1α	MAR-1	Armenian Hamster	Biotin	eBioscience, San Diego, USA
FcεR1α	MAR-1	Armenian Hamster	NA/LE	eBioscience, San Diego, USA
Ig	P260	Hase	HRP	DakoCytomation;Glostrup, Dänemark
IgE	R35-72	Ratte	FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
IgE	R35-118	Ratte	Biotin	BD Biosciences, San Jose, USA

IgE	R35-72	Ratte	Biotin	BD Biosciences, San Jose, USA
IgE	R35-72	Ratte	purified	BD Biosciences, San Jose, USA
IgG1	A85-1	Ratte	Biotin	BD Biosciences, San Jose, USA
IgG1	A85-1	Ratte	purified	BD Biosciences, San Jose, USA
IgG1	A85-3	Ratte	purified	BD Biosciences, San Jose, USA
IgG2a	R19-15	Ratte	Biotin	BD Biosciences, San Jose, USA
IgG2a	R11-89	Ratte	purified	BD Biosciences, San Jose, USA
IgM	II/41	Ratte	purified	BD Biosciences, San Jose, USA
IgM	R6-60.2	Ratte	Biotin	BD Biosciences, San Jose, USA
Gr-1	RB6-8C5	Ratte	APC	BD Biosciences, San Jose, USA
IL-2	JES6-1A12	Ratte	purified	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-2	JES6-5H4	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
IL-3	MP2-8F8	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
IL-4	30340.11	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
IL-4	30340.11	Ratte	purified	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-6	MP520F3	Ratte	purified	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-6	MP520F3	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
IL-10	JEF052A5	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
IFN γ	XMG1.2	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
INF- γ	H22	Ratte	purified	R&D Systems, Minneapolis, USA
HLA-IA/IE	M5/ 114.15.2	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
IgG Arm. Hamster	polyklonal	Isotyp Kontrolle	purified	eBioscience, San Diego, USA

2.1.8 Sekundäre Antikörper

Streptavidin-HRP, Streptavidin-FITC, Streptavidin-RPE; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Streptavidin-PE-Cy5.5; Caltag/Invitrogen, Karlsruhe

APC-Biotin, PE-Biotin; ProZyme, San Leandro, USA

2.1.9 Microbeads

Alle paramagnetischen *Microbeads* stammten von der Firma Miltenyi Biotech,

Bergisch Gladbach:

Anti-APC, Anti-Biotin, Anti-FITC, Anti-PE;

Anti-CD19 (Maus), Anti-CD4 (Maus), Anti-CD49b (DX5) (Maus), Anti-CD8 (Maus)

2.1.10 Enzyme

M-MLV (*moloney-murine leukemia virus*) Reverse Transkriptase; Invitrogen,

Karlsruhe

RNase-freie DNase; QIAGEN; Hilden

2.1.11 Kits

GeneExpression Assay; Applied Biosystems

OptEIA ELISA-Kits Maus, BD Bioscience, San Jose, CA, USA:

IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN γ

DuoSet ELISA-Kits Maus, R&D Systems, Minneapolis, USA:

IL-10, IL-13, TNF α

RNeasy Micro/Mini Kit, QIAGEN, Hilden

2.1.12 Primersonden

Die TaqMan-Sonden für die Verwendung mit GenExpression Assay wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen.

IFN γ	Mm01168134_m1
TNF α	Mm00443258_m1
IL-4	Mm00445259_m1
IL-5	Mm99999053_m1
IL-10	Mm00439615_g1
IL-13	Mm99999190_m1
GAPDH	Mm99999915_g1

2.1.13 Software

Adobe Reader 8; Adobe

CellQuest Pro; BD Bioscience, Heidelberg

MS Office 2003; Microsoft

Reference Manager 11, Adept Scientific GmbH, Frankfurt a.M.

SDS 2.3. Software; Applied Biosystems, Darmstadt

SoftMax; MDS Analytical Technologies, Ismaning

2.1.14 Tiere und Haltung

C57BL/6 N; Elevage Janvier, Le Genest, Frankreich

C57BL/6 N Charles River, Wilmington, MA, USA

Balb/c Charles River, Wilmington, MA, USA

IL-4-defiziente Mäuse ($IL4^{-/-}$), Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA

FcεRIα-defiziente Mäuse ($FcεRIα^{-/-}$); Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA

Mastzell-defiziente Mäuse ($WBB6F1\text{-Kit}^W/\text{Kit}^{W-v}$, W/W^v)⁸²; Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA

Mastzell-defiziente Mäuse ($B6.Cg\text{-Kit}^{W-sh}/\text{HNihrJaeBsmJ}$, W^{SH})⁸², Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA

FcRγ-defiziente Mäuse ($FcγR1g^{-/-}$)⁸³; Taconic Farms, Ry, Dänemark

Nach einer Akklimatisierungsphase von mindestens einer Woche nach Ankunft wurden ausschließlich weibliche Tiere, die mindestens acht Wochen alt waren, für die Versuche verwendet.

Die Tiere wurden zum Teil unter konventionellen Bedingungen einer offenen Haltung im Forschungsgebäude H1, oder unter SPF-Bedingungen (pathogenfrei) im Zentralen Tierlabor (D3) des Klinikums der Universität Regensburg gehalten. Hauptamtliche Tierpfleger übernahmen die Versorgung der Tiere. Der Zugang zu Wasser und Futter erfolgte *ad libitum*. Es herrschte eine konstante Raumtemperatur von $21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, eine konstante relative Luftfeuchtigkeit von 60% und ein kontrollierter Hell-Dunkel-Zyklus im 12 h Rhythmus. Die Haltung der Tiere und die Durchführung aller Versuche erfolgten unter Einhaltung der deutschen Tierschutzrichtlinien.

2.1.15 Anästhesie und Antagonist

Die Angaben beziehen sich auf das Körpergewicht [kg] einer Maus.

Anästhesie: 0,05 mg/kg Fentanyl

5,0 mg/kg Midazolam

0,5 mg/kg Medetomidin (Dormitor)

Die Injektion der Narkose erfolgte *intraperitoneal (i.p.)*. Vor jedem Eingriff wurde die Wirkung durch fehlende Beinretention oder ausbleibende Schmerzreaktion kontrolliert.

Antagonisierung: 1,2 mg/kg Naloxon

0,5 mg/kg Flumazenil

2,5 mg/kg Antipamezol (Antisedan)

Der Antagonist wurde *subcutan* in die Nackenfalte injiziert und wirkte schon nach kurzer Zeit.

Die Ausgabe von Narkosemitteln erfolgte über die Apotheke und den Tierärztlichen Dienst des Klinikums der Universität Regensburg nach den Bedingungen des Betäubungsmittelgesetzes.

2.1.16 Herstellung des Adjuvans Aluminiumpräzipitat

Für die Herstellung Präzipitats aus Aluminium und einem Antigen (z.B. Allophycocyanin oder Phycoerythrin) wurden Aluminiumkaliumsulfat und die gewünschte Menge Antigen gemischt und mit 1 M KOH auf einen pH von 7,0 titriert. Dabei fällt ein weißlicher Niederschlag (Präzipitat) aus, wobei das Antigen mikrokristallin vorliegt.

20,1 ml Aluminium-Kaliumsulfat (10%)

467 µl Allophycocyanin

mit 1 M KOH auf pH 7,0 titrieren

Das Präzipitat wurde anschließend dreimal mit 50 ml sterilem PBS gewaschen. Die Endkonzentration betrug 0,5 mg/ml präzipitiertes Antigen in PBS. Die Lösung wurde

zur Sättigung mindestens eine Nacht im Kühlschrank gelagert. Am Tag der Immunisierung erfolgte die Verdünnung auf eine Endkonzentration von 0,1 µg/ml des präzipitierten Antigens mit sterilem PBS.

2.1.17 Isolation des Pneumokokken Oberflächenproteins A (PspA)

Die Isolation des Oberflächenproteins von Pneumokokken (PspA) wurde von Susan Hollingshead und David E. Briles an der *University of Alabama in Birmingham* (USA) durchgeführt. Das PspA konnte mit freundlicher Genehmigung verwendet werden.

Die Experimente zur Infektion mit Pneumokokken wurden in einer Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Der *Streptococcus pneumoniae* (Kapsel Gruppe 3) Bakterienstamm 466.1 wurde in Todd-Hewitt Brühe (Difco) mit 0,1% (*wt/vol*) Hefeextrakt bis zur Mitte der logarithmischen Phase vermehrt. Daraufhin wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert ⁷⁸. Die Anzahl der *Streptococcus pneumoniae* Bakterien wurde nach 18 h Inkubation bei 37 °C anhand der koloniebildenden Einheiten (*colonie-forming units*) auf Schafsblut-enthaltenden Agarplatten (BD Biosciences) bestimmt ⁸⁴.

2.1.18 Statistik

Die dargestellten Diagramme zeigen, falls nicht anders beschrieben, jeweils die Mittelwerte der Ergebnisse einer Gruppe. Fehlerbalken geben die mittleren Standardfehler (SEM) der Ergebnisse wieder.

$$\text{SEM} = \text{Standardabweichung}/\text{Wurzel (n)}$$

n = Anzahl der Einzelwerte pro Gruppe

Zur Berechnung der Signifikanz wurde der einseitige Student'sche T-Test angewandt, wobei der Typ 2 gewählt wurde. Eine Signifikanz wurde im Diagramm mit einem * bei einem Wahrscheinlichkeitswert (p) $p < 0,05$, mit ** bei $p < 0,01$ und mit # bei einem $p < 0,001$ gekennzeichnet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Zellsuspensionen

Zur Vorbereitung der Zellpräparation wurde kaltem RPMI 1640 Medium 10% (vol/vol) fötales Kälberserum (FKS) hinzugegeben. Das Medium und andere verwendete Puffer wurden vor und während der Präparation von Zellsuspensionen auf Eis gelagert, um ein vorzeitiges Absterben der Zellen zu vermeiden.

Die Mäuse wurden mit zervikaler Dislokation getötet und mit 70% Ethanol besprüht. Vor jedem Eingriff wurde das Präparationsbesteck mit 70% Ethanol sterilisiert. Die Entnahme der Organe erfolgte unter sterilen Bedingungen, wobei eine kurzzeitige Lagerung und alle weiteren Präparationsschritte auf Eis stattfanden.

2.2.1.2 Präparation von murinen Splenozyten

Die Bauchhöhle wurde links lateral unterhalb der Rippen geöffnet und die Milz chirurgisch entfernt (*Splenektomie*). Die Milz wurde von Peritonealepithel und Fettresten befreit und in mehrere kleine Stücke geschnitten, um die Splenozyten vom Bindegewebe der Organhülle loszulösen. Die Milzstücke wurden mit einem sterilen Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Sieb mit 70 µm Maschenweite gedrückt. Die Zellen wurden in 5 ml Medium resuspendiert und bei 350 xg (1400 rpm) bei 4 °C für 7 min zentrifugiert. Aufgrund des hohen Fettgehalts in der Milz konnte dabei eine Aggregation der Zellen festgestellt werden. Die sedimentierten Aggregate wurden in 1 ml Medium resuspendiert und auf ein weiteres Zellsieb mit 40 µm Maschenweite gegeben. Das Sieb wurde wiederum mit 3 ml Medium gewaschen, um den Verlust zu minimieren. Nach erneuter Zentrifugation bei 350 xg und 4 °C für 7 min konnten die pelletierten Zellen in Medium oder Puffer aufgenommen werden und waren als Einzelzellsuspensionen sowohl für die FACS-Analyse als auch für weitere Aufreinigungsschritte und Zellkultur geeignet.

2.2.1.3 Präparation von murinen Knochenmarkzellen

Die Hinterbeine wurden am Hüftgelenk chirurgisch abgetrennt. Anschließend wurden die Pfoten und *Fibula* sowie Haut und Muskelgewebe von *Femur* und *Tibia* mit Hilfe eines Skalpells entfernt. Die einzelnen Knochen wurden daraufhin in der Mitte mit einer Schere durchtrennt und das Knochenmark mit kaltem RPMI Medium (mit 10% FKS Zusatz) und dem Druck einer 10 ml Spritze mit 27G Kanüle ausgespült. Das Knochenmark wurde in einer sterilen Petrischale aufgefangen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation bei 350 xg und 4 °C für 7 min wurden die fädigen Knochenmarkstrukturen aus Bindegewebe und Fett durch Resuspendierung in 1 ml Medium aufgelöst. Um restliche Knochenfragmente zu entfernen, wurden die Zellen in ein Zellsieb mit 40 µm Maschenweite gegeben und mit 3 ml Medium vom Sieb gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation mit gleichen Einstellungen konnten die Zellen in Medium für die Zellkultur oder in Puffer für eine weitere Zellisolation aufgenommen werden und lagen nach kräftigem Vortexen in einer FACS-geeigneten Einzelzellsuspension vor.

2.2.1.4 Durchführung einer Peritoneallavage zur Präparation von murinen Peritonealzellen für die FACS-Analyse

Für die Untersuchung der Verteilung basophiler Granulozyten wurden die Zellen des Peritonealraumes gewonnen. Die getötete Maus wurde auf einem Präparationsbrett fixiert und ohne das *Peritoneum* zu verletzen die Hautschicht ventral geöffnet. Mit einer 10 ml Spritze und einer 23G Kanüle wurde 10 ml PBS unter Druck in die Bauchhöhle gespritzt, wobei die Organe von der Flüssigkeit umspült wurden. Zellen, die im Peritonealraum zu finden sind, wurden anschließend mit der eingegebenen Flüssigkeit in die Spritze eingesaugt und konnten bei 350 xg und 4 °C für 10 min in einem Zentrifugenröhrchen sedimentiert werden. Die überstehende Flüssigkeit wurde z.T. für den Zytokinnachweis mittels ELISA bei -20 °C gelagert. Die zellulären Bestandteile wurden zur Vorbereitung der FACS-Analyse in Puffer resuspendiert.

2.2.1.5 Gewinnung von Blutzellen und Blutplasma aus Mäusen

Die Konzentration antigenspezifischer Antikörper im Plasma gab Hinweise auf eine ablaufende Immunreaktion im Mausmodell und diente der Untersuchung einer humoralen Gedächtnisimmunantwort.

Mäuse und Ratten haben die Besonderheit eines ausgeprägten *retrobulbären Venenplexus*. Dieser wurde mit Hilfe einer Kapillare leicht verletzt, wobei beim Entfernen der Kapillare ein sofortiger Stopp der Blutung erfolgte. Der sedierten Maus wurde nach Kontrolle der Narkose-Wirkung und Schmerzfreiheit eine heparinisierte Glaskapillare zwischen vorderen Lidrand und *bulbus* gedreht. Das Blut wurde in Reaktionsgefäßen mit einer 0,1%igen EDTA-Lösung aufgefangen. Das EDTA verhinderte eine Gerinnung des Blutes durch die Komplexbildung von Kalziumionen, die für viele Gerinnungsfaktoren notwendig sind. Anschließend wurde die Maus *subcutan* (sc.) mit dem Antagonisten, der jeweils die Wirkung der drei Narkose-Komponenten aufhebt, behandelt. Vorteile dieser Art der Blutabnahme ist der geringe Stress durch die kurzzeitige Sedierung mit nachfolgender Antagonisierung, die Möglichkeit einer relativ großen Volumenentnahme und die geringe Infektionsgefahr durch das Fehlen offener Wunden.

Das Blut wurde anschließend bei 450 xg (2400 rpm) für 12 min zentrifugiert und das Plasma vorsichtig abgenommen. Bis zur Bestimmung des Immunglobulingehaltes wurde das Plasma bei -20 °C gelagert.

Für die Weiterverarbeitung der zellulären Bestandteile wurde das entnommene Volumen mit der gleichen Menge von 0,9% NaCl substituiert und eine definierte Menge für die FACS-Färbungen entnommen. Blutproben wurden vor einer Färbung mindestens dreifach mit 0,9% NaCl gewaschen, um ein Abfangen der zugegebenen Farbe-Antikörper durch lösliche Faktoren zu verhindern.

2.2.1.6 Präparation von murinen Lymphknoten-Zellen für die FACS-Analyse

Lymphknoten können basophile Granulozyten enthalten. Für die Untersuchung der Zellen in den Lymphknoten wurde der Bauchraum einer Maus ventral geöffnet und der Darm zur Präparation der mesenterialen Lymphknoten freigelegt. Die

mesenterialen Lymphknoten sind perlschnurartig im *Mesenterium* des Dünndarms angeordnet und gehören zu den „Darm-assoziierten Lymphgeweben“ (*gut associated lymphoid tissue*, GALT). Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass die Lymphknoten von Fett- und Geweberesten befreit wurden, um eine problemlose Zellisolation und Weiterverarbeitung zu ermöglichen. Außerdem wurden die *lymphonodii inguinales superficiales* von beiden Seiten freigelegt. Diese liegen in der Leistengegend im Fettgewebe der Unterhaut. Bei der Präparation der *lymphonodii axillares* wurden sowohl die tiefer liegenden als auch die oberflächennahen Lymphknoten von beiden Seiten verwendet und vereint.

2.2.1.7 Antikörperfärbung: Oberflächenfärbung, intrazelluläre Färbung

Die Analyse der Zellen erfolgt mit Hilfe der Bindung markierter Antikörper.

Oberflächenfärbung:

Zellen wurden für die Durchflusszytometrie (FACS) und magnetische Zellseparation (MACS) in Einzelzellsuspension gefärbt. Die Proben konnten sowohl frisch präparierte Primärzellen als auch Zellen aus einem Zellkulturansatz enthalten. Die gewünschten Antikörper wurden in der entsprechenden Konzentration in PBS, Medium oder MACS-Puffer vorbereitet. Die Färbung erfolgte im kleinstmöglichen Volumen größer 70 µl und dauerte bei 4 °C 20 min. Bei der Inkubation mit einem Biotin-konjugierten Antikörper wurde die Probe nach 20 min gewaschen und für weitere 20 min bei 4 °C mit einem Fluorochrom-gekoppelten Streptavidin gefärbt. Die Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurde unter Lichtausschluss durchgeführt, um ein Bleichen der Fluoreszenz zu vermeiden. Nach der Färbung wurden die Zellen zur Entfernung ungebundener Antikörper mit 4 ml PBS gewaschen und bei 350 xg und 4 °C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Vor der Messung wurden die Zellen mit *FACSLysing Solution* fixiert, um störende Erythrozyten mit hoher Eigenfluoreszenz zu lysieren und die Zellen zu fixieren. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurden die Proben für 7 min bei 350 xg/4 °C zentrifugiert und in 200 µl PBS aufgenommen.

Intrazelluläre Färbung:

Für die Untersuchung der Strukturen im Inneren einer Zelle war nach einer Oberflächenfärbung der Zellen eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern möglich. Die Zugabe von 150 µl *CytoFix/CytoPerm* Lösung für 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss permeabilisierte die Zellmembran. Diese Lösung enthält Paraformaldehyd, das zu einer Denaturierung und Präzipitation von Proteinen und Seitenketten führte. Die Oberflächenantikörper und deren Fluoreszenz wurden dabei stabilisiert. Außerdem enthält die Lösung auch Detergenzien, die eine Porenbildung ermöglichten. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen dreimal mit einer *Perm/Wash* Lösung gewaschen und jeweils bei 350 xg/4 °C für 7 min zentrifugiert. Die *Perm/Wash* Lösung hielt die Porenbildung in der Zellmembran aufrecht. Anschließend wurde die Probe bei 350 xg/4 °C für 7 min zentrifugiert und der zu färbende Antikörper in *Perm/Wash* Lösung hinzu gegeben, wobei der Antikörper an intrazellulär vorliegende Moleküle binden konnte. Die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper erfolgte für 30 min bei 4 °C unter Lichtausschluss. Nach zwei weiteren Waschschritten mit *Perm/Wash* Lösung wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und zur FACS-Analyse herangezogen.

2.2.2 Magentische Zellseparation (MACS)**2.2.2.1 Prinzip MACS**

Mehrere Methoden sind zur Aufreinigung von Zellpopulationen bekannt. Dazu gehört die Methode der magnetischen Zellseparation (MACS, *magnetic associated cell sort*). Zellen einer Population haben charakteristische Oberflächenmarker, die man über Antikörper markieren kann. Diese Antikörper können entweder an einen paramagnetischen Partikel (*Beads*) gekoppelt sein oder eine fluoreszente Markierung besitzen bzw. biotinyliert sein. Die Färbung durch einen Antikörper ohne magnetische Eigenschaft erfolgt bei 4 °C für 20 min unter Lichtausschluss. In einer sekundären Färbung wurden magnetische Partikel gegen den fluoreszenten Marker (z.B. *anti-fluorescin isothiocyanat, FITC*) oder gegen das Biotin auf die Probe gegeben. Die Färbung der Zellen mit paramagnetischen *Microbeads* der Firma Miltenyi wurde bei 4 °C für 15 min unter Lichtausschluss durchgeführt. Nach dem

Entfernen ungebundener magnetischer Partikel durch einen Waschvorgang mit anschließender Zentrifugation bei 350 xg/4 °C für 7 min konnten die Proben im entsprechenden Volumen MACS-Puffer resuspendiert werden. Die Säule wurde in einen Permanentmagneten der Firma Miltenyi eingespannt und durch Zugeben von eiskaltem MACS-Puffer äquilibriert. Die Säulenmatrix besteht aus beschichteter Stahlwolle, an dem die markierten Partikel innerhalb eines Magnetfelds binden können. Je nach Packungsdichte und Größe der Säule kann man MS-, LS- und LD-Säulen unterscheiden. M-Säulen haben dabei eine kleinere Porengröße als L-Säulen. Aufgrund der großen Packungsdichte sind LD-Säulen nur zur Negativaufreinigung bzw. *in vitro* Depletion einer Zellpopulation verwendbar, weil gebundene Zellen durch den Prozess beschädigt werden. Das Säulenmaterial wird bei der Äquilibrierung mit dem Puffer benetzt, wobei die Flüssigkeit mittels Gravitationskraft durch das Säulenmaterial wandert. Die geringe Temperatur des MACS-Puffers unterstützt einen höheren Reinheitsgrad der Aufreinigung. Die Zellen wurden daraufhin im entsprechenden Volumen auf die Säulenmatrix pipettiert.

Wie in Abbildung 3 gezeigt binden magnetisch markierte Zellen an der ferromagnetischen Domäne der Säule. Bei einer positiven Isolation einer Zellpopulation wurde der Durchfluss verworfen, die Säule dreimal mit 1 ml MACS-Puffer gespült und mit 1 ml MACS-Puffer eluiert. Für die Elution der gebundenen Zellen wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entnommen und der mitgelieferte Stempel auf das Säulenmaterial gedrückt. Das aufgefangene Eluat enthielt die vorher markierte Zellpopulation.

War die Entfernung einer Zellpopulation, also eine negative Isolation oder Depletion, gefordert, so wurde nach dem Auftragen der Probe auf die Säule und allen weiteren Waschschritten der Durchfluss aufgefangen (Abbildung 3). Die Säule blieb bei dem gesamten Vorgang im Magneten. Die zu entfernenden Zellen verblieben auf der Säule und eine zusätzliche Elution wurde nicht benötigt.

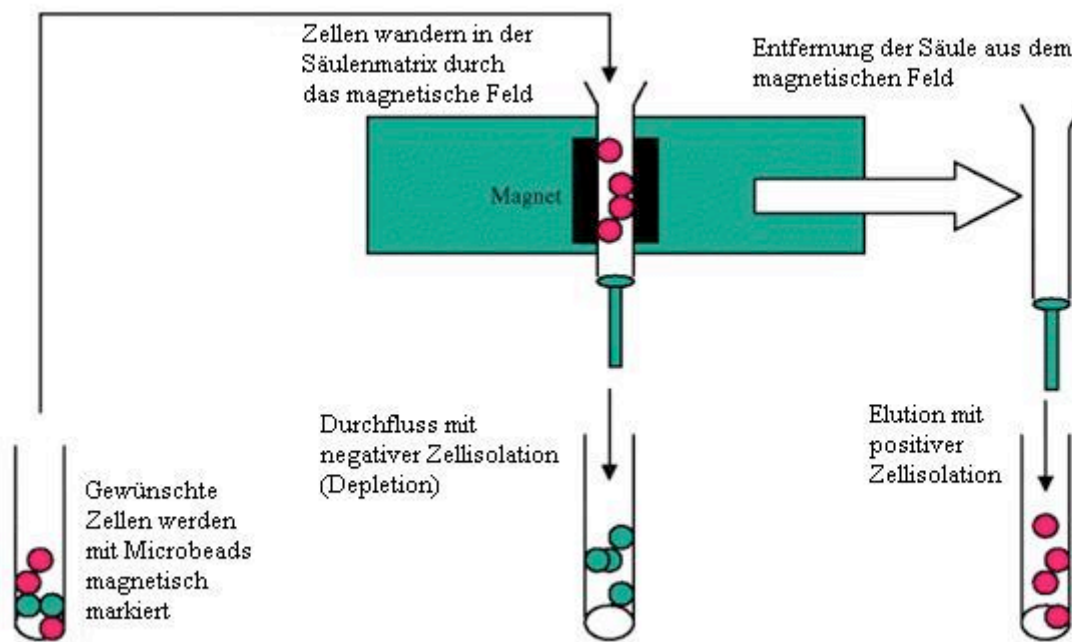


Abbildung 3: Prinzip der magnetischen Zellseparation (MACS)

Zellen werden mit magnetischen Partikeln markiert (rosa) und wandern durch eine Säulenmatrix im magnetischen Feld. Markierte (rosa) Zellen werden auf der Säule zurück gehalten, unmarkierte Zellen (blaugrün) können die Säule passieren. Bei einer negativen Isolation wird der Durchfluss aufgefangen, für eine positive Zellisolation der markierten Zellen wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen eluiert. Verändert nach Br J Dermatol (2005) (www.medscape.com)

Die erfolgreiche Aufreinigung wurde mit einer erneuten Anfärbung der Zellen und anschließender FACS-Analyse kontrolliert. Spezifische Marker für die gewünschte Zellpopulation wurden verwendet. Der so genannte „MACS-Check“ beinhaltet ein kleines Aliquot der Probe jeder Reinigungsstufe und des Durchflusses. Der Reinheitsgrad der Isolierung bzw. Depletion war in der Regel bei über 95%.

2.2.2.2 Aufreinigung von murinen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen aus der Milz

Die Aufreinigung muriner T- und B-Zellen war für die Untersuchung der Interaktionspartner basophiler Granulozyten von Bedeutung. Für die Isolierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen aus der Milz wurden die entsprechenden anti- $CD4$, anti- $CD8$ bzw. anti- $CD19$ -Microbeads nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Isolation von $CD4^+$ T-Zellen erfolgte über eine

zweifache Aufreinigung mittels MS-Säulen. Die Reinheit der Aufreinigung betrug über 95% und wurde bei jeder MACS Isolierung durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.2.2.3 Depletion muriner basophiler Granulozyten aus Knochenmark und Milz

Die Entfernung basophiler Granulozyten *in vitro* ermöglichte die Untersuchung in Ab- und Anwesenheit dieser Granulozytenpopulation. Das Depletionsverfahren wurde auch zur Vorbereitung der Zellen des adoptiven Transfers eingesetzt. Zellen wurden aus dem Knochenmark und der Milz isoliert und *in vitro* 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit FITC-konjugiertem anti-IgE Antikörper gefärbt. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer und Zentrifugation bei 350 xg/4 °C für 7 min folgte die Inkubation mit anti-FITC gerichteten *Microbeads* für 15 min im Kühlschrank. Bei FcRγ- und FcεRIα-defizienten Mäusen erfolgte die Depletion basophiler Granulozyten über die Markierung mit anti-CD49b *Microbeads*. Zur negativen Isolierung basophiler Granulozyten wurden LD-Säulen verwendet, wobei die Äquilibrierung mit 2 ml und die Probenladung in 500 µl MACS-Puffer erfolgte. Die Säule wurde dreimal mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen und der Durchfluss zur Weiterverarbeitung aufgefangen. Mit Hilfe der Oberflächenmarker IgE und CD49b konnte der Reinheitsgrad der Zellen durchflusszytometrisch kontrolliert werden, wobei IgE⁺ CD49b⁺ basophile Granulozyten zu mehr als 90% aus der Probe entfernt wurden.

2.2.2.4 Aufreinigung muriner basophiler Granulozyten aus dem Knochenmark

Eine Isolation von basophilen Granulozyten wurde hauptsächlich aus dem Knochenmark durchgeführt, weil hier basophile Granulozyten gebildet werden und in der höchsten Konzentration vorliegen. Das Knochenmark wurde wie in 2.2.1.3 beschrieben präpariert und die Zellen bei 350 xg/4 °C für 7 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Knochenmarkzellen in MACS-Puffer aufgenommen und mit anti-IgE-FITC gefärbt. Nach der Färbung im Kühlschrank wurden die Zellen mit anti-FITC-gerichteten *Microbeads* markiert und mittels LS-Säulen isoliert. Die Färbung über IgE hat den Nachteil, dass isolierte basophile Granulozyten aktiviert

werden und nicht mehr als unstimuliert angesehen werden können. Benötigte man für einen Zellkulturansatz unaktivierte basophile Granulozyten, so wurden basophile Granulozyten mit anti-CD49b-*Microbeads* isoliert. Anhand der Expression von IgE und CD49b auf der Oberfläche basophiler Granulozyten wurde die Reinheit durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

2.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wird bei Einzelzellsuspensionen zur Analyse von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften eingesetzt. Dabei werden einzelne Zellen mit der Trägerflüssigkeit *FACSFlow* angesaugt und mit einem LASER angestrahlt, um die Emission der Fluoreszenz zu messen. Verschiedene Linsen, Filter und Spiegel trennen die unterschiedlichen Emissionsbereiche und teilen sie den entsprechenden Detektoren (FL) mit Photoelektronen-Vervielfachern (*photomultiplier*) zu (Abbildung 4). Die folgenden Messungen wurden mit einem FACSCalibur der Firma Becton Dickinson (BD) durchgeführt. Dieses FACS-Gerät verfügt über zwei LASER und die Auflösung von vier fluoreszenten Farben. Der Detektor FL1 kann eine optimale Emission bei 530 nm erfassen. Dies entspricht der grünen Fluoreszenz der Farbstoffe FITC, GFP und Alexa488. FL2 kann hingegen die Emission bei 585 nm von PE detektieren. Die violett fluoreszierenden Farbstoffe Cy5, Cy5.5, PerCP oder TexasRed werden durch den Langwellen-Filter ab 670 nm auf den FL3 Detektor geleitet. Die Emissionen, die in FL1 bis FL3 detektierbar sind, werden durch einen Argon-LASER mit der Absorptionswellenlänge 488 nm angeregt. Ein weiterer Dioden-LASER, der separat hinzugeschaltet werden kann, ermöglicht eine Anregung bei 635 nm für die fluoreszenten Farbstoffe APC und Alexa647 und eine Detektion der Emission bei optimal 660 nm im FL4 Kanal.

Die zellulären Eigenschaften der Granularität und Größe kann ebenfalls im Durchflusszytometer gemessen werden und ist eines der wichtigsten Bestandteile für die Zellidentifizierung. Wie in Abbildung 4 werden hierfür die Informationen der Streuungen des Vorwärts- und Seitwärtslichtes erfasst. Die Streuung des

Vorwärtslichtes wird in der Durchflusszelle des FACS-Gerätes im 180 ° Winkel abgelenkt und im *forward side scatter* (FSC) bei der Wellenlänge des Anregungslichtes (488 nm) detektiert. Diese Streuung lässt einen Rückschluss auf die Zellgröße zu, wobei ein größerer Zellumfang eine größere Ablenkung des Anregungslichtes ergibt. Die Streuung des Seitwärtslichtes erfolgt aufgrund von weniger lichtdurchlässigen Zelleinschlüssen und gibt Hinweise auf die Granularität der Zelle. Hierbei wird das Anregungslicht im 90 ° Winkel abgelenkt und im *sideward side scatter* (SSC) bei 488 nm detektiert. Eine größere Granularität mit mehr Zelleinschlüssen ergibt somit eine stärkere Streuung des Lichtes.

Die Absorptions- und Emissionseigenschaften sind abhängig vom strukturellen Aufbau des Fluorophors und demnach materialspezifisch. Verschiedene Marker können somit problemlos anhand ihres Emissionsspektrums voneinander unterschieden werden. Ein Detektor kann diese Emission in ein elektrisches Signal umwandeln. Je mehr fluoreszente Marker einer Sorte an der Zelloberfläche gebunden sind, desto stärker ist die Emission und ein größeres Signal wird errechnet. Die vier Detektoren sind für vier verschiedene Spektralbereiche spezifisch, so dass man vier unterschiedliche Eigenschaften (z.B. Menge der Oberflächenrezeptoren) gleichzeitig anhand der Fluoreszenz ermitteln kann.

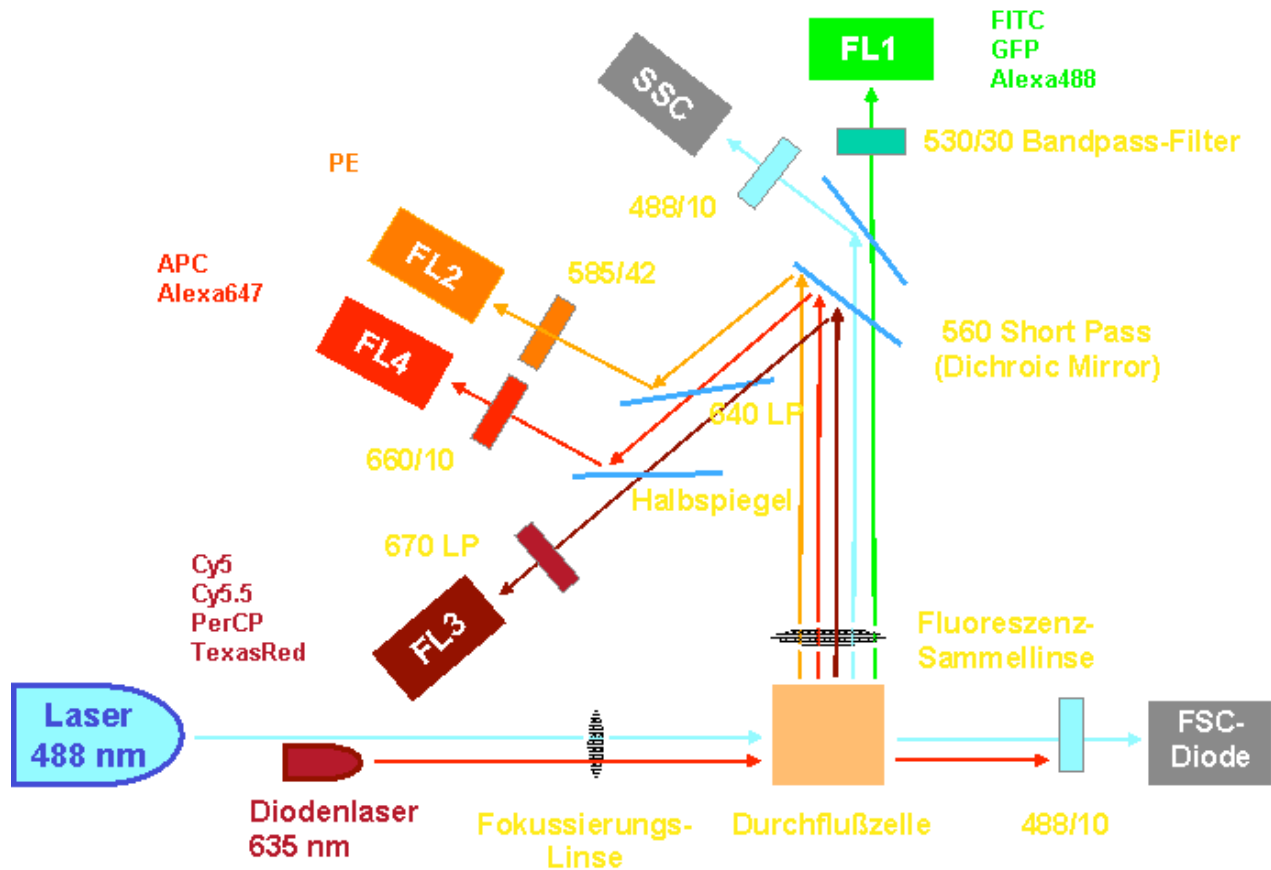


Abbildung 4: Aufbau eines FACSCalibur

Die Anregung zweier LASER wird in der Durchflusszelle auf eine Einzelzellsuspension geleitet. Die emittierte Fluoreszenz unterschiedlicher Eigenschaften wird über Linsen und Spiegel zu den entsprechenden Detektoren (FL1 bis FL4) geleitet. Die Streuung des Anregungslichtes wird in 180 ° und 90 ° Ablenkung in der FSC- und SSC-Diode detektiert. (verändert nach BD)

Die Messdaten werden in einer Einparameterdarstellung als Histogramm oder in einer Zweiparameterdarstellung als Punktwolken-Diagramm (*FACS Plot*, oder *dot plot*) dargestellt. Bei einem *FACS Plot* werden zwei Informationen über die Zelle logarithmischen Achsen zugeordnet und in Relation gestellt. Zellpopulationen können dabei z.B. anhand der Größe und Granularität, aber auch anhand der Expression bestimmter Oberflächenmarker identifiziert werden.

Der Einsatz einer Auswertungssoftware ermöglichte die Eingrenzung einer Zellpopulation (*Gate*) und einen Vergleich zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung.

