

# **Basophile Granulozyten als Regulatoren der CD4<sup>+</sup> T-Zellfunktion**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät III  
Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg**

vorgelegt von  
Fabian Johannes Hermann,  
geboren in Hofheim am Taunus

*Regensburg im Jahr 2013*

**Promotionsgesuch eingereicht am:** 26. November 2013  
**Die Arbeit wurde angeleitet von:** Prof. Dr. Matthias Mack

*Für meine Mutter*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1 Das Immunsystem . . . . .	2
2.1.1 Angeborene Immunität . . . . .	3
2.1.1.1 Basophile Granulozyten . . . . .	4
2.1.2 Adaptive Immunität . . . . .	5
2.1.2.1 Der MHC-Komplex . . . . .	6
2.1.2.2 T-Zellaktivierung und Differenzierung . . . . .	7
2.1.2.3 Basophile Granulozyten in der T <sub>H</sub> 2 Differenzierung . . . . .	10
2.1.2.4 T-Zellreifung und Selektion im Thymus . . . . .	11
2.2 T-Zellhomeostase . . . . .	12
2.3 Graft-versus-Host-Disease . . . . .	13
2.3.1 GvHD und MHC-Subtypen . . . . .	14
2.3.2 Akute GvHD . . . . .	15
2.3.3 GvHD Prophylaxe und Therapie . . . . .	18
<b>3 Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>4 Material</b>	<b>21</b>
4.1 Laborgeräte . . . . .	21
4.2 Gebrauchsfertige Kits . . . . .	22
4.3 Zellkultur-Mediums-Zusätze . . . . .	22
4.4 Glas- und Plastikwaren . . . . .	23
4.5 Chemikalien, Puffer und Reaktionsmedien . . . . .	24
4.6 Zytokine und Antikörper in der Zellkultur . . . . .	25
4.7 Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Zellkulturmedien . . . . .	26
4.8 Verwendete FACS- und Depletions-Antikörper . . . . .	27
4.9 Verwendete Software . . . . .	28
<b>5 Methoden</b>	<b>29</b>
5.1 <i>In vitro</i> Techniken . . . . .	29
5.1.1 Organaufbereitung . . . . .	29
5.1.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension: Knochenmark . . . . .	29
5.1.3 Verarbeitung der gewonnenen Zellsuspension . . . . .	29
5.1.4 Zellzählung . . . . .	30
5.1.5 Magnetische Zellseparation . . . . .	30
5.1.5.1 Aufreinigung von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen . . . . .	31

5.1.5.2	Depletion von CD90 <sup>+</sup> Zellen im Knochenmark . . . . .	32
5.1.5.3	Depletion von CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> und Mar-1 <sup>+</sup> Zellen aus der Milz . . . . .	32
5.1.5.4	MACS-Anreicherung Basophiler Granulozyten . . . . .	32
5.1.6	<i>In vitro</i> T-Zellproliferationsbestimmung . . . . .	33
5.1.7	Autologe T-Zellproliferation . . . . .	33
5.1.8	Gemischte Leukozyten Reaktion . . . . .	33
5.1.9	Apoptosebestimmung mittels 7-AAD und Annexin V . . . . .	34
5.2	Durchflusszytometrie . . . . .	34
5.2.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie . . . . .	34
5.2.1.1	Extrazelluläre FACS-Färbung . . . . .	36
5.2.1.2	Intrazelluläre FACS-Färbung . . . . .	36
5.2.1.3	Quantitative durchflusszytometrische Analyse . . . . .	37
5.2.1.4	Zellaufreinigung mittels Durchflusszytometrie . . . . .	38
5.2.1.5	Aufreinigung Basophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie . . . . .	38
5.2.2	Enzym-linked immunosorbent assay . . . . .	39
5.3	<i>In vivo</i> Arbeiten . . . . .	40
5.3.1	Tierschutz . . . . .	40
5.3.2	Tötung der Tiere und Organentnahme . . . . .	41
5.3.3	<i>In vivo</i> Depletion Basophiler Granulozyten . . . . .	41
5.3.4	Ansatz der homeostatischen Proliferationsexperimente . . . . .	42
5.3.5	Ansatz der GvHD-Experimente . . . . .	42
5.3.6	Bewertung der GvHD . . . . .	43
5.3.7	Narkose der Mäuse . . . . .	44
5.3.8	Retroorbitale Entnahme von Blut und Gewinnung von Blutplasma . . . . .	45
5.3.9	Statistik . . . . .	45
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>46</b>
6.1	CD49b <sup>+</sup> Zellen unterdrücken die Proliferation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <i>in vitro</i> . . . . .	46
6.2	Basophile Granulozyten, nicht NK-Zellen unterdrücken die autologe T-Zellproliferation . . . . .	47
6.3	Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellproliferation unabhängig von Zell-Zell-Kontakten . . . . .	49
6.4	Lösliche Faktoren unterdrücken die CD4 <sup>+</sup> T-Zellproliferation . . . . .	51
6.5	Sekretion von IL-4 und IL-6 durch Basophile Granulozyten unterdrückt die CD4 <sup>+</sup> T-Zellproliferation . . . . .	53
6.6	Basophile Granulozyten induzieren keine Apoptose in T-Zellen . . . . .	54
6.7	Basophile Granulozyten inhibieren die CD4 <sup>+</sup> T-Zellproliferation <i>in vivo</i> bei syngener Transplantation . . . . .	55
6.8	Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellteilung in der allogenen mixed lymphocyte reaction . . . . .	56

6.9 IL-4 und IL-6 unterdrücken die T-Zellteilung in der allogenen MLR . . . . .	58
6.10 Basophile Granulozyten führen zur Ausschüttung von $T_{H2}$ Zytokinen in der allogen MLR . . . . .	59
6.11 Einfluss Basophiler Granulozyten auf den Verlauf einer GvHD . . . . .	64
6.11.1 Basophile Granulozyten verbessern das Überleben in der akuten GvHD .	64
6.11.2 Basophile Granulozyten beeinflussen die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen .	65
<b>7 Diskussion</b>	<b>67</b>
7.1 Wirkmechanismus der IL-4 und IL-6 vermittelten $CD4^+$ T-Zellinhibition . . . . .	68
7.1.1 IL-4 und IL-6 inhibieren die T-Zellproliferation nicht direkt . . . . .	69
7.1.2 Syngene und allogene Basophile Granulozyten unterdrücken die $CD4^+$ T-Zellproliferation <i>in vitro</i> . . . . .	70
7.2 Basophile Granulozyten sorgen für einen schwächeren Verlauf der GvHD . . . . .	71
7.3 Unterschiede zu anderen Publikationen . . . . .	74
7.4 IL-4 in der GvHD-Therapie . . . . .	74
7.5 Zelltherapie mit Basophilen Granulozyten in der GvHD - Ausblick . . . . .	75
<b>8 Eigene Publikationen</b>	<b>77</b>
8.1 Veröffentlichungen . . . . .	77
8.2 Poster . . . . .	77
8.3 Vorträge . . . . .	77
<b>9 Danksagung</b>	<b>78</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>111</b>

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
$\alpha$	anti
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolin)-6-Sulfon-Säure
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin 7
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	Cystein-Cystein chemokine ligand, CC-Motiv-Chemokin
CCR	Cystein-Cystein chemokine receptor, CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	cluster of differentiation, Oberflächenproteine von Zellen
CFDA	5-Carboxyfluoresceindiacetat-acetoxymethylester
CFSE	Carboxy-fluoresceindiacetamethylester
CXCL	CXC chemokine ligand, Cystein - X -Cystein-Motiv-Chemokin
Cy	Cyanin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco´s phosphate buffered saline
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EOMES	Eomesodermin, T-box brain protein 2
<i>et al.</i>	et alii, lat.: und andere
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc $\varepsilon$ RI	hochaffiner Immunglobulin E Rezeptor I
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum

Foxp3	Forkhorn Box P3, Mastergenschalter für regulatorische T-Zellen
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht im Durchflusszytometer
g	mittlere Erdbeschleunigung ( $1 \text{ g} = 9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$ )
GATA-3	GATA-binding protein 2, GATA-bindeprotein
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease, Transplantat-Wirt-Reaktion
GVL	Graf-versus-Leucemia, Spende-Leukämie-Wirkung
HLA	Human Lymphocyte Antigen, humanes Lymphozyten Antigen
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
MACS	magnetic cell sorting, magnetische Zellsortierung
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätsmoleküle
miHa	Minores Antigen
MLR	mixed leucocyte reaction, gemischte Leukozyten-Reaktion
n.s.	nicht signifikant
NA/LE	no azid/low endotoxin, keine Azide, wenig Endotoxin
NEAA	non essential amino acids, Nicht-essentielle Aminosäuren
n.d.	nicht detektierbar
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMP	pathogen associated molecular patterns, Pathogen assoziierte Molekularemuster

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy7	R-Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCP	peridinin-chlorophyll-protein complex
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	pathogen recognition receptor, Mustererkennungsrezeptor
ROR $\gamma$	RAR-related orphan receptor $\gamma$
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rt	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
SN	supernatant, Zellkulturüberstand
SPF	specific pathogen free, spezifisch pathogenfrei
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht im Durchflusszytometer
T-bet	TBX21, T-box transcription factor 21
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	transforming growth factor
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSLP	thymic stromal lymphopoitin
TZR	T-Zellrezeptor
WT	Wildtyp

## 1 Zusammenfassung

Basophile Granulozyten wurden zunächst als reine Effektorzellpopulation charakterisiert; in dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Basophile Granulozyten *in vitro* in der Lage sind, sowohl die syngene, als auch die Allogen-induzierte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu unterdrücken. Basophile Granulozyten inhibieren die T-Zellproliferation unabhängig von Antigenpräsentation über MHC Klasse II Moleküle und unabhängig von Fas-Rezeptor vermittelter Apoptose. Apoptose-Assays bestätigten, dass es sich um echte Proliferationsinhibition, nicht um Apoptoseinduktion durch Basophile Granulozyten handelt.

Überraschenderweise war der Unterdrückungsmechanismus abhängig von den durch Basophile Granulozyten produzierten löslichen Faktoren Interleukin (IL) 4 und IL-6. Weder für IL-6 noch für IL-4 ist eine anti-proliferative Wirkung beschrieben. Vermutlich wird die Inhibition der CD4<sup>+</sup> T-Zellteilung nicht direkt durch diese Zytokine vermittelt, sondern über einen noch zu identifizierenden Zelltyp, der von diesen Zytokinen stimuliert wird und die CD4<sup>+</sup> T-Zellen an ihrer Teilung hindert.

Unabhängig davon, ob Basophile Granulozyten aus C57Bl/6 oder Balb/c Mäusen isoliert wurden, unterdrückten sie die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Ebenso zeigte es sich, dass Basophile Granulozyten die Konzentration von IL-2, in mixed lymphocyte reactions (gemischte Lymphozyten-Reaktion) senkten; dies stellt einen weiteren möglichen Mechanismus für die T-Zellunterdrückung dar, da IL-2 ein wichtiges T-Zellaktivierungs- und Proliferationszytokin ist. Neben der Proliferationsunterdrückung der T-Zellen verursachten Basophile Granulozyten eine Verschiebung des T-Zellphänotyps *in vitro* von T<sub>H</sub>1 hin zu T<sub>H</sub>2.

Bei *in vivo* GvHD Versuchen führte die Depletion Basophiler Granulozyten, vor der GvHD-Induktion, zu einem erhöhten GvHD-Score, einem verstärkten Gewichtsverlust sowie einem reduziertem Überleben der Versuchstiere. Darüber hinaus führte die Depletion Basophiler Granulozyten zu einer signifikant erhöhten Zahl von CD45<sup>+</sup>-Zellen sowie CD4<sup>+</sup> T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten der Versuchstiere, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nicht depletierte Tiere zeigten eine erhöhte Menge IFN- $\gamma$  positiver T-Zellen in ihren Lymphknoten. Eine Verschiebung des T-Zellphänotyps von T<sub>H</sub>1-Zellen hin zu T<sub>H</sub>2-Zellen konnte man *in vivo* nicht beobachten. Die Depletion Basophiler Granulozyten nach Einleitung der GvHD hatte keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung.

Diese Daten zeigen, dass Basophile Granulozyten sowohl die syngene, als auch die allogene T-Zellproliferation inhibieren können. Diese Eigenschaft könnte sie zu einem interessanten Therapeutikum in der Präventionstherapie einer GvHD machen. Basophile Granulozyten wurden in der Literatur noch nicht als T-Zell-inhibitorisch beschrieben, ebenso ist ein IL-4 und IL-6 abhängiger T-Zellinhibitionsmechanismus bislang unbekannt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Der Mensch ist täglich Keimen in Form von Bakterien, Viren und Pilzen ausgesetzt. Ein Teil von ihnen lebt kommensal mit dem Menschen, ein anderer ist pathogen. Die Aufgaben des Immunsystems bestehen darin, die kammensalen Bakterien auf die Bereiche des Körpers zu beschränken, in denen sie dem Menschen nützlich sind, wie auf der Hautoberfläche und im Darm. Gleichzeitig bekämpft es pathogene Keime. Die Mechanismen des Immunsystems unterteilt man in die angeborene oder unspezifische Abwehr sowie die adaptive oder auch spezifische Abwehr. Das adaptive Immunsystem reagiert langsamer, ist im Gegenzug jedoch hochspezifisch und fähig, auch neue oder veränderte Pathogene abzuwehren. Abbildung 2.1 zeigt schematisch alle Zellen des Immunsystems und deren Ursprung.

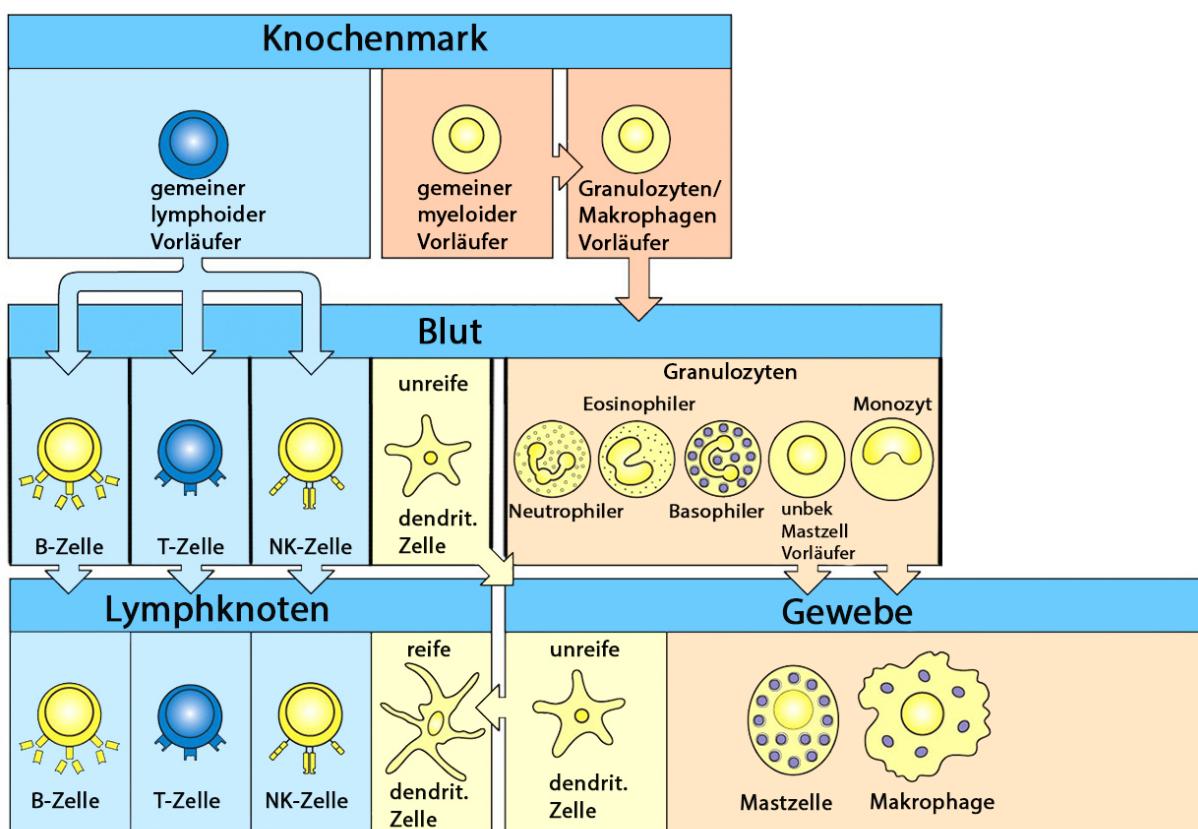


Abbildung 2.1: **Zellen des Immunsystems und ihre Entstehung.** Sog. myeloide und lymphoide Vorläuferzellen des Knochenmarks sind der Ursprung aller Zellen des Immunsystems. Aus lymphoiden Vorläuferzellen reifen Zellen des adaptiven Immunsystems, aus myeloiden die des angeborenen Immunsystems. Gezeigt ist, in welchen Geweben man welche Zelltypen findet. Abbildung verändert nach Murphy *et al.* [1].

### 2.1.1 Angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Barriere, die ein Pathogen überwinden muss, um den Körper zu befallen. Es lässt sich in die aktive und passive Abwehr unterteilen. Zur passiven Abwehr gehören der Säureschutzmantel der Haut, welcher die Besiedlung durch Bakterien und Pilze erschwert, oder die Produktion von Partikel bindendem Mukus in der Lunge und dessen Abtransport über Flimmerhärchen [1].

Die aktive Abwehr beruht auf Zellen wie Makrophagen/Monozyten, dendritischen Zellen (DZ), Granulozyten (Eosinophile, Basophile und Neutrophile) und Mastzellen. Gelingt es einem Keim die passiven Abwehrmaßnahmen zu überwinden, trifft er auf die Zellen der angeborenen Immunabwehr. Diese Zellen, vor allem Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen, sind in der Lage Mikroorganismen zu erkennen. Granulozyten und Mastzellen sind in der ersten Phase der Keimbekämpfung primär Effektorzellen, die nach Aktivierung eine Vielzahl antimikrobieller Peptide und Moleküle ausschütten, die weitere Zellen des Immunsystems anlocken.

Die Erkennung der Keime beruht auf im Erbgut codierten „Pathogen Recognition Receptors“ (PRR, Pathogenerkennungsrezeptoren). Diese Rezeptoren erkennen Bestandteile von Bakterien und Viren, die von Eukaryoten nicht produziert werden, sog. PAMPs, Pathogen associated molecular patterns (Pathogen assoziierte Molekulare Muster). Zu diesen PAMPs gehören z.B. Lipopolysaccharid (LPS) ein integraler Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien oder CpG-DNA [2; 3; 4; 5; 6]. Die wichtigsten Vertreter dieser Rezeptoren sind Toll-like- (TLRs), Scavenger-, Mannose- und C-Typ-Lektin-Rezeptoren [7]. Diese PRRs sind über alle Taxa hinweg hoch konserviert. Dies unterstreicht ihre Wichtigkeit in der Immunabwehr.

Wird ein Pathogen über ein PAMP von einer Zelle des angeborenen Immunsystems erkannt, wird sie aktiviert und beginnt eine Vielzahl von Zytosol- und Chemokinen auszuschütten. Chemokine locken andere Zellen des Immunsystems an, Zytokine wirken aktivierend oder hemmend auf Zellen. Zu den sezernierten Molekülen gehören die entzündungsfördernden Zytokine Interleukin-1 (IL-1), Tumor Nekrose Faktor (TNF), sowie Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Diese Substanzen locken weitere Zellen (Neutrophile-, Basophile-, Eosinophile- Granulozyten, Makrophagen und DZ) des angeborenen Immunsystems an. Dieser Vorgang führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, der die Ausbreitung des Keimes verhindern soll [8; 7]. DZ verlassen nach ihrer Aktivierung durch Pathogene den Ort der Entzündung und wandern in den Lymphknoten, um dort mit Zellen der adaptiven Immunabwehr zu interagieren und so für die Aktivierung dieses „Abwehrarms“ zu sorgen [7; 9; 10; 11].

Neben den zellulären Bestandteilen gehört das Komplementsystem, als löslicher Teil, zur angeborenen Immunabwehr. Dabei handelt es sich um eine Ansammlung von über 30 Plasmaproteinen, die in der Lage sind bakterielle Zellen zu opsonisieren, d.h. für Immunzellen zu markieren oder nach Ablauf einer proteolytischen Kaskade, Pathogene direkt zu lysieren [12; 13; 1].

Neben den bereits genannten Zellen gehören auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zur angeborenen Immunität. Sie sind in der Lage, durch Sekretion von zytotoxischen Molekülen (u.a. Perforin, Granzym B) [14] abnormale Zellen (Virusbefall, Krebszellen) in Apoptose (programmierter Zelltod) zu versetzen [15; 16].

Zur Abwehr von extrazellulären Parasiten greift das angeborene Immunsystem vor allem auf Mastzellen und Basophile Granulozyten zurück. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle bei der Entstehung von Asthma Bronchiale und Allergien [17; 1; 18].

### 2.1.1.1 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten stellen mit 0,1 % bis 0,5 % die kleinste zirkulierende Population der Leukozyten im Blut. Sie wurden erstmals 1878 von Paul Ehrlich beschrieben [19; 20; 21]. Basophilenartige Zellen lassen sich in der Hämolymphe von Manteltieren nachweisen, einem Tierstamm, der bereits vor 500 Millionen Jahren auf der Erde lebte [22]. Somit sind sie ein hoch konserverter und daher wichtiger Zelltyp [23]. Charakterisiert sind Basophile Granulozyten durch eine hohe Anzahl von Granulae, die mit Histamin, Proteoglykanen, Leukotrienen C4 und proteolytischen Enzymen gefüllt sind [24]. Ebenso kennzeichnet sie die Expression des hoch affinen IgE Rezeptors  $Fc_{\epsilon}RI$  und ihre kurze Lebensdauer von ca. 60 Stunden [25; 26].

Die im Blut zirkulierenden Basophilen Granulozyten weisen einige Parallelen zu im Gewebe lokalisierten Mastzellen auf. Beide tragen  $Fc_{\epsilon}RI$  auf ihrer Oberfläche, sind reich an mit Lipid-Mediatoren gefüllten Granulae [18] und sind verantwortlich für die Abwehr von Parasiten. Diese Gemeinsamkeiten führten dazu, dass bis vor einigen Jahren Basophile Granulozyten als vernachlässigbare zirkulierende Mastzellen angesehen wurden, die in ihren Funktionen nicht von Mastzellen differieren. Tatsächlich unterscheiden sich Basophile Granulozyten in einigen Belangen jedoch deutlich von Mastzellen. Basophile Granulozyten verlassen das Knochenmark als reife voll funktionsfähige Zellen, verbleiben zunächst im Blut und wandern dann an Entzündungsorte und in den Lymphknoten ein. Mastzellen hingegen verlassen das Knochenmark unreif. Erst wenn sie ihr Zielgewebe (z.B. Schleimhäute) erreicht haben, werden sie funktionsfähige Mastzellen [18].

Darüber hinaus weisen neue Erkenntnisse darauf hin, dass Basophile Granulozyten durch die Sekretion von Interleukin-4 (IL) und IL-6 potente Modulatoren der Immunantwort sind [27; 28; 29; 30; 31]. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Basophile Granulozyten die  $T_{H}2$ -Antwort verstärken, essenzielle Initiatoren einer chronischen allergischen Inflammation sein können, für die IgG abhängige Anaphylaxie verantwortlich sind, das Überleben von Plasmazellen verbessern und die Bildung des immunologischen Gedächtnisses fördern [17; 30; 31; 32; 33; 34].

### 2.1.2 Adaptive Immunität

Das adaptive Immunsystem ist evolutionär jünger als das Angeborene Immunsystem. Vertebraten und unter ihnen die Gnathostomata haben dieses System der Keimabwehr entwickelt [35]. Gekennzeichnet ist es durch das Vorhandensein sog. T- und B-Zellen [36; 37; 38].

T-Zellen erkennen über ihren hochspezifischen T-Zellrezeptor (TZR) kurze Peptidketten, die ihnen von sog. professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ, z.B. dendritische Zellen) über ein spezielles „Adapter-Molekül“ gezeigt werden. Erhält ein bestimmter T-Zelltyp ein Aktivierungssignal über seinen TZR, so ist dieser in der Lage B-Zellen zu aktivieren, die daraufhin Antikörper ausschütten [36; 39; 40]. Antikörper bilden den humoralen Teil der adaptiven Immunabwehr. Sie sind in der Lage, Pathogene zu opsonisieren [41; 42], Toxine und Viren zu binden und diese so unschädlich zu machen. Darüber hinaus können sie durch Aktivierung der Komplementkaskade [43; 44] oder von NK-Zellen direkt die Lyse von Pathogenen einleiten [45; 46]. Ebenso sind sie in der Lage T-Zellen Antigene zu präsentieren und sie so zu aktivieren. Da B-Zellen in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden, wird hier auf sie im Detail nicht eingegangen.

Die Besonderheit des adaptiven Immunsystems besteht in seiner nahezu unbegrenzten Anzahl von Rezeptoren (theoretisch bis zu  $10^{11}$ ), die im Gegensatz zu den Rezeptoren (PRRs) der angeborenen Immunität nicht fest in der Keimbahn codiert sind [1]. Stattdessen ergibt sich ein Teil ihrer enormen Varianz aus der zufälligen Rekombination von Rezeptorsegmenten (V-, (D)-, J-Segmente) auf DNA-Ebene. Dieser Vorgang wird Somatische- oder auch V,(D),J-Rekombination genannt [47; 48; 49]. Während dieser Neuanordnung werden in der Antigenbindungsfläche des Rezeptors durch Enzyme zufällige Veränderungen eingefügt, was ihre Diversität noch weiter erhöht [1]. Daher lastet ein wesentlich geringerer evolutionärer Selektionsdruck auf den so generierten Rezeptoren der T- und B-Lymphozyten.

Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt hoch selektiv, da nur eine Rezeptorvariante auf T-Zellen in vielen Kopien exprimiert wird. Jede Zelle erkennt folglich nur ein spezifisches Antigen. Wird eine T-Zelle über ihren Rezeptor (TZR) aktiviert, kommt es zur sog. Klonale-Expansion, d.h. sie teilt sich mehrfach, um das Pathogen besser bekämpfen zu können.

Der größte Vorteil des adaptiven Immunsystems gegenüber der unspezifischen Immunabwehr besteht jedoch in der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Ein Teil der spezifischen T- und B-Zellen bleibt auch nach überstandenem Infekt am Leben und entwickelt sich in sog. „Gedächtnis-T- oder -B-Zellen“, die bei einem erneuten Kontakt mit demselben Pathogen extrem schnell mit der Ausschüttung von Zytokinen und hocheffizienten Antikörpern reagieren und so den erneuten Ausbruch der Krankheit verhindern. Impfungen machen sich das immunologische Gedächtnis zu Nutze [50; 51; 52].

Damit T-Zellen der adaptiven Immunabwehr auf Pathogene reagieren können, müssen ihnen Eiweiße dieser Mikroben von anderen Zellen präsentiert werden. Diese Darbietung der Peptide erfolgt über die sog. MHC-Moleküle.

### 2.1.2.1 Der MHC-Komplex

Der zelluläre Teil der adaptiven Immunabwehr beruht auf der Präsentation von linearen Peptiden und der Erkennung dieser durch den T-Zellrezeptor (TZR). Durch diese Erkennung von Peptiden sind die T-Zellen fähig, zwischen „eigen“ und „fremd“ zu unterscheiden. T-Zellen durchlaufen in ihrem Reifungsprozess eine Selektion, der zur Folge hat, dass ihr TZR nur auf Eiweiße reagiert, die nicht im Körper vorkommen (vergleiche Abschnitt 2.1.2.4). Die Darbietung dieser Eiweiße erfolgt über die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, Major-Histocompatibility-Complex). Der MHC-Lokus befindet sich bei Menschen auf Chromosom 6 und bildet eine der genreichsten Regionen im gesamten menschlichen Genom. Darüber hinaus zeigt der MHC-Lokus den am Stärksten ausgeprägten Polymorphismus. Es sind mehr als 1200 Allele für das MHC Klasse I- und mehr als 300 für das Klasse II-Molekül bekannt [53; 54].