2.2.3.2 FACS-Messung

Die Durchflusszytometrie ist eine wichtige Methode zur Untersuchung bestimmter Zellpopulation, die über Oberflächenmarker angefärbt und identifiziert werden können. Je nach Fragestellung kann sowohl eine quantitative als auch qualitative Aussage getroffen werden. Bei der Durchflusszytometrie werden hauptsächlich Fluoreszenz-markierte Antikörper eingesetzt. Die für diese Arbeit verwendeten Marker beschränkten sich auf FITC, PE, Cy5, bzw. Cy5.5 und APC für die Kanäle FL1 bis FL4. Die Messung erfolgte am gleichen Tag nach der Färbung der Zellen. Falls mehrere Messungen durchgeführt wurden, wurden die vorbereiteten Proben bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Kompensation und Einstellungen der Detektoren erfolgten anhand einer Negativprobe oder einer Isotyp Kontrolle. Um einen Vergleich der Proben gewährleisten zu können, wurden entweder die gleiche Gesamtzellzahl oder die gleiche Messzeit aufgenommen. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde mittels Probenverdünnung auf maximal 5000 Ereignisse pro Sekunde eingestellt.

2.2.3.3 Quantitative FACS-Messung mit Caltag Counting Beads

Die Zugabe von Caltag *Counting Beads* (Invitrogen) zur Messprobe erlaubte eine quantitative Messung mit der Durchflusszytometrie. *Counting Beads* bestehen aus Partikeln drei verschiedener Größen und besitzen fluoreszente Eigenschaften. Liegen diese in einem festgelegten Verhältnis vor, so konnte man von einem statistisch aussagekräftigen Ergebnis ausgehen. Kurz vor der Messung wurde eine definierte und konstante Menge (50 µl) der Partikel zur Probe hinzugegeben und gut gemischt. Das Probenvolumen war nicht relevant, da nur das Verhältnis zwischen Zellzahl und Partikelzahl von Bedeutung war. Die Dauer der Messung, bzw. die Gesamtzahl gemessener Zellen konnte variieren. *Counting Beads* haben eine breite Fluoreszenz mit einer Emission zwischen 385 nm und 800 nm, die laut Herstellerangaben vom UV-Bereich bis 635 nm angeregt werden kann. Die Partikelfluoreszenz ist typischerweise fünf- bis zehnfach stärker als die Fluoreszenz einer markierten Zelle und war gut abgrenzbar. Bei der Auswertung wurde eine Zellpopulation ins Verhältnis zur Anzahl gemessener *Counting Beads* gesetzt. Rechnerisch konnte anhand der Herstellerangaben der Partikel-Charge die Anzahl der Zellen in der Probe ermittelt werden.

$$\text{Konzentration der Probe [Zellen/\mu l]} = A/B \times C/D$$

A = Anzahl der Zellen (*events*)

B = Anzahl der *Beads* (*events*)

C = festgelegter Wert der *Bead* Anzahl, chargen-spezifisch (*Beads*/50 μ l)

D = Probenvolumen (μ l)

Dieses Verfahren wurde vor allem bei der Messung der Migration von basophilen Granulozyten eingesetzt. Dabei konnte eine Relation zwischen verschiedenen Organen aber auch zwischen unterschiedlichen Tagen erstellt werden. Außerdem konnte die Anzahl der *Beads* als standardisierte Größe eingesetzt werden, die die Abhängigkeit einer konstanten Gesamtzellzahl relativiert. Bei der Vorbereitung der Proben wurde darauf geachtet, dass alle Proben gleich behandelt wurden und sich die Anzahl der Gesamtzellen z.B. beim Absaugen der Probe nicht veränderte.

2.2.4 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

2.2.4.1 Prinzip ELISA

Die ELISA (*Enzym-linked Immunosorbent Assay*)-Methode wird mittels Antikörperbindung zum Nachweis und zur Mengenbestimmung von Proteinen oder niedermolekularen Verbindungen in einer flüssigen Probe eingesetzt. Die ELISA-Technik beruht auf mehreren möglichen Methoden, wobei zwei im Verlauf dieser Arbeit angewandt wurden.

Eine der Methoden ist das Prinzip des so genannten Sandwich-ELISA. Dabei bindet der erste spezifische mono- oder polyklonale Beschichtungs-Antikörper an einer besonders haftenden Oberfläche der ELISA-Platte. Ungebundene Antikörper werden nach der Zugabe des Waschpuffers entfernt und mittels Block-Substrat alle unspezifischen Bindungsstellen besetzt. Als Block-Substrat werden vor allem große Serumproteine wie Albumin verwendet. Anschließend werden die Proben, der Standard und eine negative Kontrolle inkubiert. Dabei geht, wie in Abbildung 5

gezeigt, der erste Antikörper eine spezifische Bindung mit dem nachzuweisenden Antigen (bzw. Protein) ein. Nach einem Waschvorgang erfolgt die Zugabe eines zweiten spezifischen Detektionsantikörpers, der ein anderes Epitop des Antigens erkennt. Dieser Detektionsantikörper ist Biotin-konjugiert und kann mit Hilfe eines Streptavidin-gekoppelten Enzyms nachgewiesen werden. Nach einem erneuten Waschvorgang, bei dem alle niedrigaffin gebundenen Antikörper entfernt werden, wird zum Nachweis eine Chromogenlösung hinzugegeben. Diese reagiert mit dem gekoppelten Enzym zu einem Farbumschlag, dessen Extinktion bei einer definierten Wellenlänge messbar ist. Ein häufig verwendetes Enzym ist die Meerrettich-Peroxidase (hoseradish peroxidase, HRP), die als Substrat Wasserstoffperoxid benötigt. Mit der Zugabe des Chromogens wird das farblose Tetramethylbenzidin (TMB) oxidiert und zu einem blauen Farbprodukt umgesetzt. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe einer Säure wird aus dem Oxidationsprodukt ein stabiler gelber Farbkomplex gebildet. Die Absorption des gebildeten Farbkomplexes ist photometrisch ermittelbar und nach Abzug der Negativ-Kontrolle proportional zur Probenkonzentration.

Um die Konzentration antigenspezifischer Antikörper im Tiermodell zu ermitteln, kann eine zweite ELISA Methode eingesetzt werden. Hierbei wurde jedoch die Mikrotiterplatte nicht mit einem Antikörper, sondern mit dem Antigen des Immunisierungsmodells bestückt. Daraufhin können alle Antikörper binden, die ein spezifisches Erkennungsmotiv für das verwendete Antigen besitzen. Der biotinylierte Detektionsantikörper ist nun auf den Fc-Teil (kristallisierbares Fragment) des Immunglobulin Isotyps (z.B. IgG1 oder IgG2a) gerichtet und kann über eine Bindung des enzymgekoppelten Streptavidins nachgewiesen werden. Hierbei wird 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) als Chromogenlösung eingesetzt, da bei einer Oxidation die homolytische Freisetzung der stabilen Radikale photometrisch durch eine Grünfärbung nachweisbar ist. Diese Reaktion kann nicht abgestoppt werden.

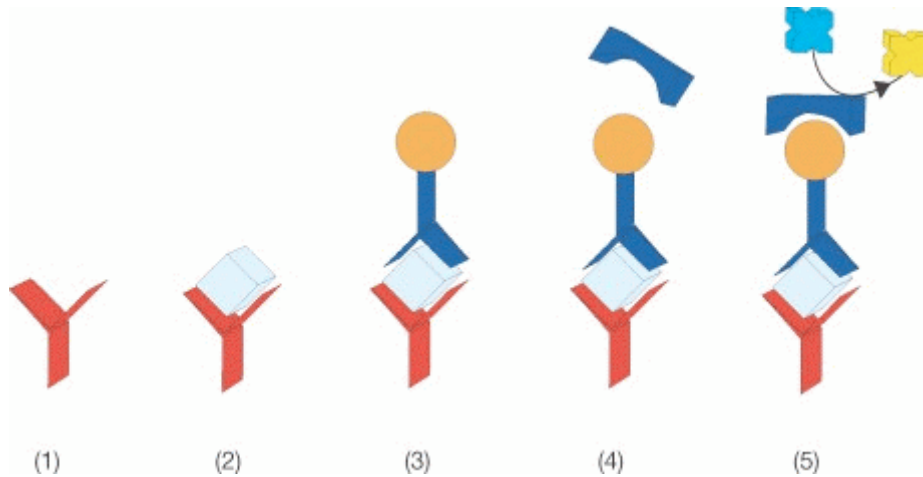


Abbildung 5: Prinzip des Sandwich ELISA

(1) ELISA Mikrotiterplatte wird mit einem Erstantikörper bestückt; (2) durch Zugabe der Probe bindet das Antigen durch eine spezifische Bindung am Antikörper; (3) Biotin konjugierter Detektionsantikörper wird hinzu gegeben und bindet an einem weiteren Epitop des Antigens, das durch den Erstantikörper gefangen wurde; (4) Zugabe von Streptavidin-HRP erfolgt und bindet am biotinylierten Detektionsantikörper; (5) Die Zugabe der Chromogen Lösung ist für eine Farbreaktion proportional zur Antigen-Konzentration der Probe verantwortlich. Die Reaktion wird durch die Zugabe einer Säure gestoppt und die Absorption gemessen. (*bendermedsystems*)

2.2.4.2 Zytokinnachweis mittels ELISA

Die ELISA-Methode wird zum Nachweis und Quantifizierung der Zytokinproduktion eingesetzt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere Zytokine wie z.B. IL-4, IL-6 oder IL-10 untersucht. Die ELISA-Methode ermöglichte die Untersuchung der Zytokinausschüttung basophiler Granulozyten nach einer Aktivierung. Dafür wurden handelsübliche Kits der Firmen R&D (z.B. IL-13) oder BD Biosciences (z.B. IL-6) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zellkultur-Überstände wurden nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer vorsichtig abgenommen und die Proben mit dem jeweiligen Blockpuffer verdünnt. Die Verdünnungsstufe wurde so gewählt, dass die Sensitivität des Standardbereichs, indem eine optimale und proportionale Detektion gewährleistet werden kann, eingehalten wurde. Zwischen allen Schritten erfolgten nach dem Protokoll der Hersteller drei bis fünf Waschschriffe mit 0,05% Tween in PBS.

Für einen ELISA der Firma R&D wurden Mikrotiterplatten mit dem Erstantikörper gegen das entsprechende Zytokin in PBS bestückt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei

Lichtausschluss und Raumtemperatur. Die Proben wurden in 1%iger BSA Lösung verdünnt und für 2 h inkubiert. Die Inkubation des Detektionsantikörpers erfolgte in einer Konzentration von 200 ng/ml für 90 min. Daraufhin wurde HRP-gekoppeltes Streptavidin für 30 min hinzugegeben. Nach fünffachem Waschen folgte die Farbreaktion.

Bei einem ELISA der Firma BD Biosciences wurde die ELISA-Platte mit dem spezifischen Erstantikörper in 100 µl *Coating*-Puffer bei 4 °C über Nacht beschichtet. Die Proben und aller weiteren Antikörper wurde in 10% FKS in PBS verdünnt. 50 µl der Proben wurden 2 h auf der gewaschenen ELISA-Platte bei Raumtemperatur inkubiert. Die weiteren Inkubationen erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Bei den Kits der Firma BD Biosciences wurde der Detektionsantikörper je nach Charge in einer 1:250 Verdünnung eingesetzt, wobei gleichzeitig das HRP-konjugierte Streptavidin-Reagenz für 90 min hinzugegeben wurde. Durch die Zugabe des Chromogens und dessen enzymatischer Umsetzung wurde daraufhin die Farbreaktion eingeleitet.

Für die Farbreaktion wurde pro Platte eine Tablette TMB in 10 ml TMB-Puffer aufgelöst und 3 µl Wasserstoffperoxid als Substrat hinzugegeben. 100 µl der Substrat-Chromogen-Lösung wurden pro Ansatz auf der ELISA-Platte verteilt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 30 min durch die Zugabe von 50 µl einer 12,5%igen Salzsäure. Das Ablesen der optischen Dichte (OD) erfolgte mit einem Photometer für Mikrotiterplatten bei der für TMB typischen Wellenlänge von 450 nm. Die Berechnung der Konzentrationen basiert auf der Korrektur durch einen Leerwert und einer platteneigenen Standardkurve.

2.2.4.3 Kombination aus Zellkultur und ELISA

Interleukine wie IL-4 sind bei der Kommunikation zwischen den Zellen beteiligt und werden nach der Synthese aus der Zelle in den extrazellulären Raum entlassen. Dieses von basophilen Granulozyten produzierte Interleukin-4 konnte an einer mit dem Erstantikörper behandelten Zellkulturplatte haften und in einem anschließenden ELISA-Verfahren mit interleukin-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Das Verfahren hat sich vor allem bei einer geringen Probenkonzentration bewährt. Für die

Analyse der IL-4-Sezernierung *in vivo* wurde eine Kombination aus Zellkultur und ELISA etabliert.

Hierbei wurden Zellen aus dem Knochenmark und der Milz isoliert und direkt auf einer mit dem Erstantikörper beschichteten ELISA-Platte kultiviert. Dieses Verfahren verhinderte, dass gebildetes IL-4 von den Zellen unmittelbar während der Kultivierung verbraucht wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte 4 h in Zellkultur-Medium. Anschließend wurden die Zellen von der Platte entfernt und der Zytokin-ELISA fortgeführt. Als Leerwert diente dabei der Messwert des Mediums.

2.2.4.4 Antigen-spezifischer ELISA

Der Nachweis antigenspezifischer Immunglobuline war für die Untersuchung der Antikörperproduktion während einer Gedächtnisimmunantwort von Bedeutung. Diese Methode wurde im Vorlauf der Arbeit etabliert. Nach der Immunisierung der Mäuse mit den Proteinen Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE) oder Pneumokokken Oberflächenprotein A (PspA) wurden im Blutplasma die Anzahl der antigenspezifischen Immunglobuline der Klasse IgG1 und IgG2a nachgewiesen. Hierfür entwickelten wir zwei ELISA-Methoden, die den Nachweis der APC- bzw. PE-spezifischen Immunglobuline erlaubten. Im Folgenden werden drei Waschschriffe mit 0,05% Tween in PBS zwischen den einzelnen Inkubationen bei Raumtemperatur und Lichtausschluss nicht wiederholt erwähnt.

Bei der ersten Methode wurden die ELISA-Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C mit 100 µl der Antigen-Lösung in der Konzentration 10 µg/ml APC oder PE bzw. 1 µg/ml PspA in PBS beschichtet. Die Plasmaproben und alle Antikörper wurden in einer 2%igen BSA Lösung verdünnt. Die Proben inkubierten für 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss in zwei unterschiedlichen Verdünnungen. Alle antigenspezifischen Immunglobuline haften dabei unabhängig von ihrem Isotyp an der Platte. Die Zugabe des Detektionsantikörpers schränkte den Nachweis des Isotypes ein. Ein Biotin-konjugierter Antikörper gegen murines IgG1- oder IgG2a-Immunglobulin wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml in 100 µl pro Reaktionsansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden für eine Stunde 100 µl einer HRP-gebundenen Streptavidin Lösung und anschließend

100 µl der ABTS-haltigen Chromogenlösung hinzugegeben. Zum Nachweis der Gesamtmenge aller antigenspezifischen Immunglobuline wurde ein HRP-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen murines Immunglobulin eingesetzt.

Die zweite Variante zum Nachweis antigenspezifischer Immunglobuline war nur für die Antigene APC und PE möglich, da für PspA kein biotinyliertes Konjugat erhältlich war. Die ELISA-Platten wurden mit dem monoklonaren isotypspezifischen Erstantikörper (10 µg/ml) gegen murine IgG1- oder IgG2a-Antikörper über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Probeninkubation erfolgte in verschiedenen Verdünnungen in 2% BSA. Alle Antikörper des entsprechenden Isotypes verblieben unabhängig von der Spezifität auf der ELISA-Platte. Der nächste Schritt schränkte die Antigen-Spezifität ein, indem 10 µg/ml des Biotin-konjugierten Antigens, z.B. APC-Biotin, hinzugegeben wurde. Die weiteren Schritte und Inkubationen erfolgten wie oben beschrieben.

Als Negativ-Kontrolle wurde im gleichen Volumen der Verdünnungspuffer eingesetzt. Da für diese ELISA-Methode kein direkter Standard zu Verfügung stand, wurde als interner Standard die Verdünnungsreihe eines bekannten antigenspezifischen Plasmas verwendet. Dies diente jedoch nur zur qualitativen Kontrolle. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte mittels *ELISA-Reader* durch die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm. Die Ergebnisse wurden in der relativen optischen Dichte (OD) nach Korrelation mit dem Leerwert der Negativ-Kontrolle angegeben.

2.2.5 Zellkultur

2.2.5.1 Quantifizierung und Vitalitätskontrolle

Vor jedem Zellkulturansatz wurde die Konzentration und Vitalität der Zellen bestimmt. Die Zellen wurden in einer Verdünnung mit Trypanblau-Lösung gefärbt und sofort mikroskopisch analysiert. Vitale Zellen nehmen den blauen Farbstoff nicht auf und erscheinen unter Durchlicht im Mikroskop hell, abgestorbene Zellen nehmen

hingegen den Farbstoff auf und werden dunkelblau. Die Vitalitätsfärbung mit Trypanblau gibt Hinweise auf den Zustand einer Zellmembran, aber nicht auf die Funktionstüchtigkeit einer Zelle.

Bei der Zählung von Leukozyten wurde auf die Färbung der Zellen mit Türk'scher Lösung zurückgegriffen. Diese besteht aus 3% Essigsäure und hämolysiert Erythrozyten, die eine genaue Quantifizierung in gut durchbluteten Geweben beeinflussen könnten. Die Türk'sche Lösung beinhaltet eine Kristallviolett-Substanz, die die Leukozytenkerne für die mikroskopische Analyse dunkel anfärbt.

Berechnung der Zellzahl:

$$z \text{ [Zellen/ml]} = Z \times V \times 10^4$$

Z = Zahl der gezählten Zellen in einem Großquadrat

V = Verdünnungsfaktor

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer, die ein Zählfeld von 1 mm Kantenlänge besitzt. Ein Zählfeld besteht aus Gruppenquadraten mit einer Fläche von 0,04 mm², die jeweils in 16 Kleinstquadrate mit je einer Fläche von 0,0025 mm² aufgeteilt sind. Das Aufbringen des Deckgläschens garantiert einen Abstand von 0,1 mm über der Zählkammer, so dass sich für ein Gruppenquadrat das Volumen von 0,004 mm³ ergibt. Immer 2 Großquadrate wurden ausgezählt und ein Mittelwert errechnet.

2.2.5.2 B-Zell-Proliferation

Die Proliferationseigenschaften der B-Zellen gaben Hinweise auf die Interaktion mit basophilen Granulozyten während einer *in vitro* simulierten Gedächtnisimmunantwort. Die Untersuchung der Zellproliferation wird mit Hilfe eines eingelagerten Farbstoffs durchgeführt. Der fluoreszente Farbstoff CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidylester*) wird zum Zeitpunkt der Färbung durch passive Diffusion intrazellulär aufgenommen und kovalent über die Succinidyl-

Gruppe an Amino-Gruppen gebunden. Bei jedem Teilungsvorgang verteilt sich der stabile Farbstoff zu gleichen Teilen in den Tochterzellen. Dadurch halbiert sich die Fluoreszenzintensität einer Zelle. Jede weitere Halbierung der Fluoreszenz bedeutet den nächsten abgeschlossenen Zellteilungszyklus. Die Fluoreszenz hat nach Herstellerangaben ein Anregungsmaximum bei 492 nm und ein Emissionsmaximum bei 517 nm und ist mittels FACS bei 488 nm Anregung im FL1 Kanal durchflusszytometrisch detektierbar. Diese Methode bietet ein Verfahren zur Untersuchung der Proliferationseigenschaft einer Zellpopulation.

Für die Analyse der B-Zell-Proliferation wurden CD19⁺ B-Zellen aus der Milz direkt über anti-CD19-*Microbeads* in MACS-Puffer mittels MS-Säulen isoliert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die CD19⁺ B-Zellen in einer 0,1%igen BSA Lösung resuspendiert. Auf 10 ml dieses CFSE-Puffers wurden 3 µl CFSE gegeben und die Zellen in entsprechendem Volumen für 5 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, und die Zellzahl erneut bestimmt. 50.000 CD19⁺ B-Zellen wurden mit 50.000 CD4⁺ T-Zellen und anti-CD3 (0,5 µg/ml) kultiviert. Die anti-CD3-Gabe simulierte dabei eine unspezifische polyklonale Aktivierung der T-Zellen und war ein notwendiger Stimulator für T-Zellen zur B-Zell-Hilfe. Um Unterschiede im Proliferationsverhalten der B-Zellen zu analysieren, wurden basophile Granulozyten, die durch IL-3 (10 ng/ml), anti-FcεRIα (0,5 µg/ml) oder anti-IgE (0,5 µg/ml) aktivierte wurden, in unterschiedlicher Anzahl mit aktivierten T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen kultiviert.

Die Fluoreszenzintensität der intrazellulären CFSE-Einlagerungen wurde nach 72 h mittels FACS-Analyse ermittelt. Die Zellen aus der Kultur wurden mit anti-CD19-PE angefärbt und deren Fluoreszenz durchflusszytometrisch ermittelt. Für die Auswertung der B-Zell-Proliferation wurde zum Einen eine halblogarithmische Histogramm-Darstellung der CFSE-Fluoreszenz zu der Anzahl CD19⁺ B-Zellen gewählt, zum Anderen wurde die Fluoreszenzintensität der CFSE-Einlagerungen der Zellen unterschiedlicher Stimulationen statistisch verglichen.

2.2.5.3 Kultivierung von CD4⁺ T-Zellen nach in vivo Restimulation

CD4⁺ T-Zellen wurden nach *in vivo* Depletion basophiler Granulozyten aus der Milz APC-immunisierter Mäuse isoliert. Dies ermöglichte die Untersuchung der *in vivo* Aktivierung basophiler Granulozyten nach Restimulation mit 10 µg Antigen. Bei der CD4-Isolation wurde eine direkte Färbung mit CD4-*Microbeads* vorgenommen, wobei die Milzzellen für einen größeren Reinheitsgrad zweifach über MS-Säulen aufgereinigt wurden. Als Kontrolle dienten CD4⁺ T-Zellen aus naiven Mäusen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden 200.000 CD4⁺ T-Zellen der behandelten Tiere mit 800.000 CD4⁻ CD8⁻ antigenpräsentierenden Zellen aus naiven Mäusen kultiviert. Die Isolation erfolgte über Anfärbung der Zellen mit CD4- und CD8-*Microbeads*, wobei für den Zellkulturansatz die negative Fraktion einer LD-Säule eingesetzt wurde. Nach drei Tagen Kultivierung mit und ohne Stimulation durch APC (1 µg/ml) wurde der Überstand abgenommen und für eine Untersuchung der Zytokin-Sekretion mittels ELISA vorbereitet.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA-Isolation

Die Produktion von Zytokinen kann sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene untersucht werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Isolation von Gesamt-RNA aus murinen Geweben und Zellen angewandt.

Ganze Gewebe- oder Organstücke wurden in flüssigem Stickstoff und -80 °C gelagert, oder direkt nach der Präparation mit 1 ml PeqGOLD TriFast (Peqlab) überschichtet und homogenisiert. Kleinere Zellmengen und Zellen aus der Kultur wurden nach dem RNeasy System von QIAGEN zur Isolierung von RNA nach Angaben des Herstellers behandelt. Entsprechend der Zellzahl wurden die Zellen in einer bestimmten Menge RLT-Puffer resuspendiert und direkt weiterverarbeitet. Während der gesamten Präparation wurden die Proben stets auf Eis gelagert, um RNase Aktivitäten zu verhindern. Bei sämtlichen RNA-Arbeiten wurde auf RNase-

freie Materialien und Geräte und den Gebrauch von Laborhandschuhen geachtet, um einen enzymatischen Abbau der RNA zu vermeiden.

Zum Einen wurde eine modifizierte Methode von Chomczynski und Sacchi ⁸⁵ über eine Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung von PeqGOLD TriFast durchgeführt. Organstücke bis zu 100 mg wurden in 1 ml TriFast mittels Stabhomogenisator dreimal für 1 min auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Dabei dissoziierten die Nukleoproteinkomplexe von der RNA. TriFast beinhaltet in einphasiger Lösung Phenol und das chaotrope Denaturierungsmittel Guanidinisothiocyanat, das für die Lyse der Zellen und Denaturierung der Proteine verantwortlich ist. Mit der Zugabe von 200 µl Chloroform bildeten sich zwei Phasen, die eine Trennung von Proteinen, DNA und RNA ermöglichte.

Nach der zehnminütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit ergab sich eine deutliche Phasentrennung, wobei die untere organische Chloroformphase den Proteinanteil, die Interphase die denaturierte DNA und die obere wässrige Phase den RNA-Anteil des Materials enthält. Die RNA wurde durch vorsichtige Abnahme der wässrigen Phase von DNA und Proteinen getrennt und in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Die nachfolgende Nukleinsäurefällung durch Zugabe und Inkubation von 300 µl Isopropanol mit anschließender Zentrifugation bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 10 min pelletierte die RNA am Gefäßboden. Für die RNA-Isolation aus Milzgewebe wurde eine Mischung aus 250 µl Isopropanol und 250 µl Hochsalzlösung verwendet. Das RNA Pellet wurde mehrfach mit 75% Ethanol gewaschen, um kontaminierende Salze zu entfernen und Ethanolreste durch anschließende Trocknung des Pellet entfernt. Die RNA wurde in 30 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Bei niedrigen Zellzahlen und RNA-Extraktion aus CD4⁺ T-Zellen fand eine weitere Methode zur Isolation von RNA Anwendung. Je nach Ausgangsmenge des Materials kann zwischen *Mini-* oder *Microkit* des RNeasy System von QIAGEN gewählt werden. Diese RNA-Isolationmethode basiert auf dem Prinzip der Adsorption von RNA an einer Säulenmatrix unter Verwendung geeigneter Puffersysteme und erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls. Das Ausgangsmaterial wurde in dem

Guanidinisothiocyanat enthaltenen RLT-Puffer mit einer 25G Kanüle oder einer Pipette mehrfach auf und ab gezogen und die Zellen lysiert. Das chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat ist für die Denaturierung von Proteinen, inklusive RNasen, und Stabilisierung der intakten RNA verantwortlich. Anschließend wurde dem zähflüssigen Zell-Lysat das gleiche Volumen 70% Ethanol hinzugegeben und durch eine hydrophile Silizium-Gelsäule zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach 15 sek Zentrifugation bei 8000 xg/ RT verworfen. RNA bindet an der großen Oberfläche aufgrund der hohen Adsorptionsfähigkeit der Kieselge-Säulenmatrix. Der Proteinanteil wurde durch Waschschrötte reduziert. DNA-Verunreinigung wurden über einen enzymatischen Verdau mit Hilfe von DNase I in entsprechender Pufferzusammensetzung und einem zusätzlichen Waschschrötte entfernt. Daraufhin konnte die intakte RNA in nuklease-freiem Wasser eluiert werden.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration, -Qualität und -Reinheit erfolgte photometrisch mittels NanoDrop® (ND-1000 UV/VIS Spektralphotometer). Hierbei wurde von einem Mikroliter der Proben eine Flüssigkeitssäule hergestellt und eine küvettenlose photometrische Messung durchgeführt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) diente als Maß zur Bestimmung des Reinheitsgehaltes der gewonnenen RNA. Bei einer idealen Präparation liegt der Quotient (260:280) bei 2. Die Reinheit der RNA-Isolationen schwankte zwischen 1,8 und 2,1. Bis zur Weiterverarbeitung für die Reverse Transkription wurden die RNA-Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.6.2 Reverse Transkription

Um die Zytokin-Expression auf mRNA-Ebene bestimmen zu können, musste die Ribonukleinsäure (RNA) in Desoxiribonukleinsäure (DNA) transkribiert werden. Dies ermöglichte das Enzym der Reversen Transkriptase, das mehrere funktionelle Untereinheiten besitzt. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase erkennt dabei einzelsträngige RNA-Moleküle und erstellt einen komplementären cDNA Strang. Die RNaseH-Untereinheit baut daraufhin den RNA-Anteil ab.

Für die reverse Transkription wurden 2 µg Gesamt-RNA in 9 µl nuklease-freiem Wasser angesetzt und mit 0,5 µg Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (1 µl) für 3 min auf 70 °C

erhitzt. Dabei lösten sich RNA-Sekundärstrukturen wie *hairpins* auf und ermöglichte eine Anlagerung der Oligo-Primer während der anschließenden Abkühlung auf Eis. Dem Reaktionsgemisch wurden 4 µl des Erststrang(*first strand*)-Transkriptionspuffers, 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP) und 1 µl nuklease-freies Wasser zugesetzt. Das Enzym M-MLV Reverse Transkriptase wurde mit 1 µl für 200 U/µl eingesetzt und ist in dem murinen Leukämie-Virus für eine sehr effektive RNA-abhängige cDNA Polymerisation verantwortlich. Die enzymatische cDNA-Synthese erfolgte für 60 min bei 37 °C. Die Inaktivierung des Enzyms wurde durch ein zweiminütiges Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 95 °C erzielt. Das Endvolumen wurde anschließend mit nuklease-freiem Wasser auf 100 µl erhöht und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die so erhaltene cDNA diente als Ausgangsmaterial für die quantitative *Real-time* PCR, um einen Vergleich der Expression auf RNA-Ebene zu untersuchen.

2.2.6.3 Prinzip der quantitativen Real-Time PCR

Die zeitgleiche (*real time*) Kontrolle der Amplifikation durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglichte viele neue Anwendungsgebiete in der Molekularbiologie. Die DNA-Menge wird dabei am Ende der Elongation in jedem Zyklus über die Anzahl eingelagerter Fluoreszenzfarbstoffe bzw. die Fluoreszenzintensität indirekt gemessen. Die Fluoreszenzintensität verhält sich dabei proportional zur DNA-Menge und ermöglicht den exponentiellen Verlauf der DNA-Amplifizierung in Echtzeit zu verfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren der TaqMan *Real-Time* PCR angewandt, um die Zytokin-Produktion zu untersuchen.

In einer Mischung sind 5'-Primer (*sense*) und 3'-Primer (*antisense*), sowie ein drittes Oligonukleotid (Sonde) mit besonderer Eigenschaft enthalten. Die Sonde wird aus drei Bestandteilen aufgebaut. Das Oligonukleotid der Sonde bindet spezifisch an eine komplementäre Sequenz zwischen dem 5'- und dem 3'-Primer an der cDNA (Abbildung 6). Am 3'-Ende des Sonden-Oligonukleotides befindet sich ein nicht-fluoreszenter *Quencher*, der eine akkurate Messung der Amplifikation ermöglicht. Der fluoreszente Reporterfarbstoff (z.B. FAM), der am 5'-Ende des Oligonukleotids gekoppelt ist, wird durch die räumliche Nähe zum Quencher in der Emission seiner

Fluoreszenz gestört. Dieses Phänomen ist als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bekannt und beruht auf dem Effekt einer strahlungsfreien Energieübertragung zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen. Die Voraussetzungen für einen FRET-Effekt sind passende Fluoreszenzpartner mit überlagernden Spektren zwischen Donor und Akzeptor und eine räumliche Nähe im Nanometerbereich. Der fluoreszente Reporterfarbstoff wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende der Sonde abgebaut. Dadurch entfernen sich *Quencher* und Fluorophor voneinander. Dies hat eine steigende Fluoreszenz zur Folge, die am Ende jeder Elongationsphase photometrisch gemessen wird.

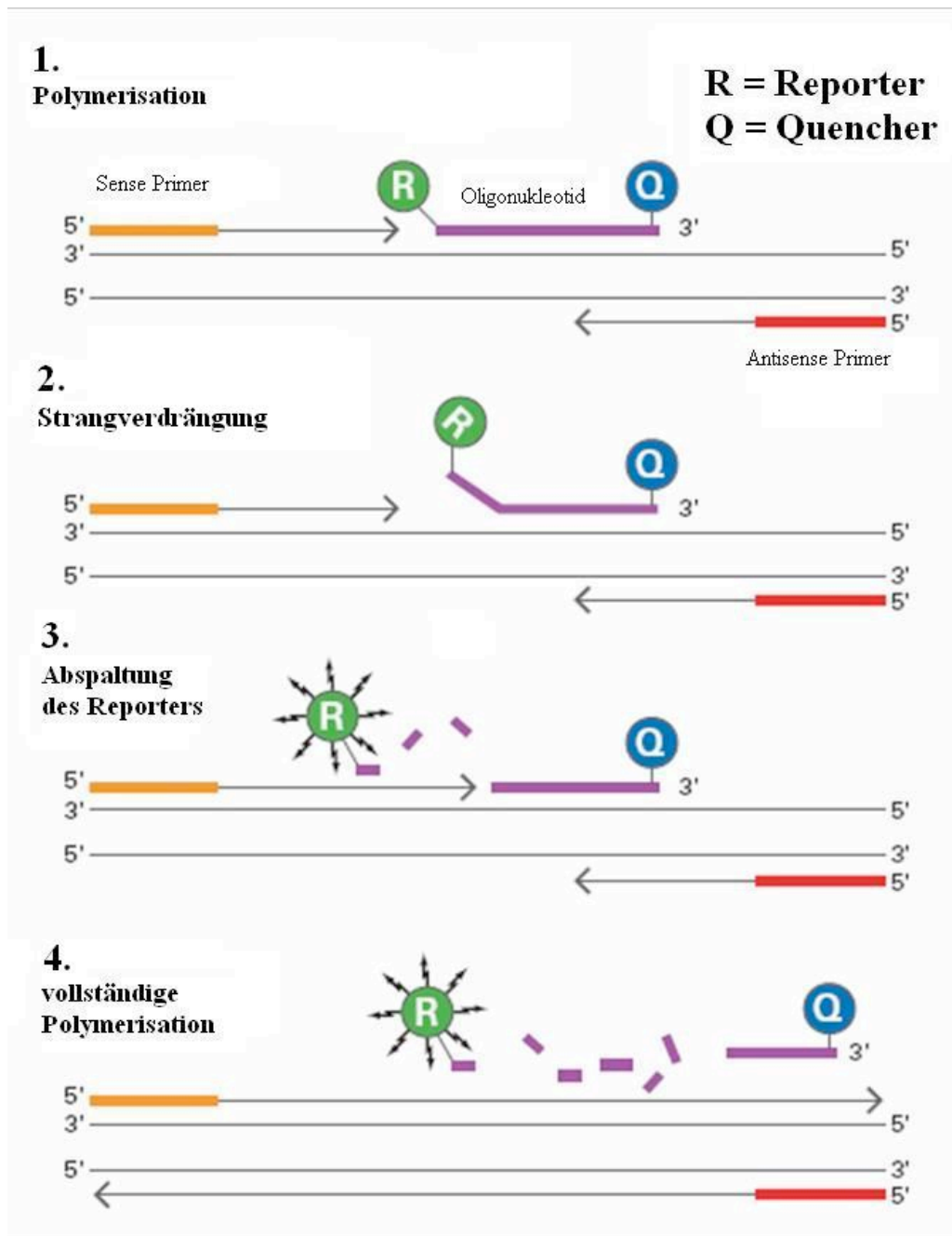


Abbildung 6: Quantifizierung von cDNA mit Hilfe der *Real-time* PCR und TaqMan-Sonden

(1) Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird bei intakter TaqMan-Sonde aufgrund direkter Nähe zu einem Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) unterdrückt. (2) Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang, die Reporter-Fluoreszenz bleibt zunächst unterdrückt. (3) Die *Taq*-Polymerase baut auf Grund ihrer 5'-3'-Exonucleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde während der PCR-Zyklen ab. Die Fluoreszenz des Reporters wird nun nicht mehr durch den Quencher gelöscht und kann gemessen werden. (4) Reste der Sonde werden abgebaut und die DNA vollständig polymerisiert.

Die Berechnung der relativen Menge einer spezifischen cDNA im Ausgangsmaterial beruht auf dem Vergleich mit einem konstant exprimierten Referenzgen. Die Daten der Zielgene wurden auf die Expression von GAPDH normalisiert. Die Auswertung der TaqMan-Ansätze erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, bei der die Zykluszahlen der Zielgene mit dem des Referenzgens in Zusammenhang gebracht werden. Die Effizienz wird hierbei auf den optimalen Wert 2 gesetzt.

Gleichungen:

$$\begin{aligned}\Delta\text{CT} &= \text{CT}(\text{Zielgen}) - \text{CT}(\text{Referenzgen}) \\ \Delta\Delta\text{CT} &= \Delta\text{CT}(\text{Behandlung}) - \Delta\text{CT}(\text{Kontrolle}) \\ \text{Ratio R} &= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}\end{aligned}$$

Der CT-Wert wurde mithilfe die Amplifikationskurve einer PCR-Reaktion ermittelt. Der CT-Wert wurde als Schnittpunkt der ansteigenden Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert (*threshold*) in einer biparametrischen Darstellung von Zykluszahl zu DNA-Konzentration (bzw. Fluoreszenzintensität) definiert. Die relative Quantität (*Ratio*) gibt das Expressionsverhältnis eines Genes zwischen zwei Gruppen an, wobei eine Normierung auf das Referenzgen stattgefunden hat.