MHC Klasse I Moleküle präsentieren Peptide zytosolischer Herkunft, sie spiegeln also das Zellinnere an der Zelloberfläche wieder. Dies ermöglicht es dem Immunsystem auch intrazelluläre Pathogene, wie Viren, intrazelluläre Bakterien oder Parasiten, zu erkennen [55]. MHC-Moleküle der Klasse II hingegen zeigen aus der Umgebung aufgenommene und prozessierte Peptide.

Das gezeigte Eiweiß ist immer integraler Bestandteil des MHC-Moleküls. Es wird durch sog. Anker-Aminosäuren in einer Falte im MHC-Molekül kovalent gebunden [56; 57; 58; 59]. MHC-Moleküle ohne Peptid sind instabil und werden nicht an der Zelloberfläche gezeigt [60; 61].

Das MHC-Molekül der Klasse I wird auf beinahe allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Es besteht aus einer 44 kDa schweren Proteinkette, die in drei Domänen unterteilt ist ( $\alpha$ 1-3). Darüber hinaus setzt es sich zusammen aus dem 12 kDa schweren  $\beta$ -2-Mikroglobulin sowie einem aus dem Zellinneren stammenden, acht bis zehn Aminosäuren (AS) langen Peptid [62; 63; 64; 65]. Die  $\alpha$ -1 und -2 Domäne bilden eine Peptidbindetasche. Die  $\alpha$ -3 Domäne ist in der Zellmembran verankert [66; 58] (Abbildung: 2.2 linke Spalte). Das MHC I Molekül wird während seiner Synthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit einem passenden Peptid beladen. Zytotoxische Lymphozyten (ZTL, CD8<sup>+</sup> T-Zellen) interagieren mit dem MHC Klasse I Molekül über ihren T-Zellrezeptor [67; 58].

Das MHC-Molekül der Klasse II wird von APZ exprimiert und unterscheidet sich in Aufbau und Funktion vom MHC-Klasse-I-Molekül. Es besteht aus einer  $\alpha$ - (34 kDa) und  $\beta$  -Kette (29 kDa), die beide zwei Domänen besitzen ( $\alpha$ -1,-2; $\beta$ -1,-2) [1]. Die  $\alpha$ -1 und  $\beta$  -1 Domänen bilden die Peptidbindetasche, während die  $\alpha$ -2 und  $\beta$ -2 Domänen mit der Zellmembran verbunden sind [60; 59] (siehe Abbildung 2.2 rechte Spalte). MHC II Moleküle präsentieren Peptide, die von APZ aus der Umgebung phagozytiert wurden.

Um sicherzustellen, dass während der Herstellung des MHC II Moleküls im ER keine intrazellulären Peptide gebunden werden, ist die Peptidbindetasche durch das sog. „invariant chain protein“ belegt [68; 69; 70; 71]. Neben der Blockade der Bindungsstelle sorgt das „invariant chain protein“ auch für den Transport des MHC Klasse II Moleküls in „MHC class II containing compartments“

(MIIC, MHC Klasse II enthaltendes Kompartiment) [72; 73; 74]. Dort wird das „invariant chain protein“ von Proteasen verdaut. In Folge dessen kann das MHC II Molekül mit Peptid beladen werden. Nun fusioniert das MIIC mit einem Endosom (durch Phagozytose gebildetes Vesikel). Das MHC II Molekül wird mit Hilfe des HLA-DM Chaperons [75] mit einem Peptid beladen, welches aus dem Endosom stammt und wird anschließend an die Zelloberfläche transportiert [76; 77; 78; 79]. Sog. T-Helferzellen ( $CD4^+$  T-Zellen) treten mit MHC-Molekülen der Klasse II in Kontakt [80] und werden aktiviert.

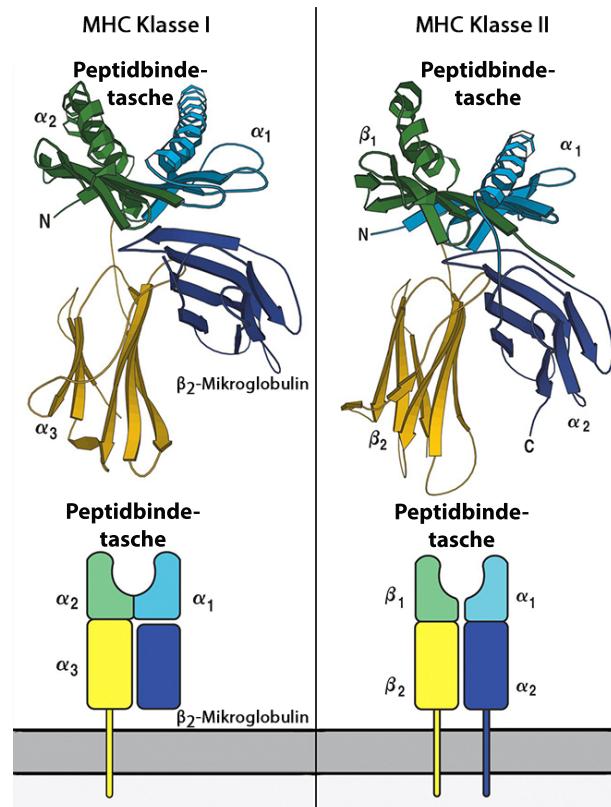


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines MHC Klasse I und Klasse II Moleküls Tertiärstruktur und schematische Darstellung des MHC Klasse I Moleküs (links), MHC der Klasse II Moleküs (rechts). Abbildung verändert nach Murphy *et al.* [1].

### 2.1.2.2 T-Zellaktivierung und Differenzierung

Treffen naive  $CD4^+$  T-Zellen in der Peripherie auf aktivierte APZ, die das für diese T-Zelle spezifische Antigen über das MHC Klasse II Molekül präsentieren, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle.

Die APZ präsentiert das Antigen zusammen mit einer Reihe von sog. ko-stimulatorischen Molekülen, wie CD80 und CD86. Beide binden das CD28 Molekül auf der T-Zelle und vermitteln zusammen mit dem MHC-TZR-Kontakt die Aktivierung der T-Zelle.

Nach der Aktivierung der T-Zelle kann sich diese in unterschiedliche Effektor-T-Zell-Klassen differenzieren. Erstmals wurden zwei dieser Klassen 1986 von Mosmann *et al.* beschrieben [81]. Später zeigte sich, dass die entstehenden T-Zellphänotypen durch das Zytokinmilieu, in dem sie ausreifen, bestimmt werden [82; 83].

Für diese Arbeit sind vier CD4<sup>+</sup> T-Zellphänotypen von Interesse: T-Helfer (T<sub>H</sub>) Zellen Typ 1, -2, -17 und sog. regulatorische T-Zellen (Tregs). Abbildung 2.3 gibt einen Überblick über diese T-Zellphänotypen, ihre initiiierenden Zytokine, Transkriptionsfaktoren (TF) und sezernierten Moleküle.

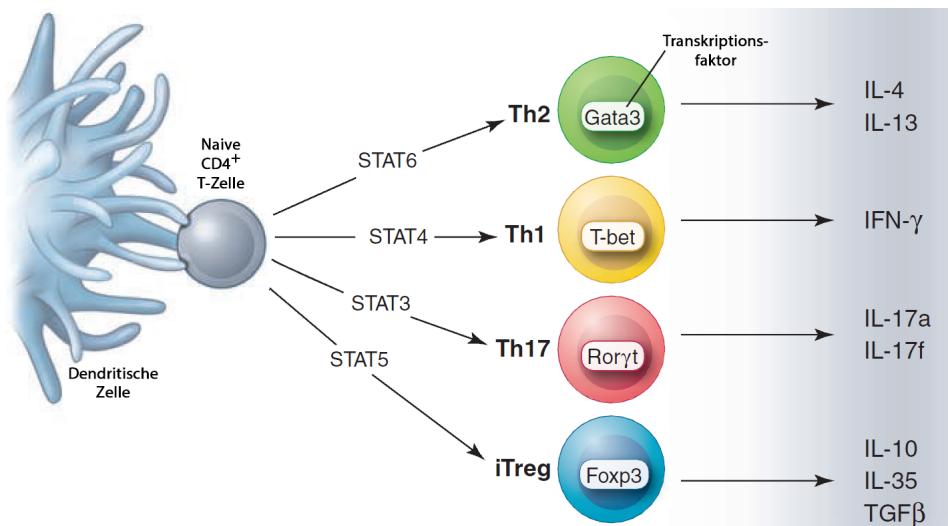


Abbildung 2.3: **T-Zellsubtypen** Dargestellt ist eine naive T-Zelle, stimuliert durch eine APZ. Die Pfeile geben die Differenzierungsmöglichkeiten wieder und die dafür benötigten Transkriptionsfaktoren. In den Zellen ist der Signatur-Transkriptionsfaktor für den jeweiligen T-Zellsubtyp angeben, links der Zelle, die von der Zelle produzierten Schlüsselzytikine. Abbildung verändert nach O'Shea *et al.* [84].

### T<sub>H</sub>1-Zellen:

Die Ausreifung einer naiven T-Zelle unter Einfluss von IL-12 [85] oder IFN- $\gamma$  [86] führt zu einer sog. T<sub>H</sub>1-Zelle. Diese ist charakterisiert durch die Sekretion von IFN- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF), Lymphotoxin- $\alpha$  [87] und der Expression der T<sub>H</sub>1 spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomes. Aktivierung von T-bet unterdrückt den T<sub>H</sub>2 TF GATA-3 [88]. Eomes sorgt für die Produktion von IFN- $\gamma$ , wird in seiner Funktion jedoch auch durch T-bet unterstützt [89].

T<sub>H</sub>1 Zellen koordinieren vor allem die Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserreger. Sie sorgen für die zelluläre Immunantwort, die durch die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen geprägt ist [90]. T<sub>H</sub>1 Zellen spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei Autoimmunerkrankungen [91; 92; 93] und der GvHD (vergleiche Kapitel 2.3).

### **T<sub>H</sub>2-Zellen:**

T<sub>H</sub>2-Zellen waren die ersten beschrieben T-Zellsubtypen [81]. Zur Ausreifung benötigen sie IL-4. Nach ihrer Entstehung produzieren sie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und sind zudem gekennzeichnet durch die Expression von GATA-3, dem T<sub>H</sub>2 „Hauptgenschalter“ [82; 94; 95; 96]. Der Ursprung des IL-4, welches die T<sub>H</sub>2 Reifung anstößt, ist unbekannt. Eine Reihe von Zellen produzieren IL-4, unter anderem auch Basophile Granulozyten (siehe 2.1.1.1).

T<sub>H</sub>2-Zellen sind vor allem für die lösliche, adaptive Immunabwehr verantwortlich. Sie interagieren mit und aktivieren B-Zellen [97], wenn diese ein passendes Antigen präsentieren [98; 99; 100]. Somit spielen T<sub>H</sub>2-Zellen ebenfalls eine Rolle bei antikörperabhängigen Krankheiten, wie Parasiteninfektionen [101], Allergien [102], Asthma [103] sowie Autoimmunerkrankungen [104; 105].

### **T<sub>H</sub>17-Zellen:**

Die 2003 [106] entdeckten T<sub>H</sub>17-Zellen zeichnen sich durch die Sekretion großer Mengen IL-17A, -17F, -21 und -22 aus [107; 108; 109]. Die Differenzierung erfolgt unter Einfluss von IL-6 und transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [110]. Die beiden genannten Zytokine aktivieren den Master-Genschalter für T<sub>H</sub>-17 Zellen, RAR-related orphan receptor  $\gamma$  (ROR $\gamma$  C) [111].

T<sub>H</sub>17-Zellen bekämpfen extrazelluläre Keime wie Pilze, jedoch kommt ihnen ebenfalls eine immer größere Rolle bei Autoimmunerkrankungen zu [112; 113]. Ebenso sind sie für die Hauterscheinungen im Verlauf einer GvHD verantwortlich (siehe Abschnitt 2.3).

### **Regulatorische T-Zellen:**

Regulatorische T-Zellen (Treg) werden in natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs), die im Thymus entstehen [114; 115; 116; 117] und induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs) unterteilt. Diese CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ CD25 $^{+}$  Zellen [118; 119; 120] können Effektor T-Zellen supprimieren. nTregs unterdrücken zellkontaktabhängig durch die Übertragung von zyklischem AMP [121; 122; 123; 124], iTregs über die Abgabe großer Mengen IL-10 und TGF- $\beta$ .

Die Treg Regulation auf DNA-Ebene erfolgt über den TF Foxp3 [125; 126]. *In vivo* halten Tregs die orale Toleranz aufrecht [127; 128] und wirken generell Autoimmunität entgegen. Ein Foxp3 Knockout führt bei Mäusen und Menschen zum sog. Scurfy bzw. IPEX-Syndrom (immunodeficiency, polyendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome), das eine Vielzahl von Autoimmunerscheinungen nach sich zieht [129; 130]. Regulatorische T-Zellen konnten auch schon erfolgreich therapeutisch eingesetzt werden [127].

Wie bereits beschrieben, produzieren T-Zellen nach ihrer Differenzierung Zytokine. Diese Zytokine stimulieren T-Zellen autokrin, was stabilisierend auf ihren T-Zellphänotyp wirkt und so einen enormen Einfluss auf die entstehende Immunreaktion hat. Die abgegebenen „Signaturzytokine“ des jeweiligen T-Zelltyps unterdrücken die Differenzierung anderer T-Zelltypen [91; 87]. Somit bietet die Verschiebung der T<sub>H</sub>-Zellantwort einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt bei Krankheiten, die auf T-Zellphänotypen beruhen.

Wie bereits erwähnt, legt das Zytokinmilieu, in dem die T-Zelle differenziert, den T-Zellphänotyp fest. Da Basophile Granulozyten IL-4 und IL-6 ausschütten, beides Zytokine, die zur  $T_{H2}$  Reifung führen können, können auch sie eine Rolle in der  $T_{H2}$  Entwicklung spielen.

### 2.1.2.3 Basophile Granulozyten in der $T_{H2}$ Differenzierung

Der Ursprung des für die  $T_{H2}$  Differenzierung notwendigen IL-4 war lange Zeit unbekannt. 2005 zeigten Oh *et al.* jedoch, dass T-Zellen *in vitro* in Anwesenheit von Basophilen Granulozyten und DZ in  $T_{H2}$ -Zellen differenzieren. Da DZ kein IL-4 produzieren, musste das Zytokin von Basophilen Granulozyten stammen [131]. Diese Erkenntnisse gaben die ersten Hinweise, dass Basophile Granulozyten die Quelle für das initiale IL-4 der  $T_{H2}$ -Entwicklung sein könnten. Für diese Theorie sprach auch, dass Basophile Granulozyten durch Entzündungsreize, wie Allergene oder Helminthen, an den Ort der Entzündung wandern und auch im Lymphknoten zu finden sind. Caroline Sokol konnte 2008 Basophile Granulozyten in drainierenden Lymphknoten von Mäusen nachweisen, die einer Infektion durch den Helmithen *N. brasiliensis*, einem  $T_{H2}$ -Initiator, ausgesetzt waren. Die in den Lymphknoten gefundenen Basophilen Granulozyten exprimierten MHC-Moleküle der Klasse II [132; 133], was eine direkte Stimulation von T-Zellen ermöglicht. Tang, Ohnmacht und Hammad *et al.* konnten die Expression von MHC-Molekülen der Klasse II jedoch nicht bestätigen [134; 135; 33]. Darüber hinaus konnte sie zeigen, dass die Depletion von Basophilen Granulozyten mit einem, gegen den hochaffinen IgE-Rezeptor (Fc $_{\epsilon}$ RI) gerichteten Antikörper (MAR-1), vor einer  $T_{H2}$ -Induktion mit Papain, die Entwicklung von  $T_{H2}$ -Zellen verhinderte.

Da naive T-Zellen vorwiegend in Lymphknoten zu finden sind, ist es auch von Interesse, die Migration von Basophilen Granulozyten in diese zu untersuchen. Die Rekrutierung der Basophilen Granulozyten in die Lymphknoten scheint in Abhängigkeit von IL-3 stattzufinden. So konnte gezeigt werden, dass in Lymphknoten von IL-3 $^{-/-}$  Mäusen, nach der Infektion mit *N. brasiliensis*, keine Basophilen Granulozyten zu finden waren. Bemerkenswert ist jedoch, dass die  $T_{H2}$  Differenzierung von diesem Umstand unbeeinflusst blieb [136; 135]. Dazu passend fanden Hammad *et al.* 2010 in Mäusen, die mit Allergenen der Hausstaubmilbe stimuliert wurden, keinen Einfluss von Basophilen Granulozyten auf die  $T_{H2}$  Entwicklung.

Ebenfalls 2010 beschrieben Tang *et al.* die Zusammenarbeit von Basophilen Granulozyten und DZ zur Etablierung einer  $T_{H2}$  Antwort, im gleichen Modell der  $T_{H2}$  Induktion, wie es auch von Sokol *et al.* verwendet wurde. Dabei führte die subkutane Immunisierung mit Papain zu Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) in dermalen DZ und in lymphknotenansässigen DZ. Daraus resultierte die Sekretion von TSLP (thymic stromal lymphopoitin) durch Epithelzellen, was eine  $T_{H2}$  Differenzierung zur Folge hatte und IL-4 produzierende Basophile Granulozyten in den Lymphknoten lockte. Darüber hinaus zog ROS Unterdrückung eine verstärkte Abgabe des  $T_{H1}$  Initiators IL-12 nach sich [134].

Generell scheint der Einfluss Basophiler Granulozyten auf die  $T_{H2}$  Entwicklung modell- oder gebeabhangig zu sein. Vermutlich kommt ihnen *in vivo*, durch die Ausschüttung großer Mengen IL-4, eine unterstützende Rolle in der  $T_{H2}$  Entwicklung zu.

#### 2.1.2.4 T-Zellreifung und Selektion im Thymus

T-Zellen sind der Dreh- und Angelpunkt des adaptiven Immunsystems. Mit ihrer Sekretion von Zytokinen koordinieren sie die gesamte Körperabwehr. Daher ist es unabdingbar, dass sie nicht durch Gewebe des eigenen Körpers aktiviert werden. Um diese Autoimmunität zu verhindern werden T-Zellen, die auf Eigen-Antigene stark reagieren, während ihrer Entwicklung zerstört. Dieser Selektionsprozess findet im Thymus statt. Lymphoide-Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus [137; 138] und wandeln sich dort, in Abhängigkeit von Notch-1, in T-Zellvorläufer [139; 140]. Jedoch verlassen nur ca. 3-5 % der eingewanderten Zellen den Thymus als naive T-Zellen. Analysen dieses Phänomens zeigten, dass T-Zellen im Thymus einen Selektionsprozess erfahren [141].

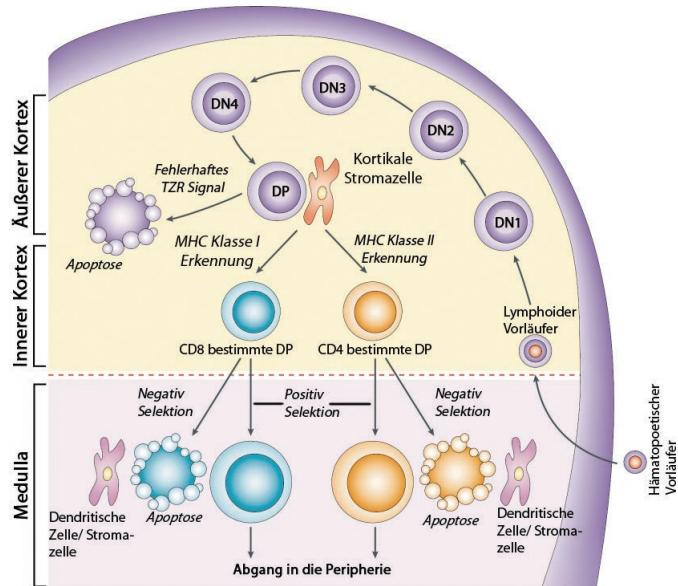


Abbildung 2.4: **T-Zellreifung im Thymus.** Die lymphoide Vorläuferzelle gelangt in den Thymus und durchwandert zunächst den äußeren Kortex. Dort findet man doppelt negative (DN) T-Zellen von Typ 1 bis 4. Es folgt die Positivselektion an kortikalen Stroma-Zellen im inneren Kortex des Thymus über MHC-Moleküle der Klasse I oder II. Wird kein MHC-Molekül erkannt, begibt sich der T-Zellvorläufer in Apoptose. MHC Klasse I Erkennung führt zu  $CD8^+$  T-Zellen, MHC II Erkennung zu  $CD4^+$  T-Zellen. In der Medulla findet die Negativselektion statt. Eigenantigenen wird von Dentritischen und Stroma-Zellen präsentiert. Ist die Affinität der T-Zelle zu hoch, erfolgt der programmierte Zelltod, ist die Affinität ausreichend, verlässt die naive T-Zelle den Thymus in die Peripherie. Abbildung verändert nach Germain *et al.*[142].

Während dieses Auswahlprozesses durchlaufen sie vier erkennbare Phasen (DN 1-4), unterschiedliche Bereiche des Thymus (vergleiche Abbildung 2.4) und exprimieren keinen der beiden T-Zell-

Ko-Rezeptoren (CD4 und CD8). Sie werden deshalb als doppelt negativ (DN) bezeichnet. Die vier Stadien lassen sich anhand der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker unterscheiden [143]. In der doppelt negativen Phase erfolgt über Zwischenschritte die Herstellung und Expression des T-Zell-Rezeptors [144; 145; 146]. Die so gebildeten Zellen exprimieren zunächst sowohl CD4 als auch CD8 [147]. Erkennt eine Zelle ein MHC-Molekül der Klasse I, wird sie zu einer CD8<sup>+</sup> T-Zelle, erkennt sie MHC-Moleküle der Klasse II, wird sie eine CD4<sup>+</sup> T-Zelle [148; 149; 150; 151; 152]. Die so entstehenden T-Zellen unterliegen der sog. MHC-Restriktion, d.h. sie können nur Antigene in Kombination mit einem MHC-Molekül erkennen [153; 154].

Ist eine T-Zelle nicht in der Lage, einen TZR herzustellen, der MHC und Eigenpeptid erkennt, erhält sie kein Überlebenssignal über ihren TZR und versetzt sich selbst in Apoptose. Ist das Aktivierungssignal nach MHC-Kontakt zu stark, erfolgt ebenfalls die Deletion der betroffenen Zelle. Die Erkennung von Eigenpeptid und MHC wird als Positivselektion bezeichnet [155; 156; 157]. Durch die Positivselektion ist jedoch auch jede T-Zelle potentiell autoreaktiv, da sie auf die Bindung mit einem MHC-Molekül reagiert.

Nach erfolgreicher Positivselektion muss die T-Zelle die Negativselektion durchwandern. Hierbei wird der T-Zelle eine Großzahl von Eigenpeptiden präsentiert, auf die sie nicht reagieren darf [158; 159]. Zwei Zelltypen präsentieren Antigene an die zu selektionierenden T-Zellen, zum einen Stromal-Zellen des Thymus, zum anderen aus dem Knochenmark stammende APZs [160; 161]. Beide Zelltypen exprimieren den TF „AIRE“ (Autoimmun Regulator) und sind daher in der Lage eine Vielzahl von im Körper vorkommenden gewebespezifischen Proteinen zu synthetisieren und zu präsentieren [162; 163; 164]. Auch bei dieser Selektion entscheidet die Reaktionsstärke der T-Zelle, ob sie deletiert wird oder den Thymus als naive T-Zelle verlassen kann. Ein zu starker Aktivierungsreiz führt zur Apoptose der Zelle [165; 166; 167].

Während dieses Reifungsprozesses durchwandern die entstehenden T-Zellen verschiedene Bereiche des Thymus und verlassen ihn zum Schluss als naive T-Zellen in die Peripherie und entwickeln sich dort zu Effektor-T-Zellen, falls sie auf ihr Antigen treffen.

## 2.2 T-Zellhomeostase

Die T-Zellhomeostase stellt sicher, dass das adaptive Immunsystem immer über einen genügend großen Pool an T-Zellen verfügt. Im Falle einer Infektion kann die Zahl der T-Zellen um den Faktor 1000 ansteigen. Nach erfolgreicher Abwehr sterben etwa 90 % dieser Zellen, ca. 10 % überleben als Gedächtnis-T-Zellen [168; 169]. Wie man aus *in vivo* Experimenten weiß, leben T-Zellen in der Peripherie relativ lange (Monate bis hin zu Jahren). Jedoch teilen sich nur 20 % der naiven T-Zellen [170; 171]. Das Überleben und die Proliferation sind abhängig vom Kontakt zwischen Eigen-MHC und dem TZR [172; 173; 174]. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die homeostatische Proliferation von naiven T-Zellen bei gesunden Individuen keine größere

Rolle spielt, da sie nicht ausreicht, um den T-Zell Pool wieder aufzufüllen. Die über das Leben anhaltende Restaktivität des Thymus ist hierfür ausreichend [175; 176].

Allerdings ist von Mäusen mit Lymphopenie (Mangel an Lymphozyten) bekannt, dass es bei Injektion naiver syngener T-Zellen zu einer spontanen homeostatischen Proliferation dieser Spenderzellen kommt [177; 178]. Die zu beobachtende Zellteilung ist nicht so rasant, wie es bei einer Stimulation mit Fremdantigen zu beobachten ist [179]. Es handelt sich dabei also um einen Prozess, der eine „freie Nische“ wieder mit T-Zellen füllt, um eine Lücke zu schließen [180].

Neben MHC-TZR-Kontakt spielen eine Reihe von Zytokinen eine Rolle in der T-Zellhomeostase und der homeostatischen Proliferation, insbesondere die sog. gemeinen gamma ( $\gamma$ )-Ketten Zytokine. Zu diesen gehören IL-2, -4, -7, -9 und -15. Alle Rezeptoren der genannten Zytokine besitzen eine gemeinsame  $\gamma$ -Kette.

Insbesondere IL-7 und IL-15 zeigen Effekte in der Homeostase von T-Zellen [181; 182; 183; 184]. Von HIV Patienten ist bekannt, dass mit sinkender CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl ein steigender IL-7 Spiegel einher geht [185]. Jedoch konnte auch IL-4 und IL-6 ein Einfluss auf die T-Zellhomeostase nachgewiesen werden, zwei Zytokine, die auch von Basophilen Granulozyten produziert werden [186; 187; 183; 182].

Obwohl die Homeostatische Proliferation in einem gesunden Organismus ein geringe Rolle spielt, ist sie im Rahmen einer Erkrankung, bei der es zu einem T-Zellverlust kommt, durchaus von Bedeutung. Bei Erkrankungen kann eine „T-Zell entleerte Nische“ entstehen, die wieder gefüllt werden muss [188; 180].

## 2.3 Graft-versus-Host-Disease

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist häufig die einzige Möglichkeit zur Heilung einer Leukämie und anderer hämatologischer Erkrankungen. Die Ausbildung einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD, deutsch: Transplantat-Wirt-Reaktion) limitiert die Erfolgsaussichten einer solchen Therapie jedoch, da 15-20 % der Patienten an dieser versterben [189].

Grundsätzlich handelt es sich bei einer GvHD um eine normale Reaktion von T-Zellen auf körperfremde Epitope. Wie zuvor beschrieben, werden T-Zellen im Thymus anhand ihrer Fähigkeit MHC-Moleküle zu erkennen und zu binden, selektiert (siehe Kapitel 2.1.2.4). Jedoch befinden sich die Spenderzellen nicht mehr in der Umgebung, in der sie selektiert wurden. Daher wird eine Großzahl von harmlosen Empfänger-Epitopen, oder bei einer direkten Alloreaktion die MHC-Moleküle des Empfängers, als fremd erkannt und eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Die Zerstörung der Gewebe des Empfängers ist die Folge. Jedoch ist die GvHD oder besser der mit ihr einhergehende sog. Graft-versus-Leukemia Effekt gewollt, da durch diesen maligne Zellen zerstört werden, die die Chemo- und/oder Strahlentherapie nicht erreicht hat.