2.2.6.4 *TaqMan-Assay*

Für den PCR-Ansatz wurde die einzelsträngige cDNA in geeignetem Maß verdünnt und 5 μl auf ein Loch einer 384 Loch-Platte gegeben. Die cDNA wurde über Nacht an die Oberfläche gebunden. Am folgenden Tag wurden je Ansatz 0,5 μl der Sondenmischung (*Assay*), 5 μl TaqMan® *Gene Expression Mastermix* und 4,5 μl nuklease-freies Wasser hinzugegeben. Als Reporterfluoreszenzfarbstoff der Sonde wurde FAM (6-FAM-phosphoramidit) gewählt. Der *Mastermix* enthielt eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und konnte die einzelsträngige cDNA vervollständigen.

PCR-Programm:

	50 °C	2 min
	95 °C	10 min
40 Zyklen:	95 °C	15 sek
	60 °C	1 min

2.2.7 In vivo Methoden**2.2.7.1 Immunisierung**

Die Untersuchung der Gedächtnisimmunantwort benötigte eine Immunisierung mit einem leicht detektierbaren Antigen in einem einfachen Modellorganismus. Im Verlauf dieser Arbeit wurden Mäuse mit den Modellantigenen Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE) und Pneumokokken Oberflächenprotein A (PspA) mit unterschiedlichen Adjuvantien als Verstärker der Immunreaktion immunisiert.

APC ist ein Protein der Phycobiliprotein-Familie aus je drei α - und β -Untereinheiten mit 104 kDa Größe. Allophycocyanin stammt aus Cyanobakterien der Art *Spirulina platensis* und wird in 60% Amoniumsulfat und 0,1 M Natriumphosphat (pH 7,0) geliefert. Allophycocyanin hat ein Absorptionsmaximum bei 650 nm, ein Emissionsmaximum bei 657 nm und einen Extinktionskoeffizienten (E^{196}_{650}) von 73.

Das Protein PE liegt in Lösung mit 60% Amoniumsulfat, 50 mM Kaliumphosphat und 5 mM Natriumazid (pH 7,0) vor. Phycoerythrin gehört ebenfalls zu der Gruppe der Phycobiliproteine, wird aus der Rotalge gewonnen und ist 240 kDa groß. PE besitzt fluoreszente Eigenschaften und hat bei einem primären Anregungsmaximum von 565 nm und einem Haupt-Emissionsmaximum (λ_{\max}) von 575 nm einem Extinktionskoeffizienten (E^{196}_{566}) von 82. Die maximale Absorption findet laut Herstellerangaben bei 566 nm statt. Das Pneumokokken Oberflächenprotein A (PspA) wurde an der *University of Alabama, Birmingham* (USA) von S. Hollingshead und D.E. Briles hergestellt.

Die Herstellung des Aluminiumpräzipitats ist unter 2.1.16 beschrieben. Bei einer Immunisierung mit Aluminiumpräzipitat als Verstärker wurde darauf geachtet, dass der Antigen-Adjuvans-Komplex in neutralem pH vorlag und über Nacht eine Sättigung erreichen konnte. Erst am folgenden Tag wurde eine Verdünnung auf 10 µg Antigen mit Adjuvans in 200 µl sterilem PBS pro Maus hergestellt und für die *intraperitoneale* Immunisierung verwendet.

Ein weiteres Adjuvans ist der hitze-inaktivierte Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) der Firma BD Biosciences. Bei einer Immunisierung mit diesem Verstärker wurden 1×10^9 *B. pertussis* Zellen mit 100 µg Antigen pro Maus angesetzt.

Die Immunisierung gegen PspA erfolgte mit 10 µg Antigen pro Maus ohne Zugabe eines Immunverstärkers. Jede Immunisierung wurde in 200 µl PBS durch *intraperitoneale* (*i.p.*) Injektion vorgenommen. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde nach der Immunisierung beobachtet.

In einigen Versuchen wurden Mäuse auch mehrfach mit dem gleichen Adjuvans immunisiert um eine stärkere Immunisierung über einen langen Zeitraum zu erreichen. Dies war vor allem bei den Spendermäusen für den Transfer antigenspezifischer Knochenmark- und Milzzellen auf naive Mäuse gefordert. Eine Restimulation erfolgte grundsätzlich ohne erneute Zugabe des Adjuvans mit der gleichen oder einer geringeren Antigenmenge. Der Erfolg der Immunisierung wurde frühestens nach drei Wochen durch eine Blutentnahme und FACS-Analyse kontrolliert. Dafür wurden Antigen-positive Zellen bestimmt, indem die Zellen in 2 Färbungen mit und ohne das Antigen angefärbt wurden. Die Spezifität der Messung konnte über eine deutliche Positivität gegenüber dem Antigen im Vergleich zur Kontrollmessung ohne Antigen verdeutlicht werden. Die erfolgreiche PspA-Immunisierung wurde anhand der Bildung antigenspezifischer Antikörper mittels ELISA nachgewiesen.

2.2.7.2 *In vivo* Depletion der basophilen Granulozyten / Behandlung der Mäuse mit MAR-1

Der Mechanismus der *in vivo* Depletion einer Zellpopulation durch die Gabe eines Antikörpers ist im Detail noch nicht bekannt. Die Depletion hat eine systemische Entfernung basophiler Granulozyten zur Folge und diente deshalb der Untersuchung basophiler Granulozyten bei einer Gedächtnisimmunantwort^{1,2}. Für die Depletion von basophilen Granulozyten wurde immunisierten Mäusen zweimal täglich 5 µg des Antikörpers gegen den hochaffinen IgE Rezeptor FcεRI (MAR-1) *i.p.* injiziert. Diese MAR-1 Behandlung wurde drei Tage in Folge durchgeführt. Das Volumen betrug für jede Injektion 200 µl in PBS. Als Kontrolle wurde ein gleicher Isotyp ohne Spezifität (Isotyp Kontrolle) aus dem Armenischen Hamster oder PBS als Vehikelkontrolle verabreicht.

Die erfolgreiche Depletion basophiler Granulozyten wurde durch Blutentnahme und anschließender FACS-Analyse zu mehreren Zeitpunkten kontrolliert. Die Identifizierung basophiler Granulozyten erfolgte mit Hilfe von anti-IgE und anti-CD49b, die Identifizierung antigenbindender B-Zellen mit Hilfe von anti-CD19. Die Antigene APC und PE wurden je nach Immunisierung in einer Konzentration von 0,1 µg/ml gefärbt, um die antigenspezifische Zellpopulation durchflusszytometrisch ermitteln zu können.

Für die Bestimmung der antigenspezifischen Immunglobuline während einer Gedächtnisimmunantwort bei depletierten im Vergleich zu undepletierten Mäusen wurde das Plasma zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Restimulation mittels ELISA untersucht. Zu einigen Zeitpunkten wurden ebenfalls Zellen aus Knochenmark und Milz isoliert und für die Zellkultur präpariert. 2×10^6 Zellen wurden für 4 h in 200 µl Medium kultiviert, um die Zytokin-Ausschüttung zu ermitteln (siehe 2.2.4.3).

Die Depletion basophiler Granulozyten wurde für jedes der erwähnten Immunisierungsmodelle und die Mausmodelle C57BL/6 N, FcεRIα-defiziente Mäuse (*FcεRIα*^{-/-}), Mastzell-defiziente Mäuse (*W/W^v* und *W^{SH}*) und FcRγ-defiziente Mäuse (*FcεRIγ*^{-/-}) wiederholt.

2.2.7.3 Adoptiver Transfer von basophilen Granulozyten

Der adoptive Transfer bezeichnet die passive Übertragung einer immunologischen Reaktionsbereitschaft. Dabei werden immunkompetente Zellen eines immunisierten Spenders auf einen naiven Empfänger übertragen. Die immunologische Reaktion der übertragenen Zellen kann nach Restimulation untersucht werden. Dies diente der Analyse der Übertragbarkeit von Eigenschaften antigenspezifischer basophiler Granulozyten.

Basophile Granulozyten aus Milz und Knochenmark APC-immunisierter Spendermäuse wurden isoliert und anhand einer CFSE-Färbung (*Carboxyfluorescein succinimidylester*) die Übertragbarkeit auf naive Empfängermäuse untersucht. CFSE ist ein fluoreszenter Farbstoff, der eine stabile, kovalente Bindung mit intrazellulären Molekülen eingeht. Die Färbung der Zellen hält über Wochen an und eignet sich auch zur Untersuchung der Zellmigration. 24 h nach dem Transfer wurden Milz und Knochenmark der Empfängermäuse auf CFSE-positive basophile Granulozyten untersucht. Die basophilen Granulozyten wurden dabei als IgE⁺ Zellen anhand ihrer Positivität für APC und CFSE als endogen oder exogen identifiziert.

Um die Wirkung antigenbindender basophiler Granulozyten besser charakterisieren zu können, wurden Spender-Mäuse zweimal im Abstand von vier Wochen mit 100 µg APC oder PE in *B. pertussis* immunisiert. Vier Wochen nach der letzten Immunisierung wurden aus diesen Mäusen die Milzen und das Knochenmark aus *Femur* und *Tibia* isoliert und von mehreren Mäusen vereint. Anschließend erfolgte eine *in vitro* Negativ-Selektion über MACS-Aufreinigung. Dabei wurden die Antikörper-produzierenden Plasmazellen über biotinylierte anti-CD138 und anti-Biotin *Microbeads* auf der LD-Säule magnetisch zurückgehalten. Der Durchlauf der MACS-Aufreinigung enthielt keine Plasmazellen. Für den Transfer war eine Entfernung der Plasmazellen notwendig, um eine Neuproduktion von Antikörpern und deren Auswirkungen zu vermeiden. Der Hälfte der Zellen wurden zusätzlich alle basophilen Granulozyten entzogen. Dies erfolgte über die Färbung mit anti-IgE-FITC und gegen FITC gerichteten magnetischen *Microbeads* mittels MACS-Zellseparation. Der Durchlauf wurde aufgefangen und war zu 95% von basophilen Granulozyten bereinigt. Die Zellen beider Gruppen wurden gezählt und in gleicher Menge (ca. 98×10^6) *intravenös* über das *retrobulbäre* Venengeflecht in sedierte Mäuse injiziert.

Eine naive Empfänger-Maus erhielt ca. 50% der Splenozyten und 50% der Knochenmarkzellen einer immunisierten Spendermaus. Eine weitere Gruppe, die nur PBS erhielt, diente als Kontrolle. Alle Mäuse wurden 16 h und 24 h nach Transfer antigenspezifischer Zellen mit jeweils 10 µg APC oder PE (ohne Adjuvans) behandelt. Bei dieser geringen Antigenmenge ohne Immunverstärkung sollten nur die transferierten Zellen reagieren. In regelmäßigen Zeitabständen wurde den Mäusen Blut entnommen und das Plasma mittels ELISA auf die Konzentration antigenspezifischer Immunglobuline der Klasse IgG1 und IgG2a untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Antigenbindung auf basophilen Granulozyten

Die Fähigkeit basophiler Granulozyten freies Antigen zu erkennen und zu binden, lässt auf einen wichtigen Beitrag bei der Entstehung einer Gedächtnisimmunantwort schließen. Zu Beginn der Arbeit bekannt²⁹, dass basophile Granulozyten *in vitro* Antigene binden und mit der Sezernierung von Zytokinen reagieren können. Diese Erkenntnisse dienten als Einstieg in die folgend dargestellten Untersuchungen.

Allophycocyanin (APC) wurde als Modellantigen für die Immunisierung verwendet. Dieses fluoreszente Protein aus Cyanobakterien wird vom körpereigenen Immunsystem als Fremdprotein erkannt, so dass eine Immunreaktion stattfindet. Aufgrund der fluoreszenten Eigenschaften von APC können Zellen, die das intakte Antigen auf ihrer Oberfläche gebunden haben, mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

3.1.1 Basophile Granulozyten können Antigene *in vitro* binden

Die folgenden Versuche dienten zur weiteren Charakterisierung der Antigenbindung *in vitro*. Sechs Wochen nach der Immunisierung mit APC und *B. pertussis* als Adjuvans wurden von naiven und APC immunisierten Mäusen Zellen aus Knochenmark und Blut isoliert und für eine Anfärbung *in vitro* mit 10 µg/ml APC inkubiert. APC wurde dabei von Zellpopulationen in Knochenmark und peripherem Blut an der Oberfläche gebunden. Bei naiven, nicht-immunisierten Mäusen konnte keine Bindung von APC detektiert werden. Die APC-bindenden Zellpopulationen unterschieden sich in ihrer Positivität für den IgE-Marker. Sie differenzierten sich in IgE⁺ Zellen und eine kleinere IgE⁻ Population. Die IgE⁺ Zellen, die bei immunisierten Mäusen in Blut und Knochenmark durch eine Bindung von APC markiert werden konnten und in der Abbildung 7 im oberen rechten Quadranten zu sehen sind, wurden als basophile Granulozyten identifiziert. Basophile Granulozyten aus naiven Mäusen (obere linke Quadranten) konnten jedoch kein APC auf ihrer Oberfläche binden können und sind deswegen negativ für APC. Die kleinere APC⁺ IgE⁻

Zellpopulation bestand aus Gedächtnis-B-Zellen, die das Antigen auf ihrer Oberfläche binden konnten.

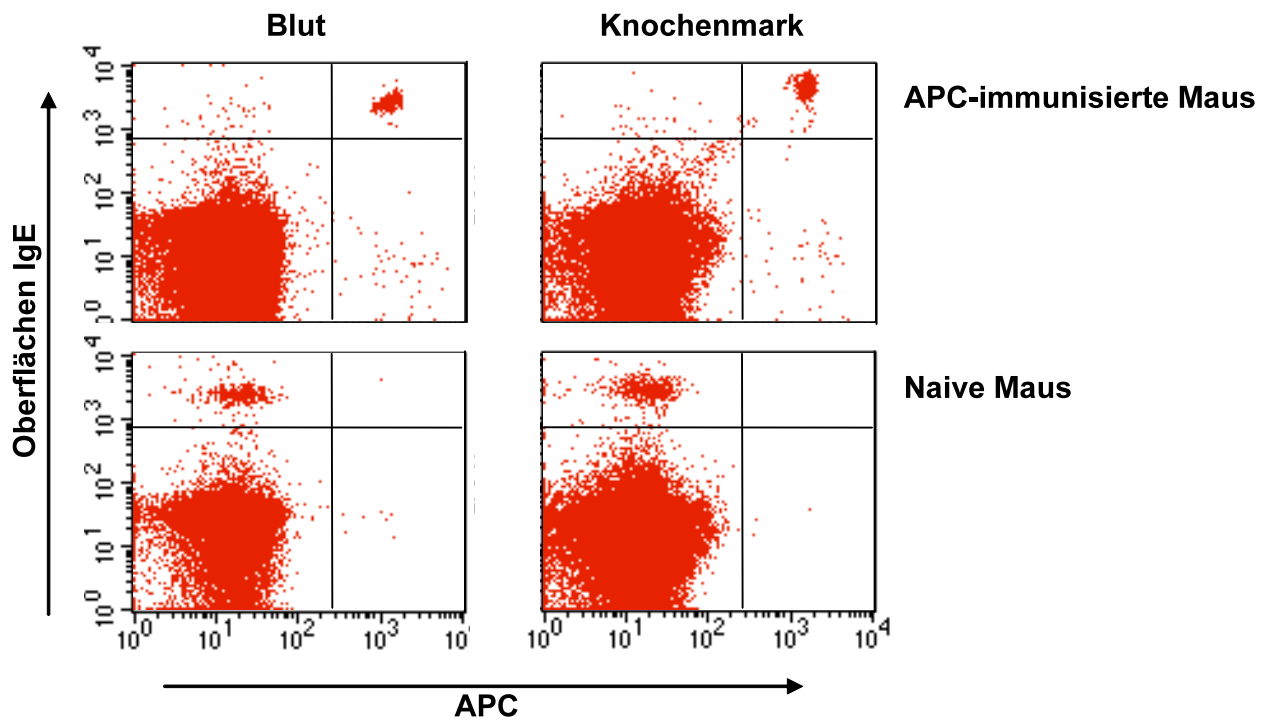


Abbildung 7: Durchflusszytometrie nach *in vitro* Färbung

FACS Plot von Blut- (links) Knochenmarkzellen (rechts) einer naiven (unten) oder APC immunisierten (oben) Maus nach *in vitro* Färbung mit $10 \mu\text{g/ml}$ APC und anti-IgE-FITC.

Schon bei sehr geringen Konzentrationen ab 1 ng/ml APC erfolgte bei vorher immunisierten Tieren eine Bindung des Antigens an basophile Granulozyten. Bei Mäusen, die einen Defekt in der IgE-Produktion oder dem IgE-Rezeptor besitzen, war keine APC-Bindung auf basophilen Granulozyten detektierbar. Auch bei APC-immunisierten IL-4-defizienten Mäusen, die kein IgE herstellen können, konnte im Vergleich zu immunisierten Kontrollmäusen keine APC-Bindung auf der Oberfläche basophiler Granulozyten gemessen werden (Abbildung 8).

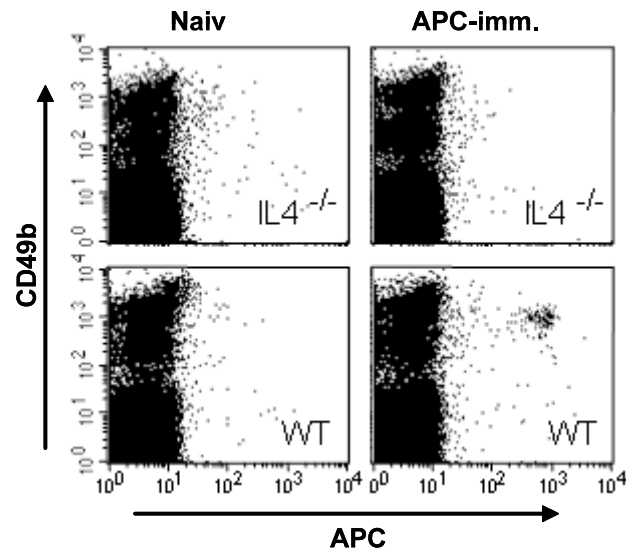


Abbildung 8: Basophile Granulozyten aus IL4-defizienten Mäusen binden kein Antigen

Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung von Splenozyten aus C57BL/6 Wildtyp (WT) und IL-4-defiziente Mäuse (IL4^{-/-}) nach vierwöchigem Immunisierungsintervall mit 100 µg APC in hitze-inaktiviertem *B. pertussis* (APC-imm.) oder ohne Immunisierung (Naiv). Fünf Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Milzzellen *in vitro* mit anti-CD49b und APC (10 µg/ml) gefärbt. Die Abbildung ist repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.¹

In Abbildung 9 konnte gezeigt werden, dass auf basophilen Granulozyten aus Mäusen, die entweder einen Defekt im hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) oder der Fc-Rezeptor gemeinsamen γ-Kette (FcRγ) besitzen, ebenfalls kein Antigen nachgewiesen werden konnte. Für APC-immunisierte Wildtyp-Mäuse (WT) stellte sich eine APC⁺ und IgE⁺ Zellpopulation im oberen rechten Quadranten dar. Diese Zellpopulation fehlte bei einer durchflusszytometrischen Untersuchung APC-immunisierter, FcRγ- und FcεRI-defizienter Mäuse in der Milz.

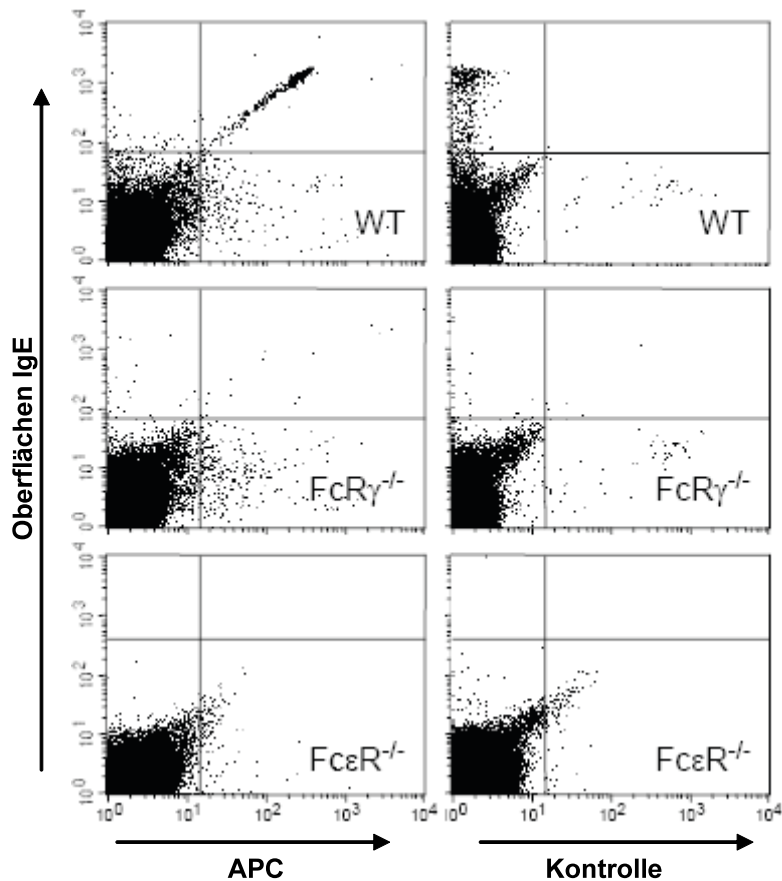


Abbildung 9: Basophile Granulozyten von $FcR\gamma^{-/-}$ und $Fc\epsilon RI^{-/-}$ Mäusen binden kein Antigen

Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung von Splenozyten C57BL/6 Wildtyp (WT), $FcR\gamma^{-/-}$ und $Fc\epsilon RI^{-/-}$ Mäuse nach 4-wöchigem Immunisierungsintervall mit 100 μg APC in hitze-inaktiviertem *B. pertussis* (APC-imm.). Fünf Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Milzzellen *in vitro* mit anti-IgE und APC (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (APC) oder anti-IgE und PBS (Kontrolle) gefärbt. Die Abbildung ist repräsentativ für fünf unabhängige Experimente. ¹

Bei IL-4-, $FcR\gamma^{-}$ - und $Fc\epsilon RI^{-}$ -defizienten Mäusen konnte das Antigen APC nicht auf der Oberfläche basophiler Granulozyten nachgewiesen werden. Die Abbildung 8 und Abbildung 9 zeigen deutlich, dass die Fähigkeit zur Bindung des Antigens *in vitro* von einer IgE-Bindung abhängig war.

3.1.2 *In vivo* Antigenbindung auf basophilen Granulozyten

Aufgrund der Antigenbindung durch basophile Granulozyten *in vitro* war zu klären, ob basophile Granulozyten auch *in vivo* das Antigen APC binden können. Dafür wurden Mäuse mit 100 μg APC in *B. pertussis* immunisiert und sechs Wochen später mit 100 μg APC oder PBS als Kontrolle restimuliert. Eine Bindung des Antigens konnte 4 bis 16 h nach der Restimulation auf basophilen Granulozyten aus der Milz detektiert

werden, wobei die Kontrolltiere ohne Restimulation keine Antigenbindung aufwiesen (Abbildung 10). Die Zellen wurden hierbei aus der Milz isoliert und anschließend nur mit markiertem anti-IgE gefärbt. IgE⁺ basophile Granulozyten zeigten nach der *intraperitonealen* Injektion von PBS keine Positivität für APC, wo hingegen sich die IgE⁺ Zellpopulation 16 h nach der Gabe von 100 µg APC zur Antigen-Positivität verschob (rechtes Diagramm).

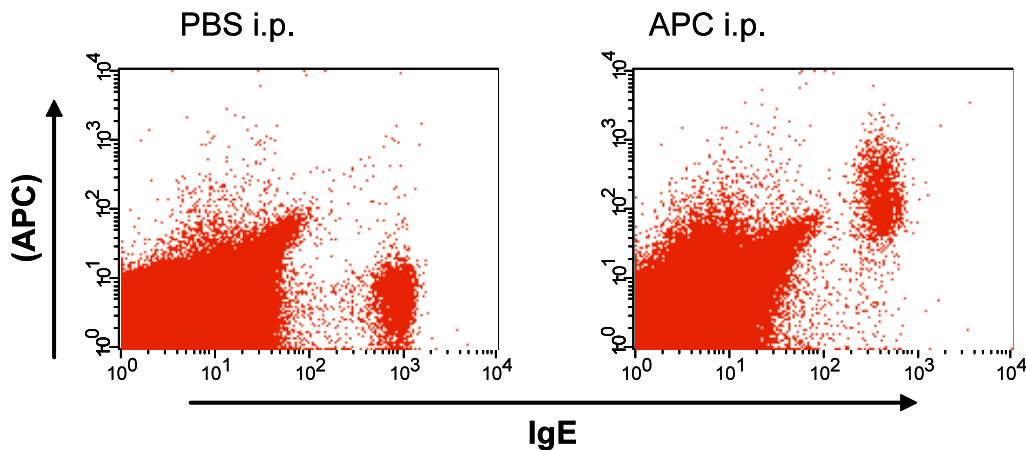


Abbildung 10: Antigenbindung *in vivo*

Durchflusszytometrische Messung (FACS Plot) von Milzzellen 16 h nach einer Restimulation mit 100 µg APC (rechts) bzw. PBS (links) durch *intraperitoneale* Injektion in APC-immunisierte Mäuse. Die Zellen wurden anschließend nur mit anti-IgE-FITC gefärbt, eine nachträgliche APC-Färbung fand nicht statt.

Die APC-Bindung auf basophilen Granulozyten konnte auch in Milzzellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 10). 16 h nach der APC-Injektion wurde das Antigen fast ausschließlich auf basophilen Granulozyten detektiert, wobei zu diesem Zeitpunkt die APC-Menge auf basophilen Granulozyten der Milz drei- bis vierfach stärker war als im Knochenmark.

3.2 Aktivierung basophiler Granulozyten

Basophile Granulozyten können durch unterschiedliche Stimulatoren aktiviert werden. Die Fähigkeit basophiler Granulozyten intaktes Antigen *in vitro* und *in vivo* zu binden, führte zu der Frage, ob diese Zellpopulation durch die Bindung des Antigens aktiviert wird. Eine Aktivierung ist vor allem durch die Ausschüttung der Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und IL-6 charakterisiert.

3.2.1 Aktivierung von basophilen Granulozyten *in vitro*

Zuerst wurde *in vitro* die Aktivierung basophiler Granulozyten durch eine Antigen-Bindung analysiert und an Milz- und Knochenmarkzellen aus APC-immunisierten Mäusen untersucht. Aus Milz und Knochenmark wurden Gesamt-Leukozytenpopulationen und Zellpopulationen isoliert, von denen durch magnetische Beads spezifisch basophile Granulozyten (IgE-) oder CD4⁺ T-Zellen (CD4-) entfernt wurden. Die Zellen wurden für 4 h durch die Zugabe von 1 µg/ml Allophycocyanin (APC) stimuliert (Abbildung 11). In der Gesamtpopulation der Milz- und Knochenmarkzellen konnte mittels ELISA eine starke Produktion von IL-4 (links) und IL-6 (rechts) gemessen werden, wobei im Knochenmark die Produktion von IL-4 mehr als fünffach und die Produktion von IL-6 dreifach stärker als in der Milz war. Weder in Milz noch im Knochenmark war nach *in vitro* Depletion basophiler Granulozyten (IgE-) eine Freisetzung von IL-4 und IL-6 messbar. Die Entfernung von CD4⁺ T-Zellen bewirkte keine Reduktion der Zytokin-Freisetzung.

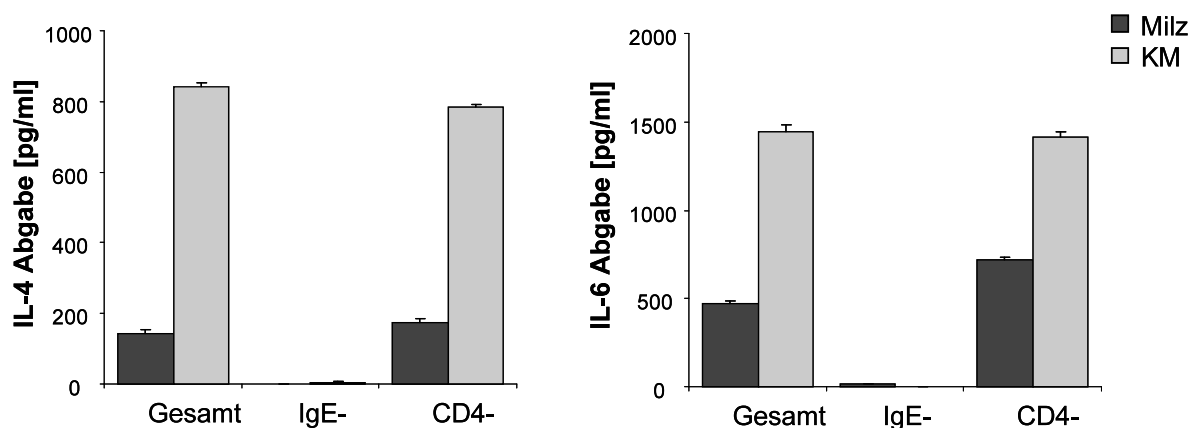


Abbildung 11: Aktivierung von Milz- und Knochenmarkzellen *in vitro*

Aktivierung von basophilen Granulozyten zur IL-4 und IL-6 Ausschüttung durch *in vitro* Stimulation mit APC (1 µg/ml) (2×10^6 Zellen pro Ansatz, dreifache Werte). Fünf APC-immunisierten Mäusen wurde Milz und Knochenmark (KM) entnommen und jeweils vereint. Basophile Granulozyten (IgE-), bzw. T-Zellen (CD4-) wurden *in vitro* über MACS depletiert und 2×10^6 Zellen pro Loch ausgesät. Die *in vitro* Stimulation erfolgte über die Zugabe von APC über 4 h. Für die Messung der IL-4 Abgabe wurden die Zellen direkt auf eine anti-IL-4-beschichteten ELISA-Platte kultiviert, für IL-6 wurde der Überstand nach 4 h abgenommen und in einem ELISA eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittleren Standardfehler (SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

Bei fehlenden basophilen Granulozyten nach einer *in vitro* Stimulation lässt die Reduktion der IL-4- und IL-6-Sekretion in Milz und Knochenmark auf eine wichtige Rolle dieser Granulozyten-Subpopulation schließen. Daher wurden über CD49b gereinigte basophile Granulozyten aus dem Knochenmark durch unterschiedliche APC-Konzentrationen und IL-3, sowie Antikörper gegen IgE und den IgE-Rezeptor stimuliert (Abbildung 12). IL-3 ist ein starker Stimulator von basophilen Granulozyten^{7,30} und diente als Positivkontrolle für die Zytokin-Abgabe. Die Stimulation durch IgE- bzw. IgE-Antikörper simuliert eine Aktivierung basophiler Granulozyten über die Vernetzung der IgE-Rezeptoren an der Oberfläche. Dies entspricht einem IgE-abhängigen Weg der Aktivierung. Bei der Antigen-induzierten Aktivierung von basophilen Granulozyten zeigte sich bei einer Antigenkonzentration zwischen 10 µg/ml und 0,1 µg/ml eine maximale Stimulation, so dass man von einer Sättigung in diesem Konzentrationsbereich ausgehen konnte. Eine Stimulation von basophilen Granulozyten zur Produktion von IL-4 und IL-6 war bis zu einer APC-Konzentration von 1 ng/ml detektierbar. Der Wert 0 (linker Balken) gibt den Leerwert ohne Stimulation wieder.

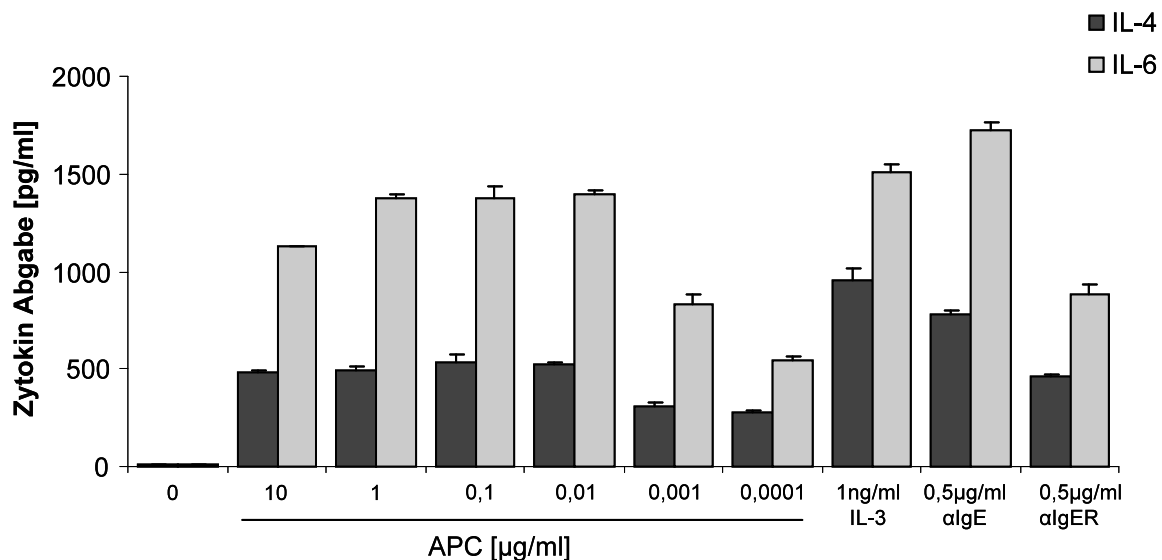


Abbildung 12: Aktivierung von basophilen Granulozyten durch unterschiedliche APC-Konzentrationen

CD49b⁺ basophile Granulozyten aus APC-immunisierten Mäusen wurden über LS-Säule magnetisch aufgereinigt und 5×10^4 Zellen in 200 µl Medium über 20 h kultiviert. Die basophilen Granulozyten wurden mit unterschiedlichen APC-Konzentrationen, IL-3, anti-IgE (αIgE) und anti-IgER (αIgER) stimuliert. Im Überstand (SN) wurde mittels ELISA die Konzentration von IL-4 und IL-6 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittleren Standardfehler (SEM).

Bereits bei sehr niedriger Konzentration von 1 ng/ml erfolgte eine deutliche Oberflächenfärbung basophiler Granulozyten mit dem Antigen APC (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 *In vivo* Aktivierung von basophilen Granulozyten

Aufgrund der Ergebnisse der *in vitro* Aktivierung basophiler Granulozyten wurde *in vivo* die Aktivierung durch Bindung des Antigens APC untersucht. Mäuse wurden mit APC und hitze-inaktiviertem *B. pertussis* immunisiert. Diese Mäuse bildeten Antikörper gegen APC und reagierten bei einer zweiten APC Gabe ohne Adjuvans nach sechs Wochen mit einer Aktivierung der basophilen Granulozyten. 2 h nach der *intraperitonealen* Injektion von APC konnte dies in Milz und Knochenmark nachgewiesen werden. Wie bei der *in vitro* Aktivierung von basophilen Granulozyten (Abbildung 11) wurde für die *in vivo* Untersuchung den Splenozyten und Knochenmarkzellen (Abbildung 13) basophile Granulozyten (IgE⁻) oder CD4⁺ T-Zellen entzogen und mittels ELISA die Freisetzung von IL-4 und IL-6 ermittelt. Die IL-4 Freisetzungen des Knochenmarks (Gesamt) beliefen sich auf den siebenfachen Wert im Vergleich zu Splenozyten.

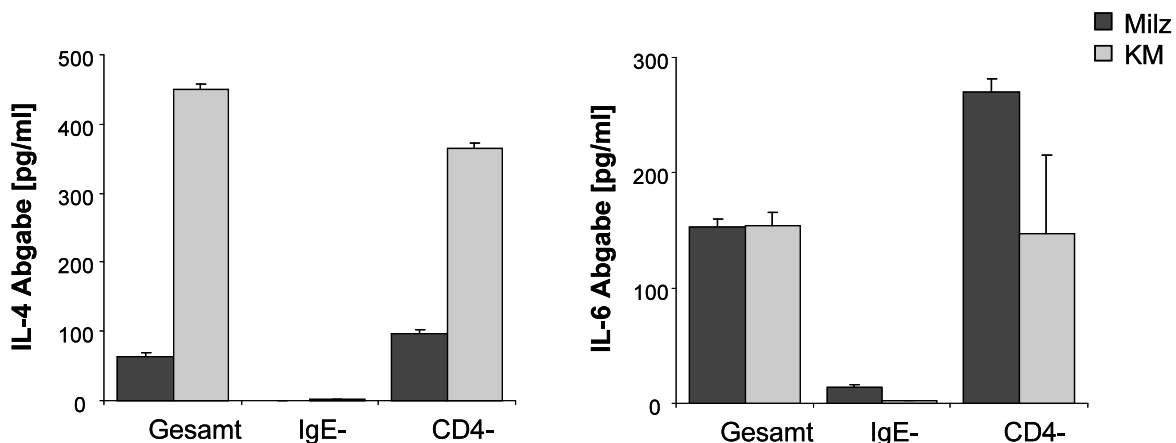


Abbildung 13: 2 h nach *in vivo* Aktivierung von Milz- und Knochenmarkzellen

ELISA von Milz und Knochenmarkzellen (KM) nach *in vitro* Depletion von basophilen Granulozyten (IgE⁻) oder T-Zellen (CD4⁺), bzw. ohne Depletion (Gesamt). APC immunisierte Mäuse wurden mit 100 µg APC *i.p.* restimuliert. Nach 2h wurden Milz und Knochenmark entnommen und über 4h kultiviert. Die Messung der IL-4 Abgaben erfolgte über eine Kultivierung der Zellen direkt auf einer beschichteten ELISA-Platte. Der SEM zwischen Gesamt bzw. CD4⁺ im Bezug auf IgE⁻ ist sowohl für Milz, als auch für Knochenmark hoch signifikant ($p < 0,005$). Milz- und Knochenmarkzellen von fünf Mäusen wurden vereint und die Mittelwerte und mittleren Standardfehlern dargestellt.

Weder für Knochenmark- noch für Milz-Zellen ohne basophile Granulozyten (IgE-) konnte eine IL-4 und IL-6 Abgabe gemessen werden. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen (CD4-) rief keine wesentliche Änderung der IL-4 Produktion hervor. Bis zu 72 h nach der *in vivo* Restimulation und anschließender *in vitro* Depletion basophiler Granulozyten konnte in der Milz eine verminderte Zytokin-Sekretion festgestellt werden, im Knochenmark jedoch nur innerhalb der ersten 4 h.

Diese Ergebnisse wurden durch folgenden Versuch bestätigt (Abbildung 14). APC-immunisierte Mäuse wurde über drei Tage zweimal täglich der anti-IgER-Antikörper (MAR-1) oder PBS injiziert, wobei der Antikörper MAR-1 eine vollständige Depletion basophiler Granulozyten bewirkte. Nach einem Intervalltag, an dem durch die Depletion freigesetzte Zytokine abgebaut wurden, restimulierte man die Mäuse mit 100 µg APC. Milz- und Knochenmarkzellen wurden 2 h nach APC-Injektion auf den IL-4- und IL-6-Gehalt untersucht. Für die Analyse des IL-4-Gehaltes wurden die Zellen für 4 h direkt auf einer beschichteten ELISA-Platte kultiviert und anschließend die IL-4-Konzentration mittels ELISA ermittelt. Eine zusätzliche Stimulierung fand nicht statt. Nach *in vivo* Depletion von basophilen Granulozyten war bei anschließender Restimulation der Mäuse mit APC nur eine sehr geringe IL-4- und IL-6-Produktion in Milz und Knochenmark detektierbar.

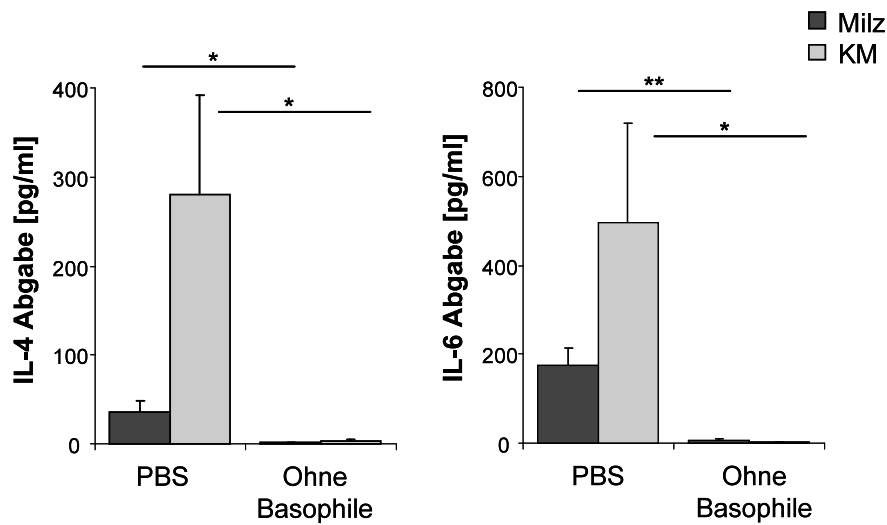


Abbildung 14: *in vivo* Aktivierung nach *in vivo* Depletion von basophilen Granulozyten

C57BL/6 Mäuse erhielten zur Depletion basophiler Granulozyten den Antikörper MAR-1 (ohne Basophile), oder (PBS). Am zweiten Tag nach der letzten Antikörper-Gabe wurden die Mäuse mit 100 µg APC *i.p.* restimuliert und nach weiteren 2 h Milz und Knochenmark (KM) entnommen. 2×10^6 Zellen wurden für 4 h in 200 µl Medium kultiviert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf die IL-6-Konzentration analysiert. Für die Messung der IL-4 Abgaben wurden die Zellen direkt auf eine beschichtete ELISA-Platte gegeben. Dargestellt wurden die Mittelwerte und SEM von 5 Mäusen pro Gruppe. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Die Aktivierung von basophilen Granulozyten fand nicht *nur in vitro* statt, sondern erfolgte auch durch Antigen-Restimulation *in vivo*. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass basophile Granulozyten in Milz und Knochenmark die Hauptquelle für IL-4 und IL-6 sind. Dies konnte sowohl bei der *in vitro* Untersuchung als auch im *in vivo* Modell gezeigt und bestätigt werden.

3.2.3 Antigen-Stimulation bei FcεRI- oder Fcγ-defizienten Mäusen

Fcγ-defiziente Mäuse wurden nach der Immunisierung mit APC auf die Fähigkeit der Zytokin-Produktion bei Restimulation mit dem Antigen untersucht. Dieser Versuch sollte die Möglichkeit einer Fc-unabhängigen Aktivierung basophiler Granulozyten bei einer Gedächtnisimmunantwort aufklären.

In Fcγ-defizienten Mäusen konnte keine IL-4- und IL-6-Produktion nach Antigen-Gabe in Milz und Knochenmark nachgewiesen werden (Abbildung 15). Diesen Mäusen fehlen die IgG-Rezeptoren FcγRI und FcγRIII und der IgE-Rezeptor FcεRI,

wobei Fc γ RI nicht auf murinen basophilen Granulozyten exprimiert wird ²⁹. Fc ϵ RI-defizienten Mäusen fehlt der hochaffine IgE-Rezeptor.

Der Gehalt an IL-4 und IL-6 in Milz und Knochenmark wurde 4 h bzw. 72 h nach einer Restimulation mit APC in APC-immunisierten FcR γ ^{-/-} und Fc ϵ RI^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen analysiert. Gesamtzellen aus Milz und Knochenmark Fc ϵ RI-defizienter Mäuse konnten auf eine Restimulation mit der Freisetzung der Zytokine IL-4 und IL-6 reagieren. Eine Stimulation der Zellen ohne basophile Granulozyten führte zu keiner bzw. einer stark verringerten Zytokin-Produktion. Bei FcR γ -defizienten Mäusen fand unabhängig von der Stimulation oder Anwesenheit basophiler Granulozyten keine Zytokin-Freisetzung statt.

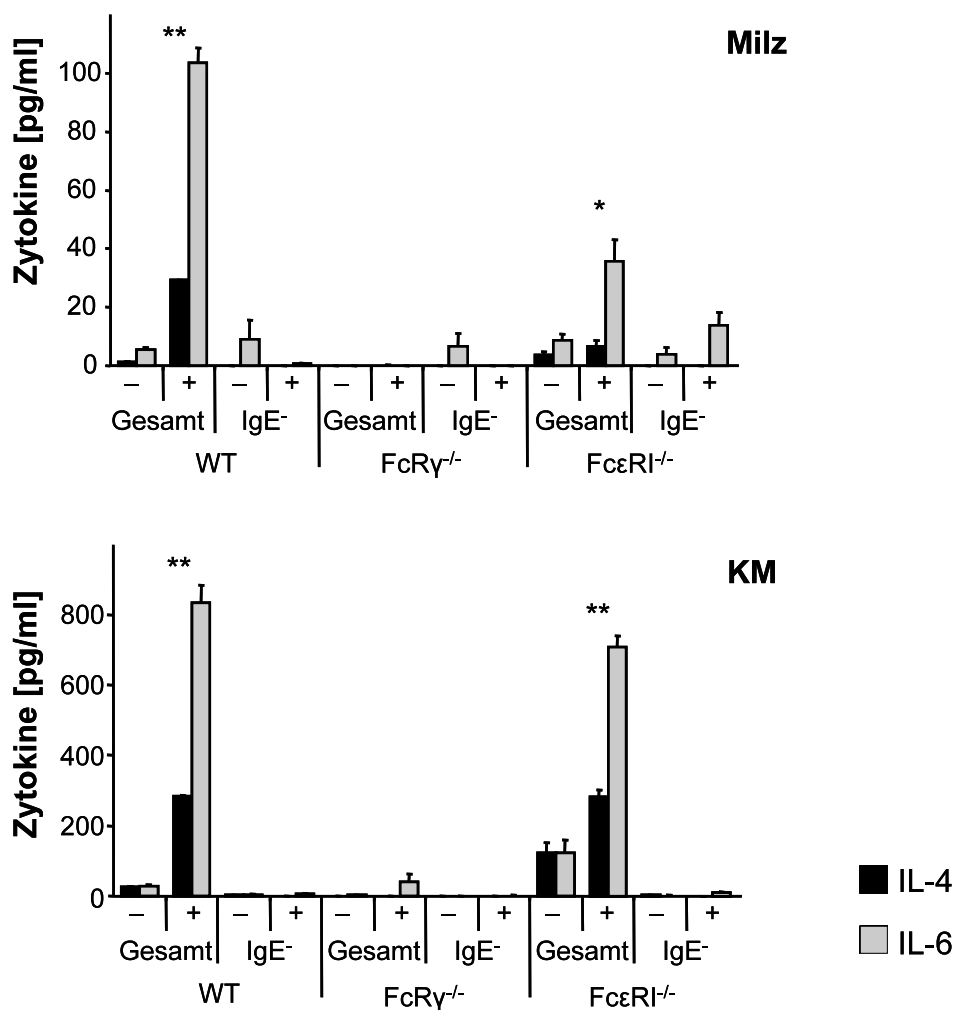


Abbildung 15: Aktivierung in FcR γ - und Fc ϵ RI-defizienten Mäusen

Milz (Milz)- und Knochenmark (KM)-Zellen aus APC-immunisierten Wildtyp (WT) Mäusen, FcR γ ^{-/-} Mäusen und Fc ϵ RI^{-/-} Mäusen wurden mittels ELISA auf die IL-4- und IL-6-Produktion untersucht. Vier Wochen nach der Immunisierung mit 100 μ g APC und hitze-inaktiviertem *B. pertussis* wurden 2×10^6 Zellen in 200 μ l Zellkulturmedium über 4 h kultiviert. Basophiler Granulozyten wurden mittels magnetischer Beads *in vitro* depletiert (IgE⁻) oder alle Zellen (Gesamt) eingesetzt. Die Zellen erhielten PBS (-) oder 1 μ g/ml APC (+) als Stimulation. Die dargestellten IL-4- und IL-6-Konzentrationen entsprechen den Mittelwerten von drei Mäusen. Fehlerbalken geben den SEM wieder. (* p < 0,05; ** p < 0,01)

IgE oder der hochaffine IgE-Rezeptor Fc ϵ RI war für eine Antigen-vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten nicht unbedingt erforderlich. Das Fehlen der FcR γ -Kette bewirkte jedoch eine ausbleibende Aktivierung basophiler Granulozyten.

3.3 Einfluss basophiler Granulozyten auf B- und T-Zellen in vitro

Die folgenden Versuche dienten zur Aufklärung der Interaktionspartner basophiler Granulozyten bei einer Gedächtnisimmunantwort.

3.3.1 Aktivierte basophile Granulozyten verstärken die B-Zell-Proliferation

Die Beziehung basophiler Granulozyten zu B-Zellen wurde über das Proliferationsverhalten der B-Zellen in Anwesenheit aktivierter basophiler Granulozyten untersucht. Die Proliferationseigenschaften von B-Zellen konnte über die Einlagerung des Farbstoffs CFSE gemessen werden. Der fluoreszente Farbstoff CFSE wird bei einer Zellteilung zu gleichen Teilen auf die beiden Tochterzellen verteilt. Die Fluoreszenzintensität pro Zelle halbiert sich daraufhin und führt zu einer Links-Verschiebung (siehe Abbildung 16).

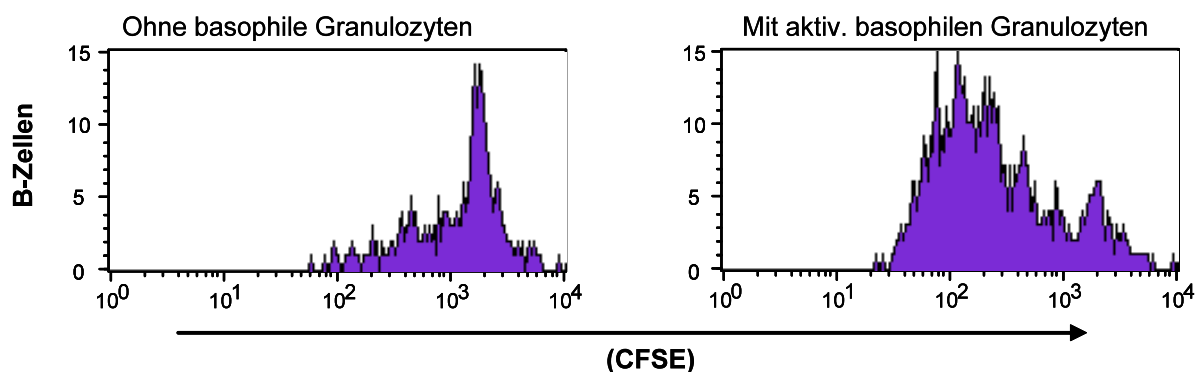


Abbildung 16: Proliferation von B-Zellen

Proliferation von B-Zellen in An- (rechts) und Abwesenheit (links) aktivierter basophiler Granulozyten. 5×10^4 B-Zellen wurden für drei Tage mit 5×10^4 T-Zellen und anti-CD3 in Anwesenheit oder Abwesenheit aktivierter basophiler Granulozyten (25.000) kultiviert. Basophile Granulozyten wurden über IgE und magnetische Beads isoliert. Die Zellen wurden nach drei Tagen mit CD19-PE gefärbt und durchflusszytometrisch vermessen. Eine Verstärkung der Proliferation wird durch eine geringere CFSE-Einlagerung pro Zelle gezeigt, was anhand einer Linksverschiebung der Fluoreszenzintensität auf der CFSE-Achse verdeutlicht wird.¹

Die B-Zell-Funktion wird durch aktivierte basophile Granulozyten verstärkt. Die Zugabe von basophilen Granulozyten zu einer Zellkultur aus B-Zellen, T-Zellen und anti-CD3 ermöglichte den B-Zellen eine verstärkte Proliferation (Abbildung 16).

Basophile Granulozyten wurden dabei mittels magnetischer Zellseparation über IgE isoliert und waren durch die Bindung von anti-IgE voraktiviert. Ohne weitere Zugabe von Stimulatoren regten die aktivierten basophilen Granulozyten die Teilung von B-Zellen an. Dies konnte anhand der CFSE-Verteilung in B-Zellen nach drei Tagen durchflusszytometrisch ermittelt werden. In halblogarithmischer Darstellung steht jedes Maximum der CFSE-Fluoreszenz für einen Teilungsschritt, wobei die Kultivierung der Zellen ohne basophile Granulozyten als Referenz diente.

80 bis 400 basophiler Granulozyten, die durch IL-3 oder anti-Fc ϵ RI aktiviert wurden, waren für eine Verstärkung der B-Zell-Proliferation ausreichend. Nicht-aktivierte basophile Granulozyten hatten in Kultur keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten von B-Zellen. Die durch basophile Granulozyten induzierte Proliferation der B-Zellen konnte teilweise durch Zugabe von monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 und IL-4 blockiert werden. Eine Kombination aus beiden Antikörpern ergab eine vollständige Blockade, so dass keine Proliferation der B-Zellen stattfand. In einer Zellkultur aus B-Zellen, mit anti-CD3 aktivierten T-Zellen und basophilen Granulozyten war die Anwesenheit von IL-4 und IL-6 notwendig, jedoch nicht ausreichend für die Induktion der B-Zellen zur Proliferation. Die Zugabe von IL-4 und IL-6 wirkte weniger induzierend als die Anwesenheit von aktivierten basophilen Granulozyten. *Transwell*-Experimente gaben Hinweise auf die Notwendigkeit von zellkontakt-abhängigen Faktoren, die zur Induktion der B-Zell Proliferation benötigt wurden. Die B-Zell-Proliferation war ebenso abhängig von der Anwesenheit aktivierter T-Zellen, da bei einem Ansatz ohne T-Zellen, oder mit nicht-aktivierten T-Zellen keine Proliferation messbar war. Die Zugabe von aktivierten CD8⁺ T-Zellen ergab auch keine Induktion der B-Zellteilung.

Diese Daten stammen aus der Arbeitsgruppe und werden aus Gründen der Vollständigkeit an dieser Stelle genannt.

3.3.2 Einfluss von basophilen Granulozyten auf T-Zellen *in vitro*

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Daten waren zum Zeitpunkt des Arbeitsbeginns schon bekannt und sollen zum besseren Verständnis an dieser Stelle erwähnt werden. Aktivierte basophile Granulozyten veränderten den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen in Richtung einer Typ2-Reaktion (T_H2). Verschiedene Methoden

wurden zur Charakterisierung des CD4-Phänotyps eingesetzt z.B. ELISA, *Real-time* PCR und FACS Analyse mit intrazellulärer Zytokin-Färbung. CD4⁺ T-Zellen wurden nach einer Aktivierung mit anti-CD3 mit und ohne aktivierte basophile Granulozyten kultiviert. Die Anwesenheit von basophilen Granulozyten resultierte in einer Hochregulation der Interleukine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und des Transkriptionsfaktors GATA-3, einer geringen Hochregulation von IL-6 und einer beachtlichen Verringerung von Interferon(IFN)- γ und IL-2. Diese Ergebnisse konnten sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Protein-Ebene durch die intrazelluläre Anfärbung der Zytokine in CD4⁺ T-Zellen nach zwei Tagen Kultur erzielt werden. Zusätzlich konnte in einem zweistufigen Kulturmodell gezeigt werden, dass basophile Granulozyten die Fähigkeit von CD4⁺ T-Zellen zur B-Zell-Hilfe deutlich steigern. Diese *in vitro* Daten deuten darauf hin, dass basophile Granulozyten sowohl über CD4⁺ T-Zellen als auch direkt die B-Zell-Proliferation und –Aktivierung unterstützen.

3.4 Basophile Granulozyten beeinflussen die B-Zell Antwort während einer Gedächtnisimmunreaktion

Die *in vitro* Daten legen nahe, dass basophile Granulozyten einen Einfluss auf die B-Zell-Antwort während einer sekundären humoralen Immunantwort haben. Im Folgenden Abschnitt wurde dieser Einfluss genauer untersucht.

3.4.1 Eine Behandlung mit anti-Fc ϵ RI (MAR-1) führt zur Depletion von basophilen Granulozyten

Eine Depletion basophiler Granulozyten war bis *dato* nur *in vitro* über magnetische Zellseparation oder FACS-Sortierung möglich. Um die Rolle von basophilen Granulozyten bei einer Immunreaktion in einem Mausmodell untersuchen zu können, war die Etablierung einer Methode zur selektiven Entfernung von basophilen Granulozyten *in vivo* notwendig.

Der Antikörper MAR-1 gegen den Fc ϵ RI α (anti-IgER) wurde eingesetzt, um Mäuse von basophilen Granulozyten zu depletieren. Dieser Antikörper aus dem

Armenischen Hamster erkennt die α -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors und bewirkte über einen ADCC- (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität-) abhängigen Mechanismus die selektive Depletion von basophilen Granulozyten. Die Isotyp Kontrolle des MAR-1 Antikörpers war ein unspezifischer IgG-Antikörper aus dem gleichen Herkunftsorganismus.

Basophile Granulozyten waren in den Mäusen 4 h nach einer *intraperitonealen* Injektion von 5 μ g MAR-1 nicht mehr nachweisbar. Nach einmaliger Antikörper-Gabe war die Depletion jedoch schnell reversibel, so dass nach 24 h die Ausgangsmenge an basophilen Granulozyten wieder erreicht war. Bei einer zweimal täglichen Verabreichung von 5 μ g MAR-1 pro Maus für drei Tage konnte jedoch eine lang anhaltende und vollständige Depletion der basophilen Granulozyten in Blut, Milz, Knochenmark und Leber erreicht werden. Zwölf Tage nach der letzten Antikörper-Gabe waren in neun von zehn Mäusen keine basophile Granulozyten in Milz und Knochenmark messbar (Daten nicht gezeigt). Um die selektive Entfernung von basophilen Granulozyten nachzuweisen, wurden basophile Granulozyten mit unterschiedlichen Kombinationen an Zellmarkern identifiziert. So wurden CD45^{niedrig} CD49b^{hoch} basophile Granulozyten in Milz, Knochenmark (KM) und peripherem Blut bei Mäusen mit oder ohne Depletion bestimmt (Abbildung 17). Die unten gezeigten FACS-Diagramme zeigen anschaulich das Fehlen der CD45^{niedrig} CD49b^{hoch} Zellpopulation nach anti-IgER-Gabe (MAR-1) (Kreis, Abbildung 17).

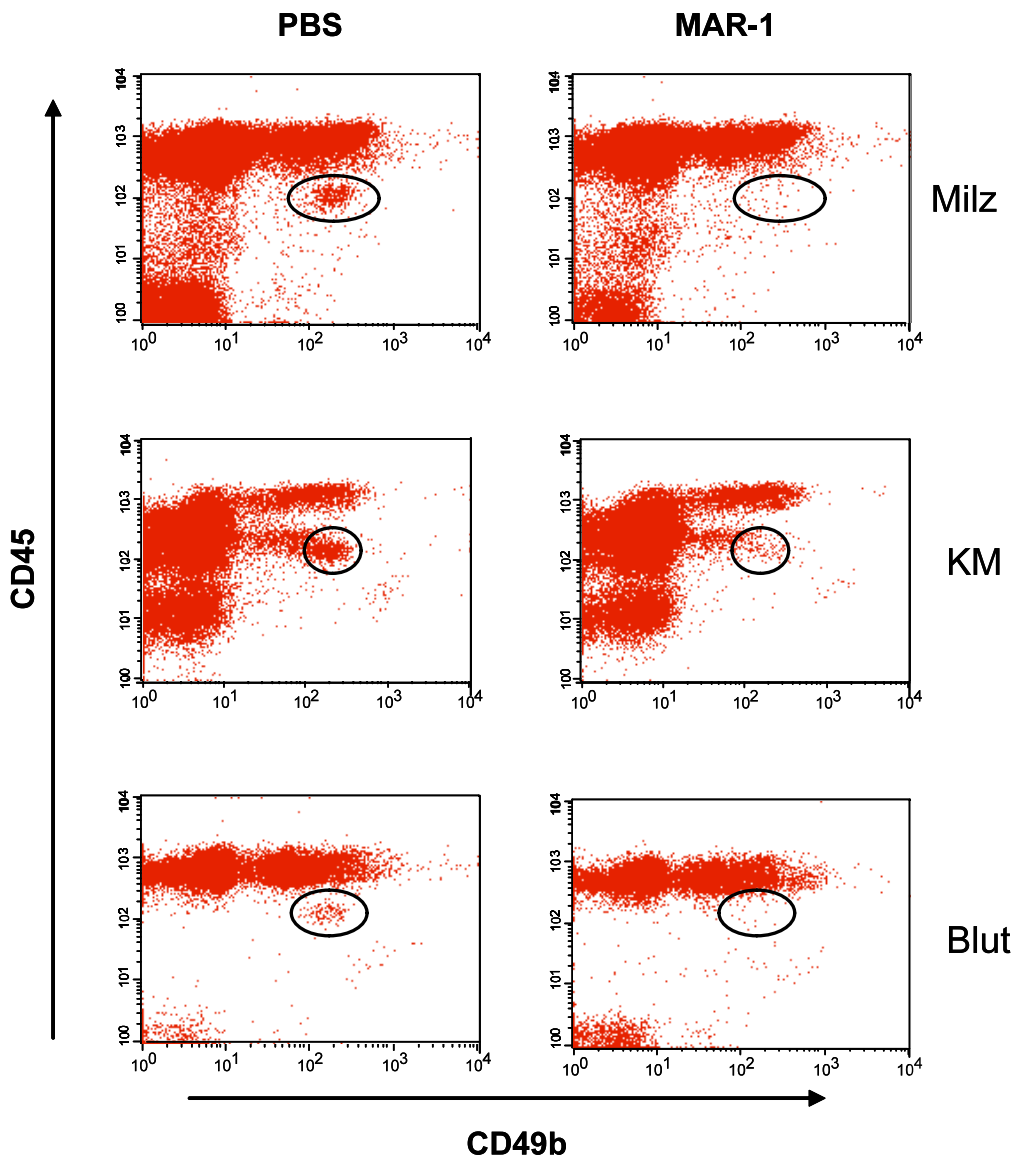


Abbildung 17: FACS Plot nach der Behandlung von Mäusen mit anti-IgER (MAR-1) oder PBS

Basophile Granulozyten wurden mit Hilfe der Oberflächenmarker CD45 und CD49b identifiziert (Kreis). Bei Injektion des MAR-1 Antikörpers (rechts) sind im Vergleich zu PBS (links) zwei Tage nach der Depletion keine basophilen Granulozyten in Milz, Knochenmark (KM) und Blut aufzufinden. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Eine zusätzliche Identifizierung basophiler Granulozyten erfolgte anhand IgE^{hoch} und $CD49b^{hoch}$. Auch hier konnte die Abwesenheit basophiler Granulozyten nach Gabe des depletierenden Antikörpers MAR-1 in Milz, Knochenmark und peripherem Blut bestätigt werden. Dies wird in Abbildung 18 durch das Fehlen der Zellpopulation mit den Eigenschaften IgE^{hoch} und $CD49b^{hoch}$ im Vergleich zur Kontrolle (PBS) verdeutlicht (Kreis, Abbildung 18).

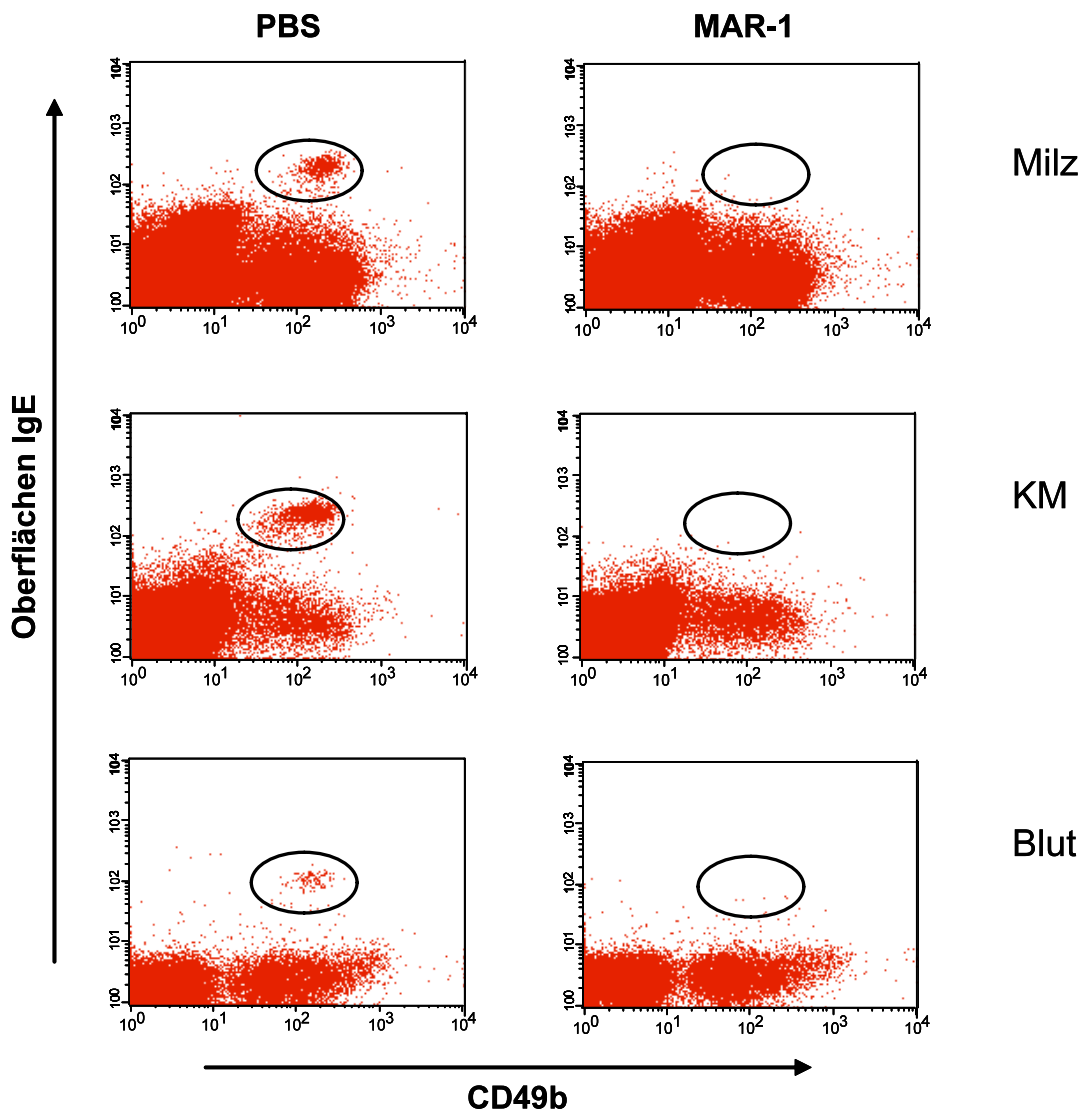


Abbildung 18: FACS Plot zur Depletion basophiler Granulozyten

FACS Plot von Milz-, Knochenmark (KM)- und Blut-Zellen zwei Tage nach der Behandlung mit (MAR-1) oder ohne (PBS) den depletierenden Antikörper. Basophile Granulozyten wurden mit anti-IgE-FITC und anti-CD49b-PE identifiziert (Kreis). Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

Die Depletion basophiler Granulozyten in Knochenmark (KM), Milz und Leber war in der statistischen Auswertung der FACS-Messung hoch signifikant. Basophile Granulozyten wurden dabei anhand der Oberflächenmarker CD49b und IgE identifiziert. APC-immunisierte Mäuse wurden mit dem anti-IgER (MAR-1) oder PBS zweimal täglich für drei Tage behandelt und restimuliert. 2 h nach der Restimulation wurden die Organe entnommen und für die FACS-Analyse gefärbt. Die Anzahl basophiler Granulozyten ist als Prozent der Gesamt-Leukozytenzahl dargestellt (Abbildung 19).

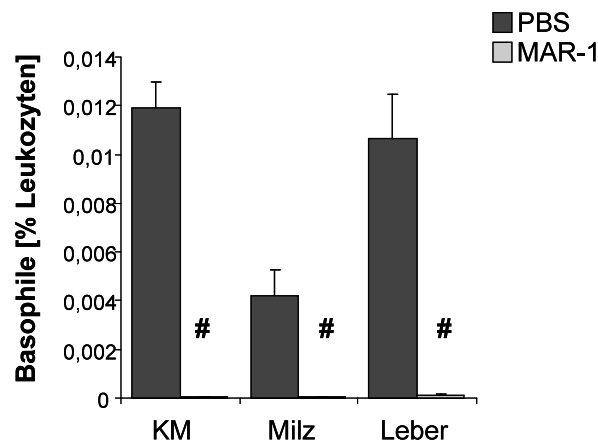


Abbildung 19: statistische FACS-Auswertung der Depletion basophiler Granulozyten in Knochenmark (KM), Milz und Leber

APC-immunisierte Mäuse wurden zweimal täglich für drei Tage mit dem depletierenden Antikörper MAR-1 (n = 5) oder PBS (n = 5) behandelt und am zweiten Tag nach der letzten Antikörpergabe mit 100 µg APC restimuliert. Die Organe wurden 2 h nach der Restimulation entnommen und mittels FACS analysiert. Basophile Granulozyten wurden über die Oberflächen IgE und CD49b identifiziert und auf die Anzahl CD45⁺ Leukozyten bezogen. Dargestellt wurde die Mittelwerte und der mittlere Standardfehler (SEM) mit einer Signifikanzwert von $p < 0.005$ (#).

Um eine Interferenz des MAR-1-Antikörpers bei der Detektion basophiler Granulozyten aufgrund der Anfärbung von Oberflächen IgE durch anti-IgE auszuschließen, wurden Knochenmarkzellen über 4 h bei 37 °C mit oder ohne 5 µg/ml MAR-1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ohne Entfernen des Antikörpers mit CD49b und IgE angefärbt. Die Auswertung der Durchflusszytometrie (Abbildung 20) zeigte, dass der Antikörper MAR-1 keine Relevanz auf die Detektion basophiler Granulozyten hat. Dies wird durch den Wert der mittleren Fluoreszenzintensität, der den Mittelwert der Anzahl gebundener IgE-Antikörper angibt, verdeutlicht. Die mittlere Fluoreszenzintensität der IgE-Bindung basophiler Granulozyten mit oder ohne Vorbehandlung mit MAR-1 zeigte keinen signifikanten Unterschied. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Gabe des depletierenden Antikörpers MAR-1 die Detektion von basophilen Granulozyten über anti-IgE verhindert.

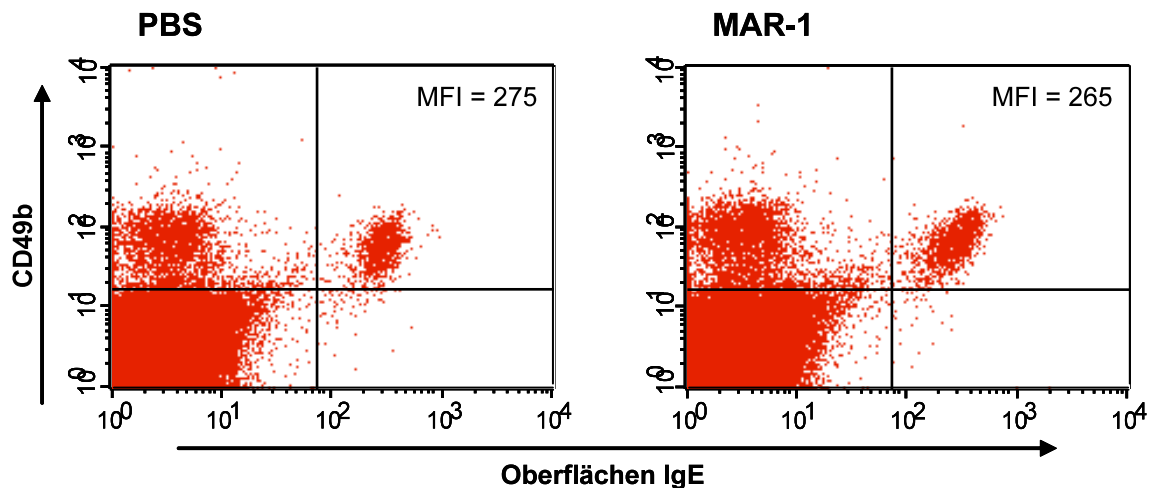


Abbildung 20: Durchflusszytometrie von Knochenmarkzellen

FACS von Knochenmarkzellen, die über 4 h bei 37 °C mit PBS (links) oder MAR-1 (5 µg/ml, rechts) inkubiert wurden, bevor sie ohne Waschvorgang mit anti-CD49b und anti-IgE gefärbt wurden. Angegeben sind die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des rechten oberen Quadranten in Bezug auf Menge der gebundenen Oberflächen IgE-Antikörper (x-Achse).

Die Selektivität der Depletion konnte anhand von weiteren FACS Untersuchungen analysiert werden. Obwohl für den Menschen eine hohe Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors bei Monozyten und dendritischen Zellen beschrieben wurde⁸⁶⁻⁸⁸, konnte im murinen System der hochaffine IgE-Rezeptor sowohl bei naiven, als auch bei APC-immunisierten Mäusen nur auf der Oberfläche basophiler Granulozyten und Mastzellen detektiert werden. Monozyten und dendritische Zellen wurden weder über anti-IgE noch über anti-FcεRIα in Milz, Knochenmark oder peripherem Blut angefärbt. Nach der *in vivo* Depletion durch die Gabe des depletierenden Antikörpers MAR-1 war außerdem keine Verringerung der Zellzahlen von Monozyten, dendritischen Zellen, B-Zellen und T-Zellen messbar. Die Anzahl cKit⁺ Mastzellen, die ebenfalls in geringem Maß IgE auf ihrer Oberfläche binden können, ist in den untersuchten Organen unterhalb der Nachweisgrenze. Nach einer Depletion basophiler Granulozyten verringerte sich in der Bauchhöhle die Anzahl der Mastzellen um 50%.

Zwei Tage nach einer Depletion basophiler Granulozyten war im Vergleich zu Kontrollmäusen keine erhöhte IL-4- oder IL-6-Produktion in Milz oder Knochenmark detektierbar. Dies zeigte, dass die Injektion des MAR-1 Antikörpers keine langfristige Zytokin-Sekretion induzierte (Abbildung 21).