Erstmals beschrieben wurde die GvHD 1956 von Barnes *et al.*. Sie stellten fest, dass letal bestrahlte CBA/H Mäuse nach der Gabe von C<sub>3</sub>H/A Knochenmark innerhalb von ein bis zwei Monaten verstarben. Heute ist bekannt, dass es sich bei diesem Versuch um eine vollständige MHC-Fehlpaarung handelte. Symptomatisch fielen die erkrankten Tiere durch starke Gewichtsabnahme und Durchfall auf [190]. Später wurde dieser Zustand nach allogener Knochenmarkstransplantation zunächst als „secondary disease“ (sekundär Erkrankung) bezeichnet [191; 192]. 1966 definierten Billingham *et al.* diese als Erkrankung, die auftritt, wenn immunkompetente allogene Donorzellen die Gewebe eines immunsuprierten Empfängers angreifen und prägte den Begriff GvHD [193]. Klinisch werden die akute und chronische GvHD unterschieden. Die akute GvHD zeichnet sich durch sehr starke inflammatorische, die chronische durch autoimmunartige und fibrotisierende Prozesse aus [194].

Der starke Polymorphismus der MHC-Gene [54] und die daraus resultierende phänotypische Varianz der MHC-Moleküle sind bei der Spender-Empfänger-Wahl zu beachten, da die Schwere der GvHD von der passenden MHC-Paarung abhängig ist. Bei inkorrektener MHC-Paarung hat der Spender nicht die gleichen MHC-Subtypen wie der Empfänger. In der Folge werden Spender-T-Zellen alleine durch den Kontakt mit einem Empfänger MHC-Molekül, unabhängig vom präsentierten Antigen, aktiviert (direkte Alloreaktivität) [195; 196; 197]. Bei einer korrekten MHC-Paarung tritt dieses Problem nicht auf. Allerdings kann sich auch in diesem Fall eine GvHD entwickeln, die auf sog. minoren Histokompatibilitätsantigenen (minor histocompatibility antigens - miHA) beruht [198; 196].

### 2.3.1 GvHD und MHC-Subtypen

Bei der korrekten Paarung stimmen die MHC-Subtypen von Spender und Empfänger überein. Jedoch kann sich auch in diesem Fall auf Grund von miHA eine GvHD entwickeln [199]. Durch die passende MHC-Paarung sind die Donor-T-Zellen nun in der Lage, Epitope auf dem MHC-Molekül zu erkennen; sie werden nicht durch MHC-Kontakt alleine aktiviert. Die miHA entstehen durch den Polymorphismus von Genen bzw. deren Proteinen. Diese können in allen Menschen die gleiche Funktion erfüllen, sich jedoch in ihrer Aminosäuresequenzen unterscheiden. So vermag ein Protein, das sowohl im Spender als auch Empfänger exprimiert wird, als miHA dienen, da es unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen kann. Somit können aus diesem Protein im Empfänger nicht die gleichen Epitope generiert werden wie im Spender, so dass die Donor-T-Zellen von diesen aktiviert werden. Auch geschlechtsspezifische Proteine können so als miHA wirken [200; 201].

Die Varianz innerhalb dieser miHA ist groß. So unterscheidet sich das Gen SMCY (männliche Form einer Zinkfinger-Domäne in Proteinen) in 200 Aminosäuren von der weiblichen Form des Gens SMCX [201]. Im anderen Extrem variieren die miHA nur in einer einzigen Aminosäure, wie im Fall der humanen Hemagglutinin-1 und Hemagglutinin-2 Moleküle [202]. Da die Expression der miHA gewebsspezifisch ist, kann ein Organ von der GvHD überproportional stark betroffen sein.

Allerdings werden die meisten GvHD-verursachenden miHA von sehr vielen Geweben exprimiert, im Besonderen auf allen hämatopoetischen Zellen [203].

Andererseits lösen nicht alle miHA eine GvHD aus, auch die Stärke der GvHD variiert. Wie aus Mausversuchen bekannt ist, reicht ein Unterschied in einem einzigen miHA nicht aus, um eine GvHD auszulösen, selbst wenn dieses immundominant ist, also bei einer Vaccinierung mit diesem Protein eine starke Immunreaktion mit T-Zellgedächtnis auslöst [204].

Die vollkommene MHC-Fehlpaarung kommt heute nicht mehr vor, jedoch ist es auf Grund der extrem hohen Variabilität des MHC-Gen-Lokus unmöglich, für jeden Empfänger den vollkommenen passenden Spender zu finden [205]. Es ist bekannt, dass Fehlpaarungen im MHC I das Anwachsen der Donorzellen beeinflussen, jedoch keinen Einfluss auf die Stärke der GvHD haben. Bei Abweichungen im MHC II-Molekül hingegen verhält es sich umgekehrt [206; 207]. Da die GvHD, aber vor allem die mit ihr verbundene Graft-versus-Leukaemia Reaktion (GvL, Spender-Leukämie-Reaktion), bei der die Zellen des Spenders residuale Leukämiezellen zerstören und so die Wahrscheinlichkeit eines Rückfall verringern, erwünscht ist, wird bei der Spendersuche eher ein Unterschied in MHC Klasse II-Molekülen in Kauf genommen. Die Rückfallwahrscheinlichkeit ist für Patienten am Geringsten, die sowohl eine akute als auch eine chronische GvHD durchlebt haben (siehe Abbildung 2.5) [208].

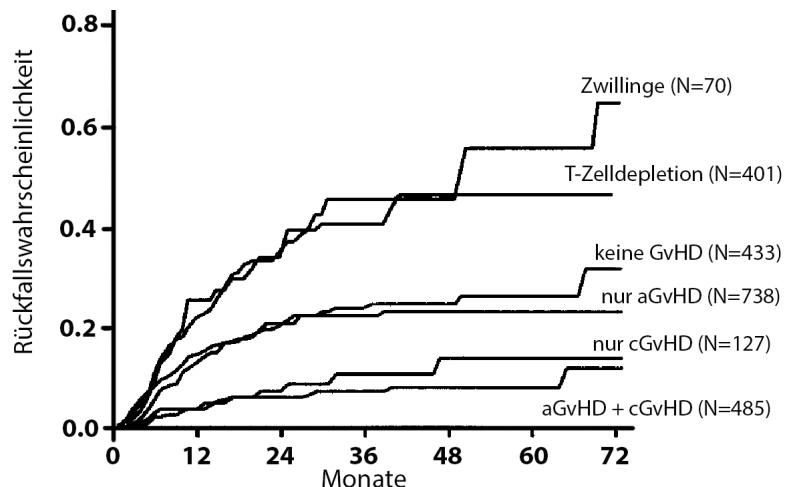


Abbildung 2.5: **Leukämie-Rückfallsrate über die Zeit nach allogenem oder syngenem Stammzelltransfer.** Patienten mit akuter und chronischer GvHD (aGvHD + cGvHD) haben die geringste Rückfallrate. Sie ist höher bei Patienten die keine GvHD entwickeln. Patienten, die eine T-Zelldepletierte Spende oder eine Spende, von ihrem eineiigen Zwilligen erhalten haben, ist die Rückfallsrate am höchsten. Abbildung verändert nach Horowitz *et al.* [208].

### 2.3.2 Akute GvHD

Die Haupteffektor-Zellen einer GvHD sind Donor T-Zellen. Dieses konnte von Kernan *et al.* und Korngold *et al.* gezeigt werden. So entwickelt sich keine GvHD, wenn T-Zellen aus der Spende

entfernt werden. Wird jedoch die T-Zellzahl erhöht, verstärkt sich auch die Intensität der GvHD [209; 210].

Die akute GvHD lässt sich in drei Phasen einteilen [211; 212; 198; 213]. Die erste Phase besteht aus der Behandlung des Patienten mit Chemo- und / oder Strahlentherapie, um die Anzahl maligner Zellen zu reduzieren und den Empfänger auf die Spende vorzubereiten. Bei Ausbleiben dieser Konditionierung würde das Immunsystems des Empfängers die Spende abwehren.

Die Konditionierung verursacht Gewebsschäden, vor allem im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) und führt so zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und PAMPs. Chemokine regen die Migration von Makrophagen, Monozyten, Dendritischen Zellen, Neutrophilen sowie NK Zellen zu dem Ort der Schäden an. Zytokine und PAMPs aktivieren Zellen über Zytokinrezeptoren und TLRs. APZ reagieren auf diese Gefahrensignale mit der verstärkten Expression von Adhäsions-, ko-stimmulatorischen-, MHC-Molekülen und der Sekretion von großen Mengen proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) [214]. Sowohl aus Tierversuchen als auch vom Menschen ist bekannt, dass die Stärke der Vorbereitungsprozedur direkt proportional zur Stärke der entstehenden Schäden und somit der zu erwartenden GvHD ist [215; 216; 217].

Nach Erhalt der Zellspende beginnt die zweite Phase der GvHD. Die in der Spende enthaltenen, zum Teil alloreaktiven T-Zellen wandern in die lymphatischen Organe und werden dort von den „voraktivierten“ APZs des Empfängers aktiviert. Die Spender T-Zellen proliferieren und sezernieren selbst proinflammatorische Zytokine (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-12 etc.). Dieser Zustand wird als „Zytokininsturm“ bezeichnet [194].

Anderson *et al.* konnten zeigen, dass eine GvHD nur durch naive T-Zellen ausgelöst wird. Gedächtnis T-Zellen waren hierzu nicht in der Lage [218; 219; 220].

Auf Grund der zeitlichen Abläufe und dem Beginn einer GvHD ist man davon ausgegangen, dass vor allem DZ des Empfängers die Spender T-Zellen stimulieren, da zum Zeitpunkt, zu dem das erste Mal GvHD-Symptome auftreten, sich noch nicht genügend Spender DZ/APZ gebildet haben können [221; 222]. Darüber hinaus konnten Koyama *et al.* mit Hilfe einer Maus, die einen transgenen T-Zellrezeptor exprimiert, der nur in der Lage ist, ein aus dem MHC II I-A $^b$  generiertes Peptid zu erkennen, zeigen, dass DZ des Empfängers, CD4 $^+$  T-Zellen des Spenders ca. 1000 mal potenter über MHC II stimulieren, als Donor-DZ. Jedoch zeigten sie in der gleichen Veröffentlichung auch, dass DZ nicht nötig sind, um eine letale GvHD auszulösen. Myofibroblasten im GI-Trakt des Empfängers, die als APZ wirken, reichten aus, um eine tödliche GvHD zu induzieren [223]. Zuvor war bekannt, dass ohne Peyer-Plaques sich nur eine stark abgeschwächte GvHD entwickelt [224]. Im Jahr 2012 bestätigte eine andere Arbeitsgruppe diese Ergebnisse. Obwohl sie Empfänger DZ, pDZ sowie B-Zellen depletiert hatten, entwickelte sich noch immer eine letale GvHD [225].

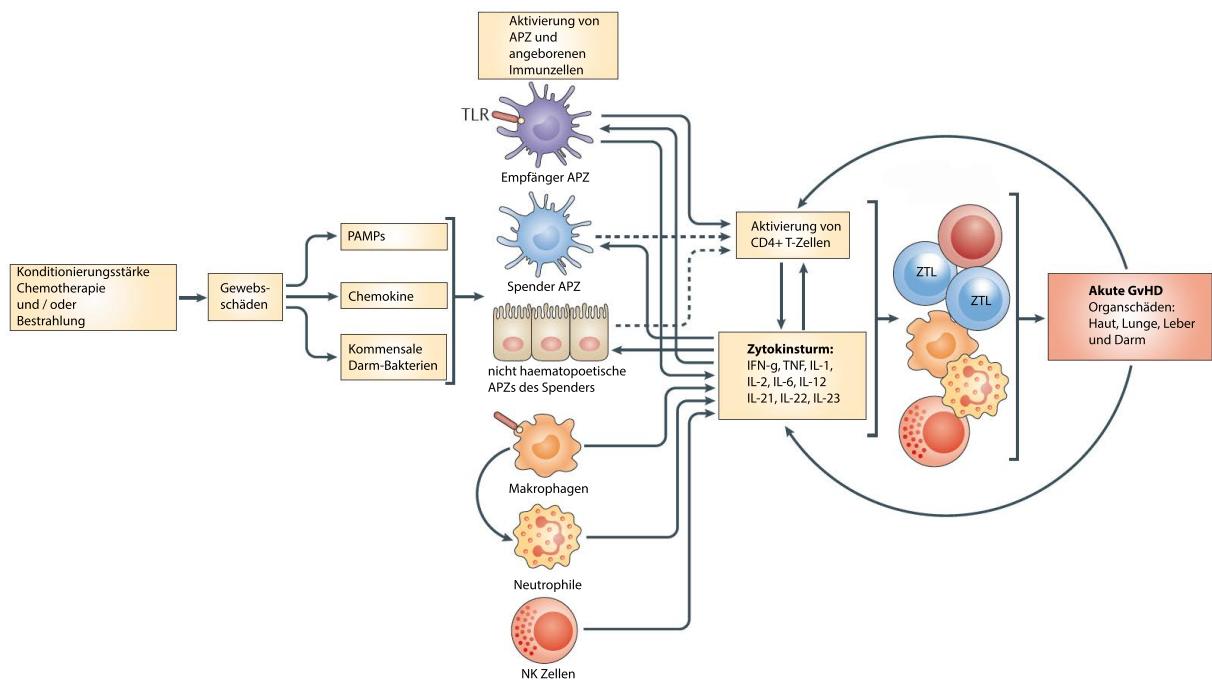


Abbildung 2.6: **Kaskade einer akuten GvHD.** Durch die Konditionierung des Patienten durch Chemo- und/oder Strahlentherapie entstehen Gewebsschäden. Diese führen zur Freisetzung von PAMPs (Pathogen assoziierte molecular Patterns), Chemokinen und kommensalen Bakterien aus dem Darm. Diese Reize führen zur Aktivierung diverser APZ (Antigenpräsentierende Zellen) und zur Migration von NK-Zellen, Neutrophilen und DZ zum Ort der Gewebsschäden aus. Die APZ sezernieren Zytokine und aktivieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Auch die T-Zellen schütten Zytokine aus; der sog. Zytokinsturm entsteht, der die systemische Aktivierung zytotoxischer Zellen zur Folge hat, die Gewebsschäden verursachen. Abbildung verändert nach Blazar *et al.* [194].

Der Zytokinsturm löst die dritte Phase der GvHD aus. Durch diesen wird eine Großzahl von zytotoxischen Zellen aktiviert, die Empfängergewebe angreifen und so zu den Symptomen der GvHD führen. Abbildung 2.6 zeigt den schematischen Ablauf einer akuten GvHD.

Im Zusammenhang mit den Schäden der GvHD wurde vor allem T<sub>H</sub>1 benannt, da T<sub>H</sub>1-Zellen INF- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ , - $\beta$  ausschütten, was zu einer verstärkten zellulären Immunantwort führt (siehe Kapitel 2.1.2.2). So konnten Allen *et al.* und andere Arbeitsgruppen zeigen, dass in Mausmodellen für die akute GvHD T<sub>H</sub>1 Zytokine, in Modellen für die chronische GvHD T<sub>H</sub>2 Zytokine, dominieren [226; 227; 228].

Jedoch ist dieses Modell wohl zu einfach, da eine Reihe von verschiedenen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Knockout-Studien (KO) gezeigt haben, dass beide T-Zellsubtypen sowohl positive als auch negative Eigenschaften haben. So führt der Transfer von IL-4<sup>-/-</sup> T-Zellen in einem GvHD Versuch zu einem schwächeren Verlauf der GvHD, der vollständige KO aller T<sub>H</sub>2 Zytokine zu einer extrem ausgeprägten GvHD [229; 230; 231].

Das Ausschalten des T<sub>H</sub>1 „Induktionszytokins“ IFN- $\gamma$  hatte ebenfalls eine besonders schwere GvHD zur Folge, mit einer starker Beteiligung der Lunge [229; 232; 233]. Der KO des IFN- $\gamma$

Rezeptors hingegen hatte einen positiven Effekt auf die GvHD. So konnten Choi *et al.* zeigen, dass über IFN- $\gamma$  Bindung auf T-Zellen die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 gesteuert wird. Ohne diesen ist es den T-Zellen nicht möglich, in den GI-Trakt einzuwandern. Daher blieb die GvHD beinahe vollständig aus [232]. Eine Reihe von Versuchen konnte den positiven Effekt von IFN- $\gamma$  belegen. 1998 zeigten Yang *et al.*, dass Injektionen mit IL-12 zu einer Ausschüttung von IFN- $\gamma$  durch Donorzellen führte, welche die Effekte der GvHD beinahe aufhoben [234]. 2012 bewies Koenecke *et al.*, dass dieses IFN- $\gamma$  von allogenen Foxp3 $^{+}$  regulatorischen T-Zellen stammt [235].

Beinahe alle beschriebene Effekte bezüglich der Verschlechterung einer GvHD nach T<sub>H</sub>1/2 Zytokin- oder Mastergenschalter KO lassen sich nach heutigem Erkenntnisstand auf T<sub>H</sub>17 Zellen und IL-17 zurückführen [232; 233; 235; 230]. Sowohl IL-4 als auch IFN- $\gamma$  unterdrücken die Ausreifung von T<sub>H</sub>17-Zellen [109; 108]. T<sub>H</sub>17-Zellen spielen eine immer größere Rolle in der GvHD. Histologische Symptome der Haut und Lunge bei Mäusen lassen sich auf T<sub>H</sub>17 Zellen zurückführen [236]. Kappel *et al.* zeigte, dass IL-17 $^{-/-}$  T-Zellen zu einer verzögerten Ausbildung der GvHD führten und weniger IFN- $\gamma$  im Plasma dieser Mäuse zu finden ist. Im Vergleich zu Wildtyp (Wt) T-Zellen bleibt die Letalität der GvHD aber unbeeinflusst [237]. Yi *et al.* bestätigten und erweiterten diese Ergebnisse. Der Mangel an IL-17 er vermehrten Generierung von T<sub>H</sub>1 Zellen, was zu einer stärkeren Ausprägung der GvHD beiträgt [238].

Der vollständige KO des Masterregulatorgens für T<sub>H</sub>17-Zellen (RORC) führte zu einer Verbesserung der GvHD [239]. Generell scheinen der Zeitpunkt, zu dem bestimmte Zytokine vorhanden sind und [240; 241] und das Zusammenspiel aller T<sub>H</sub>-Subtypen wichtig zu sein. Die auf IL-17 beruhenden Untersuchungsergebnisse scheinen die T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Theorie wieder zu unterstützen, was einen interessanten Angriffspunkt für Basophile Granulozyten und der durch sie verursachten T<sub>H</sub>2 Entwicklung bietet.

### 2.3.3 GvHD Prophylaxe und Therapie

Den größten Einfluss auf das Auftreten einer GvHD nach Transplantation der hämatopoetischen Stammzellen, haben Unterschiede im HLA (human lymphocyte antigen, humanes Lymphozyten Antigen) der humanen Form der MHC-Moleküle. Daher ist die HLA-Typisierung der erste Schritt einer erfolgreichen GvHD-Therapie.

Da die Stärke der Konditionierung (Chemo- und oder Strahlentherapie) und der mit ihr verbundenen Gewebeschäden direkt proportional zur entstehenden GvHD ist [242; 215], wird dies als weiterer Ansatzpunkt einer GvHD-Prophylaxe verwendet. So werden Patienten nicht mehr vollständig myoablativ (Zerstörung der hämatopoetischen Stamm- und Krebszellen des Empfängers) behandelt. Es wurden sogar Konditionierungen entwickelt, die auf Myablation verzichten. Dieses Vorgehen senkte die GvHD-Rate nur mäßig im Vergleich zu vollständig myablativen Protokollen [243]. Jedoch öffneten diese Dosis-reduzierten Protokolle, wegen der verminderten Anstrengung

für den Empfänger, die hämatopoetische Stammzelltransplantation für ältere Patienten, die zuvor nicht behandelt werden konnten.

Um die Abstoßung der Spende und die Reaktion der Spender-T-Zellen (siehe Abschnitt 2.3.2) zu reduzieren, beinhaltet jede GvHD-Therapie auch eine immunsuppressive Komponente. Diese erfolgt durch Verabreichung des Calcineurininhibitors Cyklosporin A (CSA), kombiniert mit niedrig dosiertem Methotrexat (MTX). CSA sorgt für eine verminderte Synthese des T-Zellproliferation anregenden Zytokins IL-2 [244]. MTX unterdrückt die DNA-Synthese und hemmt so Zellteilung generell [245]. Die Behandlung mit Immunsuppressiva erhöht jedoch das Infektionsrisiko des Patienten und führt zu zusätzlichen Gewebsschäden, vor allem in der Leber (durch Abbauprodukte dieser Medikamente), was eine Senkung der Lebensqualität zur Folge hat [246].

Kommt es zu einer akuten GvHD, so sind hochdosierte anti-inflammatorisch wirkende Kortikosteroide das Mittel der Wahl. Auch sie reduzieren die Produktion von IL-2, was eine Verminde-  
rung der T-Zellproliferation zur Folge hat. Darüber hinaus induziert ein Mangel an IL-2 Apoptose in T-Zellen.

### 3 Fragestellung

Basophile Granulozyten wurden zunächst als reine Effektorzellpopulation charakterisiert, die bei der Entstehung von Asthma bronchiale, Allergien und bei der Bekämpfung von Parasiten eine Rolle spielen. Jedoch rückte die Fähigkeit Basophiler Granulozyten, Antigen über IgE an ihrer Oberfläche zu präsentieren und große Mengen IL-4 und -6 zu sezernieren, in den Fokus der Forschung. Diese Zytokinsekretion wies Basophilen Granulozyten auch eine immunregulatorische Rolle zu. So wurde zunächst postuliert, dass Basophile Granulozyten durch ihre Ausschüttung von IL-4 der Zelltyp ist, der für die Entwicklung von  $T_{H2}$ -Zellen sorgt. Spätere Ergebnisse zeigten, dass Basophile Granulozyten in der  $T_{H2}$  Entwicklung unterstützend wirken.

Ziel dieser Arbeit war es, regulatorische Eigenschaften Basophiler Granulozyten auf  $CD4^+$  T-Zellen zu untersuchen. Hierzu analysierten wir den Einfluss Basophiler Granulozyten auf die sog. autologe  $CD4^+$  T-Zellproliferation, das *in vitro* Modell der mixed lymphocytic reaction (MLR) und auf ein *in vivo* Modell der akuten GvHD.

## 4 Material

### 4.1 Laborgeräte

Tabelle 4.1: Laborgeräte 1

Gerät	Bezugsquelle
ABI PRISM HT 7900 detection system	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Bestrahlungseinheit, Gammacell®40 Exactor	Best Thratromics, Welwyn Garden City, England
Bestrahlungskäfig (Maus)	Werkstatt für Feinmechanik der Universi- tät Regensburg
Brutschränke BBD 6220	Thermo Scientific, Heidelberg
Operationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Digitalkamera AxioCam MRc 5	Zeiss, Jena
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSaria II	BD Buiscience, Heidlerberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Injektionskammer (Maus)	Werkstatt für Feinmechanik der Universi- tät Regensburg
Infinite 200 PRO precision microplate reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Linarbeschleuniger Primus 2	Siemens, Kemnath
Magnet Octo-, QuadroMACS Separator, Multi- Stand	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Pipetten (P10, P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Bad Camberg
Pipetten (Mehrkanalpipette)	Brand, Wertheim
Pipetten (Multipette plus)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	ISB Integra Biosciences, Chur, Schweiz

Tabelle 4.2: Laborgeräte 1.1

Gerät	Bezugsquelle
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 16 R)	Thermo Scientific, Hanau

## 4.2 Gebrauchsfertige Kits

Tabelle 4.3: Gebrauchsfertige Kits

Kit	Bezugsquelle
DuoSet ELISA-Kit (Maus)	R&D Systems, Minneapolis, USA
OptEIA ELISA-Kit (Maus)	BD Biosciences, San Jose, USA
ELISA MAX <sup>TM</sup> (Maus)	BioLegend, Fell
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD	BioLegend, Fell

## 4.3 Zellkultur-Mediums-Zusätze

Tabelle 4.4: Zellkultur-Mediums-Zusätze

Zellzusätze	Bezugsquelle
$\beta$ -Mercaptoethanol 14,3 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS Gold, hitzeinaktiviert 1 h, 56 °C)	PAA, Cölte
Natriumpyruvat, Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), Penicillin, Streptomycin, RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

## 4.4 Glas- und Plastikwaren

Tabelle 4.5: Glas- und Plastikwaren 1

Gegenstand	Bezugsquelle
Einmalskalpell (No.10; No.11)	Pfm, Köln
Einmalspritzen (1 mL, 2 mL, 10 mL)	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Platte Maxisorb S96	Nunc, Roskilde, Dänemark
Heparinisierte Glaskapillaren	Brand, Wertheim
Kanülen BD Microlance 3 (27Gx3/4", 26Gx1/2")	BD Biosciences, Heidelberg
Neubauer Zell-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nylonsiebe (Cell Strainer 40 µm, 70 µm)	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Nylonsiebe (CellTrics® 35 µm)	Partec, Görlitz
Petrischalen (35x10, 60x15, 100x20mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (mit Filter 100 µl, 1 mL)	Biozym, Oldendorf
Polystyrolrörchen für Durchflusszytometer	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Reaktionsgefässe (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Separationssäulen (MS, LS, LD Columns)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten Flach-/Rundboden 96-Well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenrörchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht;BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich

## 4.5 Chemikalien, Puffer und Reaktionsmedien

Tabelle 4.6: Chemikalien, Puffer und Reaktionsmedien 1

Chemikalie	Bezugsquelle
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Tabletten	(TMB) Sigma Aldrich, Taufkirchen
2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolin)-6-Sulfon- Säurepuffer (ABTS-Puffer 10x), ABTS- Tabletten	Roche, Mannheim
AccuCheck counting beads (Zählpertikel)	Invitrogen, Darmstadt
Ammonium-Chloride-Potassium Erythrozyten-Lysepuffer	(ACK) life technologies <sup>TM</sup> , Darmstadt
Atipamezol (Antisedan®)	Pfizer, Berlin
Bovines Serumalbumin (BSA) (Fraktion V)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Counting beads für die Durchflusszytometrie	Caltag/Invitrogen, Karlsruhe
CytoFix/CytoPerm, Perm/Wash	BD Biosciences, Heidelberg
Cytometer setup & tracking beads (CST)	BD Biosciences, Heidelberg
Dulbeccos phosphate buffered saline (DPBS)	Cambrex, Verviers, Belgien
Ethanol reinst (75 Vol.-%)	J.T. Baker, Griesheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roche Diagnostics, Mannheim
FACSLysing Solution, FACSClean, FACSFlow, FACSRinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fentanyl	DeltaSelect, Pfullingen
Flumazenil	Inresa, Freiburg

Tabelle 4.7: Chemikalien, Puffer und Reaktionsmedien 1.1

Chemikalie	Bezugsquelle
Horse radish peroxidase gekoppeltes Streptavidin (HRP-Streptavidin)	BD Biosciences, Heidelberg
Medetomidin (Domitor®)	Pfizer, Berlin
Midazolam	Ratiopharm, Ulm
Naloxon	Inresa GmbH, Freiburg
Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung), Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	USB, Cleveland, USA
Trypanblaulösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Türk'sche Lösung, Tween 20, Schewfelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), Wasserstoff-peroxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt

## 4.6 Zytokine und Antikörper in der Zellkultur

Tabelle 4.8: Zytokine und Antikörper in der Zellkultur

Kit	Bezugsquelle
Anti-Maus Fc epsilon Receptor I (Fc <sub>ε</sub> RI) purified (Klon MAR-1), Armenian Hamster IgG Iso-type Control purified (Klon eBio299Arm)	eBioscience, Frankfurt a.M.
Anti-Maus IL-4 (Klon 30340)	R&D Systems Minneapolis, USA
Anti-Maus IL-6 (Klon MP5-20F3)	R&D Systems Minneapolis, USA
Rekombinantes Maus IL-4	PeproTech, Hamburg
Rekombinantes Maus IL-6	PeproTech, Hamburg

## 4.7 Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Zellkulturmedien

Tabelle 4.9: Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Zellkulturmedient