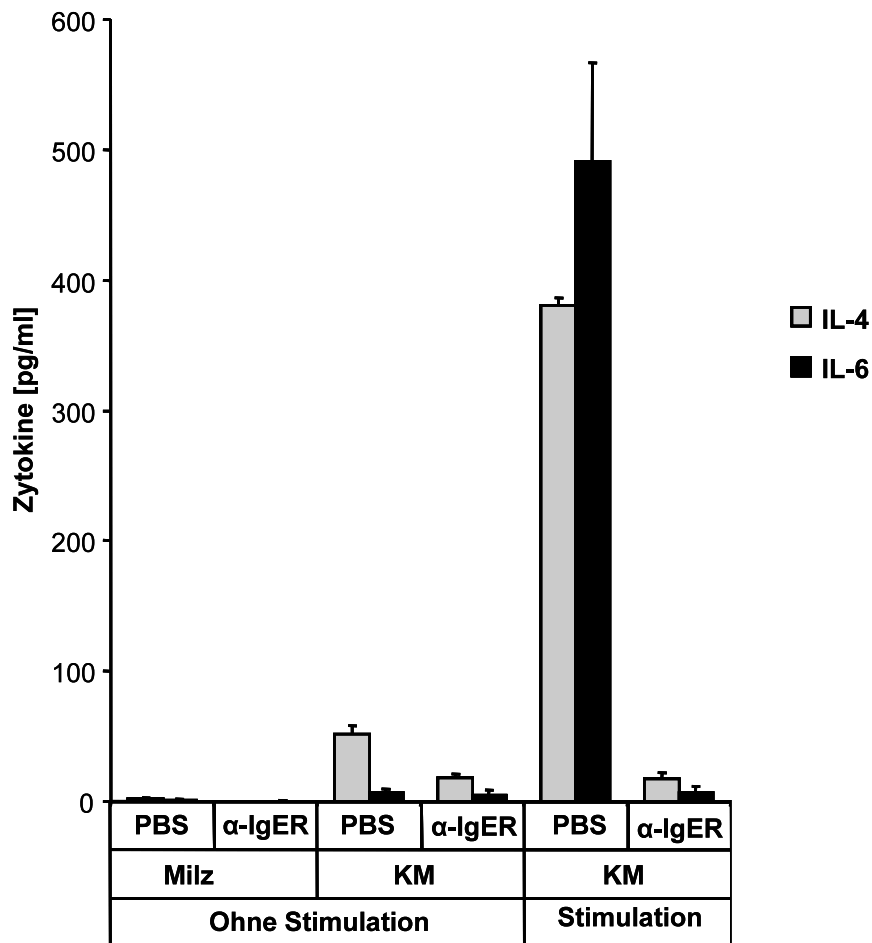


Abbildung 21: Depletion mit anti-IgER resultiert nicht im Anstieg der basalen Zytokin-Ausschüttung

ELISA Nachweis des Zytokingehaltes im Überstand nach einer 4-tägigen *in vitro* Kultivierung von 2×10^6 Zellen aus Milz und Knochenmark (KM) aus C57BL/6 Mäusen mit (α -IgER) oder ohne (PBS) Depletion von basophilen Granulozyten *in vivo* (zweimal täglich 5 μ g, drei Tage). Die Zellen wurden 4 h ohne weitere Stimulation kultiviert, oder erhielten im Fall von Knochenmarkszellen anti-IgER (MAR-1; 0,5 μ g/ml) als Stimulation (Stimulation). Dargestellt sind die Mittelwerte und mittleren Standardfehler (SEM) von vier Mäusen pro Gruppe.

Die *in vivo* Depletion basophiler Granulozyten mittels Antikörpergabe ermöglichte die Untersuchung der Bedeutung basophiler Granulozyten während einer Gedächtnisimmunantwort. Mit Ausnahme der Mastzellen wurde hierbei die Zahl anderer Zellpopulationen nicht verändert, so dass man von einer spezifischen Depletion für einen Zeitraum von zwölf Tagen ausgehen konnte. Eine Aktivierung basophiler Granulozyten zur Zytokin-Produktion fand dabei nicht statt.

3.4.2 Depletion von basophilen Granulozyten resultiert in einer geringeren Anzahl antigenspezifischer Plasma- und B-Zellen

Der Einfluss von basophilen Granulozyten auf die Proliferation der B-Zellen sollte nun auch *in vivo* untersucht werden. Die Anzahl antigenspezifischer Plasma- und B-Zellen wurde in Anwesenheit basophiler Granulozyten analysiert. Dafür wurden Mäuse mit APC immunisiert. Vier Wochen nach der primären Immunreaktion erhielten die Mäuse den depletierenden Antikörper MAR-1 (bzw. PBS) und wurden mit APC restimuliert. Milz- und Knochenmarkzellen wurden zehn Tage nach der Restimulation in einer Einzelzellsuspension für die FACS-Analyse präpariert. Die Identifizierung APC-spezifischer B-Zellen erfolgte anhand des Oberflächenmarkers CD19 und die extrazelluläre Bindung von APC. APC-spezifische basophile Granulozyten konnten bei dieser Kombination ebenfalls gut als CD19⁻ APC⁺ Population abgegrenzt werden. APC-spezifische CD19⁺ CD138⁺ Plasmazellen, jedoch nicht Plasmazellen anderer Spezifität, ließen sich nach Permeabilisierung intrazellulär mit APC (0,1 µg/ml) anfärben. Die Ergebnisse der Zellzahlen wurden auf die konstante Anzahl der Leukozyten normiert.

Die Zahl APC-spezifischer Plasma- und B-Zellen in Milz und Knochenmark war im Vergleich zur nicht depletierten Kontrollgruppe nach einer Depletion von basophilen Granulozyten signifikant um 50% geringer (Abbildung 22). Das Verhältnis von APC-spezifischen zu unspezifischen Plasmazellen hatte sich ebenfalls verschoben, wobei die Anzahl unspezifischer Plasmazellen in Milz und Knochenmark für beide Gruppen unverändert blieb.

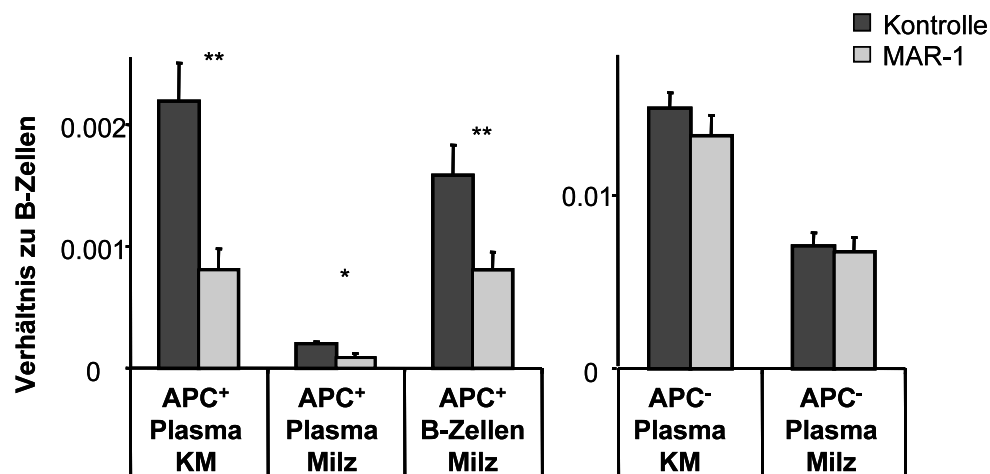


Abbildung 22: verringerte Anzahl antigenspezifischer Plasmazellen und B-Zellen in Abwesenheit basophiler Granulozyten

Mäuse wurden mit APC immunisiert und in Anwesenheit (PBS, n = 10) oder Abwesenheit (MAR-1, n = 10) von basophilen Granulozyten restimuliert. Zehn Tage nach Restimulation wurden Zellen aus Milz und Knochenmark (KM) durchflusszytometrisch analysiert und die Anzahl APC⁺ Plasmazellen (APC⁺ Plasma) und B-Zellen (APC⁺ B-Zellen) in Verhältnis zur Anzahl der B-Zellen bestimmt. Zudem wurde die Anzahl unspezifischer Plasmazellen (APC⁻ Plasma) in Knochenmark (KM) und Milz bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (* p < 0,05; ** p < 0,01) ¹

Identische Daten konnten erhoben werden, nachdem Mäuse mit dem Antigen PE (Phycoerythrin) immunisiert wurden.

3.4.3 Einfluss von basophilen Granulozyten auf die humorale Gedächtnisimmunantwort

Die Depletion basophiler Granulozyten *in vivo* war eine nützliche Methode, um den Einfluss basophiler Granulozyten auf die humorale Gedächtnisimmunantwort im Mausmodell zu untersuchen. Allophycocyanin (APC) und Phycoerythrin (PE) waren die Modellantigene der Immunisierung. Außerdem wurden zwei unterschiedliche Sandwich-ELISA-Methoden eingesetzt, um eine Abhängigkeit des Effekts von der Messmethode auszuschließen. Im Folgenden wird eine Beschichtung der ELISA-Platte mit APC bzw. PE und anschließender isotypspezifischer Detektion der gebundenen Antikörper mit „APC-spez.“ (bzw. „PE-spez.“) im Diagramm vermerkt. Die Anmerkung „IgG1-spez.“ oder „IgG2a-spez.“ deutet auf eine Nachweismethode

hin, bei der die ELISA-Platte mit Antikörpern gegen murines IgG1- oder IgG2a-Immunglobulin beschichtet wurden und die Detektion der gebundenen Antikörper mit biotinyliertem Antigen erfolgte.

Eine Gedächtnis- oder Memory-Immunantwort ist im Vergleich zu einer Primärimmunantwort an einer schnellen und stärkeren Immunantwort und Entstehung von antigenspezifischen Immunglobulinen der Klasse IgG1 und IgG2a zu erkennen. Diese Antikörper konnten im Plasma nachgewiesen werden.

3.4.3.1 Gedächtnisimmunantwort APC-immunisierter Mäuse

Der Einfluss basophiler Granulozyten auf die humorale Gedächtnisimmunantwort konnte durch die Veränderung der antigenspezifischen Antikörperproduktion in Abwesenheit basophiler Granulozyten ermittelt werden. Dazu wurden APC-immunisierte Mäuse vier Wochen nach der Immunisierung durch die mehrfache *intraperitoneale* Injektion von MAR-1 von basophilen Granulozyten depletiert oder mit einer Kontrolle (PBS oder Isotyp Kontrolle) behandelt. Am zweiten Tag nach der letzten Antikörper-Gabe wurden die Mäuse mit 100 µg APC restimuliert und der Verlauf der antigenspezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörper über mehrere Zeitpunkte im Plasma untersucht.

Zehn Tage nach Restimulation mit APC verringerte sich die Konzentration antigenspezifischer IgG1-Antikörper im Plasma von MAR-1-behandelten Tieren signifikant (Abbildung 23). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war der Antikörpergehalt ca. um 50% verringert. Die Messung der APC-spezifischen IgG2a-Antikörper ergab an Tag 7 und 10 eine um 60% bis 80% signifikant geringere Konzentration.

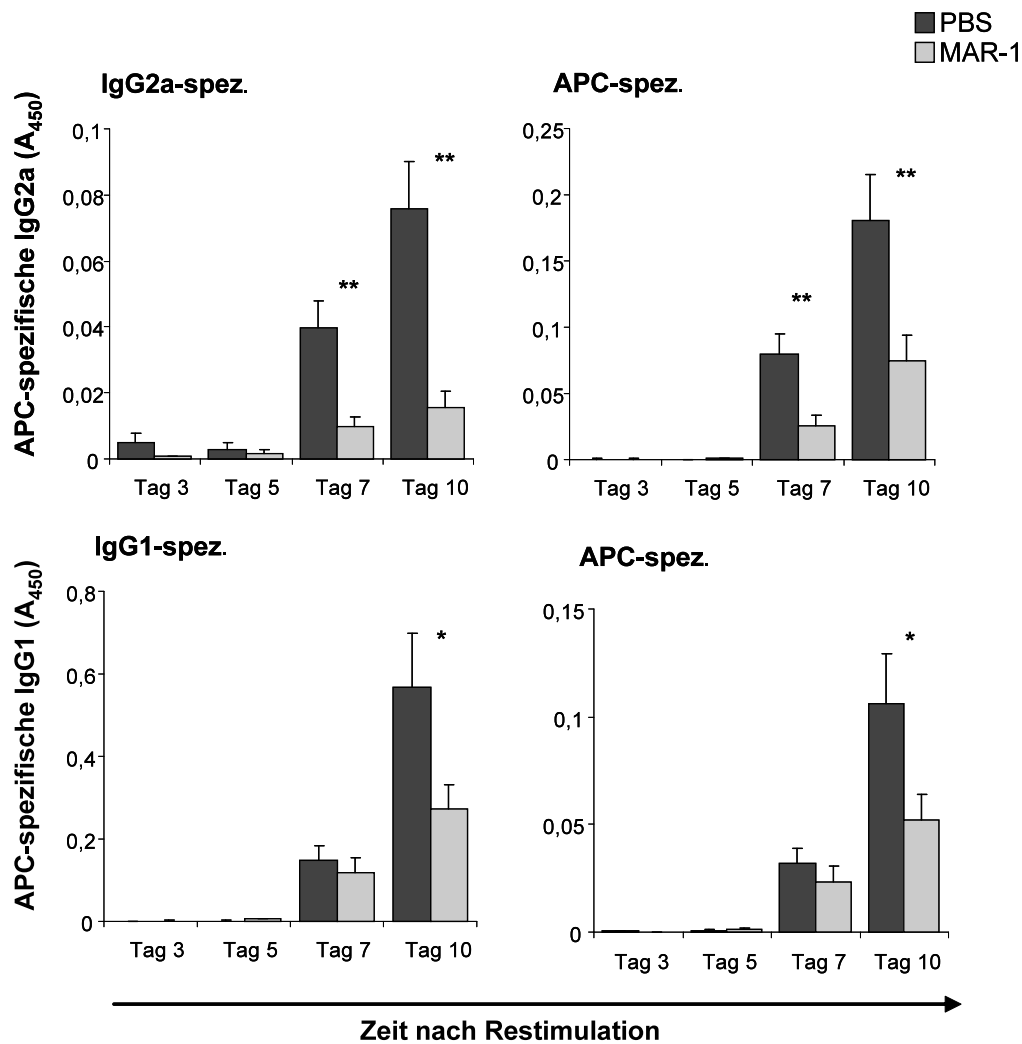


Abbildung 23: Einfluss basophiler Granulozyten auf die humorale Gedächtnisantwort bei APC-immunisierten Mäusen

C57BL/6 Mäuse wurden mit 100 µg APC und hitze-inaktiviertem *B. pertussis* als Adjuvans immunisiert und nach vier Wochen zweimal täglich für drei Tage mit anti-IgER (MAR-1, n = 10) oder PBS (n = 10) behandelt. Nach zwei Tagen wurden die Mäuse mit 100 µg APC restimuliert und mehrere Tage darauf der Serumgehalt von antigenspezifischen Immunglobulinen untersucht. Die Analyse APC-spezifischer IgG1- oder IgG2a-Immunglobuline erfolgte mit Hilfe von zwei ELISA-Methoden, wobei die ELISA-Platte entweder mit 2 µg/ml APC (APC-spez, rechts) oder 5 µg/ml anti-IgG2a, bzw. anti-IgG1 (IgG2a-spez., bzw. IgG1-spez., links) beschichtet wurde. Die Fehlerbalken geben einen mittleren Standardfehler (SEM) wieder. (* p < 0,05; ** p < 0,01)

3.4.3.2 Gedächtnisimmunantwort PE-immunisierter Mäuse

Mäuse wurden mit einem weiteren fluoreszenten Protein, nämlich Phycoerythrin (PE), ohne Adjuvans primär immunisiert, um auszuschließen, dass basophile Granulozyten nur gegen Allophycocyanin mit *B. pertussis* als Adjuvans eine

Immunantwort beeinflussen. Nach einer einfachen Injektion von 100 µg PE waren PE-bindende basophile Granulozyten messbar, was auf die Anwesenheit von PE-spezifischem IgE deutete.

Nach fünf Wochen wurden die Mäuse mit MAR-1 oder der Isotyp Kontrolle behandelt, mit 100 µg PE restimuliert und der Plasmagehalt an PE-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörpern mittels ELISA gemessen. Der Plasmagehalt PE-spezifischer Antikörper verringerte sich bei fehlenden basophilen Granulozyten an Tag sieben bis zwölf um 85-95% für IgG1- und an Tag fünf und sieben um 78% bzw. 74% für IgG2a-Immunglobulin (Abbildung 24). Als Nachweismethode wurde PE (PE-spez.), oder anti-IgG1 („IgG1-spez.“) bzw. anti-IgG2a („IgG2a-spez.“) an die ELISA-Platte gebunden.

In Abbildung 24 wird der Nachweis gezeigt, dass sich die Konzentration antigenspezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper nach einer Depletion basophiler Granulozyten verringerte. Die Analyse der gesamten Menge PE-spezifischer Immunglobuline (Ig) mittels ELISA zeigte nach Depletion eine Verringerung um 80% im Vergleich zu Kontrolltieren. Ohne Isotypen-Spezifität wurden dabei alle Immunglobuline mit der Fähigkeit zur PE-Bindung ermittelt (Daten nicht gezeigt).

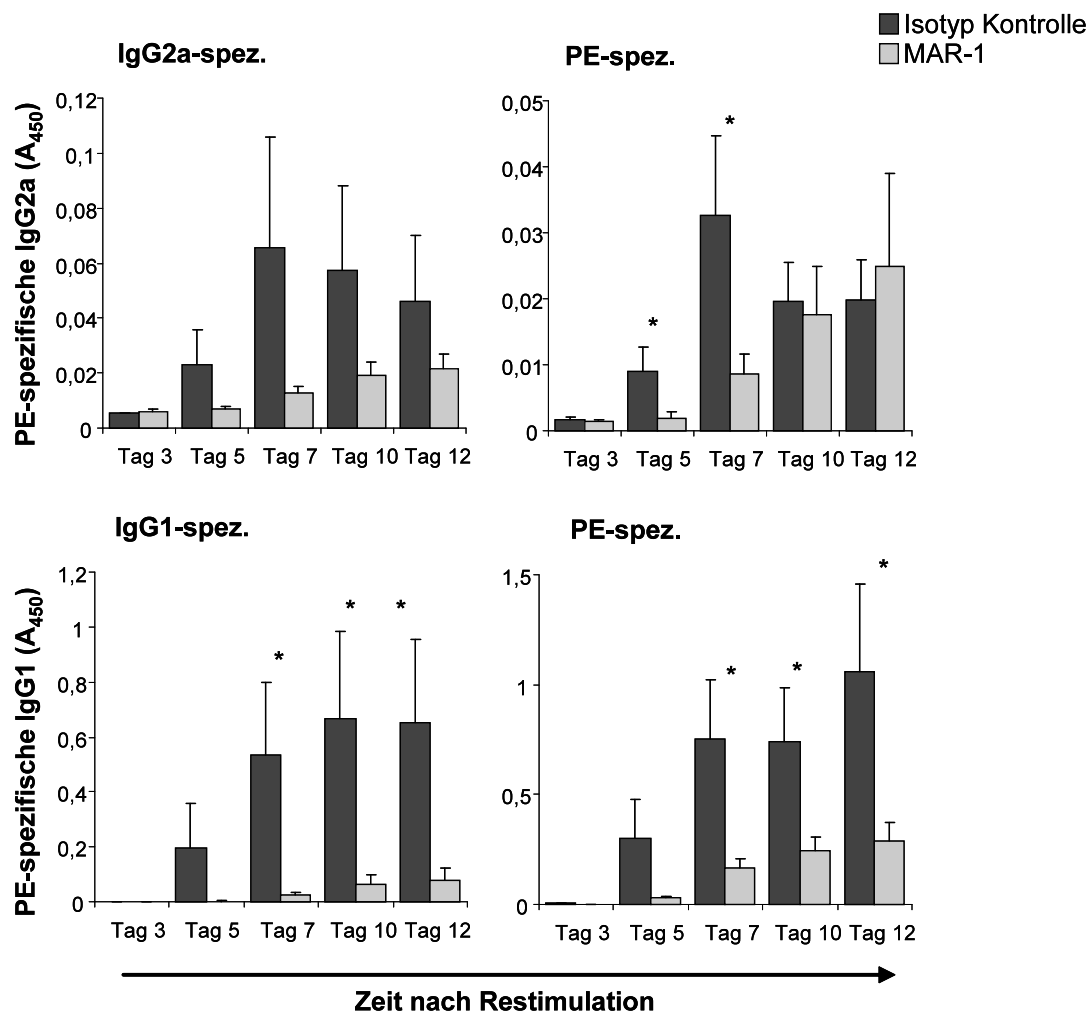


Abbildung 24: Effekt der humoralen Gedächtnisantwort ist unabhängig vom Antigen und der Nachweismethode

Mäuse wurden mit zweimal 100 µg PE ohne Adjuvans immunisiert und die basophilen Granulozyten mit der Injektion von anti-IgER depletiert (MAR-1, n = 12) oder blieben erhalten (Isotyp Kontrolle, n = 13). Nach der Restimulation mit 100 µg PE wurden den Mäusen Blut abgenommen und der Plasmagehalt an antigenspezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörper mithilfe von zwei ELISA-Methoden ermittelt. Zum Einen wurde die ELISA-Platte mit isotypspezifischen Antikörper (IgG1-, oder IgG2a-spez., linke Seite) beschichtet und mit PE-Biotin detektiert oder mit PE (rechte Seite) bestückt und einem isotypspezifischen biotinylierten Antikörper zur Detektion eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und mittleren Standardfehler (SEM). (* p < 0,05)

3.4.4 Basophile Granulozyten haben während einer Primärantwort keinen Einfluss auf die Bildung antigenspezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper

Basophile Granulozyten könnten nicht nur bei einer sekundären Immunantwort eine Rolle spielen, sondern auch die Primärantwort beeinflussen. Um diesen Effekt

auszuschließen, wurde der Einfluss basophiler Granulozyten auf eine primäre Immunantwort ermittelt. Bei einem ersten Antigenkontakt wurden mit zeitlicher Verzögerung antigenspezifische Immunglobuline gebildet, so dass es allenfalls zu einer sehr verzögerten antigenabhängigen Aktivierung von basophilen Granulozyten kommen konnte. Naive Mäuse wurden für drei Tage zweimal täglich mit 5 µg MAR-1 (anti-IgER) oder der Isotyp Kontrolle behandelt, um die Rolle der basophilen Granulozyten bei der Primärantwort zu untersuchen. Am nächsten Tag wurden die Tiere mit 100 µg APC in Aluminiumpräzipitat als Adjuvans immunisiert. Den Mäusen wurde mehreren Tage nach der Immunisierung Blut abgenommen und der APC-spezifische Gehalt an IgG1- und IgG2a-Immunglobulinen ermittelt.

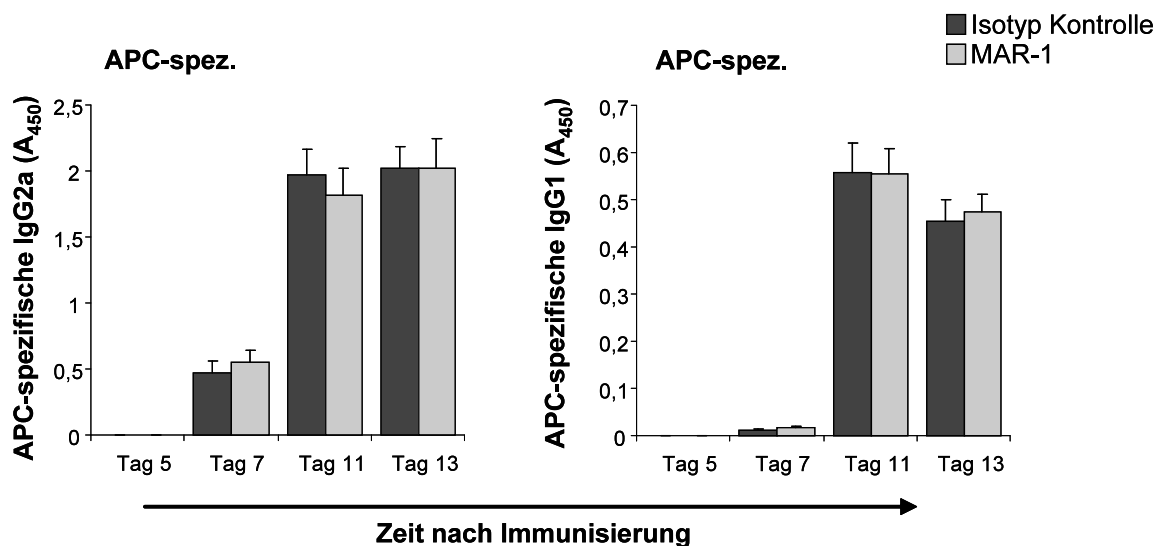


Abbildung 25: Depletion basophiler Granulozyten bei einer Primärantwort

Die Depletion von basophilen Granulozyten hat keinen Einfluss auf den Serumgehalt antigenspezifischer IgG2a- oder IgG1-Antikörper im Verlauf einer Primärantwort. Naive C57BL/6 Mäuse wurden für drei Tage zweimal täglich mit 5 µg MAR-1 (n = 10) oder Isotyp Kontrolle (n = 10) behandelt und am folgenden Tagen 100 µg APC in Aluminiumpräzipitat intraperitoneal injiziert. Der Gehalt APC-spezifischer IgG2a- und IgG1-Antikörper wurde mit APC-beschichteten ELISA-Platten und isotypspezifischen Detektionsantikörpern im Plasma nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, hat das Fehlen von basophilen Granulozyten im Vergleich zur Isotyp Kontrolle keine Auswirkungen auf die Entstehung antigenspezifischer Immunglobuline während einer Primärantwort. Basophile Granulozyten haben demnach keinen Einfluss auf die humorale Immunantwort bei einem Erstkontakt mit dem Antigen APC.

3.4.5 Gedächtnisimmunantwort in Mastzell-defizienten W/W^V -Mäusen

Mastzellen könnten ebenfalls den Effekt der Antigenproduktion bei einer sekundären Immunantwort beeinflussen. Die IgE Antikörper können über den hochaffinen IgE-Rezeptor ($Fc\epsilon R1$) auch an Mastzellen binden. Der Antikörper gegen den IgE-Rezeptor (MAR-1) konnte folglich auch Mastzellen erkennen und depletierte diese zu 50% im peritonealen Gewebe ¹ (Daten nicht gezeigt). Mastzellen sind jedoch hauptsächlich in Geweben, Schleimhäuten und im Peritonealraum lokalisiert. Um einen Mastzellen-Effekt auf die Immunglobulin-Ausschüttung von B-Zellen auszuschließen, wurde die humorale Gedächtnisimmunantwort an Mastzell-defizienten W/W^V -Mäusen untersucht. Diese Mäuse besitzen eine Mutation im Gen/*locus* für cKit, so dass keine Mastzellenentwicklung stattfindet. bei W/W^V -Mäusen sind auch andere Parameter wie die Entwicklung der Keimzellen und die Fellfarbe verändert.

Die W/W^V -Mäuse wurden für die Untersuchung der humoralen Gedächtnisimmunantwort mit 100 μ g APC und *B. pertussis* immunisiert und fünf Wochen später deren basophile Granulozyten depletiert. Als Kontrolle erhielten zehn W/W^V -Mäuse den Isotyp Antikörper. Bei diesen Mäusen war die Depletion basophiler Granulozyten schwierig, da nur etwa die Hälfte der Mäuse ein längeres und vollständiges Fehlen basophiler Granulozyten zeigte. Zwei Tage nach der Depletion mit einer erhöhten Dosis von zweimal täglich 10 μ g MAR-1 fand die Restimulation mit 100 μ g APC statt. Danach wurde über mehrere Tage der Plasmagehalt APC-spezifischer IgG1- und IgG2a-Immunglobuline quantifiziert.

Die anschließende Messung mittels ELISA ergab eine signifikante Verringerung APC-spezifischer IgG1- an Tag zehn und dreizehn und IgG2a-Antikörper an Tag dreizehn (Abbildung 26), wobei nur erfolgreich depletierte Mäuse mit kleiner 0,1% basophilen Granulozyten im Bezug auf die Gesamt-Leukozyten-Zahl des peripheren Bluts in die statistische Auswertung einbezogen wurden.

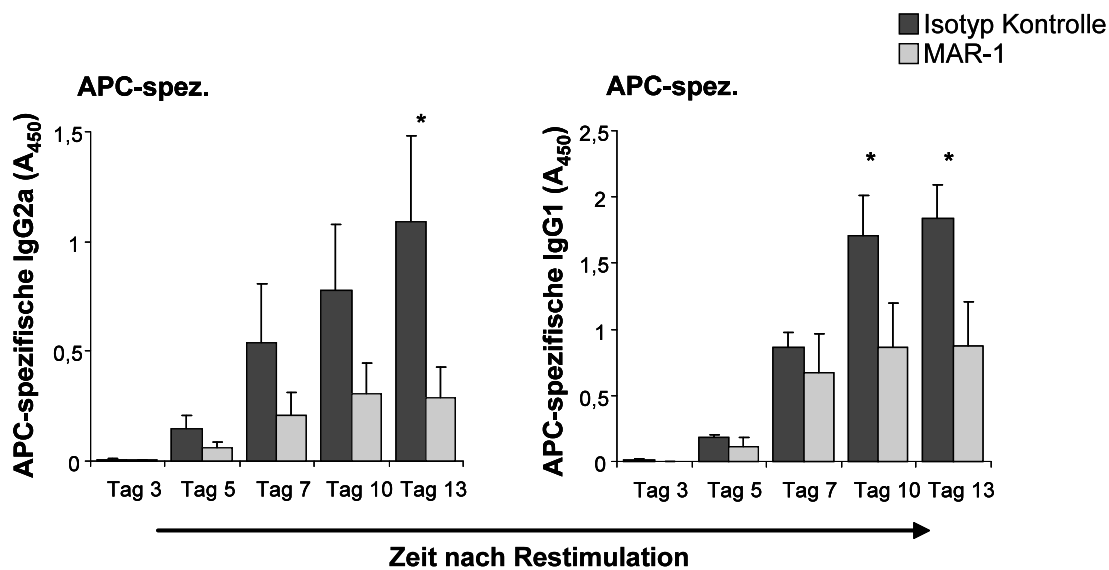


Abbildung 26: Humorale Gedächtnisimmunantwort bei W/W^v-Mäusen

Gedächtnisimmunantwort APC-immunisierter Mastzell-defizienter Mäuse (W/W^v). Die Immunisierung erfolgte mit 100 µg APC und *B. pertussis* als Adjuvans. Für die Depletion fünf Wochen nach der Immunisierung wurde für drei Tage zweimal täglich 10 µg MAR-1 oder Isotyp Kontrolle eingesetzt. Die Mäuse wurden mit 100 µg APC am zweiten Tag nach der Depletion restimuliert und der Plasmagehalt APC-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper mittels ELISA quantifiziert. Die Depletion war bei 9 von 20 Mäusen erfolgreich (<0,1% basophile Granulozyten von Leukozyten im Blut), die Gruppengröße der Isotyp Kontrolle belief sich auf 10 Mäuse. Die Fehlerbalken geben den SEM der entsprechenden Gruppe wieder. (* p < 0,05)

3.4.6 Gedächtnisimmunantwort in Mastzell-defizienten W^{SH}-Mäusen

Der Versuch wurde auch an W^{SH}-Mäusen durchgeführt, um in einem weiteren Modell eine mögliche Mastzellen-Abhängigkeit der Gedächtnisimmunantwort aufgrund des Depletionsvorgangs mit MAR-1 auszuschließen. Die W^{SH}-Mutation ist eine Inversion in proximaler Nähe zum *cKit Locus*. Homozygote Tiere besitzen keine Mastzellen, zeigen aber im Vergleich zu W/W^v-Tieren keine Veränderungen in der Entwicklung der Keimzellen und Erythrozyten.

Die oben beschriebene Versuchsdurchführung wurde zur Untersuchung der humoralen Gedächtnisimmunantwort in Ab- und Anwesenheit von basophilen Granulozyten wiederholt. Mastzell-defiziente W^{SH}-Mäuse wurden mit 200 µg APC ohne Adjuvans immunisiert. Vier Wochen nach der Immunisierung wurden basophile Granulozyten mit 5 µg (zweimal täglich, drei Tage) MAR-1 depletiert und die

Kontrollgruppe mit dem Isotyp Antikörper behandelt. Den Mäusen wurde zu mehreren Zeitpunkten nach Restimulation Blut abgenommen und der Plasmagehalt APC-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper mittels ELISA untersucht. In W^{SH} -Mäusen konnte eine signifikante Verringerung der Konzentration APC-spezifischer IgG2a-Antikörper im peripheren Blut zwischen dem fünften und zwölften Tag bei depletierten basophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Für den Gehalt antigenspezifischer IgG1-Antikörper war die Verringerung am Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Abbildung 27).

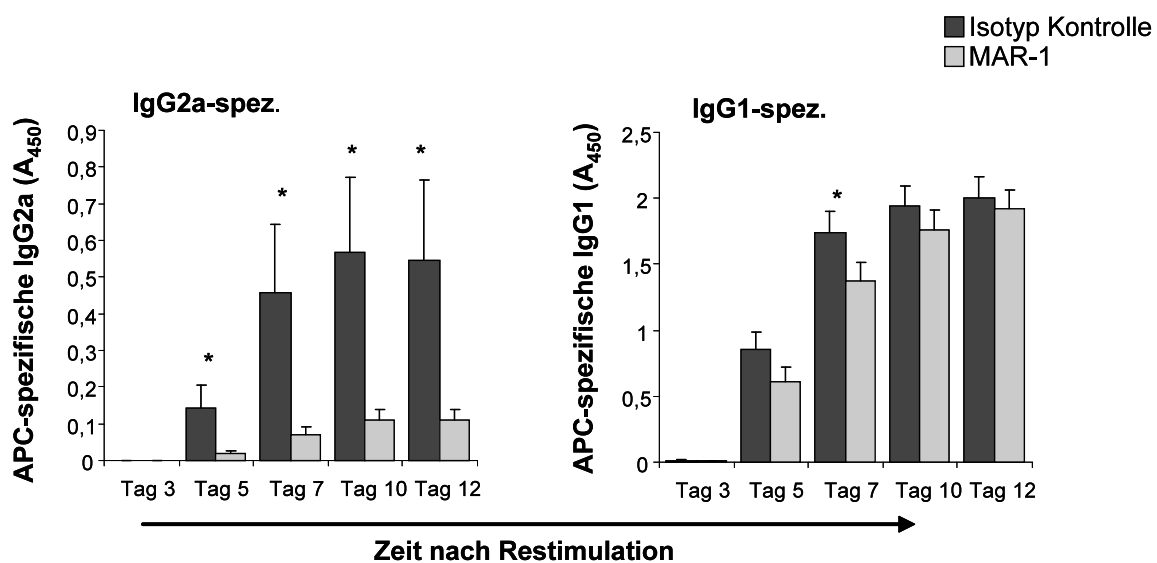


Abbildung 27: Verstärkte IgG2a-Produktion in Anwesenheit von basophilen Granulozyten bei W^{SH} -Mäusen

W^{SH} -Mäuse wurden mit 200 μ g APC ohne Immunverstärker immunisiert und zwei Tage nach der letzten MAR-1 (n = 15), bzw. Isotyp-Gabe (Isotyp Kontrolle, n = 15) mit 100 μ g APC restimuliert. Der ELISA erfolgte mit Beschichtung gegen den IgG-Isotyp (5 μ g/ml) und einer Detektion mit APC-Biotin (2 μ g/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte und mittleren Standardfehlern (SEM). (* p < 0,05)

Der Effekt des signifikant verringerten IgG1- und IgG2a-Gehalts nach einer Depletion basophiler Granulozyten ist folglich nicht durch eine mögliche Beteiligung von Mastzellen an einer Gedächtnisimmunantwort zu erklären. Dies konnte an Mastzelldefizienten W/W^V -Mäusen und W^{SH} -Mäusen gezeigt werden.

3.4.7 Gedächtnisimmunantwort PspA-immunisierter Mäuse

C57BL/6 Mäuse wurden mit 10 µg des hoch aufgereinigten Pneumokokken Oberflächenproteins A (im Folgenden nur PspA genannt) immunisiert, um den Einfluss basophiler Granulozyten auf die humorale Immunantwort gegen ein pathologisch relevantes Antigen zu untersuchen. Vier Wochen nach der Immunisierung erhielten die Mäuse den depletierenden MAR-1-Antikörper zur Entfernung basophiler Granulozyten oder den Isotyp Antikörper. Die Restimulation fand mit 20 µg PspA statt. Die Untersuchung des Plasmagehalts antigenspezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper ergab eine ausgeprägte Verringerung beider Immunglobulin-Subklassen für die depletierte Gruppe (Abbildung 28). Im Vergleich zur Kontrolle verringerte sich sieben Tage nach der Depletion basophiler Granulozyten die Konzentration PspA-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper signifikant.