Kit	Lösung	Inhaltsstoffe
<b>ELISA (OptEIA)</b>		
	Block- und Verdünnungspuffer	10 Vol.-% FKS in 1x PBS
	Coating-Puffer (pH 9,5)	0,1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O (pH 9.5)
	ELISA-Substrat-Lösung	TMB Substrate Reagent Set (BioLegend, Fell)
	Waschpuffer	0,05 Vol.-% Tween 20 in 1x PBS
<b>ELISA (DouSet)</b>		
	Block- und Verdünnungspuffer	1 Gew.-% BSA in 1x PBS
	Coating-Puffer (pH 9,5)	1x PBS
	ELISA-Substrat-Lösung	TMB Substrate Reagent Set (BioLegend, Fell)
<b>Zellisolation</b>		
	MACS-Puffer	2 mM EDTA; 0,5 Gew.-% BSA in 1x PBS
	10-fach PBS	1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl <sub>2</sub> in Aqua dest
<b>Zellkultur</b>		
	MLR-Medium	100 U/mL Penicillin; 100 g/mL Streptomycin; 1 mM Natriumpyruvat; 0,1 mM MEM-NEAA; 0,1 M β-Mercaptoethanol; 20 mM HEPES in RPMI 1640
	RPMI Minimalmedium	10 Vol.-% FKS (hitzeinaktiviert) in RPMI 1640

## 4.8 Verwendete FACS- und Depletions-Antikörper

Tabelle 4.10: Verwendete Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD3	Fitc	145-2C11	BD, Heidelberg
CD3	APC	1F4	BD, Heidelberg
CD3	PE-Cy7	eBio500A2	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD4	BD Horizon V500	RM4-5	BD, Heidelberg
CD4	PE-Cy7	GK1.5	BioLegend, Fell
CD8	APC-Cy7	53-6.7	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD11c	APC	HL-3	BD, Heidelberg
CD19	PerCP-Cy5.5	eBio1D3	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD19	PerCP-Cy5.5	eBio1D3	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD25	PE	PC61	BD, Heidelberg
CD25	APC	PC61.5	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD45	FITC	30-F11	BD, Heidelberg
CD49b	eFluor450	DX5	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD49b	PE	DX5	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD117	APC	2B8	BioLegend, Fell
IgG Isotyp control	NA/LE	eBio299Arm	eBioscience, Frankfurt a.M.
Fc <sub>ε</sub> RI	APC	Mar-1	eBioscience, Frankfurt a.M.
Fc <sub>ε</sub> RI	NA/LE	Mar-1	eBioscience, Frankfurt a.M.
Foxp3	PE	150D/E4	eBioscience, Frankfurt a.M.
GR-1	APC	RB6-8c5	eBioscience, Frankfurt a.M.
IgE	PE	RME-1	BD, Heidelberg
IL-2	PE	JES6-5H4	BD, Heidelberg
IL-4	PE-Cy7	11B11	BioLegend, Fell
IL-17	PerCP-Cy5.5	eBio17B7	eBioscience, Frankfurt a.M.
IFN-g	FITC	XMG1.2	BD, Heidelberg
NK 1.1	APC	PK136	BioLegend, Fell

## 4.9 Verwendete Software

Tabelle 4.11: Verwendete Software

Programm	Hersteller
CellQuestPro v3.1	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Diva v6.3.1	BD Bioscience, Heidelberg
FlowJo v10	Tree Star, inc., Ashland, OR, USA
GraphPad Prism®6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
i-control™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
SoftMax 2.31	MDS Analytical Technologies, Ismaning

## 5 Methoden

### 5.1 *In vitro* Techniken

#### 5.1.1 Organaufbereitung

Die aus der Maus entnommene Milz wurde in zwei bis drei Teile geschnitten und mit dem Stempel einer 2 mL-Spritze durch ein 70  $\mu\text{m}$  (Cellstrainer) Nylonsieb in eine mit RPMI-Minimalmedium befüllte Petrischale (60·15 mm) gedrückt. Das Sieb und der Spritzenstempel wurden mit zusammen 2 mL Medium gespült, die Milzsuspension im Abschluss in ein 15 mL Zentrifugen-Röhrchen überführt, zentrifugiert und nochmals durch ein 30  $\mu\text{m}$  Sieb gefiltert. Lymphknoten wurden unzerteilt durch ein 40  $\mu\text{m}$  Nylonsieb gerieben und zentrifugiert. Falls nur eine FACS-Analyse durchgeführt werden sollte, wurde die Lymphknoten-Suspension nach der Zentrifugation direkt über ein 30  $\mu\text{m}$  Sieb in FACS-Rörchen gefiltert. Alle Zellsuspensionen wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

#### 5.1.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension: Knochenmark

Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden die beiden Hinterläufe der toten Maus entfernt, deren Füße abgetrennt, und Tibia und Femur mit Hilfe eines Skalpells (No.10) von Gewebe befreit. Bei steriler Präparation des Knochenmarks wurden die Epiphysen der beiden Knochen abgetrennt und das Knochenmark mit einer mit RPMI-Minimalmedium befüllten 10 mL Spritze (27Gx3/4"Kanüle) aus dem Knochen in eine Petrischale (60·15 mm) gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert, gefiltert und resuspendiert (siehe Kapitel 5.1.1). Bei nicht steriler Präparation von Knochenmarkszellen wurden die von ihren Epiphysen befreiten Knochen in eine 100  $\mu\text{L}$  Pipettenspitze gesteckt, die Pipettenspitze nun durch den Deckel eines 1,5 mL Zentrifugen-Röhrchens gestochen und bei 450  $g$  für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Beschleunigung der Zentrifuge drückt das Knochenmark aus dem Knochen in die mit 100  $\mu\text{L}$  Minimalmedium befüllten 1,5 mL Röhrchen. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert, gefiltert und resuspendiert (siehe Kapitel 5.1.1).

#### 5.1.3 Verarbeitung der gewonnenen Zellsuspension

Um ein Absterben der Zellen in Suspension während der Verarbeitung zu verhindern, wurden stets eisgekühltes RPMI-Minimalmedium oder Puffer verwendet. Nach Zentrifugation der Zell-Suspension (350  $g$ , 7 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 2 bis 5 mL RPMI-Minimalmedium oder Puffer resuspendiert. Die anschließende Filtration über ein 30  $\mu\text{m}$  Nylonsieb (Celltrix) verhinderte den Übertrag von größeren Partikel und Gewebsteilen, wie z.B.

Knochensplitter. Dieses Verfahren wurde bis zu einer Zellmenge von  $1 \cdot 10^7$  Zellen angewendet. Ab  $1 \cdot 10^8$  Zellen wurde die Suspension über ein  $40 \mu\text{m}$  Nylonsieb (Cellstrainer) gegeben. Die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation für die weiteren Bearbeitungsschritte in Medium oder Puffer aufgenommen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei  $4^\circ\text{C}$  auf Eis.

#### 5.1.4 Zellzählung

Um die Anzahl von lebenden Zellen in einer Lösung zu bestimmen wurde Trypanblau eingesetzt. Dieser Farbstoff färbt tote Zellen blau an, da diese nicht mehr in der Lage sind ihn aus dem Zellinneren zu transportieren. Ein Teil der Zellsuspension wurde abgenommen und mit Trypanblau verdünnt. Von dieser Mischung wurden  $10 \mu\text{L}$  in eine Neubauer Zählkammer (Abbildung 5.1) gegeben und in allen vier Quadranten (grau unterlegt) der Kammer ungefärbte Zellen gezählt.

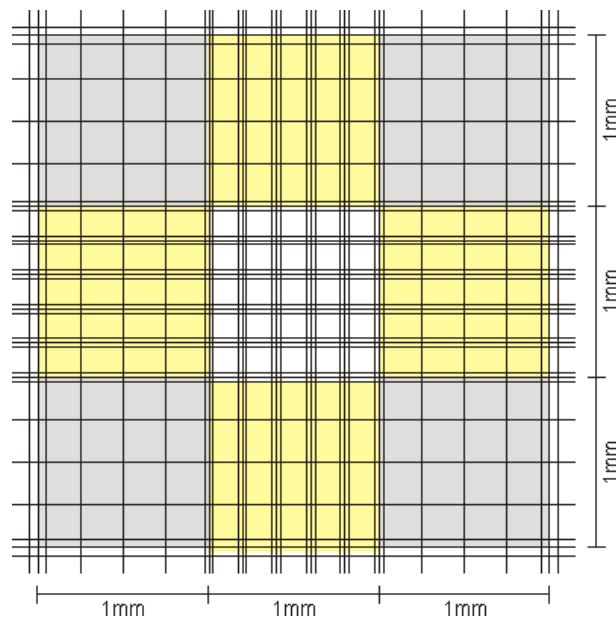


Abbildung 5.1: **Aufbau einer Neubauerzählkammer.** Die zuzählenden Felder sind grau unterlegt.

Die Zellzahl pro Milliliter (mL) ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen / mL} = \left( \frac{\text{Summe aller gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \right) \cdot (10^4) \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### 5.1.5 Magnetische Zellseparation

1990 publizierte Stefan Miltenyi die Aufreinigung verschiedener Zelltypen aus einem Zellgemisch mittels magnetischer Zellseparation (MACS, Magnetic Activated Cell Sorting) [247]. Bei dieser Technik werden Zellen mit Antikörpern markiert, die mit einem metallischen Mikropartikel (Microbeads, Durchmesser ca.  $70 \mu\text{m}$ ) versehen sind. Die so behandelten Zellen werden in Suspension über eine, in einem Magnetfeld platzierte Säule gegeben. Die in der Säule befindliche Matrix aus Metallkugeln überträgt das Magnetfeld und hält so die mit Microbeads gekennzeichneten Zellen

in der Säule fest. Durch mehrfache Spülung der Säule mit MACS-Puffer werden nicht markierte Zellen aus der Säule entfernt und der gewünschte Zelltyp angereichert. Nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld können die aufgereinigten Zellen mit einem Stempel und MACS-Puffer aus der Säule gedrückt werden (positiv Selektion)(siehe Abbildung 5.2).

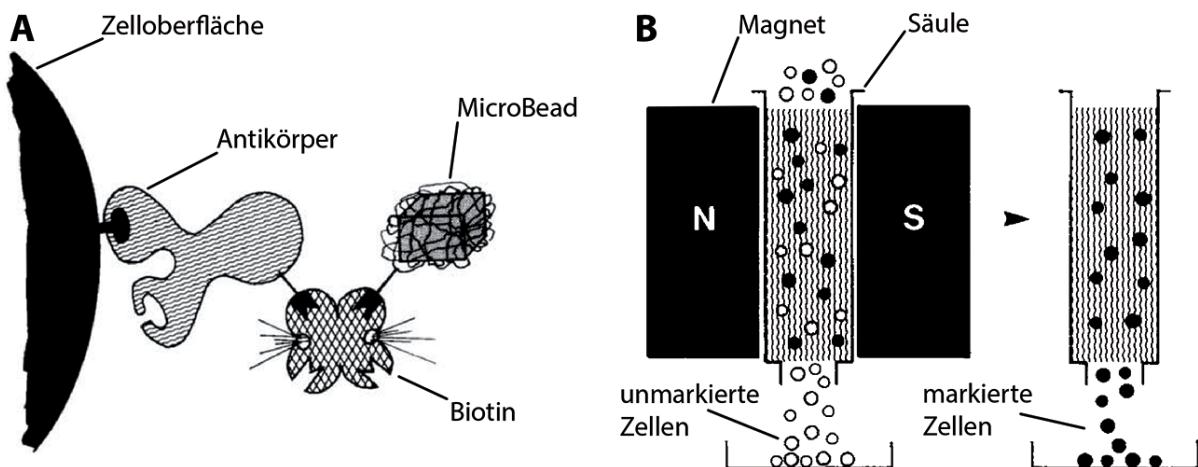


Abbildung 5.2: **Aufbau eines MACS Microbead und Ablauf der MACS-Zell-Anreicherung.** (A) Biotinylierter Antikörper in Verbindung mit Streptavidin und Ferritdextran (MicroBead), gebunden an eine Zelloberfläche. (B) Nicht markierte Zellen durchwandern die Säule (weiß), markierte Zellen werden in der Säule gehalten. Außerhalb des Magnetfeldes lassen sie sich aus der Säule spülen, Abbildung verändert nach Miltenyi et al. 1990 [247].

Es ist ebenso möglich anstelle der direkten Markierung der Zielzellen einen Microbead-Cocktail zu verwenden, der alle Zellen der Suspension außer den Zielzellen bindet. So werden alle ungewollten Zellen in der Säule gehalten. Das Effluent der Säule enthält eine Zielzellpopulation, die keinen Antikörper gebunden hat (negativ Selektion). Je nach Zellmenge und Aufreinigungsart können unterschiedliche Säulen gewählt werden: LS-, MS-, oder LD-Säulen.

### 5.1.5.1 Aufreinigung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen

Wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben, wurde eine Einzelzellsuspension aus Milz erzeugt. Diese wurde zunächst mit  $\alpha$ CD25-PE Antikörper (1:100) 20 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und gewaschen (13 mL MACS-Puffer, 300 g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde von Überstand befreit, die Zellen gezählt und mit 20  $\mu$ L  $\alpha$ PE-Microbeads und 80  $\mu$ L Puffer pro  $1 \cdot 10^7$  Zellen versetzt (15min, 4°C, Kühlschrank). Es folgte ein Waschschritt (13 mL MACS-Puffer, 300 g, 10 min, 4°C) und die Aufreinigung der Zellen über LD-Säulen. Die Anzahl der Säulen richtete sich nach der Zellzahl. LD-Säulen können mit bis zu  $1,25 \cdot 10^8$  Zellen beladen werden. Die LD-Säulen wurden vier Mal mit einem mL MACS-Puffer gespült und das Effluent in 15mL Zentrifugen-Röhrchen aufgefangen. Der Durchlauf der Säule wurde zentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C), die Zellen erneut gezählt und mit 10 $\mu$ L  $\alpha$ CD4 Microbeads und 90  $\mu$ L MACS-Puffer pro  $1 \cdot 10^7$  Zellen versetzt, inkubiert (15 min, 4°C, Kühlschrank) und gewaschen (13 mL MACS-

Puffer, 300 g, 10 min, 4 °C). Die positiv Selektion der CD4<sup>+</sup> Zellen erfolgte über MS-Säulen (bis zu 1 · 10<sup>8</sup> Zellen/Säule). Die Säulen wurden drei Mal mit 500 µL MACS-Puffer gespült und der Inhalt der Säulen mit je einem mL MACS-Puffer in ein 15 mL Zentrifugen-Röhrchen gedrückt. Die so aufgereinigten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurden zentrifugiert (300 g, 10 min, 4°C), gezählt, in reinem RMPI-Medium aufgenommen und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen lag sie im Durchschnitt bei >90 %.

#### **5.1.5.2 Depletion von CD90<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark**

Die Zellen einer Knochenmarksuspension (siehe Abschnitt 5.1.2) wurden gezählt und mit 10 µL αCD90.2 Microbeads und 90 µL MACS-Puffer pro 1 · 10<sup>7</sup> Zellen versetzt und 15 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert, anschließend gewaschen (13 mL MACS-Puffer, 300 g, 10 min, 4 °C) und CD90.2<sup>+</sup> Zellen über LS-Säulen (bis zu 1 · 10<sup>8</sup> Zellen/Säule) depletiert. Der Durchlauf der Säule wurde aufgefangen, zentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C) und mit RPMI Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. CD90.2<sup>+</sup> Zellen konnte man mit dieser Technik auf ca. 30 % des Ausgangswerts senken.

#### **5.1.5.3 Depletion von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und Mar-1<sup>+</sup> Zellen aus der Milz**

Milz wurde wie unter 5.1.1 beschrieben aufgearbeitet und anschließend nach Herstellerangaben mit αCD4-, αCD8-, MAR-1-PE und αPE-MicroBeads (Miltenyi Biotech) inkubiert und so CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und MAR-1<sup>+</sup> Zellen mit einer LD-Säule depletiert.

#### **5.1.5.4 MACS-Anreicherung Basophiler Granulozyten**

Basophile Granulozyten wurden aus Knochenmark oder Milz gewonnen. Zur Aufreinigung Basophiler Granulozyten wurden unterschiedliche Oberflächenmoleküle (CD49b, IgE, Fc<sub>ε</sub>R1) genutzt.

Bei Anreicherung über CD49b wurden Direkt-Beads (αCD49b Microbeads) der Firma Miltenyi nach Herstellerangaben verwendet. Bei Aufreinigung über IgE oder Fc<sub>ε</sub>R1 wurden die Zellsuspensionen zunächst mit αIgE-PE oder αFc<sub>ε</sub>R1-PE gerichteten Antikörpern inkubiert (15 min, 4 °C, dunkel) und anschließend mit MACS-Puffer gewaschen (300 g, 10 min, 4 °C). Es folgte die Inkubation nach Herstellerangaben mit αPE Microbeads. Nach einem weiteren Waschschritt wurden Basophile Granulozyten mit MS-Säulen isoliert.

### 5.1.6 *In vitro* T-Zellproliferationsbestimmung

Zur Bestimmung der T-Zellproliferation *in vitro* wurde der Proliferationsfarbstoff CFDA (5-Carboxyfluoresceindiacetataacetoxymethylester) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. CFDA ist ein farbloses Molekül welches in die Zelle diffundiert. Dort trennen intrazelluläre Esterasen Acetylgruppen vom Molekül. So entsteht der an Amine bindende und fluoreszierende Carboxyfluoresceindiacetatemethylester (CFSE). Nach Anregung mit einem blauen Laser (488 nm) emittiert CFSE Licht der Wellenlänge 517 nm, was dem FITC-Kanal im FACSCanto II entspricht. Nachdem CFSE eine feste Bindung mit Proteinen in der Zelle eingeht, wird es bei einer Zellteilung mit übertragen. Mit jeder Zellteilung halbiert sich daher die Fluoreszenzstärke. So kann man bis zu acht Zellteilungen durchflusszytometrisch bestimmen [248].

3,3  $\mu$ L der CFDA Stocklösung (5  $\mu$ M) wurden in 5 mL einer 1%igen BSA-PBS-Lösung gegeben. Die zu färbenden Zellen (bis zu  $1 \cdot 10^8$ ) wurden in 1 mL 1%ige BSA-PBS-Lösung aufgenommen, 1 mL des CFSE PBS-Gemisches hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Auswaschen von ungebundenem CFDA wurden die Zellen mit 12 mL PBS gewaschen (350 g, 4 °C, 7 min). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 mL Medium aufgenommen, gezählt und anschließend auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

### 5.1.7 Autologe T-Zellproliferation

Milzzellen wurden, wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben, vereinzelt und anschließend von Basophilen Granulozyten depletiert mittels  $\alpha$ CD49b- oder IgE-Microbeads und LD-Säulen. Es folgte die Markierung mit CFSE (siehe Abschnitt 5.1.6), die Verteilung der Milz-Zellen in eine 96-Lochplatte mit  $5 \cdot 10^5$  -  $8 \cdot 10^5$  Zellen pro Vertiefung und Stimulation mit unterschiedlichen Reagenzien. Wurden Basophile Granulozyten als Stimulanz eingesetzt, so wurden sie mit der zehnfachen Menge Milzzellen inkubiert (Basophile zu Milzzellen = 1 zu 10). Zytokine wurden stets mit einer Konzentration von 10 ng/mL, Antikörper mit 20  $\mu$ g/mL eingesetzt. Die so behandelten Zellen wurden in MLR-Medium in Kultur genommen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). Alle Ansätze erfolgten in Triplikaten. An Tag fünf erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellkultur. Analysiert wurde die Proliferationsrate der T-Zellen mittels CFSE und die im Überstand der Kulturen enthaltenen Zytokine.

### 5.1.8 Gemischte Leukozyten Reaktion

Als *in vitro* Modell der GvHD wurde die gemischte Leukozyten Reaktion (MLR, engl. mixed leucocyte reaction) genutzt. Hierzu wurde Milz einer Balb/c Maus, wie in Abschnitt 5.1.5.3 erläutert von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie Basophilen Granulozyten befreit und mit CFSE markierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen einer C57Bl/6 (B6) Maus, in An- oder Abwesenheit von Basophilen Granulozyten (B6) oder verschiedener Zellkulturzusätze inkubiert. Balb/c Zellen dienen als antigenpräsentierende Zellen. Wie in Kapitel 5.1.1 aufgearbeitete Milzzellen wurden gezählt und

in einer 96-Lochplatte a'  $8 \cdot 10^5$  Zellen, mit  $1 \cdot 10^5$  T-Zellen pro Vertiefung ausgesäht. Je nach Versuchsansatz variierte die Anzahl der zugegebenen Basophilen Granulozyten zwischen  $1 \cdot 10^4$  und  $4 \cdot 10^4$  Zellen. Zytokine wurden stets mit einer Konzentration von 10 ng/mL, Antikörper mit 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingesetzt. Alle Ansätze erfolgten in Triplikaten, inkubiert wurde für fünf Tage bei 37°C 5%CO<sub>2</sub>, in MLR-Medium. In diesen Ansätzen wurde die Proliferationsrate der T-Zellen mittels CFSE 5.1.6 bestimmt und der Überstand der Kulturen auf Zytokine analysiert.

### 5.1.9 Apoptosebestimmung mittels 7-AAD und Annexin V

Zur Unterscheidung von nekrotischen und apoptotischen Zellen im FACS wurde das „FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit“ mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) der Firma BioLegend verwendet.

Annexin V ist ein Protein der Annexin-Familie welche an Phosphatidylserin (PS) der Plasmamembran im Zellinneren bindet. Während der frühen Apoptose löst sich die Membransymmetrie auf und PS gelangt an die Außenseite der Zelle, wo FITC-markiertes Annexin V an Selbiges binden kann [249; 250]. Um apoptotische Zellen von nekrotischen zu unterscheiden, wurde 7-AAD verwendet. Die Zellmembran nekrotischer Zellen ist durchlässig, so dass Annexin V ins Zellinnere eindringen kann und an PS bindet. 7-AAD gelangt ebenfalls in nekrotische Zellen und bindet an DNA [251]. Erscheint eine Zelle doppelt positiv für Annexin V und 7-AAD, so ist sie nekrotisch oder in einer sehr späten Phase der Apoptose. Zellen die nur Annexin V gebunden haben sind apoptotisch. Vitale Zellen lassen sich weder durch 7-AAD noch Annexin V markieren.

Für den Apoptose-Assay bestimmte Zellen wurden von Zellkulturüberstand befreit und in einer 96-Lochplatte mit 250  $\mu\text{L}$  Zellfarbe-Puffer (Biolegend) pro Vertiefung, zweimal gewaschen (550 g, 3 min, 4 °C). Anschließend folgte die Färbung mit Antikörpern gegen Annexin V und anderen gewünschten Zellmarkern (20 min, im Kühlschrank). Nach zwei weiteren Waschschritten mit Färbepuffer (550 g, 3 min, 4 °C) wurden die Zellen nach Herstellerangaben mit 7-AAD versetzt, 10 min inkubiert und sofort im Durchflusszytometer gemessen. Nur apoptotische Zellen (7-AAD negativ, Annexin V positiv) wurden analysiert.

## 5.2 Durchflusszytometrie

### 5.2.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse unterschiedlicher Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmoleküle und Streulichteigenschaften. Die zu untersuchenden Zellen werden in Suspension, in der Trägerflüssigkeit des Durchflusszytometers, mittels sog. hydrodynamischer Fokussierung einzeln durch einen Laserstrahl geführt und erzeugen so charakteristische Streulichtsignale. Über Linsen, Spiegel und Filtersysteme werden die registrierten Signale zu Photodetektoren geleitet, verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das Vorwärtsstreulicht

(forward scatter, FSC), gibt Informationen über die Größe der Zellen, und wird dem Laser gegenüber abgegriffen. Das Seitwärtsstreulicht, (side scatter, SSC) lässt Rückschlüsse über die Zell-Granularität zu und wird im  $90^\circ$  Winkel zum Laser registriert.

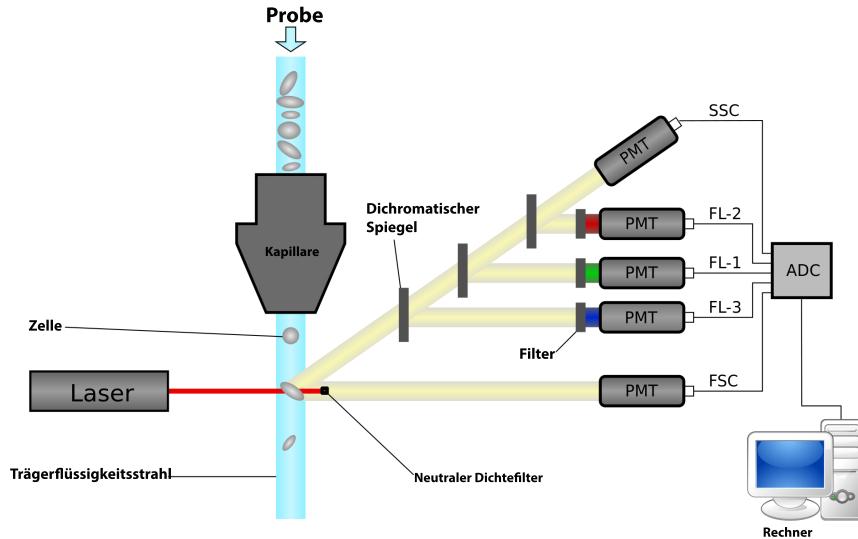


Abbildung 5.3: **Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.** Zellen in Suspension werden mittels hydrodynamischer Fokussierung in einer Kapillare perl schnurartig aufgereiht und durch den Laser geführt. Um die Intensität des Laserstrahls zu mindern, bevor es auf den Detektor trifft, wird es durch einen neutralen Dichtefilter geleitet. Die PMTs (Detektoren) nehmen die von der Zelle abgegebenen Lichtsignale auf und leiten sie an den Rechner weiter. Abbildung verändert nach Kierano *et al.* [252].

Durch FSC- und SSC-Signale lassen sich bereits drei Zellpopulationen unterscheiden: Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten. Möchte man diese Zellverbände weiter unterteilen, benötigt man Fluoreszenzfarbstoff (Flurochrom) markierte Antikörper. Diese Antikörper binden spezifische Zielstrukturen auf der Oberfläche von Zellen. Wird eine so markierte Zelle durch einen Laserstrahl im Durchflusszytometer geleitet, kommt es zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes. Dieser gibt nun selbst Licht einer bestimmten Wellenlänge ab, welches vom FACS-Gerät registriert wird. Unterschiedliche Flurochrome werden von verschiedenen Wellenlängen angeregt, daher sind in Durchflusszytometern meist mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlängen verbaut.

In dieser Arbeit wurde eine FACSCanto II der Firma BD verwendet. Das Gerät verfügt über drei Laser (violetter Diodenlaser  $\lambda = 405$  nm, Argon-Ionen-Laser,  $\lambda = 488$  nm oder roter Diodenlaser,  $\lambda = 635$  nm). Dies ermöglichte die zeitgleiche Analyse von acht Fluoreszenzen. Jedes Flurochrom gibt nach seiner Anregung Licht einer spezifischen Wellenlänge ab. Daher ist es möglich mehrere Epitope auf der Oberfläche einer einzelnen Zelle anzufärben und somit mehrere Zellpopulationen in einer Probe zu charakterisieren. Neben der einfachen Unterscheidung von Zelltypen ist es ebenfalls möglich die Expressionsstärke einzelner Oberflächenmoleküle zu untersuchen. Das

Lichtsignal ist direkt proportional zur Anzahl der auf der Zelle gebundenen Antikörper. Somit steigt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) je mehr Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden sind. Abbildung 5.3 zeigt den schematischen Aufbau eines Durchflusszytometers. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte über die Programme Flow Jo (Firma Tree Star.) sowie FACSDiVa-Software V6.3.1 (BD Bioscience). Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper findet sich in Abschnitt 4.10.