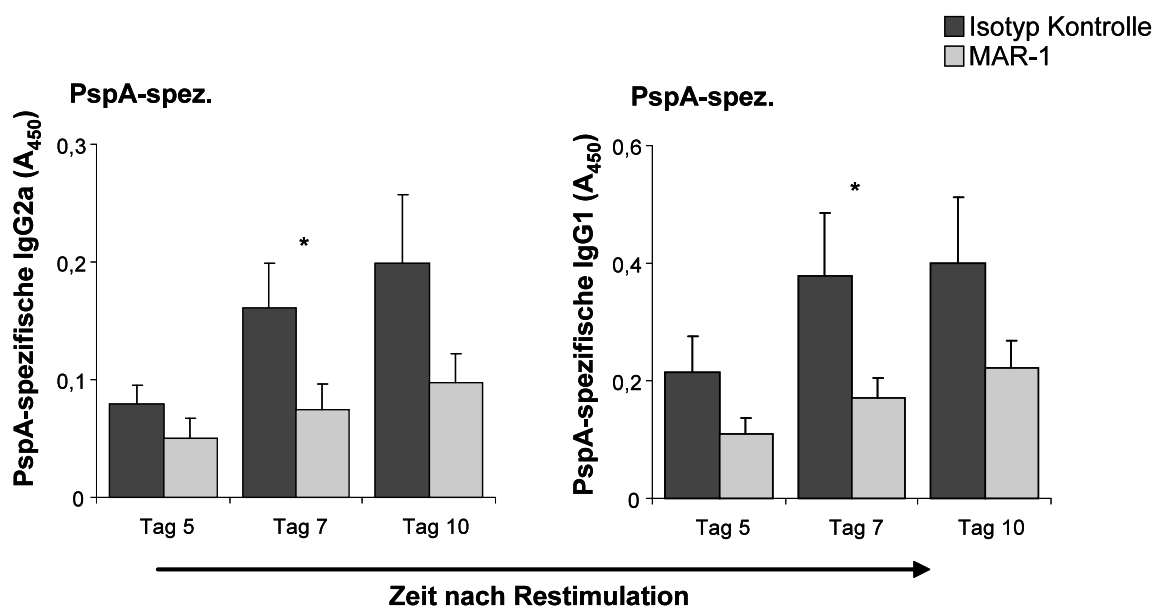


Abbildung 28: humorale Gedächtnisimmunantwort nach Immunisierung mit PspA

C57BL/6 Mäuse wurden mit 10 µg PspA ohne Immunverstärkung immunisiert und vier Wochen später mit 5 µg (zweimal täglich, drei Tage) MAR-1 oder der Isotyp Kontrolle behandelt. Am zweiten Tag nach der letzten Antikörpergabe wurden die Mäuse mit 20 µg PspA restimuliert und der Plasmagehalt PspA-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper über mehrere Tage nach der Restimulation mittels ELISA gemessen. Dabei wurde die ELISA-Platte mit PspA beschichtet und gebundene Antikörper mit biotinylierten Detektionsantikörpern gegen IgG1- und IgG2a-Antikörper detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und der SEM von zehn Tieren pro Gruppe. (* $p < 0,05$)

Es konnte gezeigt werden, dass basophilen Granulozyten auch bei einem Immunisierungsmodell mit einem pathologisch relevanten Antigen einen Einfluss auf die Antikörper Herstellung haben.

3.4.8 Einfluss basophiler Granulozyten bei einem Infektionsmodell

Nachdem auch im PspA-Immunisierungsmodell die Gedächtnisimmunantwort nach der Depletion basophiler Granulozyten signifikant verringert war, wurde die Auswirkung einer veränderten Immunantwort auf die anschließende Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* untersucht. Die Versuche wurden in Kooperation mit Ulrich Maus an der Medizinischen Hochschule Hannover (Labor für experimentelle Lungenforschung) durchgeführt.

PspA-spezifische Antikörper können Mäuse vor einer Sepsis nach der Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* schützen⁷⁶⁻⁷⁸. Bei dem Infektionsmodell wurden Mäuse mit 10 µg PspA immunisiert und nach einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* das Auftreten von Sepsis und das Überleben der Mäuse untersucht. PspA-immunisierte oder naive Tiere wurden zur Depletion basophiler Granulozyten mit dem Antikörper MAR-1 oder der Isotyp Kontrolle behandelt. Nach einer Intervallphase von zwei Tagen erfolgte die Restimulation mit 20 µg PspA. Fünf Tage nach der Restimulation wurden die Mäuse *intratracheale* mit *S. pneumoniae* Erregern infiziert. Die Sepsisrate, ermittelt durch Anwesenheit lebender *S. pneumoniae* Erreger im peripheren Blut, war wesentlich höher, wenn die Restimulation mit PspA in Abwesenheit von basophilen Granulozyten stattfand. In der Gruppe ohne basophile Granulozyten wurden für Tag 1 und Tag 3 fünf und zehn septische Mäuse gezählt. In der Kontrollgruppe hingegen zeigten an Tag 1 nur eine Maus und an Tag 3 nur vier Mäuse eine Sepsis (Abbildung 29). Als weitere Kontrolle diente die Infektion nicht-immunisierter, naiver Mäuse und ergab im Vergleich zu PspA-immunisierten Mäusen eine höhere Sepsisrate und niedrigere Überlebensrate, wobei hier die Depletion von basophilen Granulozyten keinen Einfluss auf Sepsis oder Überleben hatte.

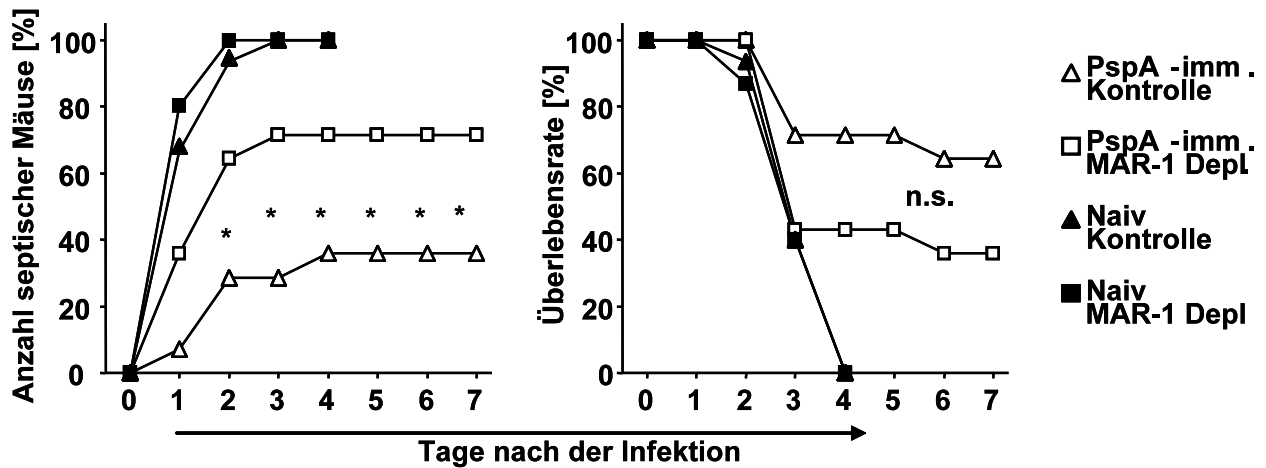


Abbildung 29: Sepsis und Überlebensrate nach *S. pneumoniae*-Infektion

Es wurde das Auftreten einer Sepsis und die Überlebensrate PspA-immunisierter (PspA-imm, weiß) oder nicht immunisierter Mäuse (naiv, schwarz) in der Anwesenheit (Kontrolle) oder nach einer Depletion basophiler Granulozyten (MAR-1 Depl) ermittelt. Zwei Tage nach der Depletion wurden die PspA-immunisierten Mäuse mit PspA restimuliert. Die Kontrolle erhielt PBS. Nach weiteren fünf Tagen wurden alle Mäuse *intratracheal* mit *S. pneumoniae* infiziert. Dargestellt wurden die Mittelwerte von fünfzehn Mäusen pro Gruppe bzw. vierzehn PspA-immunisierten Mäusen mit MAR-1-Behandlung. Die Divergenz bei der Überlebensrate war nicht signifikant (n.s.). Eine Signifikanz wurde mit * gekennzeichnet und entsprach einem p-Wert von kleiner 0,05 (Kaplan-Meier-Analyse).¹

Dieser Versuch konnte die Relevanz basophiler Granulozyten bei einer humoralen Immunantwort während der Infektion mit *S. pneumoniae* zeigen.

3.5 Antigenbindende basophile Granulozyten verstärken eine Gedächtnisimmunantwort

Die Eigenschaften antigenspezifischer Zellen können von immunisierten Tieren auf naive Tiere übertragen werden. Dieser Vorgang wird adoptiver Transfer genannt und wurde auch bei der Untersuchung basophiler Granulozyten als Hilfsmittel eingesetzt. So sollte die Übertragbarkeit der Eigenschaften antigenspezifischer basophiler Granulozyten auf naive Mäuse ermittelt werden.

3.5.1 CFSE-Markierung

Die Anfärbung von Zellen mit dem Farbstoff CFSE ermöglichte den Nachweis transferierter Zellen in Empfängermäusen. C57BL/6 Mäuse wurden mit 20 µg APC in

Aluminiumpräzipitat immunisiert. Nach abgeschlossener Primärantwort dienten diese Tiere als Spender für APC-spezifische Zellen. In Abbildung 30 wird der Transfer CFSE-markierter Zellen gezeigt. Hierfür wurden Zellen aus dem Knochenmark APC-immunisierter Mäuse isoliert und mit dem fluoreszenten Farbstoff CFSE markiert. Die Zellen wurden dann *intravenös* auf eine naive Maus übertragen und 24 h nach Transfer die Antigen-Spezifität untersucht. Die Zellen wurden dafür aus Milz und Knochenmark der Empfängermaus isoliert und mit APC oder PBS gefärbt. APC-spezifische Zellen besitzen dabei die Fähigkeit das Antigen APC über APC-spezifische Antikörper und Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche zu binden. Gebundenes APC kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Man kann deutlich erkennen, dass sowohl in Milz als auch im Knochenmark IgE⁺ basophile Granulozyten vorhanden sind, die CFSE-positiv sind und somit transferiert wurden (Abbildung 30). CFSE⁻ Zellen sind endogene Zellen der Empfängermaus. Der Anteil CFSE⁺ basophiler Granulozyten betrug in der Milz 6%, im Knochenmark 2% der Anzahl endogener basophiler Granulozyten. Nach Eingrenzung IgE⁺ Zellen konnte gezeigt werden, dass CFSE⁺ basophile Granulozyten (mittlere Diagramme) zu 50% positiv für APC sind. Endogene basophile Granulozyten waren nicht in der Lage APC zu binden.

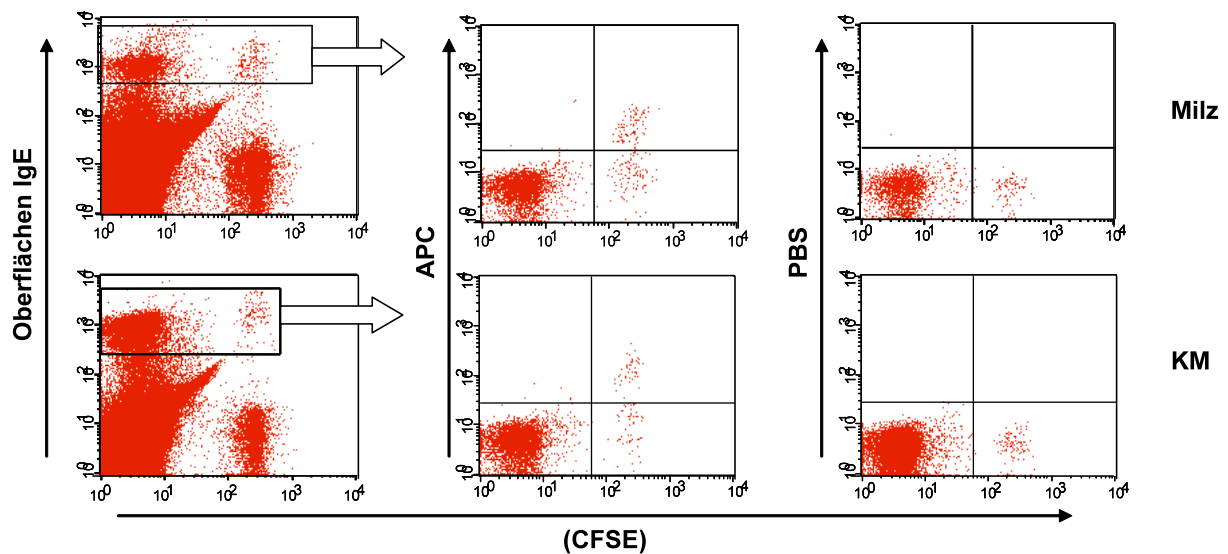


Abbildung 30: CFSE-markierte Zellen können transferiert werden

Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung (FACS Plot) 24 h nach adoptivem Transfer von CFSE-gefärbten Zellen einer APC-immunisierten Spendermaus in Milz und Knochenmark (KM) einer naiven Empfängermaus. 24 h nach dem Transfer wurden die Zellen aus den Organen isoliert und mit anti-IgE-PE und APC (10 µg/ml) bzw. PBS als Kontrolle gefärbt. IgE⁺ Zellen wurden eingegrenzt (linke Seite) und auf die Fähigkeit zur Antigenbindung untersucht (Mitte). Als negative Kontrolle der Antigen-Spezifität diente die Färbung mit PBS (rechts) anstelle des Antigens.

Der Nachweis CFSE⁺ Zellen bedeutet, dass der Transfer von basophilen Granulozyten möglich ist. Außerdem zeigen diese Diagramme, dass die Fähigkeit basophiler Granulozyten zur Antigenbindung auch nach dem Transfer erhalten blieb.

3.5.2 Adoptiver Transfer antigenspezifischer Zellen

Um die Beteiligung basophiler Granulozyten bei der Entwicklung einer humoralen Gedächtnisimmunantwort zu untersuchen, wurde ein adoptiver Transfer antigenspezifischer Zellen mit und ohne basophilen Granulozyten von immunisierten Spendermäusen auf naive Mäuse durchgeführt. Dabei wurden die Plasmazellen *in vitro* entfernt, um die basale Produktion von antigenspezifischen Antikörpern durch transferierte Plasmazellen zu vermeiden.

3.5.2.1 Adoptiver Transfer mit Zellen aus APC-immunisierten

Spendermäusen

Für den adoptiven Transfer der Zellen immunisierter Spendermäuse auf naive Empfängermause wurden C57BL/6 Mäuse zweimal im vierwöchigen Intervall mit APC und *B. pertussis* immunisiert und fünf Wochen nach der letzten Immunisierung die Zellen aus Milz und Knochenmark isoliert. Ein Teil der Zellen wurde daraufhin *in vitro* anhand von CD138-Biotin von Plasmazellen depletiert (CD138⁻). Bei den restlichen Zellen wurden sowohl Plasmazellen als auch IgE⁺ basophile Granulozyten (CD138⁻ IgE⁻) entfernt (Abbildung 31). Die *in vitro* Depletion der Zellpopulationen erfolgte mittels MACS-Aufreinigung und wurde durch eine FACS-Analyse vor dem Transfer auf Vollständigkeit kontrolliert. Der Transfer der Zellsuspensionen erfolgte über *intravenöse* Injektion ins *retrobulbäre* Venengeflecht der Empfängermaus. Eine dritte Gruppe erhielt als weitere Kontrolle keine Zellen, sondern nur PBS. Alle Tiere wurde 12 h und 36 h nach dem Transfer mit jeweils 10 µg APC *i.p.* restimuliert bzw. stimuliert.

Den Empfängermäusen wurde in den folgenden Tagen Blut abgenommen und der Plasmagehalt APC-spezifischer IgG1 und IgG2a Immunglobuline mittels ELISA quantifiziert. Tiere, die keine Zellen sondern PBS erhalten haben, zeigten innerhalb von dreizehn Tagen nur einen sehr geringen Anstieg APC-spezifischer Immunglobuline (Abbildung 31). Die CD138⁻ Gruppe erhielt sowohl APC-spezifische Gedächtnis-T- und -B-Zellen als auch APC-spezifische basophile Granulozyten aus Milz und Knochenmark. Die CD138⁻ IgE⁻ Gruppe erhielt hingegen Gedächtnis-Zellen, aber keine basophilen Granulozyten. Die Gruppe mit transferierten basophilen Granulozyten (CD138⁻) reagierte auf die Restimulation mit einer raschen und starken Antikörper-Produktion, die typisch für eine Gedächtnisantwort ist. Abbildung 31 zeigt den Plasmagehalt APC-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper. Im Vergleich zu dieser Gruppe war die Produktion APC-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper bei der fehlenden Übertragung von basophilen Granulozyten (CD138⁻ IgE⁻) um die Hälfte verringert. Für IgG1 war die eingeschränkte Antikörperproduktion zwischen den Tagen 7 und 13 für beide Nachweismethoden signifikant. IgG2a-Antikörper traten jedoch nur in sehr geringer Konzentration im peripheren Blut auf und waren für den Nachweis mit APC-Biotin unterhalb der Detektionsgrenze.

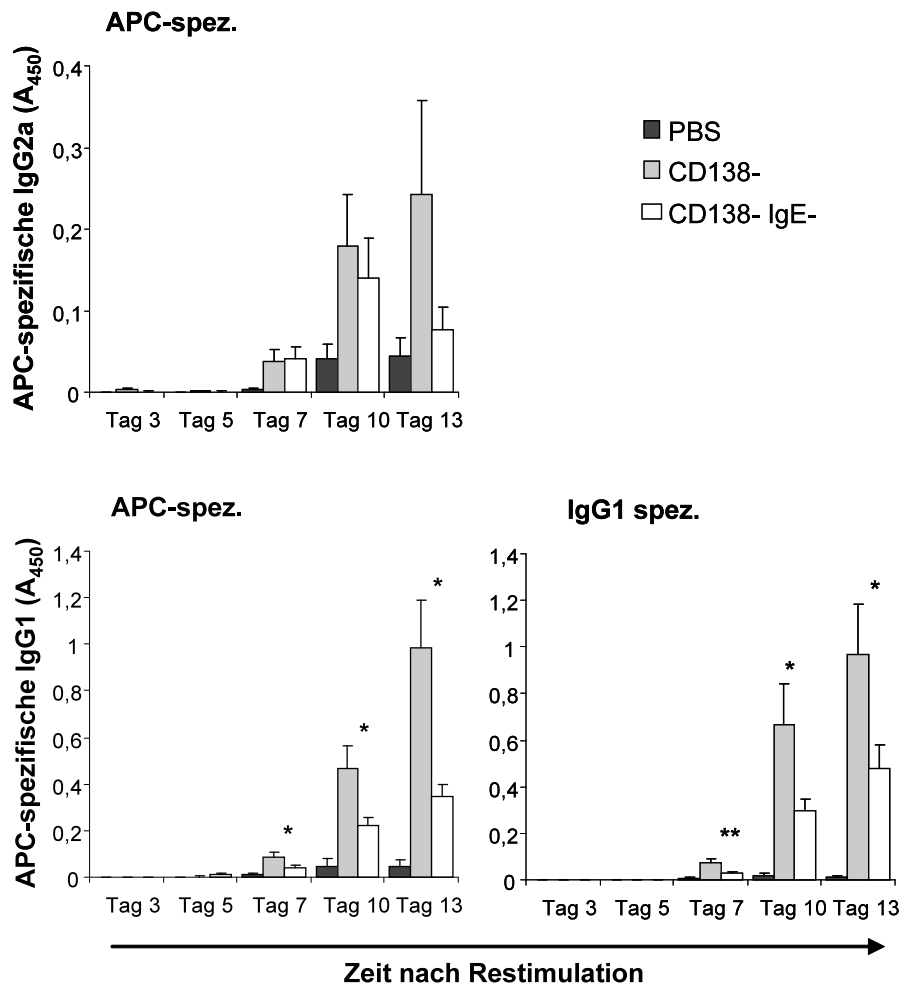


Abbildung 31: humorale Gedächtnisimmunantwort nach Transfer APC-spezifischer Zellen

C57BL/6 Mäuse wurden zweimal mit 100 µg APC und *B. pertussis* immunisiert. Fünf Wochen nach der letzten Immunisierung wurden Milz- und Knochenmarkzellen isoliert und über den Oberflächenmarker CD138 mittels MACS von Plasmazellen depletiert (CD138-). Einer Empfängergruppe wurden Zellen ohne basophile Granulozyten (CD138- IgE-) *i.v.* übertragen, eine weitere Gruppe erhielt PBS als Kontrolle. Die Restimulation erfolgte an den zwei darauf folgenden Tagen mit jeweils 10 µg APC. APC-spezifische IgG1- und IgG2a-Antikörper wurden über mehrere Tage nach der Restimulation mittels ELISA gemessen. Der IgG2a-spezifische ELISA mit APC-Biotin zur Detektion war aufgrund der geringen Plasma-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittleren Standardfehler von zehn Mäusen pro Gruppe. (* $p < 0,05$)

Die PBS-Gruppe zeigte als Reaktion auf die APC-Gabe nur eine sehr geringe Antikörper Sekretion, was auf eine Primärreaktion deutet. Folglich fand bei der PBS-Gruppe keine Gedächtnisimmunantwort statt. Die beiden anderen Gruppen zeigten hingegen eine sekundäre Immunreaktion aufgrund des erfolgreichen Transfers antigenspezifischer Zellen.

3.5.2.2 Adoptiver Transfer bei Balb/c Mäusen

Der adoptive Transfer wurde mit Balb/c Mäusen wiederholt, um eine spezifische Reaktion eines Mausstammes auszuschließen. Dazu wurden Balb/c Spender-Mäuse in einem vierwöchigen Abstand zweimal mit APC und hitze-inaktiviertem *B. pertussis* immunisiert. Nach abgelaufener Immunreaktion (vier Wochen) wurden die Zellen aus Milz und Knochenmark aufgereinigt und CD138⁺ Plasmazellen bzw. CD138⁺ Plasmazellen und IgE⁺ basophile Granulozyten mittels MACS *in vitro* depletiert. Nachdem die Zellzahl beider Aufreinigungen angeglichen wurde, wurden die Zellen in naive Balb/c Mäuse über *i.v.* Injektion transferiert. Zur Kontrolle der sekundären Immunreaktion erhielt eine weitere Gruppe nur die Vehikelkontrolle (PBS). Nach 12 h und 36 h wurden alle Tiere mit 20 µg APC restimuliert und der Plasmagehalt APC-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper (Daten für IgG2a-Antikörper nicht gezeigt) an Tag 3, 5, 7 und 11 nach der Restimulation ermittelt.

Die Kontrollmäuse ohne adoptiven Transfer antigenspezifischer Zellen (PBS) zeigten nur eine minimale Verstärkung der antigenspezifischer Antikörperproduktion für IgG1 und IgG2a (Abbildung 32). Diese Mäuse konnten aufgrund fehlender Zellübertragung nicht mit einer sekundären Immunantwort auf die Antigen-Gabe reagieren. Im Gegensatz dazu war für die Gruppen, die Zellen aus APC-immunisierten Mäusen erhalten haben, ab Tag 7 eine vermehrte Ausschüttung APC-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper messbar. Mäuse, denen basophile Granulozyten übertragen wurden (CD138-), konnten mit einer schnellen und verstärkten Bildung APC-spezifischer IgG1-Antikörpern reagieren. An Tag 7 und 10 war mittels ELISA eine signifikante Erhöhung der Konzentration antigenspezifischer IgG1-Antikörper nach Übertragung basophiler Granulozyten (CD138-) detektierbar.

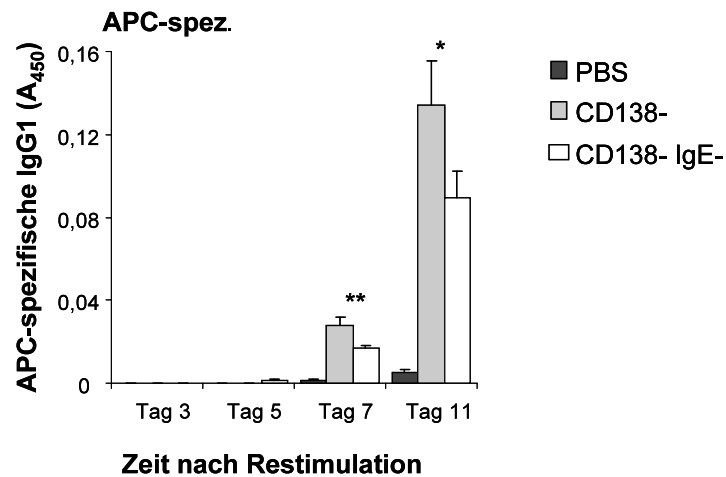


Abbildung 32: Transfer von APC-spezifischen Zellen bei Balb/c Mäusen

Aus zweifach APC-immunisierten Balb/c Mäusen (vier Wochen Abstand mit 100 µg und *B. pertussis*) wurden Zellen aus dem Knochenmark und der Milz isoliert. Die Zellen der Spendermäuse wurden entweder über CD138 von Plasmazellen (CD138-), oder über CD138 und IgE von Plasmazellen und basophilen Granulozyten (CD138-IgE-) depletiert. Nach dem Angleichen der Zellzahl wurden die Zellen *i.v.* in naive Balb/c Empfängermause injiziert. Die Restimulation erfolgte nach 12 h und 36 h mit jeweils 20 µg APC. Eine Gruppe erhielt als Kontrolle nur PBS. Der Plasmagehalt APC-spezifischer IgG1-Antikörper wurde über mehrere Tage mittels ELISA und APC-beschichteten Platten analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von zehn Mäusen pro Gruppe. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Alle Tiere besaßen endogene basophile Granulozyten, die nicht auf die APC-Gabe reagierten (PBS). Erst der adoptive Transfer von basophilen Granulozyten aus immunisierten Mäusen ermöglichte eine Reaktion der basophilen Granulozyten auf das Antigen und damit eine Steigerung der humoralen Immunantwort.

Die Abhängigkeit der Reaktion von der Anwesenheit basophiler Granulozyten und deren Fähigkeit, das Antigen APC zu binden und zu reagieren, lassen auf eine Beteiligung basophiler Granulozyten bei der Entwicklung einer humoralen Immunantwort schließen. Der Einfluss basophiler Granulozyten bei einer humoralen Gedächtnisimmunantwort war zudem nicht auf den Mausstamm C57BL/6 begrenzt, sondern konnte auch in Balb/c Mäusen nachgewiesen werden.

3.6 Rekrutierung von basophilen Granulozyten bei einer Restimulation

Die Aufgabe basophiler Granulozyten besteht bei einer humoralen Gedächtnisimmunantwort in der Bindung des Antigens und der Stimulation von B-Zellen und T-Zellen mit Hilfe von IL-4 und IL-6. Die Lokalisation basophiler Granulozyten ist unter basalen Konditionen in Milz, Knochenmark und peripherem Blut beschrieben. Bei allergischen Reaktionen können basophile Granulozyten jedoch auch in den ableitenden Lymphknoten und dem entzündlichen Geweben detektiert werden^{2,7,23,35}. Im Folgenden wurde die Verteilung basophiler Granulozyten während einer Gedächtnisimmunantwort untersucht.

3.6.1 Antigen-spezifische basophile Granulozyten werden aus dem peripheren Blut in die Lymphknoten rekrutiert

Die Präsenz basophiler Granulozyten wurde im Verlauf einer humoralen Gedächtnisimmunantwort in unterschiedlichen Organen untersucht. Erneut wurde das Modellantigen APC verwendet, weil es einen guten Nachweis der Antigenbindung ermöglicht. Organe APC-immunisierter Mäuse wurden an mehreren Zeitpunkten nach der Restimulation durchflusszytometrisch untersucht, um den Verlauf der Antigenbindung und Rekrutierung basophiler Granulozyten zu verfolgen.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 20 µg APC in Aluminiumpräzipitat immunisiert und vier Wochen später mit 10 µg APC restimuliert. Eine Bindung von Antigen war auf basophilen Granulozyten und anderen antigenpräsentierenden Zellen wie zum Beispiel Gedächtnis-B-Zellen nach einer Restimulation in verschiedenen Organen wie Lymphknoten, Peritoneum, Milz, Knochenmark und Blut nachweisbar. Die Organe wurden in unterschiedlichen Zeitabständen auf das Vorkommen APC⁺ basophiler Granulozyten (APC⁺ Basophile) und die Anzahl basophiler Granulozyten insgesamt (Gesamt Basophile) durchflusszytometrisch untersucht. Die Messung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe von Caltag *Counting Beads*. Basophile Granulozyten wurden mit Hilfe der Oberflächenmarker IgE⁺ CD49b⁺ identifiziert. Die APC-Bindung auf Zellen wurde ebenfalls durchflusszytometrisch quantifiziert. Als Kontrolle dienten naive Tiere, die vor der Restimulation keine Immunisierung erhalten haben.

In der Abbildung 33 wird gezeigt, dass schon 3 h nach einer Restimulation die ersten antigenspezifischen basophilen Granulozyten in die Lymphknoten einwanderten. 24 h nach der Restimulation erreichte die Anzahl antigenpositiver basophiler Granulozyten ihren Höhepunkt, wobei alle basophilen Granulozyten in den Lymphknoten eine Positivität für APC aufwiesen. Im weiteren Verlauf verringerte sich die Zahl der antigenpositiver basophiler Granulozyten im Lymphknoten. Im Peritonealgewebe erfolgte nach 24 h die Zunahme der Gesamtzahl und auch der Anzahl APC⁺ basophiler Granulozyten und hielt bis 72 h nach der Gabe von 10 µg APC an. Gleichzeitig reduzierte sich die Zahl APC⁺ basophiler Granulozyten im peripheren Blut. 3 h und 24 h nach der Restimulation verringerte die Gesamtmenge basophiler Granulozyten sich im Blut signifikant um 46% und 71% im Vergleich zum Ausgangswert. 24 h nach der APC-Gabe hatte der Hauptanteil (97%) der basophilen Granulozyten im peripheren Blut das Antigen auf der Zelloberfläche gebunden. Die Zahl basophiler Granulozyten stieg im peripheren Blut 72 h nach einer Restimulation immunisierter Mäuse wieder auf das Niveau des Ausgangswertes (Zeitpunkt 0 h) an und unterschied sich nicht mehr von der Zahl basophiler Granulozyten in naiven Mäusen (Abbildung 33).

In Milz und Knochenmark blieb die Zahl basophiler Granulozyten im Verlauf der Untersuchungszeit konstant auf hohem Niveau. Der Anteil APC⁺ basophiler Granulozyten betrug nach 3 h und 24 h im Knochenmark zwischen 65% und 82% und in der Milz bis zu 92% der Gesamtzahl basophiler Granulozyten.

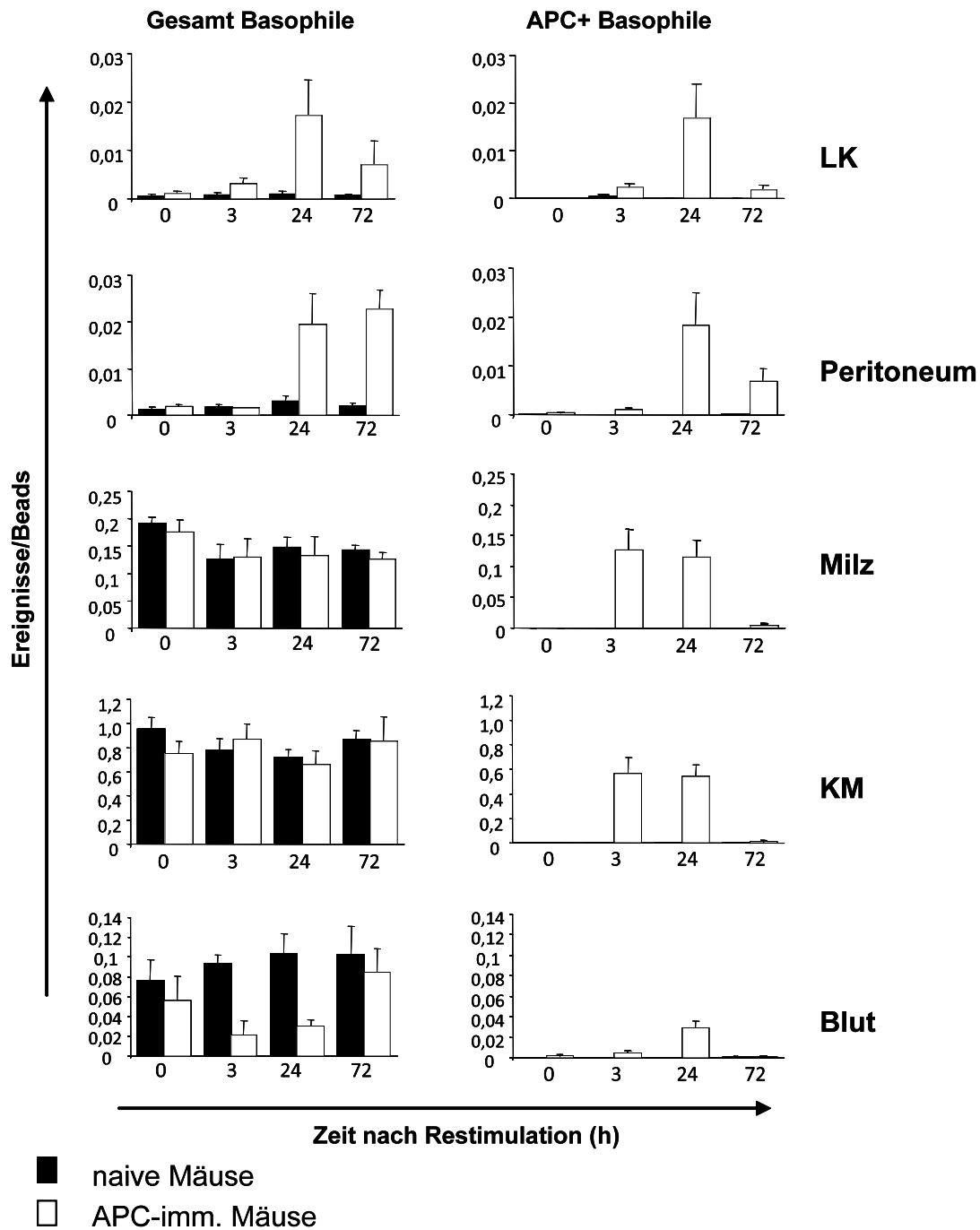


Abbildung 33: Verteilung von basophilen Granulozyten in Lymphknoten (LK), Peritonealgewebe (Peritoneum), Milz, Knochenmark (KM) und peripherem Blut nach *in vivo* Restimulation

Allophycocyanin (APC)-immunisierte Mäuse (weißer Balken) oder naive Mäuse (schwarzer Balken) werden mit 10 µg APC *in vivo* restimuliert und die Zellen der Organe nach unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde zwischen der Anzahl aller basophilen Granulozyten (Gesamt Basophile, CD49b⁺ IgE⁺) und der antigenbindenden basophilen Granulozyten (APC+ Basophile, CD49b⁺ IgE⁺ APC⁺) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von fünf Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt.

Die Migration antigenspezifischer basophiler Granulozyten in die Lymphknoten und die gleichzeitige Abnahme der basophilen Granulozyten im Blut war nur bei einer sekundären Reaktion immunisierter Mäuse (Gedächtnisantwort) messbar. Basophile Granulozyten naiver Mäuse zeigten nach einer Antigen-Gabe keine Veränderung des Migrationsverhaltens. Die Ergebnisse sind damit zu erklären, dass nur bei einer sekundären Immunreaktion antigenspezifische Antikörper vorhanden sind und basophile Granulozyten auf ein Antigen reagieren können.

3.6.2 Antigenbindung auf basophilen Granulozyten

Die Bindung des Antigens auf der Oberfläche basophiler Granulozyten wurde in 3.1.2 in Milz, Knochenmark und Blut 4 h nach Restimulation nachgewiesen. Die Fähigkeit basophiler Granulozyten zur Antigenbindung sollte im Vergleich zu Monozyten in unterschiedlichen Organen und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Monozyten exprimieren in der Maus die Oberflächenmarker CD11b, CD115 und F4/80 und können in GR1⁺ und GR1⁻ Subpopulationen unterschieden werden. GR1⁺ Monozyten werden „Entzündungsmoноzyten“ genannt. Sie sind kurzlebig und akkumulieren am Entzündungsort. GR1⁻ Monozyten entstehen aus GR1⁻ Monozyten und sind vorzugsweise an Endothelien anzutreffen⁸⁹.

Erneut wurden APC-immunisierte und naive C57BL/6 Mäuse mit 10 µg APC restimuliert bzw. stimuliert und in unterschiedlichen Zeitabständen die Anzahl GR1⁺ und GR1⁻ Monozyten und basophiler Granulozyten in Lymphknoten, Peritonealgewebe, Milz, Knochenmark und peripherem Blut im Verlauf einer sekundären Gedächtnisimmunantwort untersucht. Von den Organen wurden Einzelzellsuspensionen für die FACS Analyse hergestellt und mit Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD11b, GR1 und IgE gefärbt. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von APC diente als Maß für die Menge gebundener APC-Moleküle.

Nach 3 h und 24 h konnte auf der Oberfläche basophiler Granulozyten von APC-immunisierten Mäusen konnte, wie in Abbildung 34 gezeigt wird, in allen untersuchten Organen das Antigen APC nachgewiesen werden. Im Lymphknoten war dies sogar 72 h nach der Restimulation in einem geringeren Maß möglich. GR1⁺ Monozyten konnten im Lymphknoten weniger APC-Moleküle binden. Die APC-

Bindung auf basophiler Granulozyten war in der Peritoneallavage so hoch wie in anderen Organen, jedoch geringer als die APC-Bindung auf Monozyten. In Milz und Knochenmark konnten Monozyten APC binden, aber die Anzahl gebundener APC-Moleküle war im Vergleich zu basophilen Granulozyten zehnfach geringer. Insgesamt war im peripheren Blut, Milz, Knochenmark und Lymphknoten die APC-Bindung auf basophilen Granulozyten deutlich höher als auf Monozyten. Eine Bindung von APC konnte bei naiven Mäusen, außer im geringen Umfang auf GR1⁺ Monozyten im Lymphknoten, nicht detektiert werden.