### 5.2.1.1 Extrazelluläre FACS-Färbung

Für die FACS-Färbung wurden verschiedene Zellmengen eingesetzt: 1/20 - 1/10 der Milz, 1/4 bis zu einem Ganzen Knochenmark, die Hälfte der pro Maus vereinten Lymphknotensuspension, unter Umständen auch die gesamte Suspension für eine Färbung. 100  $\mu$ L der vereinzelten Milz-, Lymphknoten- oder Knochenmarkszellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und 10 min mit Fc-Block ( $\alpha$ CD16/32; Verdünnung 1:100) inkubiert. Hierbei handelt es sich um Antikörper die IgG-Rezeptoren auf der Zelloberfläche blockieren und so unspezifische Bindung von FACS-Antikörpern unterbinden. Die verwendeten FACS-Antikörper wurden nach Herstellerangaben, oder in selbst ausgetesteten Verdünnungen eingesetzt. Bei einer großen Anzahl von Proben wurde ein Mastermix (MM) hergestellt, der alle benötigten Antikörper enthielt, dann 10  $\mu$ L des MM auf die Proben mit einer Eppendorf Multistep-Pipette gegeben. Zur Berechnung der Antikörperkonzentration im MM wurde das Endvolumen verwendet, was sich aus dem Probenvolumen, dem Volumen des Fc-Blocks und den 10  $\mu$ L des MM errechnete. Nach Zugabe des Antikörpercocktails wurden alle Proben geschüttelt und 20 min, bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden alle Proben mit 4 mL 0,9 % NaCl-Lsg. oder PBS gewaschen (350 g, 4 °C, 7 min) um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die FACS-Proben, sofern nötig, mit BD Lysing-Solution (1 mL/Probe, 10 min, RT, dunkel) behandelt, um vorhandene Erythrozyten zu lysieren und die Zellen zu fixieren. Nach erfolgter Lyse wurden die Proben auf 4 mL mit NaCl oder PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Zuletzt wurden die Proben abgegossen, um einen nahezu gleichen Flüssigkeitsstand in den Röhrchen herzustellen und 100  $\mu$ L PBS oder NaCl-Lsg. auf die Proben gegeben, geschüttelt und bis zur Messung im Durchflusszytometer im Kühlschrank gelagert.

### 5.2.1.2 Intrazelluläre FACS-Färbung

Zur intrazellulären Färbung bestimmte Zellen wurden, wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben, gewonnen und in eine 48-Lochplatte überführt. Zur Anreicherung der von den Zellen produzierten Zytokine wurden sie mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)(10 ng/mL) und Ionomycin (1  $\mu$ g/mL) für 3 h inkubiert. PMA führt zur Aktivierung der Proteinkinase C, was zusammen mit Ionomycin die Produktion von Zytokinen in der Zelle erhöht. Ionomycin wirkt als Calcium Ionophore und steigert die Menge von intrazellulärem Calcium. Calcium wirkt in der Zelle als sog. „second messenger“ und führt zu einer verstärkten Transkription und Translation. Um

die Ausschüttung der produzierten Zytokine zu verhindern, wurde Brefeldin A (1 µg/mL) ins Kulturmedium gegeben. Brefeldin A unterbindet den Transport von Proteinen aus dem Endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat, was eine Anreicherung von Zytokinen in der Zelle nach sich zieht. Durch die gesteigerte Zytokinproduktion lassen sich einzelne Zytokine leichter im Durchflusszytometer nachweisen.

Nach Ablauf der dreistündigen Aufbewahrung im Brutschrank wurden die Zellen aus der 48-Lochplatte in Facs-Röhrchen überführt und mit je 4 mL Medium gewaschen (350 g, 7 min, 4 °C). Es folgte eine wie in Kapitel 5.2.1.1 beschriebene extrazelluläre Färbung jedoch ohne Fixierung und Erythrozytenlyse. Die anschließende Permeabilisierung der Zellen erfolgte mittels BD Cytofix/Cytoperm Puffer (150 µL/Röhrchen) für 20 min bei 4 °C, gefolgt von einem erneuten Waschschnitt mit BD Perm/Wash Solution (350 g, 7 min, 4 °C). Nach einem in Perm/Wash angesetzten FC-Block (10 min, dunkel bei RT) fand die eigentliche intrazelluläre Färbung statt. Bei dieser Färbung wurde genauso verfahren wie auch bei der extrazellulären, allerdings wurde der MM mit Perm/Wash angesetzt um das Verschließen der Zellen zu verhindern. Nach Ablauf der Färbungszeit wurden die Zellen zweimal mit Perm/Wash gewaschen (jeweils 4 mL, 350 g, 7 min, 4 °C), danach die FACS-Röhrchen ausgegossen, mit 100 µL NaCl oder PBS befüllt und bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

### 5.2.1.3 Quantitative durchflusszytometrische Analyse

Zur Quantifizierung unterschiedlicher Zellpopulationen in frischen Geweben oder Zellkultursätzen wurde den FACS-Proben vor der durchflusszytometrischen Messung AccuCheck Counting Beads (Zählpartikel) zugesetzt. Die Addition einer bekannten Menge Zählpartikel zu einer genau definierten Menge Probe (z.B. 1/10 Milz) ermöglicht die Normalisierung der gemessenen Zellen auf die Anzahl der gemessenen Zählpartikel. Aus dieser Normalisierung und der Kenntnis über die Menge der Ausgangsprobe und der Menge von Partikeln pro µL Zählpartikel-Lösung lässt sich die Gesamtmenge einer Zellpopulation in einem µL Blut mit folgender Formel berechnen.

$$\text{Zellen pro } \mu\text{L} = \left( \frac{\text{Zahl der gemessenen Zellen}}{\text{Zahl der gemessenen Partikel}} \right) \cdot \text{perfect count der Beads}$$

#### 5.2.1.4 Zellaufreinigung mittels Durchflusszytometrie

Bei einem FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) handelt es sich um einen Durchflusszytometer, das eine zusätzliche Sortiereinheit besitzt. So ist es in der Lage, Zellen anhand ihrer Fluoreszenz-Signal zu ordnen. Die gemessenen Zellen werden nicht in einen Abfallbehälter weitergeleitet, sondern in bereitgestellte Auffanggefäß (z.B. 15 mL Zentrifugen-Röhrchen). Um dies zu erreichen werden die Zellen erfasst und der Trägerflüssigkeitsstrahl, in dem die Zellen perl schnurartig aufgereiht sind, mittels der Vibration einer Piezo-Elektrik in Einzeltropfen zerlegt. Jeder Tropfen enthält eine einzelne Zelle. Dieser beladene Tropfen wird nun elektrisch geladen und kann dann mittels Elektromagneten in ein Auffangröhren oder in den Abfallbehälter geleitet werden. Abbildung 5.4 zeigt den schematischen Ablauf einer Zellsortierung.

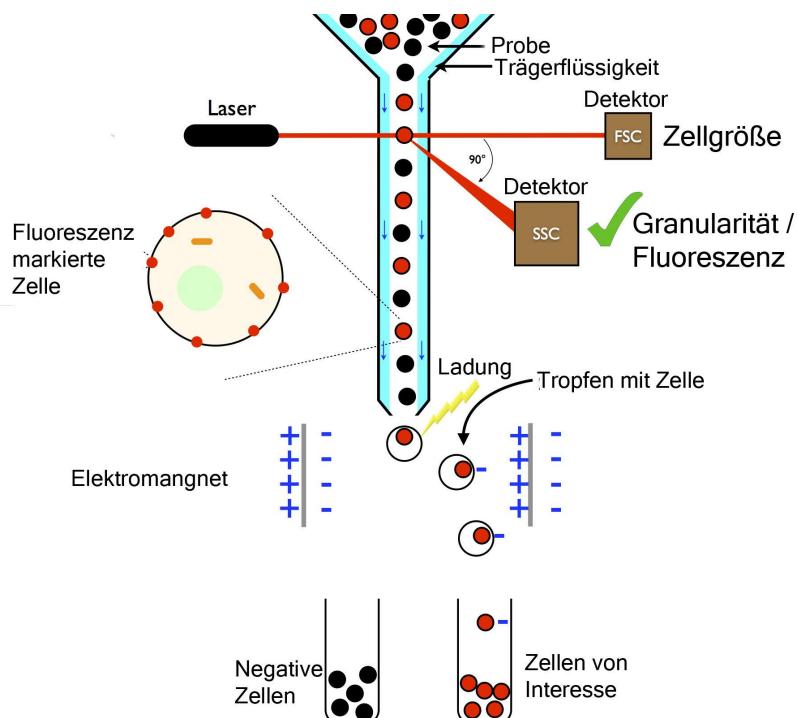


Abbildung 5.4: **Aufbau eines Zellsorters.** Eine Zellsuspension wird wie im Durchflusszytometer durch einen Laserstrahl geleitet. Die Zielzellen werden an Hand ihrer Fluoreszenzmarkierung erkannt, die Trägerflüssigkeit in Tropfen vereinzelt, die mit Zielzellen (rot) beladenen Tropfen werden elektrisch geladen und mittels Magnet in Auffanggefäß geleitet. Abbildung verändert nach Sabban *et al.* [253].

#### 5.2.1.5 Aufreinigung Basophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie

Zur Aufreinigung Basophiler Granulozyten wurden Knochenmarkszellen, wie in Abschnitt 5.2.1.1 erklärt, mit  $\alpha$ IgE-PE,  $\alpha$ CD19-APC,  $\alpha$ NK1.1-APC,  $\alpha$ CD117-APC,  $\alpha$ GR-1-APC und  $\alpha$ CD11c-APC gefärbt. Alle APC positiven Zellen wurden ausgegrenzt und nur PE positive Zellen sortiert.

Diese Gatingstrategie führte zu einer Zellreinheit von >98 %. Die so aufgereinigten Basophilen Granulozyten wurden im Anschluss in Zellkulturansätzen verwendet.

### 5.2.2 Enzym-linked immunosorbent assay

Der Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) ist ein 1971 etabliertes Verfahren zur Quantifizierung eines Moleküls von Interesse in biologischen Flüssigkeiten, wie Blutplasma oder Zellkulturüberständen [254; 255]. Hierbei werden spezielle 96-Loch-ELISA-Platten mit einem sog. Fang-Antikörper beschichtet. Dieser bindet das Zielmolekül nach Auftragen der Probe an die Platte. Zur Quantifizierung wird neben den Proben auch eine Standardreihe, von bekannter Zielmolekül-Konzentration auf die Platte aufgetragen. Diese Standardreihe ermöglicht die quantitative Bestimmung des Zielmoleküls in der Probe.

Einen Tag vor der Durchführung des ELISA wurden 96-Lochplatten nach Herstellerangaben mit Fangantikörper beschichtet und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. An nächsten Morgen wurden die Lochplatten mit Waschpuffer gespült (0,05 % Tween 20 in PBS; 3 mal je 300  $\mu$ L pro Vertiefung) und die Platte mit 10 % FCS- oder 1 % BSA-PBS Lösung blockiert, um freie Bindungsstellen auf der 96-Lochplatte zu sättigen. Es folgte das Auftragen von 100  $\mu$ L Probe/-Vertiefung und die Inkubation nach Herstellerangaben. Blutplasma wurde pur eingesetzt und Zellkulturüberstände je nach nachzuweisendem Zytokin mit Blockpuffer verdünnt. Nach Ablauf der Inkubation folgte ein erneuter Waschschnitt (0,05 % Tween 20 in PBS; 3 mal je 300  $\mu$ L pro Vertiefung), um Probenreste zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die Platte mit dem Biotin konjugierten Detektions-Antikörper (100  $\mu$ L pro Vertiefung, Verdünnung mit Blockpuffer nach Herstellerangaben) beschickt und erneut inkubiert (2 h RT). Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit Strepavidin, an welches Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebunden ist (Verdünnung 1:1000 in Blockpuffer, 100  $\mu$ L pro Vertiefung). Im Anschluss an die Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschnitt und die 20 minütige Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB). HRP ist in der Lage TMB umzusetzen, was sich in einem Farbumschlag äußert. Die Intensität der so generierten Farbe ist direkt proportional zur Menge des vorhandenen Zielmoleküls. Abgestoppt wurde die Farbreaktion mit 12,5 % Schwefelsäure, gemessen wurde die Farbintensität im Tecan Infinite M200pro Photometer bei 450 nm und 570 nm. In dieser Arbeit wurden kommerzielle ELISA Kits der Firmen BD (OptEIA), BioLegend (ELISA MAX) und R&D Research verwendet. Tabelle 5.1 zeigt mit welchem Kit das jeweilige Zytokin detektiert wurde.

Tabelle 5.1: Elisa-Kits

Detektiertes Zytokin	ELISA-Kit
IL-2	BD (OptEIA)
IL-4	R&D Research
IL-6	R&D Research
IL-10	BD (OptEIA)
IL-13	BioLegend (ELISA MAX)
IFN- $\gamma$	BioLegend (ELISA MAX)

## 5.3 In vivo Arbeiten

### 5.3.1 Tierschutz

Die Tiere wurden gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten, auch die Tierexperimente erfolgten unter Einhaltung deutscher Tierschutzrichtlinien. Für *In-vivo*-Experimente wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, die unter SPF (specific pathogen free) Bedingungen bei konstanter RT ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem kontrollierten Hell-Dunkel-Zyklus von 12 h in den Tierställen des Universitätsklinikums Regensburg gehalten wurden. Diese Tiere erhielten autoklaviertes Wasser und Futter ad libitum. Die für *in vivo* und *in vitro* Experimente verwendeten Mausstämme lassen sich der Tabelle 5.2 entnehmen.

Tabelle 5.2: Verwendete Mausstämme

Tierstamm	Alter bei Verwendung	Herkunft
AnNCrl Balb/c [WT]	14 Woche	Charles River, Sulzfeld
C57Bl/6N [WT]	8 Wochen	Charles River, Sulzfeld
C57Bl/6J [WT]	12 Wochen	Charles River, Sulzfeld
IL-4/ $6^{-/-}$ Mäuse: Verpaarung von B6.129P2-Il4 <sup>tm1Cgn</sup> /J- und B6.129S6-Il6 <sup>tm1Kopf</sup> /J Mäusen	12 Wochen	Charles River, Sulzfeld
B6MLR-Fas <sup>lpr</sup> /J [Fas $^{-/-}$ ]	12 Wochen	Charles River, Sulzfeld
B6.129S2-H2 <sup>dlAb1-Ea</sup> /J [MHC II $^{-/-}$ ]	12 Wochen	Charles River, Sulzfeld

### 5.3.2 Tötung der Tiere und Organentnahme

Zur Organpräparation bestimmte Mäuse wurden durch zervikale Dislokation der Halswirbel, oder mittels CO<sub>2</sub>-Narkose getötet und anschließend mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Maus wurde mit einer Schere vom Anusansatz bis zum Kiefer geöffnet und die benötigten Lymphknoten, Milz oder Knochenmark entnommen. Abbildung 5.5 zeigt den Situs einer Maus.

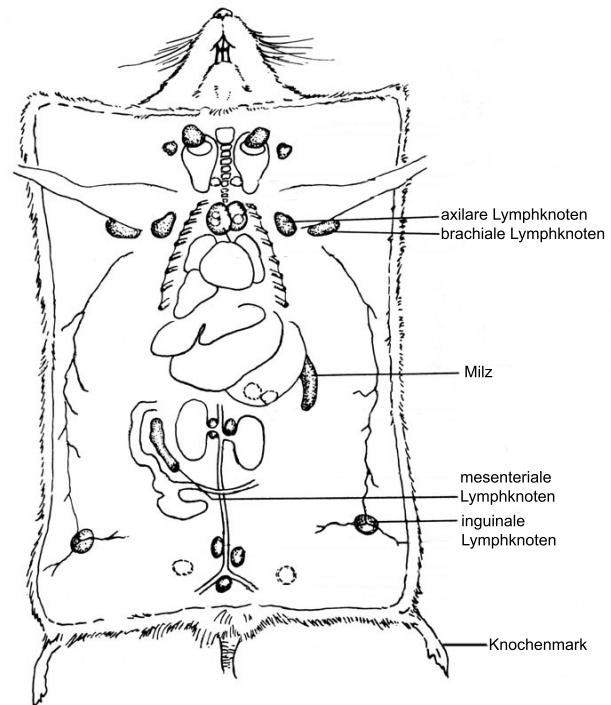


Abbildung 5.5: **Situs einer Maus verändert nach Dunn et al. [256].** Markiert sind lymphatische Organe die zur Analyse entnommen wurden.

### 5.3.3 *In vivo* Depletion Basophiler Granulozyten

Zur *in vivo* Depletion von Basophilen Granulozyten wurde der gegen den hochaffinen IgE-Rezeptor (Fc<sub>ε</sub>R1) gerichtete Antikörper MAR-1 der Firma eBioscience (Frankfurt a.M.) genutzt. MAR-1 wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen zweimal täglich i.p. verabreicht, je 5 µg pro Maus. Dies führte zu einer bis ins Knochenmark reichenden Depletion von Basophilen Granulozyten. In behandelten Mäusen ließen sich nach dieser Behandlung bis zu 12 Tage keine Basophilen Granulozyten nachweisen [30]. Zwischen der Depletion und dem Start des eigentlichen Experiments konnten die Versuchstiere 24 h ruhen. Abbildung 5.6 zeigt die Effizienz der Depletion Basophiler Granulozyten mit Mar-1 sieben Tage nach der letzten Gabe des Antikörpers.

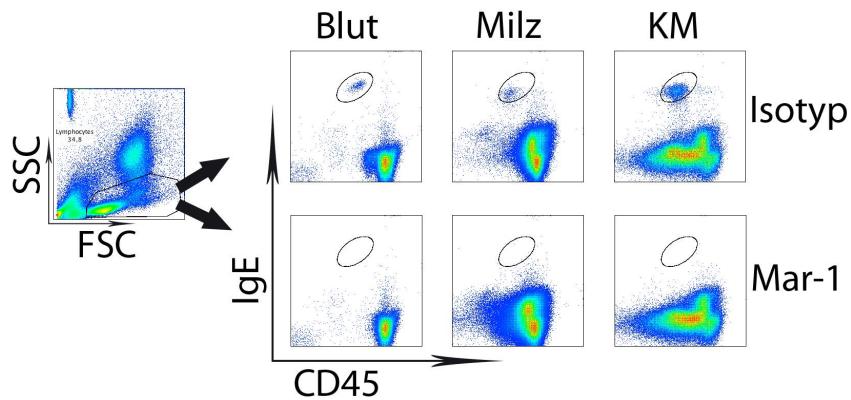


Abbildung 5.6: **Depletion von Basophilen mit Mar-1 in Blut, Milz und Knochenmark** Durchflusszytometrische Analyse von Blut, Milz und Knochenmark (KM) sieben Tage nach der letzten Gabe von Mar-1. Die obere Zeile zeigt Gewebe Isotyp behandelter Tiere, die untere Zeile Gewebe Mar-1 behandelter Tiere. Lymphozyten wurden eingegrenzt, dann Basophile Granulozyten (BG) durch die Oberflächenmoleküle IgE und CD45<sup>med</sup> diskriminiert.

### 5.3.4 Ansatz der homeostatischen Proliferationsexperimente

Empfänger AnNCrl Balb/c Mäuse wurden subletal (6 Gy) bestrahlt, um die T-Zellzahl in diesen Mäusen zu reduzieren. 24 h später folgte der Transfer syngener T-Zellen in Kombination mit Basophilen Granulozyten im Verhältnis 10 zu 1 (zehn Teile Splenozyten, ein Teil Basophile Granulozyten). Je nach Versuchsaufbau wurde neben den Zellen auch IL-3 (200 ng/Tag/Maus) oder PBS i.p. appliziert. Um Spender- und Empfänger-Zellen unterscheiden zu können, wurde auf die kongenen Marker CD90.1 bzw. CD90.2 zurück gegriffen. Sieben Tage nach dem Zelltransfer wurden die Mäuse geopfert und die Proliferation der CD90.1<sup>+</sup> Spender-T-Zellen in der Milz durchflusszytometrisch analysiert.

### 5.3.5 Ansatz der GvHD-Experimente

Zur Untersuchung der GvHD wurde das Mausmodell einer vollständigen Fehlpaarung des Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. complete MHC-Mismatch) genutzt.

Hierbei wurden AnNCrl Balb/c Mäuse (MHC Typus H-2k<sup>d</sup>) entweder im Linearbeschleuniger Linac II des Universitätsklinikums Regensburg (9,0 Gy), oder in einer Gammacell Bestrahlungseinheit (8,0 Gy) letal bestrahlt. Sechs bis acht Stunden später folgte die Rekonstitution der bestrahlten Tiere mit C57Bl6/N (MHC Typus H-2k<sup>b</sup>) CD90 depletierten Knochenmarkszellen ( $5 \cdot 10^6$ ) und naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen ( $5 \cdot 10^5$ ). Die Knochenmarks- und T-Zellen wurden, wie in Abschnitt 5.1.5.1 und 5.1.5.2 beschrieben, aufgereinigt. Das Anwachsen der Spenderzellen wurde an Tag 14 nach der GvHD-Induktion durchflusszytometrisch überprüft. Hierzu wurde den Versuchstieren Blut entnommen (siehe Abschnitt 5.3.8) und die Zellverteilung darin untersucht. Zur Identifikation von Spenderzellen wurde das MHC I Molekül genutzt. Balb/c Mäuse exprimieren MHC I Moleküle des Subtypus H2k<sup>d</sup>, C57Bl/6 Mäuse den Subtypus H2k<sup>b</sup>. Zum

Zeitpunkt der Kontrolle waren über 90 % der nachgewiesenen Zellen aus B6 Mäusen. Abbildung 5.7 gibt das Gatingschema wieder. GvHD-Versuche wurden mit unterschiedlichen Laufzeiten durchgeführt.

#### GvHD Überlebensversuche:

Empfänger- und Spendertiere wurden, wie in Kapitel 5.3.3 erläutert, mit MAR-1 oder den passenden Isotypkontroll-Antikörpern (Armenischer Hamster IgG Isotyp) behandelt. An Tag 0 erfolgte die Bestrahlung der Mäuse und der Zelltransfer. Ab Tag 10 wurden die Versuchstiere zweimal pro Woche mit eingeweichtem Futter versorgt und die sich entwickelnde GvHD beurteilt (siehe Abschnitt 5.3.6). Überlebensversuche wurden bis zum Verlust einer Behandlungsgruppe fortgesetzt oder, falls keine Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten, beendet.

#### GvHD-Versuche zur Bestimmung des T-Zellphenotyps:

Empfänger- und Spendertiere wurden, wie in Kapitel 5.3.3 erläutert, mit MAR-1 oder den passenden Isotypkontroll-Antikörpern behandelt. An Tag 0 erfolgte die Bestrahlung der Mäuse und der Zelltransfer. An Tag 14 nach der GvHD-Induktion wurden die Versuche durch Opferung der Versuchstiere beendet und ihre Organe analysiert.

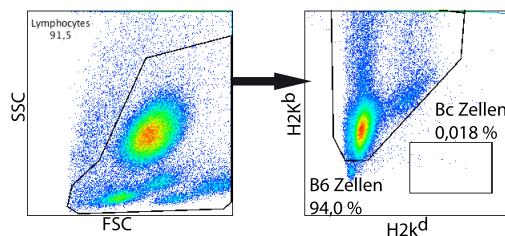


Abbildung 5.7: Anwachskontrolle der C57Bl/6 Zellen. Lymphozyten wurden eingegrenzt, aus diesen die Marker für B6-Zellen (H2Kb) und für Bc-Zellen (H2Kd) dargestellt.

#### 5.3.6 Bewertung der GvHD

Zur Bewertung des Gesundheitszustandes der Tiere wurde zweimal pro Woche ein Krankheits-score erhoben. Hierzu wurde das 1996 von Cooke et al. [257] entworfene Bewertungsschema für eine GvHD (leicht verändert) verwendet.

Es wurde der Zustand des Fells, der Haut, der Körperhaltung, sowie die Aktivität und der Gewichtsverlust bewertet. In jeder Kategorie kann ein Maximalwert von zwei vergeben werden. Erreichte ein Versuchstier einen aufsummierten Wert von sechs oder höher, oder einen Gewichtsverlust von 30 % an zwei aufeinander folgenden Bewertungstagen, wurde sie getötet. Jede tote Maus wurde fortan mit einem maximalen Score von 10 in den Versuchsaufzeichnungen weiter geführt. Tabelle 5.3 gibt die Bewertungen wieder.

Tabelle 5.3: Aufschlüsselung des GvHD-Score

Pkt.	Haut	Fell	Körperhaltung	Gew. Verlust	Aktivität
<b>0,5</b>	Schuppen an Pfoten und Ohren	struppiges Fell ventral	leichte Kyphose in Ruhe	0-10 %	-
<b>1</b>	Erythema an Schwanz und Anus	ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal	leichte Kyphose auch im Laufen	11-20 %	reduzierte Aktivität
<b>1,5</b>	Offene Läsion	struppiges Fell >50 % betroffen	klar sichtbar Kyphose	>21-25 %	-
<b>2</b>	mehrere offene Läsionen	komplettes Fell struppig	starke Kyphose mit Bewegungseinschränkung	>25 %	Maus sitzt unbewegt im Käfig

### 5.3.7 Narkose der Mäuse

Um Mäuse vor unnötigem Stress und Schmerzen während einer Blutentnahme zu schützen, wurden sie mit einer antagonisierbaren Injektionsnarkose betäubt. Hierzu wurde die Narkose i.p. verabreicht. Diese ließ die Mäuse innerhalb weniger Minuten einschlafen. Bewusstseinszustand und Schmerzempfinden der Mäuse wurde mittels Pfoten-Schmerzreiz getestet. Nach Ende des Eingriffes folgte die Injektion des Antagonisten in die Nackenfalte. Die Zusammensetzung von Narkose und Antagonist, sowie den verwendeten Konzentrationen lässt sich den Tabellen 5.4 und 5.5 entnehmen.

Tabelle 5.4: Zusammensetzung der Narkose

Anästhetikum	Dosis
Fentanyl	0,05 mg/kg KG
Midazolam	5,0 mg/kg KG
Medetomidin	0,5 mg/kg KG

Tabelle 5.5: Zusammensetzung des Antagonisten

Antagonist	Dosis
Naloxon	1,2 mg/kg KG
Flumazenil	0,5 mg/kg KG
Atipamezol	2,5 mg/kg KG

### 5.3.8 Retroorbitale Entnahme von Blut und Gewinnung von Blutplasma

Um zelluläre Bestandteile und Blutplasmas von Mäusen zu untersuchen wurde retroorbital Blut entnommen. Narkotisierten (siehe Kapitel 5.3.7) Mäusen wurde mit einer Heparin beschichteten Kapillare 10-12 Tropfen Blut entnommen. Das erhaltene Blut wurde in einem, mit  $10 \mu\text{L}$  EDTA (0,1%) bestückten, 1,5 mL Zentrifugen-Röhrchen aufgefangen. Zur Gewinnung von Plasma wurde das Blut bei  $4^\circ\text{C}$  und  $450 \text{ g}$ , 15 min zentrifugiert, anschließend das Plasma abgenommen und die Zellen verworfen. Sollte eine FACS-Analyse des Bluts vorgenommen werden, so wurde  $100 \mu\text{L}$  Vollblut zur Analyse genutzt.

### 5.3.9 Statistik

Graphen sind als Mittelwert mit SEM dargestellt. Populationsunterschiede wurden über einen einseitigen T- bzw. ANOVA-, das Überleben mittels Lok-Rank-Test analysiert.

Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant gewertet und mit einem Stern markiert. p-Wert  $< 0,05 =^*$ ; p-Wert  $< 0,01 =^{**}$ ; p-Wert  $< 0,001 =^{***}$

## 6 Ergebnisse

### 6.1 CD49b<sup>+</sup> Zellen unterdrücken die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro*

In den letzten Jahren konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Basophile Granulozyten einen Einfluss auf die Entwicklung des T-Zellphänotyps haben. Des Weiteren entsteht ohne Basophile Granulozyten keine IgG abhängige Anaphylaxie, ebenso spielen sie eine nicht redundante Rolle in der Abwehr von Helminthen. Ich wollte mit dieser Arbeit untersuchen, ob Basophile Granulozyten noch andere, regulatorische Einflüsse auf T-Zellen haben.

Zu Beginn dieser Untersuchungen stellte ich fest, dass mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen in kultivierter Milz zu finden waren, wenn diese Splenozyten zuvor von CD49b<sup>+</sup> Zellen depletiert worden waren (Abbildung 6.1). Im Verlauf der Arbeit konnte ich zeigen, dass die verminderte T-Zellzahl durch Unterdrückung der T-Zellproliferation verursacht wird (siehe Abschnitt 6.6).