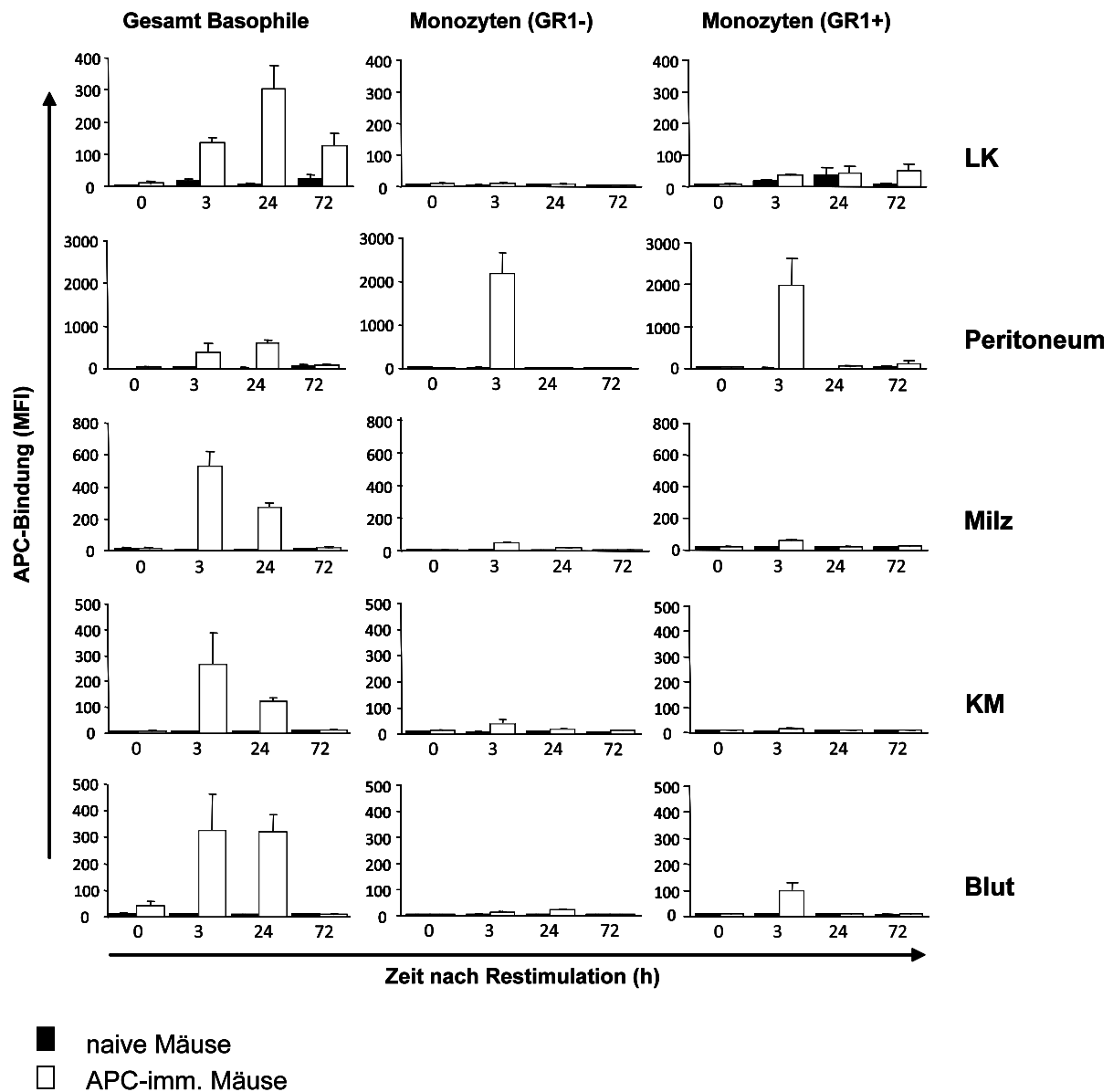


Abbildung 34: Verteilung APC-bindender Zellen

Naive (schwarze Balken) oder APC-immunisierte Mäuse (weiße Balken) wurden mit 10 µg APC stimuliert bzw. restimuliert. 0 (vorher), 3, 24, und 72 h nach der APC-Gabe wurde untersucht, wie viel APC auf den Zellen von mesenterialen Lymphknoten (LK), Peritoneum, Milz, Knochenmark (KM) und peripherem Blut gebunden ist (APC-Bindung (MFI)). Basophilen Granulozyten wurde über Positivität für CD49b und IgE (Gesamt Basophile) identifiziert. Monozyten wurden anhand ihrer Größe und Granularität sowie der Expression von CD11b identifiziert und in GR1⁺ (Monozyten (GR1+)) oder GR1⁻ (Monozyten (GR1-)) Subpopulationen aufgeteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von fünf Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt.

Basophile Granulozyten hatten in den gezeigten Organen, außer dem Peritonealgewebe, etwa zehnfach mehr APC gebunden als Monozyten. Diese Bindung hielt in den meisten Organen bis zu 24 h an, in Lymphknoten sogar bis zu 72 h. Die APC-Bindung war abhängig von APC-spezifischen Antikörpern, was durch

die fehlende Antigenbindung auf basophilen Granulozyten bei naiven Mäusen deutlich wurde.

3.6.3 Verteilung von Monozyten und Granulozyten nach einer Restimulation

In folgendem Versuch wurde analysiert, ob basophile Granulozyten die Migrationseigenschaften anderer Zellpopulationen beeinflussen. Basophile Granulozyten wanderten 3 h nach einer Restimulation APC-immunisierter Mäuse in die Lymphknoten, verringerten ihre Zahl im Blut und blieben in Milz und Knochenmark über den Zeitraum der Untersuchung konstant. Deshalb wurde auch die Zahl neutrophiler Granulozyten und Monozyten nach einer Restimulation ermittelt.

APC-immunisierte Mäuse und naive Kontrolltiere wurden mit 10 µg APC stimuliert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden mesenteriale Lymphknoten, Zellen des Peritoneums, Milz, Knochenmark und peripheres Blut mittels FACS in einer Einzelzellsuspension untersucht. CD11b⁺ Monozyten konnten in GR1⁺ und GR1⁻ Subpopulationen unterschieden werden. Die Identifizierung neutrophiler Granulozyten erfolgte anhand der Größe und Granularität, sowie der Positivität für GR1. *Counting Beads* verhalfen zu einer standardisierten Quantifizierung der Zellzahl mittels FACS-Analyse.

3 h nach APC-Gabe waren antigenspezifische Monozyten (Abbildung 35) *in vivo* in den Lymphknoten, Peritoneum, Milz, Knochenmark und Blut detektierbar. Bei naiven und APC-immunisierten Mäusen war 3 h nach der Restimulation die höchste Monozytenzahl der GR1⁻ Subpopulation in den Lymphknoten erreicht. GR1⁺ Monozyten und neutrophile Granulozyten wanderten nur bei APC-immunisierten Mäusen bis zu 24 h in die Lymphknoten ein. Bei den Zellen des Peritoneums stellte sich die Identifizierung der neutrophilen Granulozyten durch die große Zahl der Makrophagen als schwierig heraus. Die Anzahl GR1⁻ Monozyten verringerte sich jedoch 3 h nach der Restimulation im Vergleich zum Ausgangswert (0 h). Auch in der Milz konnte eher eine Verringerung der Zahl neutrophiler Granulozyten und Monozyten bei immunisierten Mäusen detektiert werden. Während des

Versuchszeitraums traten im Knochenmark APC-immunisierter Mäuse weniger neutrophile Granulozyten im Vergleich zu naiven Mäusen auf. Im Blut konnten vor allem GR1⁺ Monozyten detektiert werden. Auch die Anzahl Antigen-positiver neutrophiler Granulozyten und Monozyten waren im Blut APC-immunisierter Mäuse im Vergleich zu naiven Tieren eher verringert.

Nach Restimulation zeigte sich für neutrophile Granulozyten und Monozyten ähnlich wie für basophile Granulozyten eine Abnahme der Zellzahl im peripheren Blut und zusätzlich in der Milz. Monozyten sind klassische antigenpräsentierende Zellen. Monozyten können im Lymphknoten Antigene an B- und T-Zellen präsentieren und die Zellen aktivieren. Wie man in Abbildung 34 erkennen kann, war die Fähigkeit von Monozyten zur Antigenbindung im Vergleich zu basophilen Granulozyten jedoch gering. Im Peritoneum war die Antigenbindung auf Monozyten stärker als auf basophilen Granulozyten, was auf die *intraperitoneale* Injektion des Antigens zurückzuführen ist.

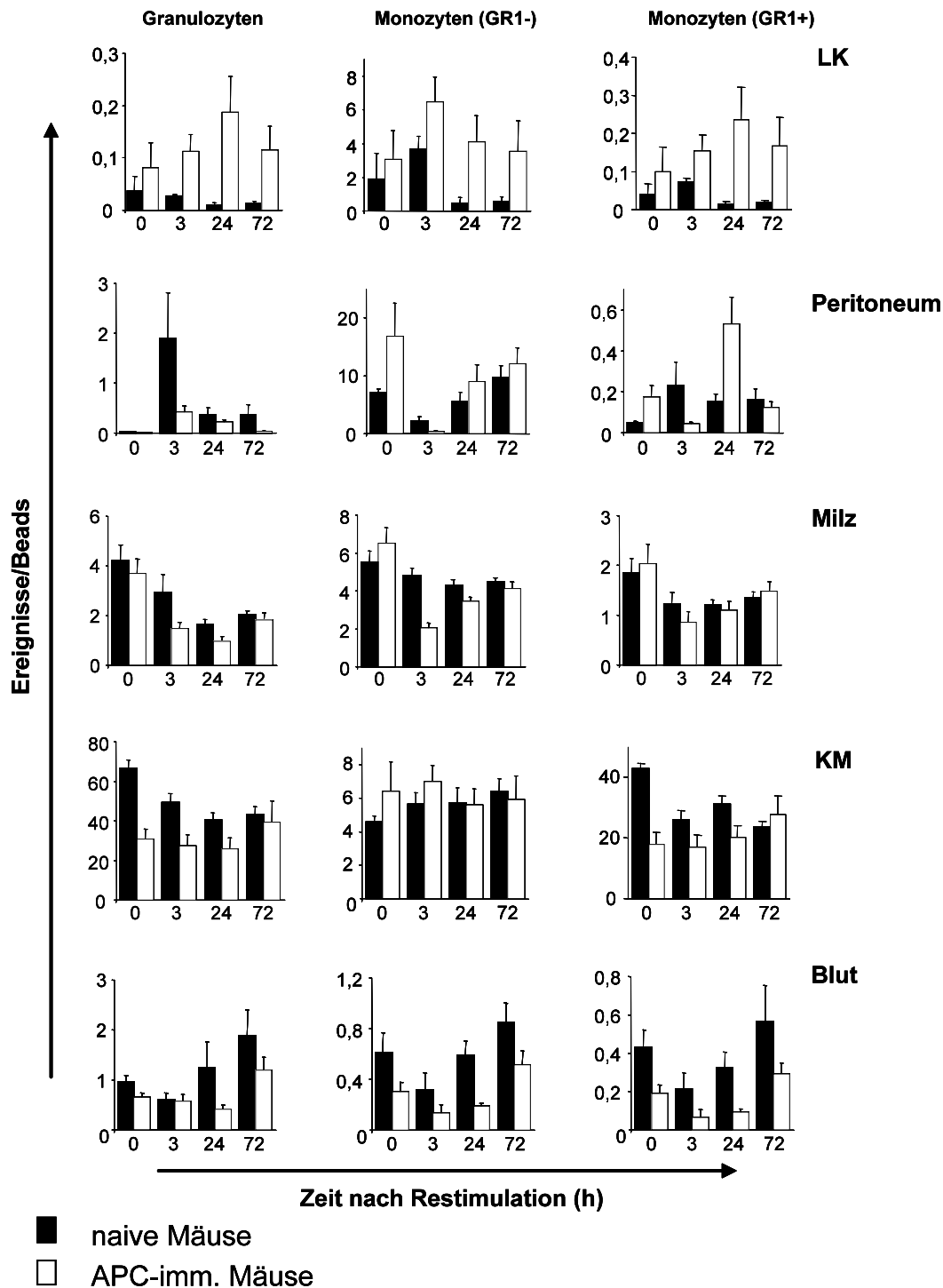


Abbildung 35: Verteilung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach *in vivo* Restimulation

Die Zahl aller neutrophilen Granulozyten (Granulozyten) und Monozyten wurden nach einer Restimulation mit 10 µg bei APC-immunisierten (weiße Balken) und naiven Mäusen (schwarze Balken) in Lymphknoten (LK), Peritoneum, Milz, Knochenmark (KM) und peripherem Blut ermittelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Organe entnommen und mittels FACS und *Counting Beads* vermessen (Ereignisse/Beads). Neutrophile Granulozyten wurden über den Oberflächenmarker GR1 identifiziert. Die Zahl der CD11b⁺ Monozyten wurde in die Subpopulationen GR1⁺ (Monozyten GR1⁺) und GR1⁻ (Monozyten GR1⁻) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von fünf Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt.

Diese Daten, insbesondere die Migration von basophilen Granulozyten in die Lymphknoten, legen nahe, dass auch basophile Granulozyten eine wichtige Funktion in der Präsentation von Antigenen an B- und/oder T-Zellen besitzen und für das Zustandekommen einer adaptiven Immunantwort wichtig sind.

3.6.4 Die Rekrutierung antigenspezifischer basophiler Granulozyten ist von der Anwesenheit antigenspezifischer Immunglobuline abhängig

Die Aktivierung basophiler Granulozyten mit Proteinen wie APC ist von Fc-Rezeptoren und daran gebundenen antigenspezifischen Immunglobulinen abhängig. Um der Frage nachzugehen, ob eine Aktivierung von basophilen Granulozyten auch unabhängig von einer sekundären Immunantwort zur Migration von basophilen Granulozyten führt, wurde naiven C57BL/6 Mäusen 1 h vor der APC-Stimulation Serum von APC-immunisierten Mäusen oder PBS (450 µl) *i.p.* verabreicht. Anschließend wurde die Verteilung der APC-spezifischen basophilen Granulozyten in mesenterialen Lymphknoten (LN), Peritonealgewebe (Peritoneum), Leber, Milz, Knochenmark (KM) und peripherem Blut über einen Zeitraum von 24 h ermittelt. Schon 90 min nach der Stimulation mit 10 µg APC war eine deutliche Zunahme basophiler Granulozyten in den Lymphknoten und eine Abnahme im peripheren Blut messbar. Zusätzlich konnten basophile Granulozyten nur in APC-Serum behandelten Tieren, jedoch nicht in Kontrolltieren, APC auf ihrer Oberfläche binden. Die Veränderung der Zahl der B-Zellen war für beide Gruppen nicht signifikant (Abbildung 36).

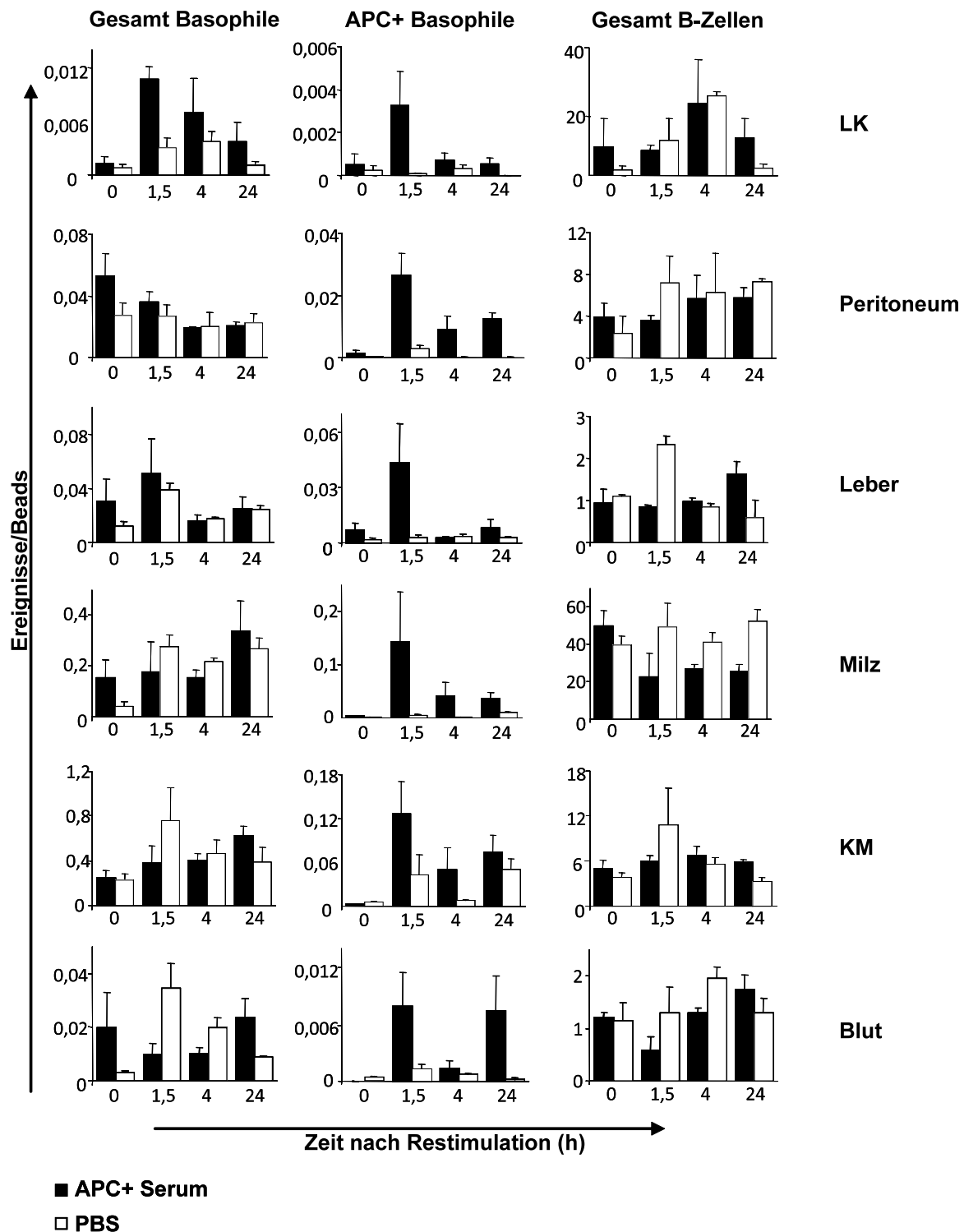


Abbildung 36: Antigen-spezifische Antikörper sind für die Rekrutierung von basophilen Granulozyten notwendig

Naive Mäuse wurden *in vivo* mit antigen-spezifischem Serum (APC+ Serum) oder PBS 1 h vor der Stimulation mit 10 µg APC präinkubiert. Vor der Restimulation (0 h) und 1,5 h, 4 h und 24 h nach der Stimulation wurden die Zahl basophiler Granulozyten (CD49b⁺ IgE⁺), APC⁺ basophiler Granulozyten (CD49b⁺ IgE⁺ APC⁺) und die Zahl der B-Zellen (CD19⁺) in mesenterialen Lymphknoten (LK), Peritonealgewebe (Peritoneum), Leber, Milz, Knochenmark (KM) und Blut mittels *Counting Beads* und FACS gemessen. Angegeben sind Mittelwerte und mittleren Standardfehler (SEM) von drei Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt.

Diese Daten zeigen, dass die Rekrutierung antigenspezifischer basophiler Granulozyten im Wesentlichen von der Anwesenheit antigenspezifischer Immunglobuline bei einer Antigen-Stimulation abhängt.

3.6.5 Zytokinprofil CD4⁺ T-Zellen nach einer Restimulation

Basophile Granulozyten wurden *in vivo* durch die Gabe des MAR-1 Antikörpers depletiert, um die Beteiligung basophiler Granulozyten an der Aktivierung weiterer Zellen der Gedächtnisimmunantwort zu untersuchen. Andere Tiere erhielten als Kontrolle den Isotyp und wurden dabei nicht depletiert (Kontrolle). Wie schon in Abschnitt 3.4.1 beschrieben resultierte die zweimal tägliche Injektion von 5 µg Antikörper für drei Tage in einer systemischen und lang anhaltenden Depletion von basophilen Granulozyten in der Maus.

Eine weitere Zielsetzung der Arbeit bestand in der Untersuchung, ob basophile Granulozyten APC-spezifische CD4⁺ T-Zellen zur Interleukinproduktion anregen können. 24 h nach der Restimulation wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Milz APC-immunisierter Mäuse mit (Kontrolle) und ohne (MAR-1) basophile Granulozyten isoliert und die Expression der Interleukine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 mittel quantitativer *Real-time* PCR analysiert. CD4⁺ T-Zellen exprimierten nach Restimulation in Abwesenheit basophiler Granulozyten weniger TNF α , IL-4, IL-10, IL-13 und IFN γ (Abbildung 37). Dabei verringerte sich der mRNA Gehalt von TNF α um 35%, von IL-4 um 39%, von IL-10 um 39%, von IL-13 um 28% und von IFN γ um 33% bezogen auf die Kontrollgruppe in Anwesenheit basophiler Granulozyten.

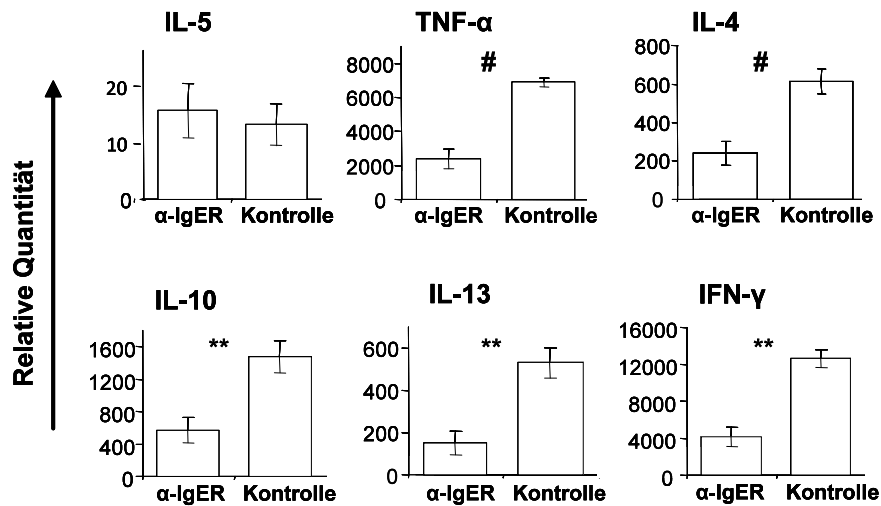


Abbildung 37: Zytokinprofil CD4⁺ T-Zellen nach einer Restimulation

Relative Quantität der Zytokin mRNA von CD4⁺ T-Zellen 24 h nach *in vivo* Restimulation in Ab- oder Anwesenheit basophiler Granulozyten. APC-immunisierte Mäuse wurden mit dem Antikörper zur Depletion basophiler Granulozyten (MAR-1) oder der Isotyp Kontrolle (Kontrolle) behandelt und mit 10 µg APC restimuliert. 24 h nach der Restimulation wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Milz gewonnen und die RNA isoliert. Die relative Quantität der Zytokine wurde mittels TaqMan-Sonden in dreifachen Werten ermittelt und über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode im Vergleich zum Referenzgen GAP-DH ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von zehn Mäusen pro Gruppe, Signifikanzen werden mit ** (p < 0,01) oder # (p < 0,001) angegeben.

Diese Daten zeigen, dass basophile Granulozyten einen wichtigen Beitrag zur T-Zell-Aktivierung leisten. Inzwischen ist bekannt, dass basophile Granulozyten auch MHC-II exprimieren und Antigene direkt an T-Zellen präsentieren können³⁷.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass basophile Granulozyten in immunisierten Mäusen die entsprechenden Antigene *in vitro* und *in vivo* binden konnten, dadurch aktiviert wurden und Interleukine, wie IL-4 und IL-6, freisetzen. Dieser Prozess war in FcR γ -defizienten Mäusen nicht detektierbar und somit von antigenspezifischen Antikörpern und Fc-Rezeptoren abhängig. Basophile Granulozyten waren während einer Gedächtnisimmunantwort die Hauptquelle für IL-4 und IL-6 in Milz und Knochenmark. Zudem besaßen basophile Granulozyten die Fähigkeit, die Proliferation von B-Zellen anzuregen und den T-Zell-Phänotyp zu verändern. Mit Hilfe der Depletion basophiler Granulozyten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass basophile Granulozyten einen wichtigen Beitrag für das Zustandekommen einer Gedächtnisimmunantwort und für die Bildung antigenspezifischer IgG2a- und IgG1-Antikörper leisten. Die Methode des adoptiven Transfers basophiler Granulozyten erzielte die gleichen Ergebnisse.

Außerdem wurde während einer Gedächtnisimmunantwort gezeigt, dass basophile Granulozyten aus dem Blut in die Lymphknoten wandern und dort zur T-Zell-Aktivierung beitragen. Für diese Migration ist die Antigen-abhängige Aktivierung von basophilen Granulozyten erforderlich. Diese Daten zeigen erstmalig, dass basophilen Granulozyten eine wesentliche Rolle bei der Induktion und Regulation einer Immunantwort zukommt.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung basophiler Granulozyten bei einer sekundären humoralen Immunantwort und die Migration von basophilen Granulozyten nach einer Restimulation untersucht. Basophile Granulozyten konnten *in vitro* und *in vivo* Antigene binden und mit der Produktion von Interleukinen reagieren. Zu Beginn der Arbeit war nicht bekannt, dass sie einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung einer humoralen Gedächtnisimmunantwort leisten und damit den Verlauf einer Infektion mit einem pathogenen Erreger wesentlich beeinflussen.

4.1 Aktivierung basophiler Granulozyten kann über die Bindung eines Antigens erfolgen

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass basophile Granulozyten *in vitro* und *in vivo* freies Antigen auf ihrer Oberfläche binden können. Dieser Prozess ist abhängig von der Funktionalität der Fc-Rezeptoren und der Anwesenheit antigenspezifischer Immunglobuline. Modellantigene (z.B. APC oder PE) konnten auf der Zelloberfläche basophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Durch die Antigenbindung und die daraus resultierende Quervernetzung der Fc-Rezeptoren wurden basophile Granulozyten zur Ausschüttung der Zytokine IL-4 und IL-6 angeregt. Dies konnte erstmals in Milz- und Knochenmarkzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mithilfe unterschiedlicher Depletionsverfahren für basophile Granulozyten gezeigt werden. Aus diesen Ergebnissen konnte man schließen, dass basophile Granulozyten in der Milz und dem Knochenmark die Hauptquelle für IL-4 und IL-6 sind. Die Produktion von IL-4 und IL-6 verstärkte die Aktivierung und Proliferation von B-Zellen und induzierte ihre Differenzierung zu Plasmazellen. Aktivierte basophile Granulozyten veränderten der Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen in Richtung T_H2 und verstärkten die Fähigkeit von CD4⁺ T-Zellen zur B-Zell-Hilfe.

Zusätzlich wurde die Fc-unabhängige Aktivierung basophiler Granulozyten während einer Gedächtnisimmunantwort auf das Antigen APC untersucht. In FcRγ-defizienten Mäusen fehlt die Expression der IgG-Rezeptoren FcγRI und FcγRIII und des IgE-

Rezeptors FcεRI. Der hochaffine IgG-Rezeptor FcγRI wird hingegen nicht auf murinen basophilen Granulozyten exprimiert²⁹. Während einer Gedächtnisimmunantwort wurde in immunisierten FcRγ-defizienten Mäusen nach einer *in vitro* oder *in vivo* Restimulation mit APC keine IL-4- und IL-6-Ausschüttung von basophilen Granulozyten detektiert. Die fehlende Zytokin-Ausschüttung deutete darauf hin, dass während einer sekundären Immunreaktion die Funktionalität der γ-Kette enthaltenden Fc-Rezeptoren und die Bindung der entsprechenden antigenspezifischen Antikörper benötigt werden. Für die Aktivierung basophiler Granulozyten und deren vollständige Reaktion auf ein Antigen war eine FcεRI-abhängige Signaltransduktion nicht unbedingt notwendig. An APC-immunisierten FcεRI-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass basophile Granulozyten bei fehlendem IgE-Rezeptor in fast gleichem Umfang über APC aktiviert werden konnten. Diese Ergebnisse korrelieren mit den bei Mastzellen beschriebenen Daten^{82,90-92}. Bei immunisierten FcεRI-defizienten Mäusen war allerdings keine Bindung des Proteins APC auf basophilen Granulozyten detektierbar. Die fehlende Antigenbindung beruhte auf der geringen Affinität des FcγRIII-Rezeptors für IgG. Somit war die Antikörper-Antigen-Bindung für einen Nachweis mittels FACS-Analyse zu schwach.

4.2 Basophile Granulozyten beeinflussen B- und T-Zellen

Für eine effektive B-Zell-Hilfe wurden von aktivierten basophilen Granulozyten sowohl lösliche Faktoren wie IL-4 und IL-6 als auch Zellkontakt-abhängige Faktoren benötigt. Die B-Zell-Hilfe führte zu einer erhöhten Proliferation der B-Zellen, zur Antikörperproduktion und zur Differenzierung in Plasmazellen. Nach Restimulation von Mäusen in Abwesenheit aktivierter basophiler Granulozyten verringerte sich die Zahl antigenspezifischer Plasma- und B-Zellen. Hierfür war die Anwesenheit aktivierter CD4⁺ T-Zellen notwendig. Zusammen mit den CD4⁺ T-Zellen konnten basophile Granulozyten die Proliferation und Antikörperproduktion bei einem sekundären Antigenkontakt verstärken. Zudem wurde in CD4⁺ T-Zellen ein T_H2-Phänotyp induziert, der eine bessere Hilfe für B-Zellen ermöglicht. Obwohl die Effekte von IL-4, IL-6 und CD40-Ligand für die B- und T-Zellfunktion weitgehend

beschrieben sind⁹³⁻⁹⁶, wurde bislang der erhebliche Einfluss basophiler Granulozyten auf eine humorale Gedächtnisimmunantwort *in vivo* nicht erkannt.

Die Zahl der basophilen Granulozyten, die *in vitro* für eine Induktion zur B-Zell-Proliferation nötig waren (0,1% der Gesamtzahl der eingesetzten Zellen), korreliert gut mit der Anzahl basophiler Granulozyten *in vivo* (0,1% bis 0,5% der Leukozyten in der Milz). Die Stimuli zur Aktivierung basophiler Granulozyten wurden außerdem *in vitro* und *in vivo* physiologischen Konzentrationen angepasst. Eine Aktivierung aufgrund von IL-3 oder einer Antikörper-Bindung an oberflächengebundenem IgE oder IgER lösten im gleichen Ausmaß wie die Bindung des Antigens eine Zytokin-Ausschüttung aus.

In einer Gedächtnisimmunantwort waren für die vollständige B-Zell-Funktion mehrere Faktoren notwendig. Zum Einen wurden die von basophilen Granulozyten sezernierten Interleukine IL-4 und IL-6 benötigt. Außerdem war die Hilfe von aktivierten CD4⁺ T-Zellen für die Proliferation der B-Zellen zwingend erforderlich. Die CD4⁺ T-Zellen konnten nur in Anwesenheit von aktivierten basophilen Granulozyten eine optimale B-Zell-Hilfe leisten und erhielten einen T_H2-Phänotyp. Zellkontakt-abhängige Faktoren unterstützten diesen Prozess.

4.3 Basophile Granulozyten beeinflussen eine sekundäre humorale Immunantwort

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten zum ersten Mal, dass basophile Granulozyten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Gedächtnisimmunantwort spielen.

4.3.1 Basophile Granulozyten benötigen antigenspezifische Antikörper

In An- oder Abwesenheit basophiler Granulozyten konnten bei einer primären Reaktion keine Unterschiede in der IgG1- und IgG2a-Produktion detektiert werden. Während einer Primärimmunantwort fehlten antigenspezifische Immunglobuline. Deswegen konnten basophile Granulozyten beim ersten Antigen-Kontakt nicht über die Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren, vor allem nicht über den FcεRI-

abhängigen Signalweg, aktiviert werden. Es gibt jedoch einige andere Stimulatoren (z.B. IL-3), die eine Aktivierung basophiler Granulozyten auch bei einer Primärantwort ermöglichen³⁰. In naiven Mäusen war jedoch keine IL-4- und IL-6-Produktion durch basophile Granulozyten in Milz- oder Knochenmarkzellen nachweisbar. Die primäre Immunisierung mit APC oder die *in vitro* Stimulation mit dem Antigen konnten in naiven Mäusen ebenfalls keine Interleukin-Ausschüttung aktivieren (Daten nicht gezeigt). Außerdem hat eine Depletion von basophilen Granulozyten bei einer Primärantwort im Gegensatz zu einer Gedächtnisimmunantwort keine Modifizierung der humoralen Immunantwort zur Folge. Für eine Reaktion basophiler Granulozyten im Zusammenhang mit einer Gedächtnisimmunantwort hatte das Vorhandensein antigenspezifischer Antikörper eine große Bedeutung.

4.3.2 Depletion basophiler Granulozyten

Die Depletion basophiler Granulozyten ist eine wichtige und nützliche Methode zur Untersuchung dieser Zellpopulation während einer sekundären Immunantwort. Dabei unterscheidet sich unser Protokoll von dem zeitgleich publizierten Protokoll einer anderen Arbeitsgruppe². Für eine lang anhaltende und komplette Depletion basophiler Granulozyten wurden, im Gegensatz zu 200 µg bei dem alternativen Protokoll, innerhalb von drei Tagen (mit zwei Dosen pro Tag) 30 µg anti-IgER (MAR-1) pro C57BL/6-Maus injiziert. Ein weiterer Unterschied war die *intraperitoneale* Injektion anstatt einer *intravenösen* Gabe des Antikörpers.

Die Behandlung der Mäuse mit dem MAR-1 Antikörper erzielte nicht nur eine lang anhaltende und vollständige Depletion basophiler Granulozyten, sondern auch eine Verringerung der Mastzellen-Zahl in einer Peritoneallavage. *In vitro* Daten zeigten, dass eine Stimulation mit dem MAR-1 Antikörper eine IL-4- und IL-6-Ausschüttung induziert. Zwei Tage nach der letzten Antikörpergabe ergab jedoch die *in vivo* Messung in Milz und Knochenmark keine erhöhte Zytokin-Sekretion. *In vitro* fand über die Stimulation mit anti-IgE oder anti-IgER eine Quervernetzung der IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche basophiler Granulozyten statt und führte zu einer Zytokin-Abgabe. Die *in vivo* Daten deuteten aber darauf hin, dass basophile Granulozyten durch den Antikörper MAR-1 nur initial aktiviert werden. Aufgrund der raschen Depletion konnte keine weitere Aktivierung basophiler Granulozyten

erfolgen. Anfänglich sezernierte Zytokine waren nach kurzer Zeit abgebaut. Die Depletion basophiler Granulozyten ist demnach eine vorher nicht bekannte, hilfreiche Methode für die Untersuchung basophiler Granulozyten während einer Gedächtnisimmunreaktion.

4.3.3 In Abwesenheit basophiler Granulozyten findet eine verringerte Gedächtnisimmunantwort statt

Die Depletion basophiler Granulozyten ermöglichte die Untersuchung der Gedächtnisimmunantwort immunisierter Mäuse ohne die Anwesenheit basophiler Granulozyten. Erstmals konnte eine verringerte IgG1- und IgG2a-Produktion nach Restimulation mit einer geringen Menge Antigen in Abwesenheit basophiler Granulozyten nachgewiesen werden. Diese T_H2-charakteristische Reaktion war nicht vom Antigen oder dem Adjuvans abhängig, da mit den Proteinen PE und PspA und ohne die Verwendung eines Adjuvans die gleichen Ergebnisse erzielt wurden. Auch andere Nachweismethoden für antigenspezifische Antikörper bestätigten das Ergebnis.

Die Relevanz basophiler Granulozyten bei einer sekundären Immunantwort konnte auch an einem Krankheitsmodell mit *Streptococcus pneumoniae* gezeigt werden. Die Immunisierung der Mäuse mit dem Protein PspA führte nach einer Infektion zu einer geringeren Sepsis und erhöhten Überlebensrate der Tiere, wobei dieser Schutz in Abwesenheit basophiler Granulozyten reduziert war. Die Mäuse zeigten im Vergleich zur Kontrolle einen schlechteren Krankheitsverlauf. Bei naiven Mäusen war nach der Infektion kein Unterschied in Abhängigkeit einer Depletion basophiler Granulozyten detektierbar. Diese Ergebnisse zeigen eine deutliche Rolle basophiler Granulozyten in einem Modell mit pathogen relevanten Erregern. Basophile Granulozyten konnten dabei durch die Zytokin-Ausschüttung T- und B-Zellen zu einer schnellen Immunreaktion mit folgender Antikörperproduktion anregen. Spezifische Antikörper schützten die Mäuse vor dem Erreger. Basophile Granulozyten übernehmen demnach eine wichtige Rolle bei einer Gedächtnisimmunantwort im Infektionsmodell.