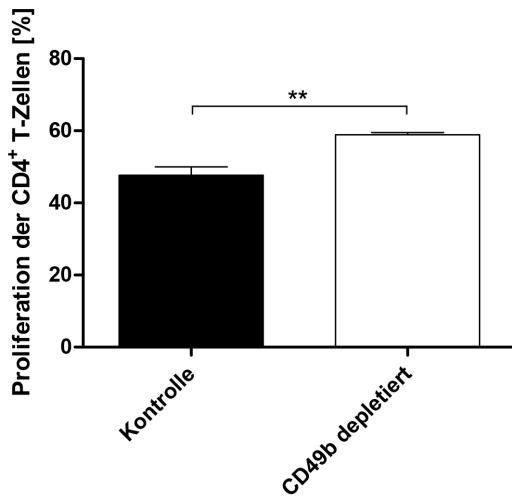


Abbildung 6.1: CD49b<sup>+</sup> Zellen unterdrücken die syngene CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation. Milzzellen, von CD49b<sup>+</sup> Zellen depletiert (CD49b depletiert) oder mit CD49b<sup>+</sup> Zellen (Kontrolle). Dargestellt sind proliferierte (schwach CFSE positive oder CFSE negative) CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Das Phänomen der spontanen T-Zellproliferation in kultivierten Milzzellen wurde erstmals 1973 beschrieben und als syngene oder autologe Proliferation bezeichnet [258; 259]. Später wurde diese Erscheinung auf den Kontakt von Antigenpräsentierenden Zellen mit T-Zellen zurückgeführt [260; 261]. Glimcher *et al.* sowie Steinman *et al.* konnten zeigen, dass diese Proliferation im Besonderen durch dendritischen Zelle verstärkt wird [262; 263]. Ich hingegen konnte zeigen, dass CD49b<sup>+</sup> Zellen die syngene Proliferation unterdrücken.

Der Oberflächenmarker CD49b wird nicht exklusiv von einem Zelltypen exprimiert. Sowohl Basophile Granulozyten als auch Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) tragen dieses Molekül auf ihrer Oberfläche, daher musste der Einfluss beider Zelltypen auf die Proliferationsunterdrückung untersucht werden.

## **6.2 Basophile Granulozyten, nicht NK-Zellen unterdrücken die autologe T-Zellproliferation**

Bei CD49b<sup>+</sup> Zellen handelt es sich um eine Mischpopulation, die aus CD49b<sup>+</sup> NK-Zellen und CD49b<sup>+</sup>IgE<sup>+</sup> Basophilen Granulozyten besteht. Um zu testen, ob der in Abschnitt 6.1 beschriebene Effekt auf die IgE<sup>+</sup> Basophilen Granulozyten zurückzuführen war, wurden Milzzellen von Basophilen Granulozyten depletiert. Anschließend wurden diese Splenozyten mit CD49b<sup>+</sup> (Basophile Granulozyten und NK-Zellen) oder mit CD49b<sup>+</sup>-Zellen, die von Basophilen Granulozyten depletiert worden waren (CD49b<sup>+</sup>IgE<sup>-</sup>), stimuliert. Dies erfolgte in absteigender Konzentration (Abbildung 6.2). Das IgE-Molekül wird von Basophilen Granulozyten auf ihrer Oberfläche gebunden, nicht aber von NK-Zellen. Werden also CD49b<sup>+</sup> Zellen von IgE<sup>+</sup> Zellen befreit, bleiben überwiegend NK-Zellen übrig. Die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde anhand von CFSE-Verdünnung bestimmt (siehe Abschnitt 5.1.6). Hierbei zeigte sich, dass CD49b<sup>+</sup>IgE<sup>-</sup> Zellen die T-Zellproliferation nicht so effizient unterdrückten, wie es CD49b<sup>+</sup> Zellen taten.  $5 \cdot 10^4$  CD49b<sup>+</sup> Zellen inhibierten die T-Zellproliferation noch signifikant (entspricht einem Verhältnis von 1 zu 160; CD49b<sup>+</sup> zu Milzzellen), die gleiche Menge CD49b<sup>+</sup>IgE<sup>-</sup> Zellen war dazu nicht mehr in der Lage. Die IgE positive Zellpopulation unter den CD49b<sup>+</sup> Zellen, also Basophile Granulozyten, sind somit die T-Zellproliferation unterdrückenden Zellen.

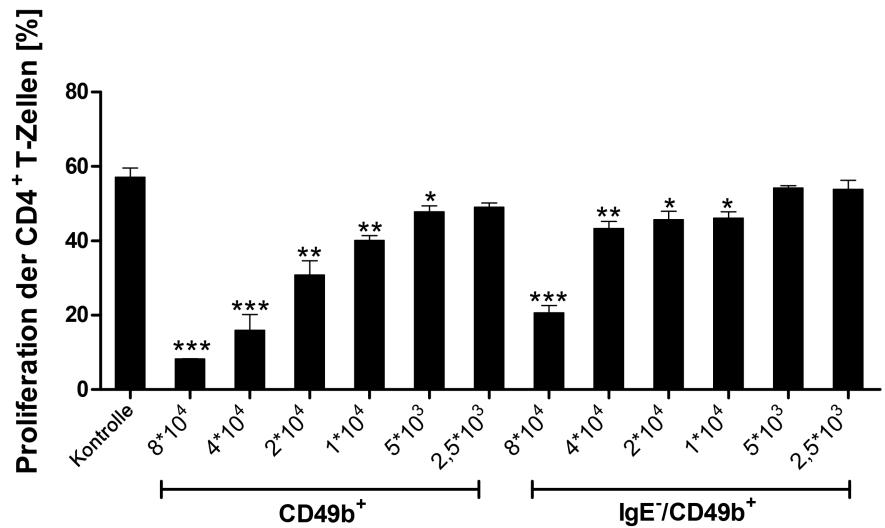


Abbildung 6.2: **Basophile Granulozyten, nicht NK-Zellen unterdrücken die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.** Gezeigt ist die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation von CD49b depletierten Milzzellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von Basophilen Granulozyten (CD49b<sup>+</sup>) und NK-Zellen (CD49b<sup>+</sup>/IgE<sup>-</sup>). CFSE negative Zellen wurden als proliferiert gewertet. Sterne über den Balken geben die Signifikanz zur Kontrolle ohne Basophile Granulozyten oder NK-Zellen an. (n=3)

Da IgE<sup>+</sup> Basophile Granulozyten als Effektorzellen identifiziert wurden, überprüfte ich, ob aktivierte Basophile Granulozyten die T-Zellproliferation noch besser inhibieren. Basophile Granulozyten wurden mittels IL-3 aktiviert, da dieses Zytokin zum einen ihr Überleben verlängert, zum anderen wurde es als sehr effizienter Aktivator von Basophilen Granulozyten beschrieben, der sie zur Ausschüttung von Zytokinen anregt [264; 32]. Hierzu wurden IgE<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark (KM) von Balb/c Mäusen isoliert und diese zusammen mit Milzzellen (CD49b depletiert) der gleichen Maus kultiviert (Abbildung 6.3 B). Als Kontrolle depletierte ich eine weitere Gruppe von Balb/c Mäusen *in vivo*, von Basophilen Granulozyten mit Hilfe des Antikörpers Mar-1 (siehe Abschnitt 5.3.3) und isolierten aus deren KM ebenfalls IgE<sup>+</sup> Zellen (IgE<sup>+</sup>Baso<sup>-</sup>). Zur Bestimmung der T-Zellproliferation wurde CFSE verwandt. Dieses fluoreszierende Molekül bindet kovalent an intrazelluläre Proteine. Teilt sich die Zelle, halbiert sich die im FACS messbare Fluoreszenz. So lassen sich proliferierte von nicht proliferierten Zellen unterscheiden. Abbildung 6.3 A zeigt das für die Analyse gewählte Gatingschema.

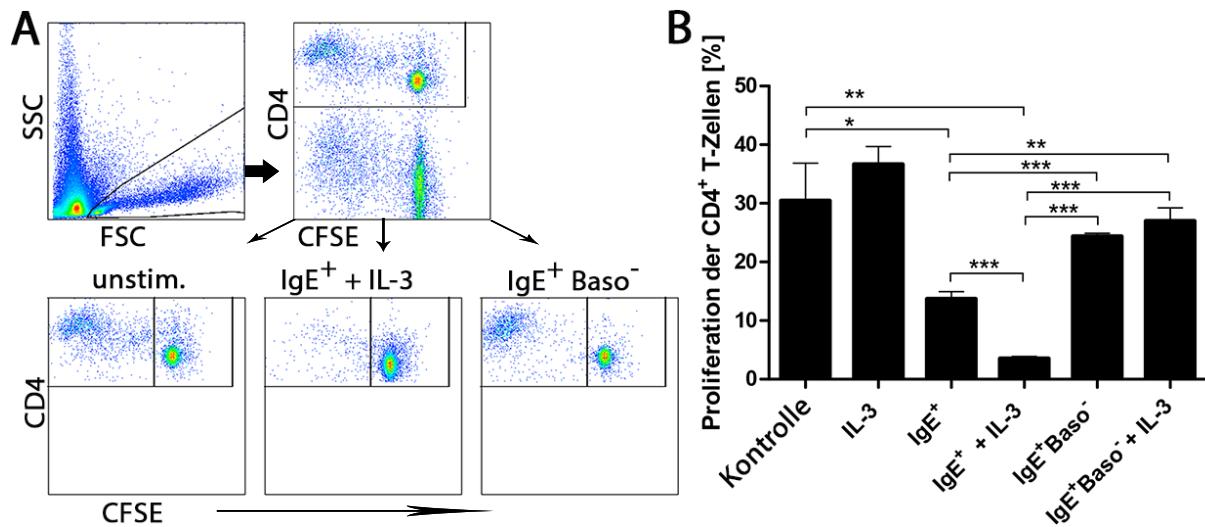


Abbildung 6.3: Mit IL-3 aktivierte Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellproliferation hoch effizient. **A** Verwendete Eingrenzungsstrategie der Durchflusszytometrie: Es wurden Lymphozyten ausgewählt, dann CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> Zellen eingegrenzt und anschließend anhand der CFSE Verdünnung die T-Zellproliferation bei unterschiedlicher Stimulation bestimmt. CFSE negative und schwach positive Zellen wurden als proliferiert gewertet. **B** CD49b depletierte Milzzellen (CFSE markiert) wurden in Kultur genommen und entweder mit IL-3, IgE<sup>+</sup> Basophilen Granulozyten (IgE<sup>+</sup>), aktivierten Basophilen (IgE<sup>+</sup> + IL-3) oder mit IgE<sup>+</sup> Zellen aus *in vivo* Basophilen Granulozyten depletierten Mäusen inkubiert (IgE<sup>+</sup>Baso<sup>-</sup>). Die T-Zellproliferation wurde über CFSE ermittelt.

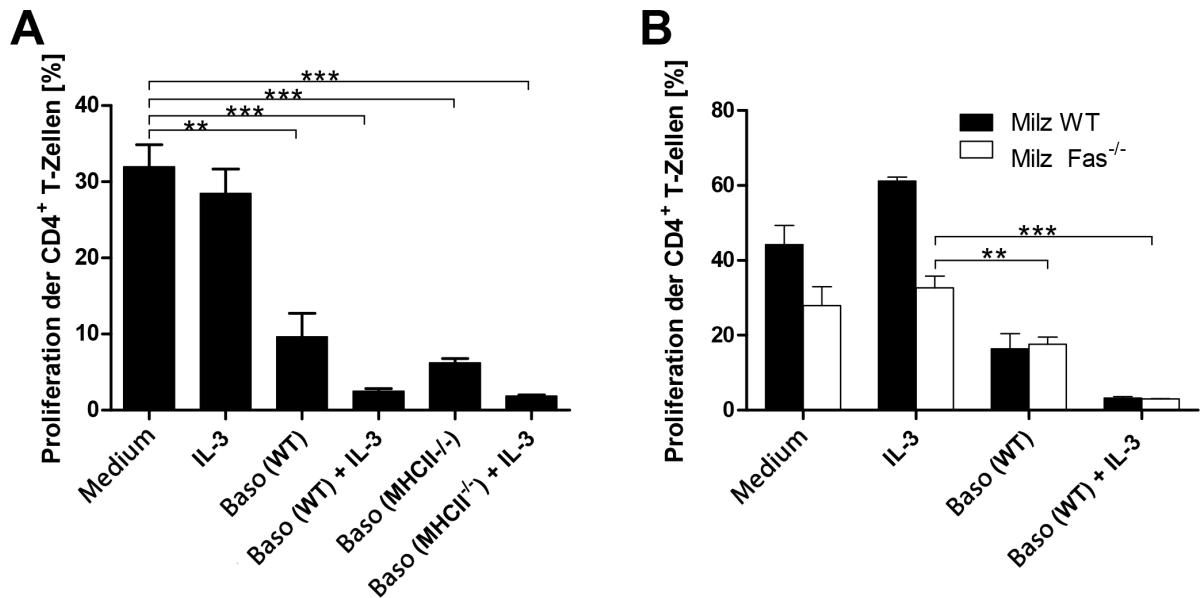
Es zeigte sich, dass die Addition von Basophilen Granulozyten (IgE<sup>+</sup>) die Anzahl von proliferierten T-Zellen um die Hälfte reduzierte. Wurden die Basophilen Granulozyten mit IL-3 aktiviert (IgE<sup>+</sup> + IL-3), verstärkte sich dieser Effekt nochmal signifikant. IgE<sup>+</sup> Zellen aus *in vivo* Basophilen Granulozyten depletierten Mäusen (IgE<sup>+</sup>Baso<sup>-</sup>) waren hierzu nicht in der Lage. Auch die Zugabe von IL-3 änderte diese Beobachtung nicht (IgE<sup>+</sup>Baso<sup>-</sup> + IL-3) (Abbildung 6.3 B).

Diese Ergebnisse bestätigen Basophile Granulozyten als Inhibitoren der CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.

### 6.3 Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellproliferation unabhängig von Zell-Zell-Kontakten

Da ich Basophile Granulozyten und Milzzellen in Ko-Kulturen inkubierte, konnte der T-Zelleffekt sowohl von Zell-Zell-Kontakt zwischen Basophilen Granulozyten und T-Zellen stammen, vermittelt über das von Basophilen Granulozyten exprimierte MHC II Molekül [265; 133; 266; 32], als auch durch humorale Faktoren, die von Basophilen Granulozyten ausgeschüttet werden, wie Histamin oder Zytokinen [28; 27; 30; 31; 267; 268; 18]. Auch diese Moleküle können auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen wirken.

Für dendritische Zellen ist eine antigenabhängige, also auf MHC II-Kontakt beruhende Inhibition von T-Zellen bekannt [269]. Um diesen Inhibitionsweg für Basophile Granulozyten zu untersuchen, wurden Experimente mit Basophilen Granulozyten aus MHC II<sup>(-/-)</sup> Mäusen durchgeführt (Abbildung 6.4 A).



**Abbildung 6.4: Proliferationsunterdrückung funktioniert unabhängig von FAS und MHC II.** **A** CD49b depletierte Milzzellen wurden mit Medium, IL-3, WT Basophilen (Basos (WT)), aktivierte Basophilen (Basos (WT) + IL-3), MHC II<sup>-/-</sup> Basophilen Granulozyten (Basos (MHC II<sup>-/-</sup>)), oder aktivierte MHC II<sup>-/-</sup> Basophilen Granulozyten (Basos (MHC II<sup>-/-</sup>)+IL-3) inkubiert. **B** CD49b<sup>-</sup> Splenozyten einer Fas<sup>-/-</sup> (weißer Balken) oder Wildtyp (schwarzer Balken) Maus wurden ohne Zusätze kultiviert (Medium), mit IL-3 behandelt (IL-3), mit Wildtyp Basophilen Granulozyten (Basos (WT)) oder mit aktivierte WT Basophilen Granulozyten (Basos (WT) + IL-3) behandelt. (n=3)

Die Versuche zeigten, dass Basophile Granulozyten unabhängig vom MHC II-Molekül inhibierten. Denn sowohl Basophile Granulozyten aus Wildtyp Mäusen (Basos (WT)) als auch Basophile Granulozyten aus MHC II<sup>(-/-)</sup> Mäusen (Basos (MHC II<sup>(-/-)</sup>)) waren in der Lage die T-Zellproliferation zu unterdrücken. Die Aktivierung mit IL-3 führte, unabhängig von der Herkunft der zugesetzten Basophilen Granulozyten (Basos (WT) + IL-3; Basos (MHC II<sup>(-/-)</sup>) + IL-3), zu einer Verstärkung der T-Zellinhibition (Abbildung 6.4 A).

Ein weiterer auf Zellkontakt beruhender Weg, T-Zellzahlen zu vermindern, ist die durch Zellkontakt vermittelte Apoptose [270]. Dabei bindet der Fas-Ligand den auf T-Zellen exprimierten Fas-Rezeptor, der die T-Zelle in Apoptose versetzt. Um auch diesen Weg der Inhibition auszuschließen, wurden Fas-Rezeptor<sup>-/-</sup> oder WT Splenozyten mit Wildtyp Basophilen Granulozyten (WT), mit und ohne IL-3 kultiviert (Abbildung 6.4 A).

Auch die über Fas vermittelte Apoptose spielte keine Rolle bei der, durch Basophile Granulozyten ausgelösten, Inhibition der T-Zellen (Abbildung 6.4 B). Denn obwohl Fas<sup>(-/-)</sup> T-Zellen schwächer

proliferierten als WT T-Zellen, wurden beide T-Zelltypen von WT Basophilen Granulozyten in ihrer Proliferation gehemmt (Basos (WT)). Die Aktivierung der Basophilen Granulozyten mittels IL-3 verstärkte die Unterdrückung nochmals (Basos (WT) + IL-3).

Auf Grund dieser Ergebnisse konnte ein auf Zell-Zell-Kontakt beruhender Wirkungsmechanismus ausgeschlossen werden. Daher konzentrierte ich mich auf lösliche Faktoren, die von Basophilen Granulozyten produziert werden.

## 6.4 Lösliche Faktoren unterdrücken die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation

Im Zuge der Helminthenabwehr schütten Basophile Granulozyten große Mengen Histamin aus [18; 267]. Es wurde gezeigt, dass Histamin im Blut von HIV Patienten in erhöhten Konzentrationen zu finden ist und bei diesen zu einer verstärkten Ausbildung von Tregs führt, die die T-Zellproliferation unterdrücken können [271]. Daher wurde überprüft, ob Histamin eine Wirkung auf T-Zellen hat. Hierzu inkubierte ich CD49b depletierte Milzzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Histamin von 0,2 mM bis 2,5  $\mu$ M (Abbildung 6.5).

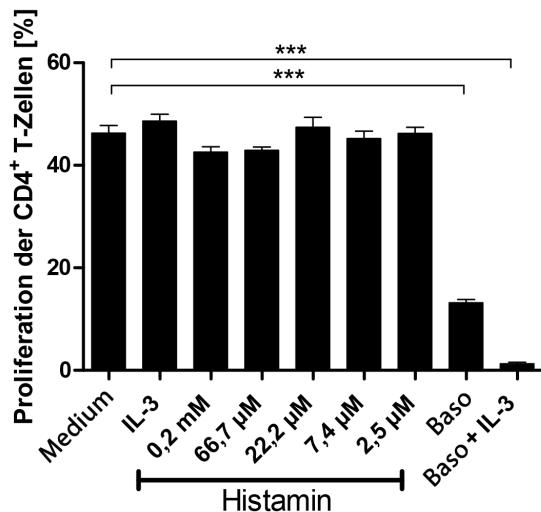


Abbildung 6.5: **Histamin hat keinen Einfluss auf die T-Zellproliferation.** CD49b depletierte Splenozyten wurden mit unterschiedlichen Histamin-Konzentrationen, Basophilen Granulozyten (Baso) oder aktivierten Basophilen Granulozyten (Baso + IL-3) inkubiert. (n=3)

Jedoch hatte keine der gewählten Histamin-Konzentrationen einen Einfluss auf die T-Zellproliferation. Erst die Zugabe von Basophilen Granulozyten (Basos) bzw. aktivierten Basophilen Granulozyten (Basos + IL-3) reduzierte die CD4 T-Zellproliferation signifikant, im Vergleich zur Kontrolle (unstimuliert; IL-3). Somit spielt Histamin keine Rolle in der Unterdrückung der CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.

Da Histamin als Effektormolekül keine Rolle spielte, lag der Fokus nun auf anderen löslichen Faktoren. Um diese zu untersuchen, führte ich Transferversuche mit Überstand von hoch auf-

gereinigten Basophilen Granulozyten durch. Hierzu wurden Basophile Granulozyten über IgE oder CD49b mittels FACS aufgereinigt (siehe Abschnitt 5.2.1.4) und mit oder ohne IL-3 in Kultur genommen. Nach 4 h bzw. 24 h wurde der Zellkulturüberstand (SN) abgenommen und auf CD49b depletierte Milzzellen gegeben.

Es zeigte sich, dass der SN Basophiler Granulozyten allein ausreichte, um die T-Zellproliferation zu unterdrücken. Daher lag die Vermutung nahe, dass es sich um einen humoralen Weg der Inhibition handelt (Abbildung 6.6 C). Die Untersuchung des Überstands der FACS-aufgereinigten Basophilen Granulozyten, mittels ELISA zeigten große Mengen IL-4 und -6 (Abbildung 6.6 A, B). Erhöhte IL-4 Konzentrationen ließen sich jedoch nur nach 24 h im Überstand von aktivierten Basophilen Granulozyten nachweisen (SN IgE<sup>+</sup> + IL-3; SN CD49b<sup>+</sup> IL-3). IL-6 hingegen war sowohl nach 4 h als auch nach 24 h im Überstand von aktivierten und nicht aktivierten IgE<sup>+</sup> Basophilen Granulozyten zu finden (SN IgE<sup>+</sup> + IL-3; SN IgE<sup>+</sup>). Wurden Basophile Granulozyten über CD49b isoliert, so war IL-6 nach 4 h und 24 h nur nach IL-3-Aktivierung in größeren Mengen nachweisbar (SN CD49b<sup>+</sup> + IL-3). Dies lässt sich vermutlich auf die geringe Anzahl Basophiler Granulozyten unter den CD49b<sup>+</sup> Zellen zurückführen. Die IgE<sup>+</sup> Zellen hingegen bestanden ausschließlich aus Basophile Granulozyten.

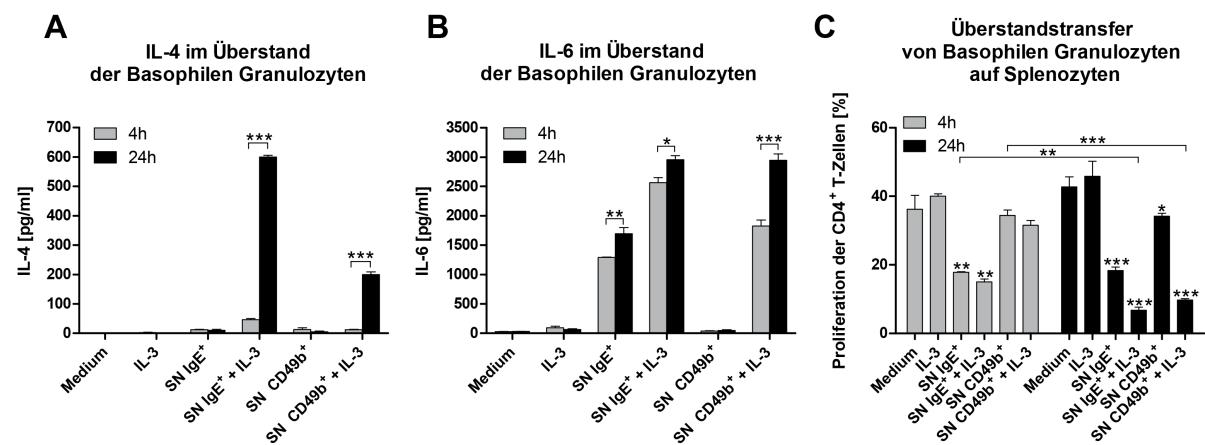


Abbildung 6.6: Überstand Basophiler Granulozyten unterdrückt die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Zytokine wurden über ELISA, die Proliferation mittels CFSE Verdünnung bestimmt. (A) und (B) zeigen IL-4 und -6 ELISA von FACS aufgereinigten Basophilen Granulozyten nach 4 h (graue Balken, 4 h) und 24 h (schwarze Balken, 24 h). Die Aufreinigung erfolgte entweder über die Marker IgE (SN IgE<sup>+</sup>) oder CD49b (SN CD49b<sup>+</sup>). Basophile Granulozyten wurden mit IL-3 aktiviert (SN IgE<sup>+</sup> + IL-3; SN CD49b<sup>+</sup> + IL-3). Als Kontrolle dienten Medium und Medium mit IL-3 (IL-3). (C) Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CD49b depletierten Splenozyten nach Inkubation mit dem Überstand Basophiler Granulozyten aus A und B. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zu Medium wieder. (n=3)

Somit könnten Basophile Granulozyten durch ihre Sekretion von IL-4 und IL-6 die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation hemmen.

## 6.5 Sekretion von IL-4 und IL-6 durch Basophile Granulozyten unterdrückt die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation

Die bisherigen Beobachtungen zeigten, dass der Überstand von Basophilen Granulozyten alleine ausreichend war, die T-Zellteilung einzuschränken und in diesem SN der Basophilen Granulozyten große Mengen von IL-4 und -6 zu finden waren. Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob die Zugabe rekombinanter Zytokine den gleichen Effekt auf die T-Zellproliferation auslöste, wie Basophiler Granulozyten. CD49b depletierte Milzzellen wurden in Kultur genommen und mit IL-3, IL-4, IL-6 oder einer Kombination von IL-4 und -6 inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Splenozyten (Abbildung 6.7 A).

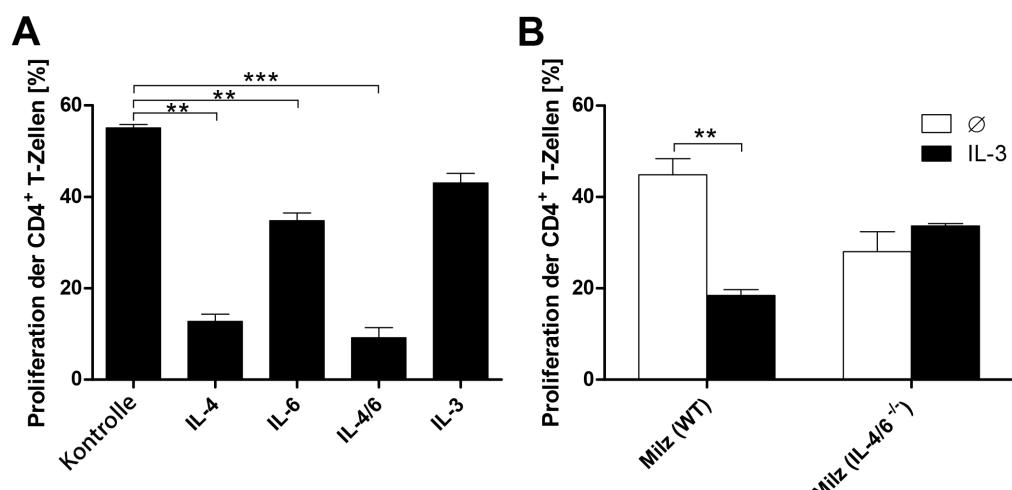


Abbildung 6.7: **IL-4 und IL-6 unterdrücken die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.** (A) CD49b depletierte Splenozyten wurden mit IL-3,-4,-6 oder einer Kombination aus IL-4 und -6 in Kultur genommen. Nur in Medium kultivierte CD49b depletierte Splenozyten wurde als Kontrolle genutzt. (B) Milzzellen aus Wildtyp (WT) oder IL-4/6<sup>-/-</sup> Mäusen wurde in Kultur genommen und die enthaltenen Basophilen Granulozyten mit IL-3 stimuliert (schwarzer Balken) oder nicht (weißer Balken). (n=3)

Sowohl IL-4 als auch IL-6, sowie die Kombination dieser beiden Zytokine, senkten die Proliferation signifikant. Jedoch war die Wirkung von IL-6 schwächer als die von IL-4. IL-3 hatte keinen Einfluss auf die T-Zellteilung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Effektorformoleküle von Basophilen Granulozyten IL-4 und IL-6 sind.

Nachdem ich zeigen konnte, dass IL-4 und -6 die T-Zellproliferation unterdrücken, stellte sich die Frage, ob diese Faktoren tatsächlich von Basophilen Granulozyten stammten.

Wie ich aus der Eingangsbeobachtung wusste (vergleiche Abbildung 6.1), reichten die in der Milz enthaltenen Basophilen Granulozyten aus, um die Proliferation der T-Zellen zu unterdrücken. Daher setzte ich einen Versuch an, in dem ich zum einen WT Milz (Milz WT), zum anderen IL-4/6<sup>-/-</sup> Milz mit und ohne IL-3 inkubierte (Abbildung 6.7 B). Die in der WT Milz enthaltenen

Basophilen Granulozyten unterdrückten nach Aktivierung durch IL-3 die T-Zellproliferation signifikant (Milz WT). Die Basophilen Granulozyten der IL-4/6<sup>-/-</sup> Milz waren hierzu nicht in der Lage (Milz (IL-4/6<sup>-/-</sup>)).

Diese Daten zeigen, dass IL-4 und -6 von Basophilen Granulozyten die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen inhibiert.

## 6.6 Basophile Granulozyten induzieren keine Apoptose in T-Zellen

Bisherige Daten zeigten, dass in Zellkulturansätzen mit Basophilen Granulozyten weniger T-Zellen vor zu finden waren als in Kulturen ohne Basophile Granulozyten. Mit den folgenden Experimenten sollte ergründet werden, ob sich dieser Effekt auf eine erhöhte Apoptoserate zurückführen lässt. Es zeigte sich jedoch, dass Basophile Granulozyten dem programmierten Zelltod entgegenwirken (Abbildung 6.8).

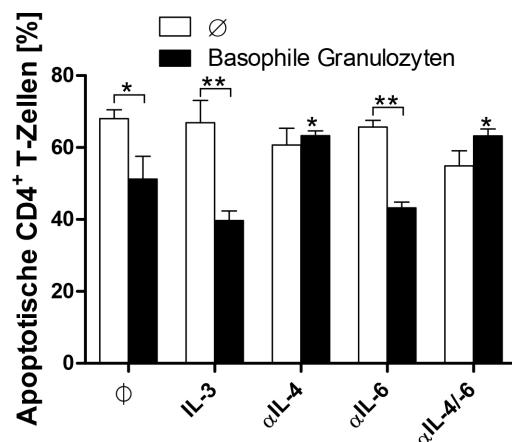


Abbildung 6.8: **Basophile Granulozyten verringern den Anteil apoptotischer Zellen.** CD49b depletierte Milzzellen in Kultur mit (schwarze Balken) oder ohne Basophile Granulozyten (weiße Balken). IL-3 oder neutralisierende Antikörper für IL-4, IL-6 oder die Kombination beider Antikörper wurde zugesetzt. Apoptotische Zellen wurden durchflusszytometrisch als 7-AAD negativ und Annexin V positive Zellen identifiziert. Sterne über den schwarzen Balken geben die Signifikanz zum Ansatz Milzzellen und Basophile Granulozyten ohne Zusätze an. (n=3)

Nach Zugabe von Basophilen Granulozyten verringerte sich der Anteil apoptotischer Zellen (Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>). Die Aktivierung der Basophilen Granulozyten mit IL-3 hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate. Jedoch führte die Neutralisation von IL-4 ( $\alpha$ IL-4), bzw. von IL-4 und IL-6 in Kombination ( $\alpha$ IL-4/6) zur vollständigen Aufhebung des anti-apoptotischen Effekts Basophiler Granulozyten. Die Neutralisierung von IL-6 alleine hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Basophile Granulozyten durch die Sekretion, vor allem von IL-4, anti-apoptotisch wirken können. Darüber hinaus wird bestätigt, dass es sich um Inhibition der CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation, nicht um Apoptoseinduktion, handelt.

## 6.7 Basophile Granulozyten inhibieren die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation *in vivo* bei syngener Transplantation

Da Basophile Granulozyten die autologe Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* behindern, stellte sich die Frage, ob sie dazu auch *in vivo* fähig wären.

Hierzu wurden Balb/c Empfänger-Mäuse mit 6 Gy bestrahlten, um die Anzahl von T-Zellen in diesen Mäusen zu reduzieren. Die syngene Transplantation der CD<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte 24 h später (siehe Abschnitt: 5.3.4). Um T-Zellen aus Spender- und Empfängertieren unterscheiden zu können, wurde der kongenale Marker CD90.1 verwendet. Empfängertiere exprimierten den CD90.2, Spenderiere den CD90.1 Subtypus. So war es möglich die Proliferation der transferierten T-Zellen zu beobachten.

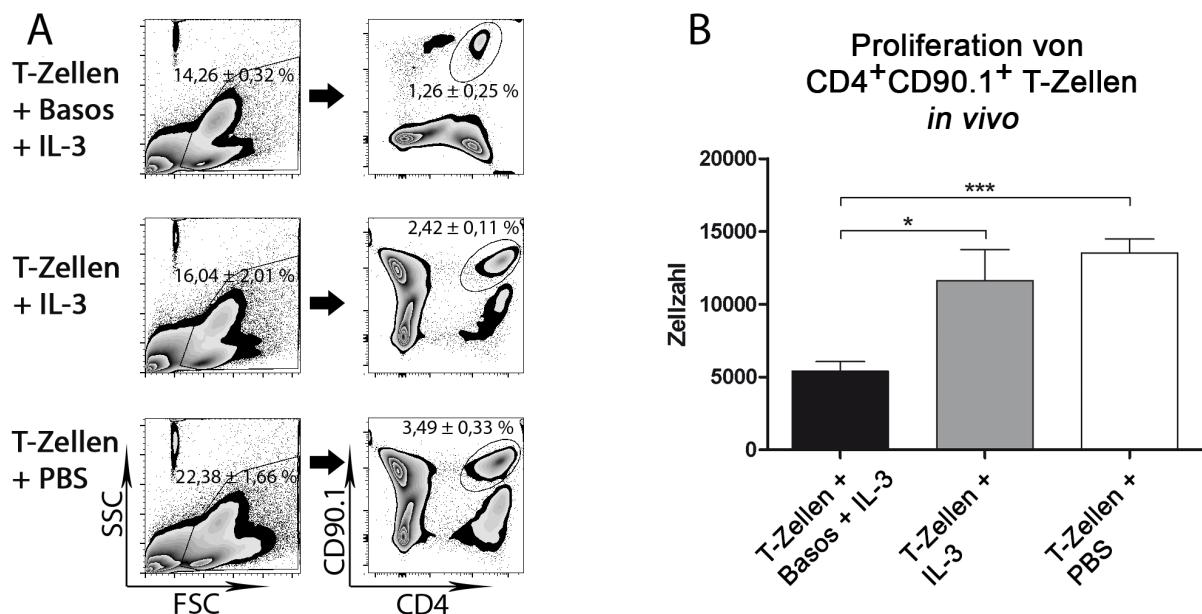


Abbildung 6.9: Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellenproliferation *in vivo*. **A** Gatingschema der *in vivo* Versuche. Eine Gruppe Versuchstiere erhielt T-Zellen zusammen mit Basophilen Granulozyten (Basos) und IL-3 (oberste Zeile); eine weitere Gruppe erhielt T-Zellen und IL-3 (mittlere Zeile); die dritte Gruppe erhielt T-Zellen und PBS (unterste Zeile). Die erste Spalte zeigt eingegrenzte Lymphozyten, die zweiten die gemessenen Spender CD4<sup>+</sup> T-Zellen (eingekreist). **B** Zusammenfassung von A. Quantifizierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz mittels Counting Beads. (n=5)

Bei diesen Experimenten zeigte sich ebenfalls, dass Basophile Granulozyten die T-Zellteilung unterdrücken. Obwohl die gleiche Anzahl an Zellen in jeder Gruppe appliziert und die gleiche Gesamtmenge an Ereignissen durchflusszytometrisch erfasst wurden, unterschieden sich die Mengen von T-Zellen, die wiedergefunden wurden (Abbildung 6.9 A Spalte 2 und B).

Basophile Granulozyten unterdrücken auch *in vivo* die autologe T-Zellproliferation.

## 6.8 Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellteilung in der allogenen mixed lymphocyte reaction

Da T-Zellen in der syngenen Proliferation nur einen sehr schwachen Proliferationsreiz erhalten, sollte nun die Frage geklärt werden, ob Basophile Granulozyten auch in der Lage wären die T-Zellteilung nach einer sehr starken T-Zellaktivierung zu unterdrücken. Daher wurden nun sog. „mixed lymphocyte reaction“ (MLR) Versuche durchgeführt.

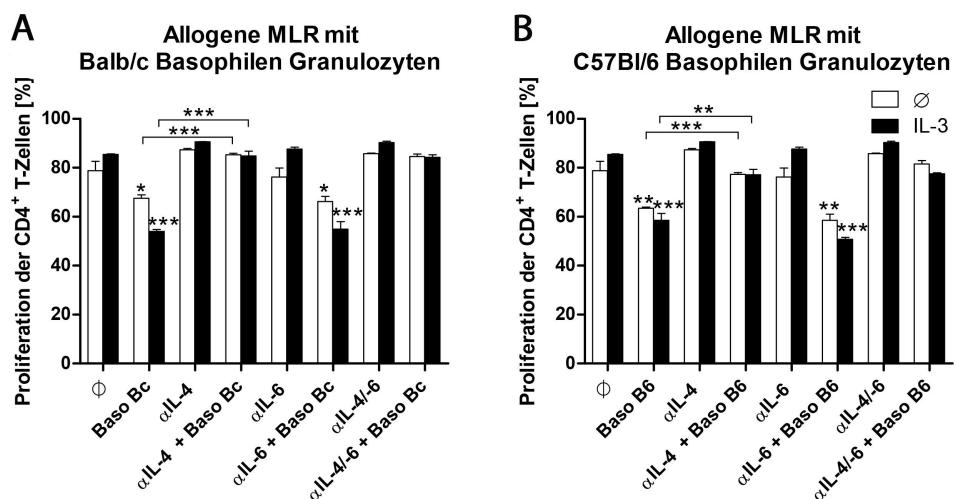


Abbildung 6.10: **Basophile Granulozyten inhibieren die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation in der allogenen MLR.** Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einer MLR unter Einfluss von Bc (A) oder B6 Basophile Granulozyten (B) aktiviert durch IL-3 (schwarze Balken) oder nicht aktiviert (weiße Balken). **A** Bc Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellteilung signifikant (Baso Bc). Die Zugabe von  $\alpha$ IL-4 hob diesen Effekt auf ( $\alpha$ IL-4 + Baso Bc).  $\alpha$ IL-6 hat keinen Einfluss auf die T-Zellhemmung durch Basophile Granulozyten ( $\alpha$ IL-6 + Baso Bc). Die Aktivierung der Bc Basophilen Granulozyten (schwarze Balken) verstärkt die beschriebenen Effekte. **B** B6 Basophile unterdrücken die T-Zellproliferation (weiße Balken). Ihre Aktivierung verstärkt die Unterdrückung (schwarze Balken). Die Addition von IL-4 neutralisierendem Antikörper lässt die Inhibition verschwinden ( $\alpha$ IL-4 + Baso B6). Auch bei B6 Basophilen Granulozyten hat die Neutralisierung von IL-6 keinen Einfluss auf die Inhibition der T-Zellproliferation ( $\alpha$ IL-6 + Baso B6). Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zur Kontrolle ohne Basophile Granulozyten oder Antikörper der Gruppe wieder, bezogen auf IL-3 oder ohne Zusätze. Proliferation gemessen durch CFSE Verdünnung. (n=3)

In der MLR wurden Balb/c (Bc) Splenozyten von T-Zellen und Basophile Granulozyten depletiert (siehe Abschnitt 5.1.8), so dass sie durch die hohe Dichte von Antigenpräsentierenden Zellen als Stimulatoren dienten. Zu diesen Splenozyten wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Effektor-T-Zellen einer C57BL/6 (B6) Maus gegeben. Durch Unterschiede in den MHC-Molekülen, zwischen Bc und B6 Mäusen, werden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der B6 Mäuse allein durch MHC-Kontakt aktiviert (Alloreaktivität), so wie es auch bei einer vollständig fehlgepaarten GvHD der Fall ist (siehe Abschnitte 2.3 und 2.3.1). Da eine MLR sowohl Balb/c Zellen als auch T-Zellen von B6 Mäusen enthält, sollte untersucht werden, ob sich Basophile Granulozyten der beiden Mausstämme unterschiedlich auf die MLR auswirken. Dazu wurden MLR angesetzt und diese entweder mit B6 oder Bc Basophilen Granulozyten inkubiert (Abbildung 6.10).

Sowohl Bc (Abbildung 6.10 A) als auch B6 Basophile Granulozyten (Abbildung 6.10 B) senkten die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant. Die Zugabe von  $\alpha$ IL-4 Antikörpern zu den Ansätzen mit Basophilen Granulozyten hob deren inhibitorischen Effekt auf. In der autologen Proliferation war IL-6 das Zytokin, welches die T-Zellproliferation unterdrückte (vergleiche Abbildung 6.6). Dieser Effekt ließ sich in der allogenen MLR nicht feststellen. Hier hatte die Zugabe von  $\alpha$ IL-6 zu Basophilen Granulozyten keinen Einfluss auf die Proliferationsunterdrückung. Die kombinierte Blockade beider Zytokine (IL-4 und IL-6) hingegen verstärkte die T-Zellproliferation wieder.

Die Addition von IL-3 hatte in der MLR keinen Einfluss auf die T-Zellteilung. Jedoch blieb die Neutralisation von IL-4 der Schlüsselschritt, um die Unterdrückung der T-Zellproliferation aufzuheben. Nicht aktivierte B6 Basophile Granulozyten inhibierten die T-Zellteilung effizienter als nicht aktivierte Bc Basophile Granulozyten. Die Aktivierung der Basophiler Granulozyten durch die Zugabe von IL-3 hob diesen geringen Unterschied jedoch auf.

Nachdem Basophile Granulozyten in MLR fähig waren die T-Zellproliferation zu unterdrücken, wollte ich im Anschluss die Frage klären, ob die alleinige Zugabe der Zytokine IL-4 und IL-6 ebenfalls diesen Effekt zeigt.

## 6.9 IL-4 und IL-6 unterdrücken die T-Zellteilung in der allogenen MLR

Da die Wirkung von Basophilen Granulozyten auf ihre Sekretion von IL-4 und -6 zurück geführt werden konnte (vergleiche Kapitel 6.5), stellte sich im Weiteren die Frage, ob die Addition dieser Zytokine, die T-Zellproliferation in einer allogenen MLR unterdrücken würde. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass die Zytokine IL-4 und -6 in der Lage waren, die  $CD4^+$  T-Zellproliferation signifikant zu inhibieren (Abbildung 6.11).

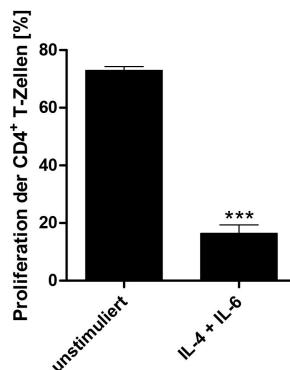


Abbildung 6.11: **Einfluss von IL-4 und IL-6 auf die  $CD4^+$  T-Zellproliferation in einer allogenen MLR.** Von T-Zellen und Basophilen Granulozyten befreite Balb/c Splenozyten wurden mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen einer C57BL/6 Maus in Kultur genommen und unterschiedlich stimuliert. Die Addition der kombinierten Zytokine IL-4 und -6 unterdrückte die T-Zellproliferation signifikant (IL-4 + IL-6). (n=3)

Zudem ergab die Analyse des Zellkulturüberstands eine signifikante Reduktion des Proliferationszytokins IL-2 in MLR-Ansätzen, die mit IL-4 und IL-6 kultiviert wurden (Abbildung 6.12 A). Nach der Zugabe von IL-4 und IL-6 kam es zu einem auffälligen Abfall der  $IFN-\gamma$  Konzentration unter die Nachweisgrenze in den Überständen der MLR (Abbildung 6.12 B). Da  $IFN-\gamma$  zur  $T_{H1}$  Polarisierung von naiven T-Zellen führt, ist dieses Verschwinden des Zytokins ein Indiz für eine Verschiebung des T-Zellphänotyps. Die Sekretion des  $T_{H2}$ -Zytokins IL-10 wurde durch IL-4 und IL-6 nicht beeinflusst (Abbildung 6.12 C).

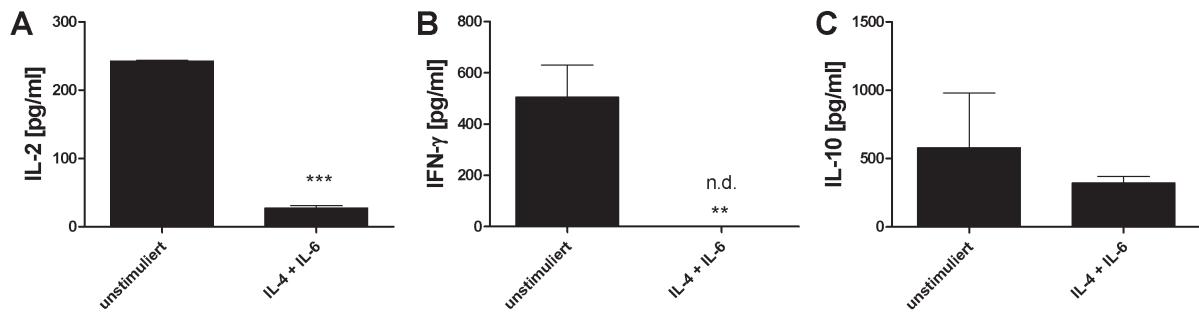


Abbildung 6.12: Einfluss von IL-4 und IL-6 auf die Zytokinproduktion in der allogene MLR. Überstandsanalyse der MLR aus Abbildung 6.11. **A** Die IL-2 Sekretion verringerte sich signifikant nach Zugabe von IL-4 und -6. **B** IFN- $\gamma$  war nach Zugabe von IL-4 und -6 nicht mehr detektierbar (n.d.). **C** Die Zugabe von IL-4 und -6 hatte keinen Einfluss auf die IL-10 Konzentration. (n=3)

Somit wirken Basophile Granulozyten auch in der MLR über ihre Sekretion von IL-4 und IL-6. Da es sich bei diesen Zytokinen um T<sub>H</sub>2-Zytokine handelt und diese die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen fördern, analysierte ich im Anschluss die Zellkulturüberstände aus Abschnitt 6.8 auf Verschiebungen im Zytokinmilieu, um Rückschlüsse auf den T-Zellphänotyp ziehen zu können.

## 6.10 Basophile Granulozyten führen zur Ausschüttung von T<sub>H</sub>2 Zytokinen in der allogenen MLR

Basophile Granulozyten unterdrücken, durch ihre Sekretion von IL-4 und -6, die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in allogenen MLRs. Um zu testen, ob es neben der Proliferationsunterdrückung auch zu einer Verschiebung im T-Zellphänotyp kam, untersuchte ich den Überstand dieser MLR. Die Analyse zeigte, dass die von Basophilen Granulozyten sezernierten Zytokine zu einer Verschiebung des T-Zellphänotyps führten.

Zunächst fiel ins Auge, dass sowohl Bc als auch B6 Basophile Granulozyten die Menge des, von T-Zellen sezernierten T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN- $\gamma$  signifikant reduzierten. B6 Basophile Granulozyten reduzierten die Sekretion stärker als Bc Basophile Granulozyten (Abbildung 6.13 A und B). Reduzierte IFN- $\gamma$  Konzentrationen deuteten auf eine Verschiebung des T-Zellphänotyps hin, da T<sub>H</sub>1 Zellen durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  charakterisiert sind. Die Zugabe von IL-3 hatte keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Konzentration in Ansätzen mit Bc Basophilen Granulozyten. Bei B6 Basophilen Granulozyten führte die Addition dieses Zytokins wieder zu einem leichten Anstieg der IFN- $\gamma$  Konzentration. Wurden IL-4, IL-6 oder beide Zytokine durch die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gebunden, erhöhte sich die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  durch T-Zellen wieder.

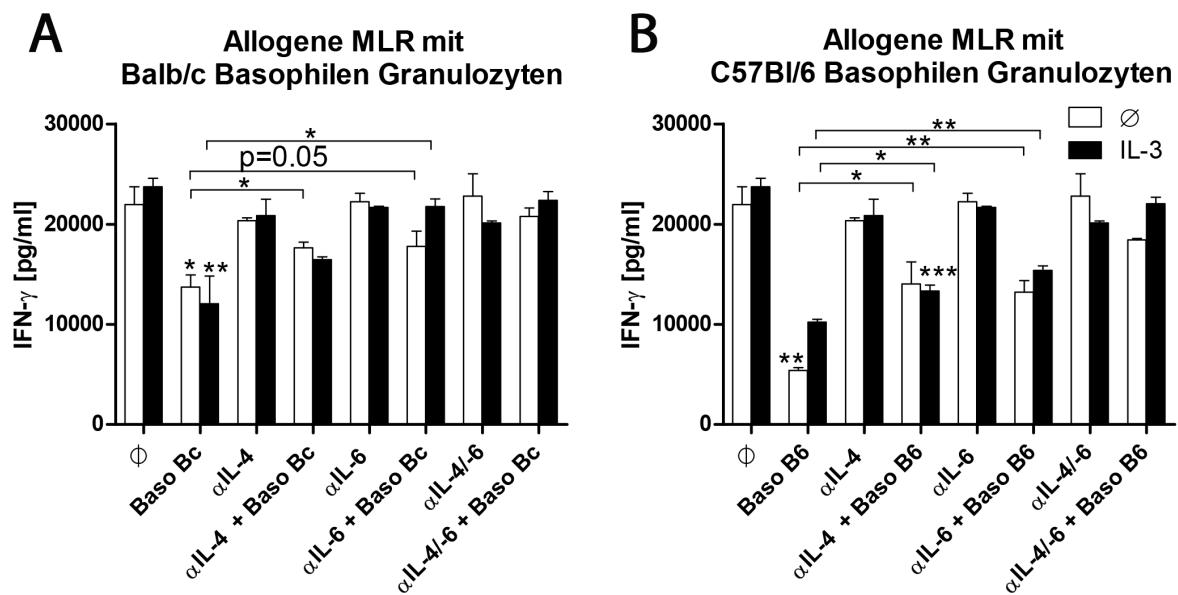


Abbildung 6.13: **Basophile Granulozyten vermindern die Ausschüttung des T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN- $\gamma$ .**

Analyse des Zellkulturüberstands der allogenen MLR. **A** Balb/c (Bc) Basophile Granulozyten (Baso Bc) senken den IFN- $\gamma$ -Spiegel im Überstand. Die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen IL-4 ( $\alpha$ IL-4 + Baso Bc) oder IL-6 ( $\alpha$ IL-6 + Baso Bc) hebt diesen Effekt wieder auf. Aktivierte Basophile Granulozyten (IL-3, schwarze Balken) verstärkten die Reduktion von IFN- $\gamma$ . **B** C57BL/6 (B6) Basophile Granulozyten hatten die gleiche Wirkung, reduzierten im unaktivierten Zustand die Konzentration jedoch stärker als Bc Basophile Granulozyten. Ebenso wie bei Bc Basophilen Granulozyten führte die Zugabe von  $\alpha$ IL-4 oder  $\alpha$ IL-6 zur Steigerung des IFN- $\gamma$ -Wertes. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zum Ansatz ohne Basophile wieder. (n=3)

Neben der Reduktion der IFN- $\gamma$  Konzentration führte die Addition von Basophilen Granulozyten zu einem Anstieg des T<sub>H</sub>2-Zytokins IL-6. Dieses wird von Basophilen Granulozyten sezerniert und kann die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen fördern. Die Aktivierung der Basophilen Granulozyten über IL-3 erhöhte die nachweisbare Menge von IL-6. In Ansätzen, die B6 Basophile Granulozyten enthielten, war mehr IL-6 nachweisbar als in Ansätzen mit Bc Basophilen Granulozyten (Abbildung 6.14 A und B).

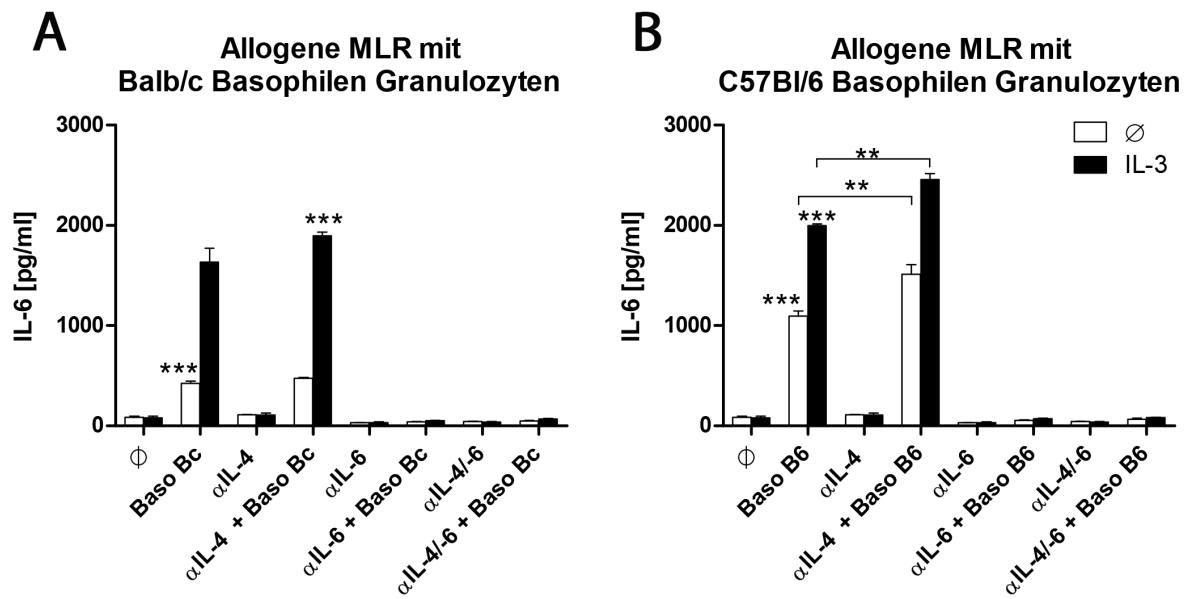


Abbildung 6.14: **Bc (A) und B6 (B) Basophile Granulozyten führen zur Ausschüttung von IL-6.** Die mittels ELISA gemessenen IL-6 Konzentrationen stiegen bei IL-3 Zugabe und bei Neutralisation von IL-4. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zum Ansatz ohne Basophile wieder. (n=3)

Darüber hinaus führten Basophile Granulozyten zu einer verstärkten Sekretion des T<sub>H</sub>2 Schlüsselzytokins IL-4. Dieses Zytokin wird sowohl von Basophilen Granulozyten als auch von T-Zellen sezerniert. Wie auch bei IL-6 waren die nachgewiesenen Konzentrationen von IL-4 höher, wenn Basophile Granulozyten aus B6 Mäusen in der Kultur enthalten waren. IL-3 erhöhte die IL-4 Konzentration unabhängig von der Art der zugesetzten Basophilen Granulozyten. Wie aus Abbildung 6.10 hervorgeht, hatte die Neutralisation von IL-6 keinen Einfluss auf die Unterdrückung der T-Zellteilung, jedoch führte die Blockade dieses Zytokins zu einer verminderten Ausschüttung von IL-4 (Abbildung 6.15 A und B).