4.3.4 Adoptiver Transfer von basophilen Granulozyten verstärkt die Immunantwort

Das immunologische Gedächtnis konnte mittels adoptiven Transfers von Leukozyten aus immunisierten auf naive Tiere experimentell untersucht werden. Die Spendermäuse wurden dazu mit einem Antigen (z.B. APC) immunisiert. Einen Monat nach der Immunisierung war die maximale Anzahl der B-Gedächtniszellen erreicht, was ein geeigneter Zeitpunkt zur Übertragung der Zellen war. Die naiven Empfängertiere besaßen weder antigenspezifische Antikörper, noch antigenspezifische B- und T-Zellen. Die CD138⁺ Plasmazellen wurden aus der Zellsuspension vor dem Transfer entfernt, so dass die basale Antikörperproduktion durch Plasmazellen in den Empfängermäusen gering war. Der erfolgreiche adoptive Transfer von Leukozyten, insbesondere basophilen Granulozyten wurde über die Anfärbung der transferierten Zellen mit CFSE gezeigt. Basophile Granulozyten tragen auf ihrer Zelloberfläche über Fc-Rezeptoren gebundene antigenspezifische Antikörper der Klassen IgG und IgE, die ihnen eine schnelle Reaktion bei erneutem Antigenkontakt ermöglichen. Freie antigen-spezifische Antikörper waren im Empfänger nicht vorhanden und konnten nicht innerhalb der ersten Tage das Antigen abfangen. Bei der Entfernung basophiler Granulozyten aus dem Zellsortiment zeigte sich nach Transfer und Antigen-Stimulation der Empfängertiere eine verringerte Produktion antigenspezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper und somit eine verringerte Immunantwort. Nach Restimulation mit dem Antigen konnte eine stärkere Antikörperbildung erfolgen, wenn basophile Granulozyten in dem transferierten Zellsortiment enthalten waren. Im Verlauf der Arbeit wurde zum ersten Mal mittels adoptiven Transfers gezeigt, dass Eigenschaften basophiler Granulozyten auf einen nicht-immunisierten Empfänger übertragbar sind.

4.4 Fehlende Beteiligung von Mastzellen an einer sekundären Immunantwort

Die Ergebnisse mehrerer Experimente deuten darauf hin, dass Mastzellen an einer humoralen sekundären Immunantwort nicht beteiligt sind. Auch in Mastzelldefizienten Mäusen verringerte sich die Zahl antigenspezifischer IgG2a- und IgG1-Immunglobuline nach Depletion basophiler Granulozyten und einer Restimulation.

Außerdem sind in Milz, Knochenmark und Lymphknoten keine Mastzellen enthalten. Bei dem adoptiven Transfer von Milz- und Knochenmarkzellen können demnach die Effekte einer Depletion basophiler Granulozyten nicht auf eine mögliche gleichzeitige Depletion von Mastzellen zurückgeführt werden. Zudem waren Mastzellen aus dem Knochenmark, die über ein bis drei Wochen mit IL-3 und Stammzellofaktor kultiviert wurden, nicht zu einer B-Zell-Hilfe in der Lage (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu basophilen Granulozyten, die frisch isoliert oder aus dem Knochenmark kultiviert wurden, induzierten diese Mastzellen keine Proliferation von B-Zellen.

4.5 Rekrutierung von basophilen Granulozyten nach einer Restimulation

Basophile Granulozyten veränderten ihren Aufenthaltsort bei einer sekundären Immunreaktion und zeigten insbesondere eine Einwanderung in die Lymphknoten, die unter basalen Bedingungen keine basophilen Granulozyten enthielten. Zusätzlich konnten basophile Granulozyten mehr als alle anderen Zellen das entsprechende Antigen auf der Zelloberfläche binden.

Die Wanderung antigenbindender basophiler Granulozyten in die Lymphknoten ermöglichte eine Interaktion mit den dort vorkommenden B- und T-Zellen. In Abwesenheit basophiler Granulozyten war die *in vivo* Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 durch T-Zellen verringert. Die Population basophiler Granulozyten ist im Blut kleiner als 1% der Leukozytenpopulation⁹⁷. Eine transiente Rekrutierung basophiler Granulozyten in die ableitenden Lymphknoten wurden sowohl zwei Tage nach einer Helminthen Infektion⁶¹ als auch bei einer allergischen Reaktion² beschrieben. Unter basalen Konditionen waren jedoch basophile Granulozyten nicht im Gewebe anzutreffen. Innerhalb weniger Stunden nach Restimulation kam es im Blut zu einem starken Abfall der Zahl basophiler Granulozyten. Erst nach 72 h wird das Ausgangsniveau wieder erreicht. In den Lymphknoten und im Peritonealgewebe erhöhte sich jedoch nach Antigen-Gabe die Zahl basophiler Granulozyten um ein Vielfaches. Diese Ergebnisse legen nahe, dass basophile Granulozyten aus dem Blut in die Lymphknoten und den Entzündungsort (Peritonealraum) wandern. Die Migration fand nur in Anwesenheit antigenspezifischer Antikörper statt, was mit Hilfe

naiver Kontrollmäuse oder durch die Substituierung antigenspezifischer Antikörper durch die Behandlung naiver Mäuse mit antigenspezifischem Serum gezeigt werden konnte. Die An- oder Abwesenheit von basophilen Granulozyten hatte jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen oder dendritischer Zellen in Milz und Lymphknoten (Daten nicht gezeigt). Auch die Gesamtzahl der B-Zellen in Milz und Lymphknoten wurde durch basophile Granulozyten nicht beeinflusst. Bemerkenswert ist außerdem, dass für die Rekrutierung von basophilen Granulozyten in Lymphknoten keine Gedächtnis-B- oder T-Zellen erforderlich waren, da auch bei passivem Transfer von antigenspezifischen Antikörpern nach Restimulation eine Wanderung der basophilen Granulozyten in die Lymphknoten stattgefunden hat.

Im Gegensatz zu einer Primärantwort fand im Verlauf einer sekundären Immunantwort eine Rekrutierung und Migration basophiler Granulozyten aus dem Blut in die Lymphknoten statt. Im Knochenmark und der Milz hingegen war die Anzahl der basophilen Granulozyten während einer Gedächtnisimmunantwort und auch einer Primärantwort konstant. Trotz einer Rekrutierung in die Lymphknoten verringerte sich die Zahl basophiler Granulozyten nicht in Knochenmark und Milz. Das Knochenmark und die Milz gelten als die Bildungs-Orte basophiler Granulozyten aus Vorläuferzellen⁸. Eine verstärkte Neubildung basophiler Granulozyten während einer sekundären Immunantwort ist nicht auszuschließen, so dass ein Abfall der basophilen Granulozyten in Milz und Knochenmark verhindert werden konnte.

Weitere Daten zeigten, dass basophile Granulozyten in den Lymphknoten, der Milz, dem Knochenmark und dem Blut unmittelbar nach Antigeninjektion und bis zu 72 h danach große Mengen Antigen auf der Oberfläche gebunden hatten. Andere Leukozyten, insbesondere Monozyten, konnten deutlich weniger Antigen auf ihrer Zelloberfläche binden. Monozyten hatten hingegen im Peritonealgewebe eine größere Bindungskapazität für das Antigen, als basophile Granulozyten. Dies ist am ehesten auf die *intrapitoneale* Injektion des Antigens zurückzuführen.

4.6 Rolle basophiler Granulozyten während einer sekundären Immunantwort - eine Modellvorstellung

Die Ergebnisse der Arbeit führten zu der Modellvorstellung (Abbildung 38), dass basophile Granulozyten einen wichtigen Beitrag für das Zustandekommen einer Immunantwort leisten:

Antigenspezifische Immunglobuline, die nach der Primärimmunisierung gebildet werden, binden bei einer Gedächtnisimmunreaktion über den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) oder den niedrigaffinen IgG-Rezeptor (FcγRIII) an der Zelloberfläche basophiler Granulozyten. Bei einem erneuten Antigen-Kontakt können basophile Granulozyten effektiv das freie Antigen binden, werden aktiviert und sezernieren IL-4 und IL-6.

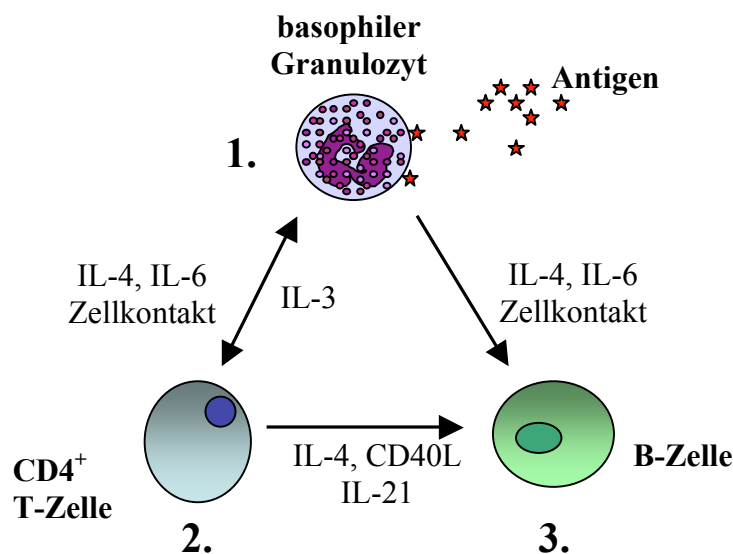


Abbildung 38: Modell basophiler Granulozyten bei einer sekundären humoralen Immunantwort

1. Bindung des Antigens auf der Zelloberfläche; 2. T_H2-Phänotyp und Verstärkung einer B-Zell-Hilfe; 3. Proliferation, Differenzierung zu Plasmazellen, IgG-Produktion.

CD4⁺ T-Zellen werden durch das von basophilen Granulozyten freigesetzte IL-4 und IL-6 zur Differenzierung in einen T_H2-Phänotyp angeregt. Zellkontakte verstärken diesen Mechanismus. Kürzlich konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass basophile Granulozyten auch MHC-II exprimieren und Antigenpeptide direkt an CD4⁺ T-Zellen präsentieren können³⁷. Die T_H2-Zellen bilden wiederum Faktoren, die sowohl basophile Granulozyten aktivieren (IL-3) als auch B-Zellen zur Proliferation

anregen (IL-4, CD40L, IL-21). B-Zellen werden ebenfalls von aktivierten basophilen Granulozyten über die B-Zell-stimulierenden Zytokine IL-4 und IL-6 und Zellkontakt-abhängigen Faktoren zur Proliferation und Differenzierung in Plasmazellen angeregt. Die daraufhin folgende antigenspezifische Antikörperproduktion ermöglicht bei einer Gedächtnisimmunantwort eine schnelle und gezielte Reaktion auf ein Antigen.

5 Zusammenfassung

Das immunologische Gedächtnis ermöglicht dem Immunsystem bei einem zweiten Antigenkontakt schneller und stärker als beim Primärkontakt zu reagieren. Die Gedächtnisfunktion ist die Grundlage für erfolgreiche Impfungen und dem Schutz vor Reinfektion mit bereits bekannten Erregern. Auf der anderen Seite kann sich das immunologische Gedächtnis negativ auf die Entstehung von Autoimmunkrankheiten und Transplantat-Abstoßung auswirken. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass basophile Granulozyten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer humoralen Gedächtnisimmunantwort spielen. Für die funktionelle Untersuchung basophiler Granulozyten während einer Gedächtnisimmunantwort wurden Protokolle entwickelt, um diese Zellpopulation in einer nicht-aktivierten Form zu isolieren, *in vivo* zu depletieren und adoptiven zu transferieren.

Basophile Granulozyten besitzen die Eigenschaft sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein auch in geringer Konzentration vorliegendes Antigen auf der Oberfläche zu binden. Diese Bindung erfolgt über antigenspezifische IgE-Antikörper und den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI und hat die Produktion der T_H2-unterstützenden Zytokine IL-4 und IL-6 zur Folge. In Wildtyp-Mäusen sind basophile Granulozyten die Hauptquelle dieser Interleukine in Milz und Knochenmark innerhalb der ersten Tage einer Gedächtnisimmunantwort. Basophile Granulozyten induzieren dabei die Proliferation, Antikörperproduktion und Plasmazell-Differenzierung von B-Zellen. CD4⁺ T-Zellen werden ebenfalls von basophilen Granulozyten beeinflusst und können durch Veränderung ihres Zytokinprofils und Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle eine wesentlich effektivere B-Zell Hilfe leisten. In Abwesenheit basophiler Granulozyten führt dies zu einer verringerten Produktion von antigenspezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörpern, einem niedrigeren Impftiter nach Immunisierung mit Streptokokkenantigen und einer verstärkten Empfindlichkeit der Mäuse auf eine nachfolgende Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*. Zudem erhöht die Übertragung antigenspezifischer basophiler Granulozyten die spezifische Antikörperproduktion in naiven Mäusen nach einer Stimulation mit dem Antigen. Die Restimulation immunisierter Mäuse beeinflusst die Verteilung von basophilen Granulozyten und induziert deren Migration in die Lymphknoten und an den Ort der Immunisierung. Im Blut ist die Zahl basophiler Granulozyten innerhalb der ersten

Stunden stark verringert, wobei dieser Prozess von der Anwesenheit antigenspezifischer Antikörper abhängig ist.

Basophile Granulozyten wurde somit zum ersten Mal als wichtiger Baustein des Immunsystems und wichtiger Regulator der adaptiven Immunität identifiziert.

6 Ausblick

Die Daten der Dissertation führen zu weiteren Fragestellungen, die in zukünftigen Projekten bearbeitet werden sollen. Die Mechanismen der Migration basophiler Granulozyten und ihr Einfluss auf die Funktion der T- und B-Zellen sollen hierfür *in vivo* untersucht werden.

Zum Einen stellt sich die Frage, in welchen lymphatischen Geweben basophile Granulozyten mit T- und B-Zellen interagieren. Diese Versuche sind von großer Relevanz, da basophile Granulozyten in naiven oder immunisierten Mäusen zwar in Milz und Knochenmark, jedoch nicht in den Lymphknoten vorhanden sind. Als Schlussfolgerung würde sich ergeben, dass basophile Granulozyten nur dort mit T-Zellen interagieren können und den Phänotyp der T-Zellen modulieren.

Ein anderes Projekt soll die Frage beantworten, über welche Mechanismen basophile Granulozyten während einer Gedächtnisimmunantwort aus dem peripheren Blut in die Lymphknoten einwandern, und ob eine vorausgehende Aktivierung der basophilen Granulozyten erforderlich ist. Verschiedene chemoattraktive Faktoren sollen *in vivo* blockiert oder Gen-defiziente Mäuse eingesetzt werden.

Zudem ist die Untersuchung geplant, ob basophile Granulozyten auch unabhängig von T-Zellen die B-Zell-Antwort beeinflussen können. Das Projekt hat große Relevanz, da kürzlich *in vitro* mit humanen basophilen Granulozyten ein direkter, T-Zell-unabhängiger Einfluss von basophilen Granulozyten auf B-Zellen beschrieben wurde⁹⁸. Die Fragestellung soll *in vivo* durch Analyse der humoralen Immunantwort gegen T-Zell-unabhängige Antigene (z.B. Dextran) untersucht werden. Polyvalente Antigene könnten durch starke Quervernetzung von Immunglobulinen bzw. Fc-Rezeptoren eine besonders ausgeprägte Aktivierung von basophilen Granulozyten induzieren und deshalb in ihrer Immunogenität besonders stark von basophilen Granulozyten abhängig sein.

7 Literaturverzeichnis

1. Denzel, A. *et al.* Basophils enhance immunological memory responses. *Nat. Immunol.* 9, 733-742 (2008).
2. Sokol, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G. & Medzhitov, R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol.* 9, 310-318 (2008).
3. Dvorak, A. M. The mouse basophil, a rare and rarely recognized granulocyte. *Blood* 96, 1616-1617 (2000).
4. Ehrlich, P. *Arch. Anat. Physiol. Leipz.*, pp. 166-169 Leipzig, 1879).
5. Gurish, M. F. The expanding universe of the basophil. *Blood* 113, 2616 (2009).
6. Arinobu, Y. *et al.* Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 18105-18110 (2005).
7. Sullivan, B. M. & Locksley, R. M. Basophils: a nonredundant contributor to host immunity. *Immunity.* 30, 12-20 (2009).
8. Arinobu, Y., Iwasaki, H. & Akashi, K. Origin of basophils and mast cells. *Allergol. Int.* 58, 21-28 (2009).
9. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306 (2005).
10. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197 (2000).
11. Denburg, J. A. *et al.* Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood* 66, 312-318 (1985).
12. Leary, A. G. & Ogawa, M. Identification of pure and mixed basophil colonies in culture of human peripheral blood and marrow cells. *Blood* 64, 78-83 (1984).
13. Gurish, M. F. & Boyce, J. A. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1285-1291 (2006).
14. Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D. & Zhang, D. E. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90, 489-519 (1997).
15. Iwasaki, H. *et al.* The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev.* 20, 3010-3021 (2006).

16. Min, B. *et al.* Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J. Exp. Med.* 200, 507-517 (2004).
17. Voehringer, D., Shinkai, K. & Locksley, R. M. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity.* 20, 267-277 (2004).
18. Gauchat, J. F. *et al.* Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365, 340-343 (1993).
19. Dvorak, A. M., Seder, R. A., Paul, W. E., Morgan, E. S. & Galli, S. J. Effects of interleukin-3 with or without the c-kit ligand, stem cell factor, on the survival and cytoplasmic granule formation of mouse basophils and mast cells in vitro. *Am. J. Pathol.* 144, 160-170 (1994).
20. Bruhl, H. *et al.* Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 1352-1361 (2009).
21. Ben-Sasson, S. Z., Le, G. G., Conrad, D. H., Finkelman, F. D. & Paul, W. E. Cross-linking Fc receptors stimulate splenic non-B, non-T cells to secrete interleukin 4 and other lymphokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 1421-1425 (1990).
22. Seder, R. A. *et al.* Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2835-2839 (1991).
23. Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445-454 (2008).
24. Lantz, C. S. *et al.* Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392, 90-93 (1998).
25. MacGlashan, D., Jr. IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 717-723 (2008).
26. Yoshimoto, T. *et al.* IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13962-13966 (1999).
27. Schmitz, J. *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 23, 479-490 (2005).
28. Voehringer, D. The role of basophils in helminth infection. *Trends Parasitol.* 25, 551-556 (2009).
29. Mack, M. *et al.* Identification of antigen-capturing cells as basophils. *J. Immunol.* 174, 735-741 (2005).
30. Mack, M. & Rosenkranz, A. R. Basophils and mast cells in renal injury. *Kidney Int.* 76, 1142-1147 (2009).

31. Valent, P. *et al.* Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. *Immunol. Rev.* 179, 74-81 (2001).
32. Buhning, H. J., Streble, A. & Valent, P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 133, 317-329 (2004).
33. Tsujimura, Y. *et al.* Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity.* 28, 581-589 (2008).
34. Khodoun, M. V., Orekhova, T., Potter, C., Morris, S. & Finkelman, F. D. Basophils initiate IL-4 production during a memory T-dependent response. *J. Exp. Med.* 200, 857-870 (2004).
35. Hida, S., Tadachi, M., Saito, T. & Taki, S. Negative control of basophil expansion by IRF-2 critical for the regulation of Th1/Th2 balance. *Blood* 106, 2011-2017 (2005).
36. Reese, T. A. *et al.* Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 447, 92-96 (2007).
37. Yoshimoto, T. *et al.* Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 10, 706-712 (2009).
38. Ohnmacht, C. & Voehringer, D. Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood* 113, 2816-2825 (2009).
39. Hirai, H. *et al.* Cutting edge: agonistic effect of indomethacin on a prostaglandin D2 receptor, CRTH2. *J. Immunol.* 168, 981-985 (2002).
40. Lim, L. H. *et al.* Stimulation of human endothelium with IL-3 induces selective basophil accumulation in vitro. *J. Immunol.* 176, 5346-5353 (2006).
41. Kubagawa, H. *et al.* Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. *J. Exp. Med.* 206, 2779-2793 (2009).
42. Gounni, A. S. *et al.* Human airway smooth muscle cells express the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI): a critical role of Fc epsilon RI in human airway smooth muscle cell function. *J. Immunol.* 175, 2613-2621 (2005).
43. Ganguly, S. *et al.* Neural adrenergic/cyclic AMP regulation of the immunoglobulin E receptor alpha-subunit expression in the mammalian pinealocyte: a neuroendocrine/immune response link? *J. Biol. Chem.* 282, 32758-32764 (2007).
44. Alphonse, M. P. *et al.* Regulation of the high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) in human neutrophils: role of seasonal allergen exposure and Th-2 cytokines. *PLoS. One.* 3, e1921 (2008).
45. Gober, L. M. *et al.* Expression of activation markers on basophils in a controlled model of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1181-1188 (2007).

46. Macglashan, D. W., Jr. Endocytosis, recycling, and degradation of unoccupied FcepsilonRI in human basophils. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1003-1010 (2007).
47. Kennedy, N. S. *et al.* IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 180, 2848-2854 (2008).
48. Wang, Q. H. *et al.* Suppressive effect of Elf-1 on FcepsilonRI alpha-chain expression in primary mast cells. *Immunogenetics* 60, 557-563 (2008).
49. Yamaguchi, M. *et al.* IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J. Exp. Med.* 185, 663-672 (1997).
50. Parravicini, V. *et al.* Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat. Immunol.* 3, 741-748 (2002).
51. Hong, H. *et al.* The Src family kinase Hck regulates mast cell activation by suppressing an inhibitory Src family kinase Lyn. *Blood* 110, 2511-2519 (2007).
52. Baba, Y. *et al.* Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat. Immunol.* 9, 81-88 (2008).
53. Mukai, K. *et al.* Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity.* 23, 191-202 (2005).
54. Saini Sarbjit S Basophil responsiveness in chronic urticaria. *Current allergy and asthma reports* 9, 286-290 (2009).
55. Gibbs, B. F. Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. *Clin. Exp. Med.* 5, 43-49 (2005).
56. Prussin, C. & Metcalfe, D. D. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, S450-S456 (2006).
57. Yazdanbakhsh, M. & Matricardi, P. M. Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 26, 15-24 (2004).
58. Hessel, E. M. *et al.* Immunostimulatory oligonucleotides block allergic airway inflammation by inhibiting Th2 cell activation and IgE-mediated cytokine induction. *J. Exp. Med.* 202, 1563-1573 (2005).
59. Falcone, F. H., Zillikens, D. & Gibbs, B. F. The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Exp. Dermatol.* 15, 855-864 (2006).
60. Finkelman, F. D. *et al.* Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 505-533 (1997).
61. Perrigoue, J. G. *et al.* MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat. Immunol.* 10, 697-705 (2009).

62. Ohnmacht, C. *et al.* Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206, 549-559 (2009).
63. Bruhl, H. *et al.* Targeting of Gr-1+,CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 2975-2985 (2007).
64. Heyzer-Williams, L. J., Malherbe, L. P. & Heyzer-Williams, M. G. Checkpoints in memory B-cell evolution. *Immunol. Rev.* 211, 255-268 (2006).
65. Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'. *Immunol. Rev.* 211, 310-319 (2006).
66. Julius, M. H., Masuda, T. & Herzenberg, L. A. Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69, 1934-1938 (1972).
67. Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H. & Ravetch, J. V. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379, 346-349 (1996).
68. Manz, R. A., Thiel, A. & Radbruch, A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388, 133-134 (1997).
69. Wynn, T. A. Basophils trump dendritic cells as APCs for T(H)2 responses. *Nat. Immunol.* 10, 679-681 (2009).
70. Oh, K., Shen, T., Le, G. G. & Min, B. Induction of Th2 type immunity in a mouse system reveals a novel immunoregulatory role of basophils. *Blood* 109, 2921-2927 (2007).
71. Coffman, R. L. & von der, W. T. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *J. Exp. Med.* 185, 373-375 (1997).
72. Khodoun, M. V., Orekhova, T., Potter, C., Morris, S. & Finkelman, F. D. Basophils initiate IL-4 production during a memory T-dependent response. *J. Exp. Med.* 200, 857-870 (2004).
73. Heyzer-Williams, L. J., Cool, M. & Heyzer-Williams, M. G. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory b cell compartment. *J. Exp. Med.* 191, 1149-1166 (2000).
74. Bell, J. & Gray, D. Antigen-capturing cells can masquerade as memory B cells. *J. Exp. Med.* 197, 1233-1244 (2003).
75. Obata, K. *et al.* Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood* 110, 913-920 (2007).
76. Gor, D. O., Ding, X., Briles, D. E., Jacobs, M. R. & Greenspan, N. S. Relationship between surface accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and antibody-mediated

- immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 73, 1304-1312 (2005).
77. Langermann, S. *et al.* Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J. Exp. Med.* 180, 2277-2286 (1994).
 78. Swiatlo, E., King, J., Nabors, G. S., Mathews, B. & Briles, D. E. Pneumococcal surface protein A is expressed in vivo, and antibodies to PspA are effective for therapy in a murine model of pneumococcal sepsis. *Infect. Immun.* 71, 7149-7153 (2003).
 79. Lambrecht, B. N., Kool, M., Willart, M. A. & Hammad, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 23-29 (2009).
 80. Ramanathan, V. D., Badenoch-Jones, P. & Turk, J. L. Complement activation by aluminium and zirconium compounds. *Immunology* 37, 881-888 (1979).
 81. McKee, A. S. *et al.* Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J. Immunol.* 183, 4403-4414 (2009).
 82. Dombrowicz, D. *et al.* Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J. Clin. Invest* 99, 915-925 (1997).
 83. Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R. & Ravetch, J. V. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76, 519-529 (1994).
 84. Winter, C. *et al.* Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis. *J. Immunol.* 178, 5828-5838 (2007).
 85. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (1987).
 86. Kita, H. *et al.* Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy? *J. Immunol.* 162, 6901-6911 (1999).
 87. Maurer, D. *et al.* Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J. Exp. Med.* 179, 745-750 (1994).
 88. Maurer, D. *et al.* Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J. Immunol.* 157, 607-616 (1996).
 89. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19, 71-82 (2003).

90. Miyajima, I. *et al.* Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J. Clin. Invest* 99, 901-914 (1997).
91. Piccinni, M. P. *et al.* Human bone marrow non-B, non-T cells produce interleukin 4 in response to cross-linkage of Fc epsilon and Fc gamma receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 8656-8660 (1991).
92. Seder, R. A. *et al.* Production of interleukin-4 and other cytokines following stimulation of mast cell lines and in vivo mast cells/basophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 94, 137-140 (1991).
93. Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793 (1996).
94. Kopf, M. *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-342 (1994).
95. Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. & Flavell, R. A. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 185, 461-469 (1997).
96. Seder, R. A. & Paul, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 635-673 (1994).
97. Karasuyama, H., Mukai, K., Tsujimura, Y. & Obata, K. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 9-13 (2009).
98. Chen, K. *et al.* Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10, 889-898 (2009).

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau basophiler Granulozyten.....	10
Abbildung 2: FcεRI mit gebundenem IgE	17
Abbildung 3: Prinzip der magnetischen Zellseparation (MACS)	46
Abbildung 4: Aufbau eines FACSCalibur	50
Abbildung 5: Prinzip des Sandwich ELISA.....	54
Abbildung 6: Quantifizierung von cDNA mit Hilfe der Real-time PCR und TaqMan-Sonden	65
Abbildung 7: Durchflusszytometrie nach in vitro Färbung	73
Abbildung 8: Basophile Granulozyten aus IL4-defizienten Mäusen binden kein Antigen	74
Abbildung 9: Basophile Granulozyten von FcRγ ^{-/-} und FcεRI ^{-/-} Mäusen binden kein Antigen	75
Abbildung 10: Antigenbindung in vivo	76
Abbildung 11: Aktivierung von Milz- und Knochenmarkzellen in vitro.....	77
Abbildung 12: Aktivierung von basophilen Granulozyten durch unterschiedliche APC- Konzentrationen	78
Abbildung 13: 2 h nach in vivo Aktivierung von Milz- und Knochenmarkzellen	79
Abbildung 14: in vivo Aktivierung nach in vivo Depletion von basophilen Granulozyten	81
Abbildung 15: Aktivierung in FcRγ und FcεRI knockout-Mäusen	83
Abbildung 16: Proliferation von B-Zellen	84
Abbildung 17: FACS Plot nach der Behandlung von Mäusen mit anti-IgER (MAR-1) oder PBS.....	88
Abbildung 18: FACS Plot zur Depletion basophiler Granulozyten.....	89
Abbildung 19: statistische FACS-Auswertung der Depletion basophiler Granulozyten in Knochenmark (KM), Milz und Leber	90
Abbildung 20: Durchflusszytometrie von Knochenmarkzellen.....	91
Abbildung 21: Depletion mit anti-IgER resultiert nicht im Anstieg der basalen Zytokin- Ausschüttung.....	92
Abbildung 22: verringerte Anzahl antigenspezifischer Plasmazellen und B-Zellen in Abwesenheit basophiler Granulozyten.....	94
Abbildung 23: Einfluss basophiler Granulozyten auf die humorale Gedächtnisantwort bei APC-immunisierten Mäusen	96

Abbildung 24: Effekt der humoralen Gedächtnisantwort ist unabhängig vom Antigen und der Nachweismethode	98
Abbildung 25: Depletion basophiler Granulozyten bei einer Primärantwort	99
Abbildung 26: Humorale Gedächtnisimmunantwort bei W/W ^v -Mäusen	101
Abbildung 27: Verstärkte IgG2a-Produktion in Anwesenheit von basophilen Granulozyten bei W ^{SH} -Mäusen.....	102
Abbildung 28: humorale Gedächtnisimmunantwort nach Immunisierung mit PspA	103
Abbildung 29: Sepsis und Überlebensrate nach <i>S. pneumoniae</i> -Infektion	105
Abbildung 30: CFSE-markierte Zellen können transferiert werden	107
Abbildung 31: humorale Gedächtnisimmunantwort nach Transfer APC-spezifischer Zellen	109
Abbildung 32: Transfer von APC-spezifischen Zellen bei Balb/c Mäusen	111
Abbildung 33: Verteilung von basophilen Granulozyten in Lymphknoten (LK), Peritonealgewebe (Peritoneum), Milz, Knochenmark (KM) und peripherem Blut nach in vivo Restimulation	114
Abbildung 34: Verteilung APC-bindender Zellen	117
Abbildung 35: Verteilung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach in vivo Restimulation	120
Abbildung 36: Antigen-spezifische Antikörper sind für die Rekrutierung von basophilen Granulozyten notwendig	122
Abbildung 37: Zytokinprofil CD4 ⁺ T-Zellen nach einer Restimulation	124
Abbildung 38: Modell basophiler Granulozyten bei einer sekundären humoralen Immunantwort	134

9 Anhang

9.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg, Abteilung Nephrologie, (Direktor Prof. Dr.med. G. Riegger) in der Zeit vom 01.06.2006 bis 14.01.2010 durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst herzlich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und das hochinteressante Thema bedanken. Seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft haben diese Arbeit im Wesentlichen ermöglicht.

Ebenfalls großer Dank gebührt dem Erstgutachter Prof. Dr. Richard Warth für das rege Interesse und die Vertretung dieser Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

Viele Personen haben durch die freundliche Überlassung verschiedener Materialien und Geräte zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. So möchte ich der Abteilung Innere Medizin I, sowie der Abteilung Hämatologie/Onkologie der Uniklinik Regensburg für die Bereitstellung des NanoDrops und des ELISA-Readers danken. Die Pathologie der Uniklinik stellte den FACS Aria zur Verfügung. Ein großer Dank geht auch an die Tierpfleger des Zentralen Tierlabors in D3 und H1, die sich sehr um das Wohl der Mäuse gekümmert haben. Susan Hollingshead und Charles Briles möchte ich mich für die Herstellung des PspA-Proteins bedanken. Ein Dankeschön geht an Ulrich Maus und seinem Team an der Medizinischen Hochschule Hannover für die gute Zusammenarbeit. Bei Cordula Moll möchte ich mich für einige Vorarbeiten bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Innere Medizin II in Regensburg für die nette Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft bedanken. Klaus Stark möchte ich für die Unterstützung bei einigen PC-Problemen danken. Bei Claudia Pace und Gitte Ruhland möchte ich mich für die geteilte Tierliebe, die vielen

hilfreichen Gespräche und ihre Freundschaft bedanken. Ein besonderer Dank gebührt Andreas Steege, der in den letzten Wochen viele richtungsweisende Ratschläge gab und viel Zeit für das Lektorat der Dissertation aufbrachte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei dem besten Team, das man sich vorstellen kann, bedanken. Ohne das Team aus Manuel, Marianne, Barbara, Yvonne, Nicole, Kathrin und Mia wäre die Durchführung der Versuche unmöglich gewesen. Vor allem bei Nicole Göbel bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung. Es hat mir Freude gemacht, mit Euch zusammen zu arbeiten und ihr seid immer für mich da gewesen. Für diesen Dank reichen keine Worte.

Ein herzlicher Dank gebührt der Landesjugendleitung des NAJU und meinen Freunden, die in den letzten Jahren öfters auf mich verzichten mussten. Die Freundschaft zu jedem Einzelnen von Euch hat mir Kraft gegeben. Einen besonderen Dank für die vielen Gespräche sende ich an Esther, Maria und Selina. Meiner Familie in Silheim möchte ich für ihre Ratschläge und den Unterschlupf danken. Ganz besonders möchte ich mich bei Jörg Hoffmeister für die Geduld und emotionale Unterstützung, für das Verständnis und die Motivation in der Schlussphase der Arbeit bedanken.

Zuletzt möchte ich mich in besonderem Maß bei meinen Eltern und meinem Bruder für die jahrelange Unterstützung der Arbeit bedanken. Das Lektorat der Arbeit und die vielen guten Hinweise dürfen auch nicht vergessen werden. Ihr habt mir in meinem Leben den Rückhalt gegeben, auch wenn der Weg mal steinig war. Dieses Werk ist Euch gewidmet, denn ihr seid vom ersten Augenblick daran beteiligt gewesen. Vielen Dank!

Ein herzliches Dankeschön an alle, die mich auf meinem Weg begleitet haben.

9.2 Publikationen

Veröffentlichungen:

Klose SM, Smith C, **Denzel A**, Kalko EKV (2005) Reproduction elevates the corticosterone stress response in common fruit bats. *Journal of Comparative Physiology A*, 2005 Volume 192 (4), p. 341-349.

Leutenegger A, D'Angelo C, Matz MV, **Denzel A**, Oswald F, Salih A, Nienhaus GU, Wiedenmann J (2007) It's cheap to be colorful. Anthozoans show a turnover of GFP-like proteins. *FEBS J.*, 2007 Volume 274 (10), p.2496-2505.

Brühl H, Cihak J, Plachý J, Kunz-Schughart L, Niedermeier M, **Denzel A**, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Luchow B, Stangassinger M, Mack M (2007) Targeting of GR-1+, CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2007 Volume 56 (9), p. 2975-2985.

Denzel A, Maus UA, Gomez Rodriguez M, Moll C, Niedermeier M, Winter C, Maus R, Hollingshead S, Briles DE, Kunz-Schughart LA, Talke Y, Mack M (2008) Basophils enhance immunological memory responses. *Nature Immunology*, 2008 Volume 9 (7), p.733-742.

D'Angelo C, **Denzel A**, Vogt A, Matz MV, Oswald F, Salih A, Nienhaus GU, Wiedenmann J (2008) Blue light regulation of host pigment expression in reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*, 2008 Volume 354, p.97-106.

Vogt A, D'Angelo C, Oswald F, **Denzel A**, Mazel CH, Matz MV, Ivanchenko S, Nienhaus GU, Wiedenmann J (2008) A green fluorescent protein with photoswitchable emission from the deep sea. *PLoS One*; 3(11):e3766. Epub 2008 Nov 19.

Brühl H, Cihak J, Niedermeier M, **Denzel A**, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, Plachý J, Stangassinger M, Mack M (2009) Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 May; 60(5):1352-61.

Niedermeier M, Reich B, Rodriguez Gomez M, **Denzel A**, Schmidbauer K, Göbel N, Talke Y, Schweda F, Mack M (2009) CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A , 2009 Oct 6.

Vorträge:

Smith C, Klose SM, **Denzel A**, Kalko EKV. "Stress, hormones and life history of a neotropical bat" Animal behaviour society, 42 annual meeting (2005), Snowbird Utah, USA

Denzel A, "Role of basophils in immunological memory responses" Kongress der Österreichischen Gesellschaft für Allergien und Immunologie (OEGAI) und deutschen Gesellschaft für Immunologie(2008), Wien

Posterbeiträge:

Niedermeier M, **Denzel A**, Rodriguez-Gomez M, Schmidbauer K, Göbel N, Mack M 2008. "Fibrozyten als Kollagen-produzierende hämatopoietische Zellen in der Nierenfibrose". Kongress für Nephrologie, Tübingen (2008)

Denzel A, Rodriguez Gomez M, Niedermeier M, Talke Y, Göbel N, Schmidbauer K, Mack M. "Recruitment of basophils after restimulation" European Immunology Congress (ECI), Berlin (2009),

Auszeichnung:

„Glanzlichter der Biomedizinischen Forschung“, (2008) Universitätsklinikum Regensburg

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 14.05.2010

(Andrea J. Denzel)