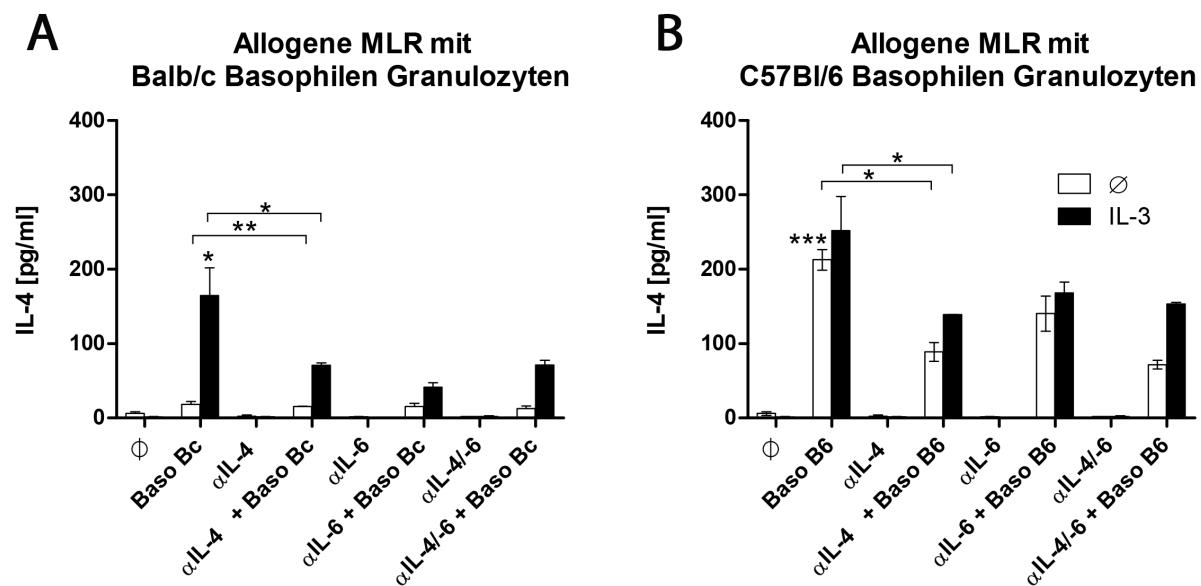


Abbildung 6.15: **Basophile Granulozyten verstärken die Ausschüttung des T<sub>H</sub>2 Zytokins IL-4.** Analyse des Zellkulturüberstands der allogenen MLR. **A** Balb/c (Bc) Basophile Granulozyten erhöhen die Ausschüttung des T<sub>H</sub>2 Zytokins IL-4 (Baso Bc), vor allem nach Aktivierung der Basophilen Granulozyten mit IL-3 (Baso Bc, schwarzer Balken). Die Zugabe von  $\alpha$ IL-6 senkte die Sekretion von IL-4 signifikant (Baso Bc). **B** In Ansätzen mit B6 Basophilen Granulozyten wurde unabhängig vom Aktivierungszustand der Basophilen Granulozyten wesentlich mehr IL-4 ausgeschüttet. Auch hier reduzierte die Blockade von IL-6 die IL-4 Konzentration. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zum Ansatz ohne Basophile wieder. (n=3)

Auch das von T<sub>H</sub>2-Zellen sezernierte Zytokin IL-13 war in sehr hohen Konzentrationen in den Überständen nachweisbar, wenn sich Basophile Granulozyten in der Kultur befanden. Ansätze mit B6 Basophilen Granulozyten wiesen höhere IL-13 Konzentrationen auf als Ansätze mit Bc Basophilen Granulozyten. Dies ist ein weiteres Indiz für eine Verschiebung des T-Zellphänotyps durch Basophile Granulozyten in Richtung T<sub>H</sub>2, da IL-13 von T-Zellen, nicht aber von Basophilen Granulozyten sezerniert wird. Die Sekretion von IL-13 ließ sich durch die Blockade von IL-4, unabhängig von der Art der zugesetzten Basophilen Granulozyten, stark reduzieren. Die Blockade von IL-6 führte nur bei Bc Basophilen Granulozyten zu einer verringerten IL-13 Menge im Überstand (Abbildung 6.16 A und B).

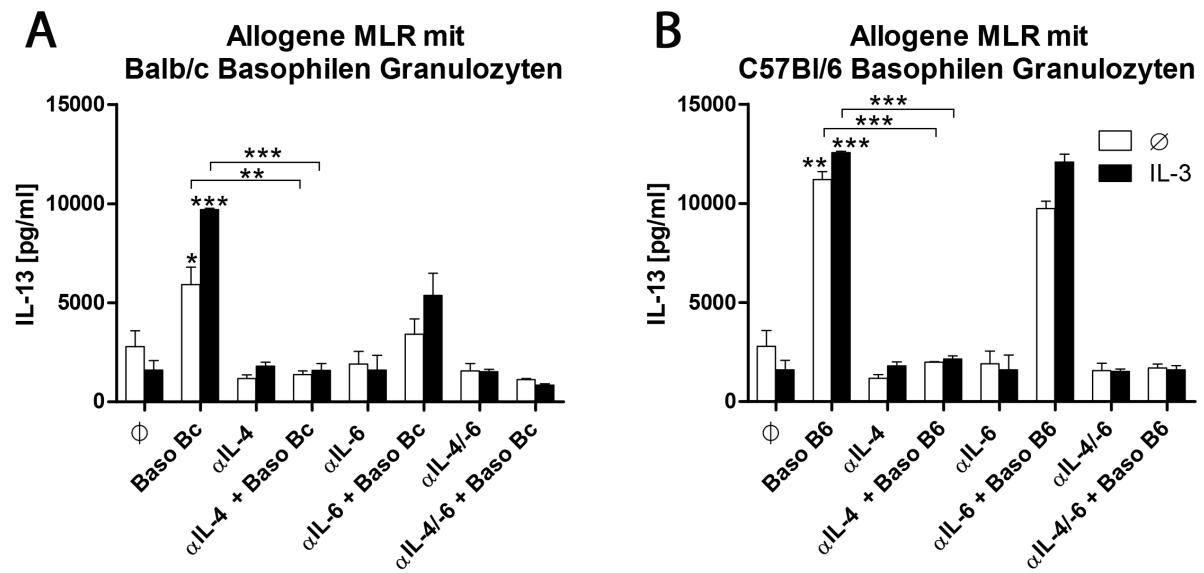


Abbildung 6.16: Basophile Granulozyten steigern die Sekretion des TH2-Zytokins IL-13 in der MLR. **A** Die Konzentration des TH2-Zytokins IL-13 stieg, wenn Bc Basophile Granulozyten in den Ansätzen vorhanden waren. Die Zugabe von IL-3 erhöhte diesen Wert. Die Ausschüttung von IL-13 ließ sich sowohl durch die Neutralisation von IL-4 als auch durch IL-6 unterbinden. **B** B6 Basophile Granulozyten führten, unabhängig von ihrer Aktivierung (Baso B6, weißer bzw. schwarzer Balken), zu einer stärkeren IL-13 Abgabe als Bc Basophile Granulozyten. Die Sekretion von IL-13 ließ sich nur durch die Neutralisation von IL-4 unterbinden ( $\alpha$ IL-4 + Baso B6, weißer bzw. schwarzer Balken).  $\alpha$ IL-6 Antikörper hatten keinen Einfluss auf die IL-13 Konzentration. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zum Ansatz ohne Basophile wieder. (n=3)

Da Basophile Granulozyten in MLR-Ansätzen sowohl die T-Zellproliferation unterdrückten als auch die Bildung von TH2-Zytokinen und -Zellen förderten und beide genannten Eigenschaften sich positiv auf den Verlauf einer GvHD auswirken könnten, untersuchte ich im Anschluss den Einfluss Basophiler Granulozyten in einem Mausmodell der akuten GvHD.

## 6.11 Einfluss Basophiler Granulozyten auf den Verlauf einer GvHD

### 6.11.1 Basophile Granulozyten verbessern das Überleben in der akuten GvHD

Das einfachste Mausmodell der akuten GvHD ist das der vollständigen MHC Fehlpaarung. Bei dieser werden Bc Empfängermausen letal bestrahlt und ihnen anschließend Knochenmark und CD4<sup>+</sup> T-Zellen von B6 Mäusen transplantiert. Die applizierten B6 T-Zellen binden an die fremden MHC-Moleküle der Bc Zellen, werden aktiviert und verursachen dadurch eine akute GvHD (siehe Abschnitte 2.1.2.2 und 2.3.1). Um die Wirkung Basophiler Granulozyten auf den Verlauf einer GvHD *in vivo* zu untersuchen, wurden Empfänger- und Spendertiere mit einem Basophile Granulozyten depletierenden Antikörper behandelt (siehe Abschnitt 5.3.3). Die Kontrollgruppe erhielt den zum Depletionsantikörper passenden Kontrollantikörper.

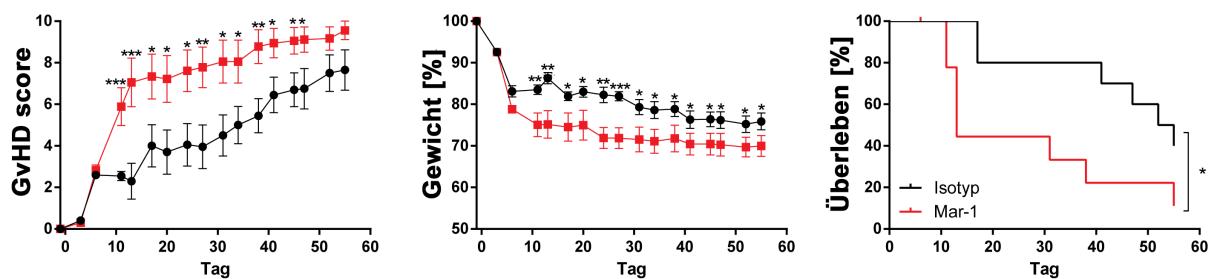


Abbildung 6.17: Die Depletion Basophiler Granulozyten vor der GvHD-Induktion verschlechtert den Krankheitsverlauf. Die Depletion von Basophilen Granulozyten mittels Mar-1 (rote Linie) führt zu einer signifikanten Erhöhung des GvHD-Scores, des Gewichtsverlusts, sowie zu einem verringerten Überleben, im Vergleich zur Isotyp behandelten Kontroll-Gruppe (schwarze Linie). (n=10)

Die Depletion Basophiler Granulozyten wirkte negativ auf alle aufgezeichneten GvHD-Parameter (Abbildung 6.17). Depletierte Tiere zeigten einen höheren GvHD-Score, einen stärkeren Gewichtsverlust sowie eine verringerte Überlebensrate. Da die Depletion Basophiler Granulozyten vor Einleitung der GvHD zu einem verstärkten Verlauf dieser Krankheit führte, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt ebenfalls zu beobachten wäre, wenn Basophile Granulozyten nach Einleitung der GvHD depletiert würden. Jedoch zeigte sich, dass die Depletion Basophiler Granulozyten an Tag 10 nach GvHD-Induktion keinen lang anhaltenden Einfluss auf den Verlauf der GvHD hatte (Abbildung 6.18). Es ließ sich lediglich eine transiente Verschlechterung im GvHD-Score und im Gewichtsverlust beobachten. Die zuvor beobachteten Unterschiede im Überleben zwischen der depletierten und Kontrollgruppe traten nicht mehr auf.

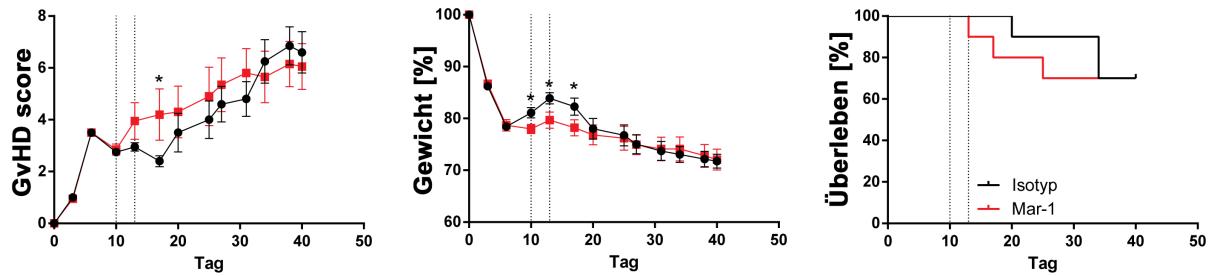


Abbildung 6.18: **Depletion Basophiler Granulozyten nach der GvHD-Induktion hat keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf.** Die Depletion Basophiler Granulozyten (rote Linie), von Tag 10 bis 12 (gekennzeichnet durch gepunktete vertikale Linien) nach der GvHD-Induktion, hat keinen dauerhaften Einfluss auf den GvHD-Score, den Gewichtsverlauf oder das Überleben der Mäuse. (n=10)

Nachdem das Fehlen der Basophilen Granulozyten zu einer Verschärfung der GvHD führte, wollte ich herausfinden, ob eine Verschiebung des Zytokinmilieus bzw. des T-Zellphänotyps, wie ich sie bereits in den MLR beobachtet hatte, für diese Effekte verantwortlich sein könnte. Hierzu wiederholte ich die GvHD-Versuche, beendete sie jedoch zu einem früheren Zeitpunkt und untersuchten die Organe der Versuchstiere auf Veränderungen im T-Zellphänotyp.

### 6.11.2 Basophile Granulozyten beeinflussen die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Um *in vivo* Veränderungen im T-Zellphänotyp zu analysieren, wiederholte ich die GvHD-Versuche zur Depletion Basophiler Granulozyten. Jedoch wurden diese Versuchen an Tag 14 nach der GvHD-Induktion beendet und die Milz und mesenteriale Lymphknoten der Versuchstiere untersucht. Dabei zeigte sich *in vivo* eine ähnliche Funktion Basophiler Granulozyten, wie ich sie bereits *in vitro* in MLRs beobachten konnte.

Die Analyse der Milzen der Versuchstiere zeigte keine Unterschiede in Zellpopulationen oder T-Zellphänotypen (Abbildung 6.19 A und B). Im Vergleich zur depletierten Gruppe wies die Kontrollgruppe mehr Basophile Granulozyten in ihren Milzen auf. Dies bestätigt, dass die Depletion der Basophilen Granulozyten erfolgreich war. Beide Gruppen hatten stark reduzierte B-Zellzahlen (CD19). Dies ist wiederum ein Anzeichen für eine GvHD [272].

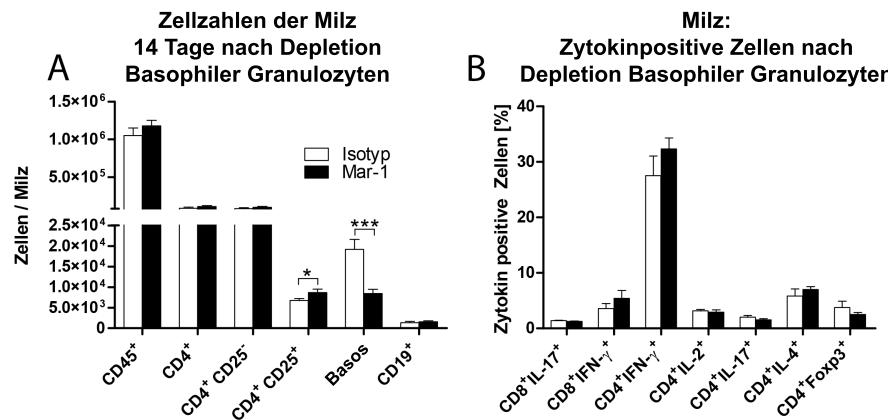


Abbildung 6.19: Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen zur Bestimmung des T-Zellphänotyps in einer GvHD nach Depletion Basophiler Granulozyten mit Mar-1. **A** FACS-Analyse der Zellpopulationen in der Milz. **B** Intrazelluläre FACS-Analyse der Milzzellen. Analyse erfolgte 14 Tage nach Induktion der GvHD. (n=10)

Jedoch ließen sich in den mesenterialen Lymphknoten der depletierten Gruppe signifikant mehr CD45<sup>+</sup> Zellen sowie CD4<sup>+</sup> T-Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, detektieren (Abbildung 6.20 A). Darüber hinaus befanden sich in den mesenterialen Lymphknoten der Isotyp behandelten Gruppe signifikant mehr IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und IL-2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 6.20 B). Ebenso konnte in Lymphknoten depletierter Tiere eine Tendenz zu weniger CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs detektiert werden.

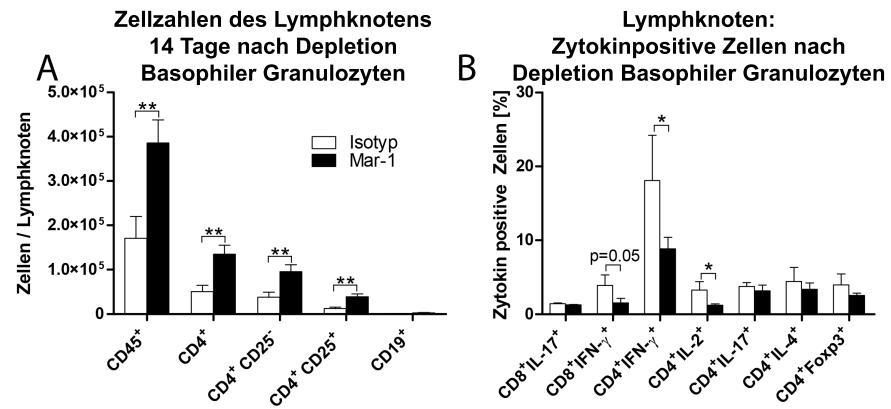


Abbildung 6.20: Durchflusszytometrische Analyse der mesenterialen Lymphknoten zur Bestimmung des T-Zellphänotyps in einer GvHD nach Depletion Basophiler Granulozyten mit Mar-1. **A** FACS-Analyse der Zellpopulationen in den mesenterialen Lymphknoten. **B** Intrazelluläre FACS-Analyse der Lymphknoten. Analyse erfolgte 14 Tage nach Induktion der GvHD. (n=10)

Die erhöhte Anzahl CD45<sup>+</sup> Zellen zusammen mit der verminderten Anzahl von Tregs in der von Basophilen Granulozyten depletierten Gruppe sind eine mögliche Erklärung für die positiven Effekte Basophiler Granulozyten auf die Entwicklung einer GvHD.

## 7 Diskussion

Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, dass Basophile Granulozyten sowohl die autologe als auch die MLR-induzierte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterdrücken können. Diese Unterdrückung wurde nicht durch Fas oder MHC II ausgelöst und ist damit Zell-Zell-Kontakt unabhängig. Die Inhibition wurde durch die löslichen Faktoren IL-4 und IL-6 vermittelt. Die autologe Proliferation wurde primär von IL-6 unterdrückt, die durch eine MLR ausgelöste CD4<sup>+</sup> T-Zellteilung durch IL-4. Der beobachtete Effekt war nicht auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen, da Basophile Granulozyten anti-apoptotisch wirkten. Auch die anti-apoptotische Wirkung Basophiler Granulozyten ließ sich auf die Sekretion von IL-4 zurückführen. Die rekombinanten Zytokine IL-4 und IL-6 hatten die gleiche Wirkung wie Basophile Granulozyten.

Des Weiteren führten Basophile Granulozyten in einer MLR zu einer verminderten Sekretion des pro-proliferativen Zytokins IL-2 und des T<sub>H</sub>1 Zytokins IFN- $\gamma$ , steigerten aber die Konzentration der T<sub>H</sub>2 Zytokine IL-4, IL-6 und IL-13 im Überstand der MLR. Die inhibitorischen Effekte und die Verschiebung des Zytokinmilieus durch Basophile Granulozyten ließen sich in der MLR sowohl mit allogenem als auch mit syngenen Basophilen Granulozyten auslösen.

Die Depletion Basophiler Granulozyten vor der Induktion einer akuten GvHD wirkte sich negativ auf den Verlauf der GvHD aus. Depletion der Basophilen Granulozyten nach Einleitung der GvHD hatte keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Jedoch ließ sich keine Verschiebung des T-Zellphänotyps in der GvHD feststellen. Die antiproliferativen Effekte, die in der MLR beobachtet wurden, zeigten sich auch in der GvHD durch reduzierte Mengen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD45<sup>+</sup> Zellen.

Basophile Granulozyten wirken vermutlich nicht direkt auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sondern über einen dritten Zelltyp. Abbildung 7.1 fasst die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte und Erkenntnisse zusammen.

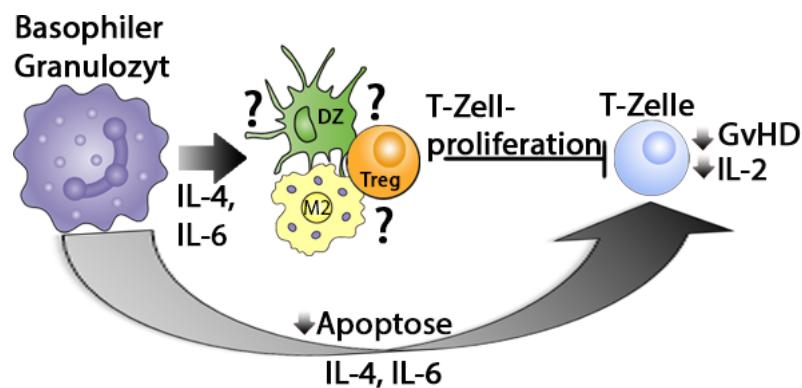


Abbildung 7.1: **Schema des Wirkungsspektrums Basophiler Granulozyten *in vitro* und in der GvHD.** Basophile Granulozyten sezernieren IL-4 und IL-6. Diese wirken vermutlich auf dendritische Zellen (DZ) oder regulatorische T-Zellen (Treg) oder M2 Makrophagen (M2), die die T-Zellproliferation behindern, was sich positiv auf eine GvHD auswirkt. Das sezernierte IL-4 und -6 wirkt direkt anti-apoptotisch auf T-Zellen.

## 7.1 Wirkmechanismus der IL-4 und IL-6 vermittelten CD4<sup>+</sup> T-Zellinhibition

Wir konnten zeigen, dass die Zytokine IL-4 und IL-6 *in vitro* die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation unterdrücken (vergleiche Abbildung 6.11 A). In der Literatur sind für diese Zytokine nur T-Zellproliferation anregende [273; 274; 275], jedoch noch keine inhibitorischen Funktionen beschrieben. Ebenso führten die von Basophilen Granulozyten produzierten Zytokine IL-4 und IL-6, zu einer Reduktion der IL-2 Konzentration (siehe Abbildung 6.12). IL-2 ist ein pro-proliferatives Zytokin für T-Zellen [276]. Ein IL-2-Mangel kann T-Zellen in Apoptose versetzen [277; 278], jedoch, wirken IL-4 und IL-6 dem programmierten Zelltod entgegen. Somit könnte der Mangel an IL-2, zusammen mit der anti-apoptotischen Wirkung von IL-4 und IL-6, die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation verringern, aber gleichzeitig die T-Zellen am Leben erhalten.

Darüber hinaus wäre es möglich, dass die Kombination beider Zytokine diese Unterdrückung hervorruft. Allerdings konnte ich beobachten, dass bereits die Neutralisation von IL-4 die Inhibition der T-Zellproliferation aufhob bzw. der Zusatz von rekombinantem IL-4 in die Zellkultur den Inhibitionseffekt herbeiführte (vergleiche Abbildung 6.10 A und B; 6.7 A).

Conticello *et al.* zeigten, dass IL-4 Brustkrebszellen vor dem, über Fas (CD95) vermittelten, programmierten Zelltod schützte. Dies geschieht durch die verstärkte Expression der Moleküle (c) FLIP/FLAME-1 and Bcl-xL [279]. Die durchgeführten Versuche mit Fas<sup>-/-</sup> Splenozyten zeigten jedoch, dass das Fehlen des Fas-Moleküls keinen Einfluss auf die T-Zellinhibition hatte (vergleiche Abbildung 6.4 B). Ebenso wirkt IL-4 auf B-Zellen der Milz, durch Induktion der Protein Kinase C und des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 als Überlebenssignal [280; 281].

Ferner zeigten Wurster sowie Kaplan *et al.*, dass IL-4 auch in T-Zellen zu einer verstärkten Expression von MCL-1 führt und so vor Apoptose schützt [273; 274; 275]. Das Zytokin IL-6 schützt T-Zellen ebenfalls vor dem programmierten Zelltod durch BCL-2 Induktion [186]. Jedoch wurde für beide Zytokine neben dem Schutz vor Apoptose auch eine pro-proliferative Wirkung nachgewiesen [282]. Auch ich konnte beobachten, dass Basophile Granulozyten anti-apoptotisch auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen wirkten, sich diese Wirkung aber durch die Neutralisation von IL-4 aufheben ließ.

### 7.1.1 IL-4 und IL-6 inhibieren die T-Zellproliferation nicht direkt

Vermutlich wirken die von Basophilen Granulozyten sezernierten Zytokine IL-4 und -6 nicht direkt auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sondern stimulieren einen dritten Zelltyp, der dann die T-Zellen in ihrer Teilung behindert. Da alle *in vitro* Versuche dieser Arbeit mit Splenozyten durchgeführt wurden, enthielten sie neben T-Zellen und Basophilen Granulozyten noch weitere Zelltypen.

Es wäre denkbar, dass Tregs die T-Zellproliferation, über ihre Sekretion von IL-10, unterdrücken. Auch die Entwicklung von Tregs in den MLR-Ansätzen wäre möglich, da ich in MLR mit Basophilen Granulozyten eine verstärkte Sekretion von IL-4 und IL-13 nachweisen konnte (siehe Abbildung 6.16 A und B; 6.15 A und B). Verschiedene Studien demonstrierten, dass sich Tregs abhängig von IL-4 und IL-13 in der Peripherie bilden [283; 284]. Jedoch war die gemessene Menge von IL-10 im Überstand dieser Versuche gering, was eine Inhibition der T-Zellproliferation über IL-10 durch Tregs unwahrscheinlich macht. Des Weiteren konnte ich neben den erhöhten IL-4 und -13 Spiegeln auch große Mengen IL-6 in den Überständen nachweisen, dies spricht nicht für einen Wirkmechanismus über Tregs. Denn Chen *et al.* konnten zeigen, dass IL-6 der Entwicklung von Tregs entgegen wirkt [285]. Blockierten sie den IL-6 Rezeptor systemisch, kam es zu einem Anstieg von regulatorischen T-Zellen. Dies lässt vermuten, dass Tregs keinen Einfluss auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellinhibition haben.

Ebenso wurde bereits die Inhibition von T-Zellen durch DZ beschrieben [286; 287; 288]. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* werden DZ mit IL-4 und Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) aus Monozyten gebildet [288; 289]. Eine erhöhte IL-4 Konzentration könnte somit auch für die verstärkte Entwicklung von DZ sorgen. In Versuchen mit den rekombinanten Zytokinen IL-4 und IL-6 ließen sich erhöhte IL-10 Konzentration im Überstand der Zellkultur messen (vergleiche Abbildung 6.11 C). Zudem zeigten Steinbrink *et al.*, dass Monozyten unter Einfluss von IL-4, GM-CSF und IL-10 zu tolerogenen DZ ausdifferenzieren, die die allogene T-Zellaktivierung und Proliferation hemmen [288].

Überdies könnten sich sog. alternativ aktivierte Makrophagen (M2 Makrophagen) in den Zellkulturen gebildet haben und auf T-Zellen wirken. IL-4 und IL-13, beides Zytokine, die ich auch in den MLR in großen Mengen nachweisen konnten, führen zur Ausreifung dieses speziellen Zelltypus [290]. Egawa *et al.* konnten 2013 zeigen, dass Basophile Granulozyten in Abhängigkeit von IL-4, anti-inflammatoryische M2 Makrophagen rekrutieren können [291]. Das Fehlen dieser

M2 Makrophagen führte zur Verschärfung einer IgE abhängigen chronischen allergischen Entzündung (IgE-CAI). Somit wäre dieser Zelltyp im Zusammenhang mit IL-4 und Basophilen Granulozyten ebenfalls ein möglicher Vermittler des inhibitorischen Effekts.

### **7.1.2 Syngene und allogene Basophile Granulozyten unterdrücken die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation *in vitro***

Die schwache Stimulation von T-Zellen, durch syngene DZ führt zur autologen T-Zellproliferation [260; 261]. Da die Aktivierung der T-Zellen in einer allogenen MLR wesentlich stärker ist, war es überraschend, dass Basophile Granulozyten auch T-Zellteilung nach einem derart starken Proliferationsreiz unterdrücken konnten.

Wie bereits beschrieben, bewirkte das von Basophilen Granulozyten freigesetzte IL-4 diese Unterdrückung. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sowohl Balb/c (Bc) als auch B6 Basophile Granulozyten die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation inhibierten (siehe Abbildung 6.10 A und B). Zwar ließen sich leichte Unterschiede in der Anregung der Zytokinproduktion zwischen den beiden Mausstämmen feststellen (B6 Basophile Granulozyten führen zu einer leicht verstärkten Produktion von Zytokinen im Vergleich zu Bc Basophilen Granulozyten), jedoch wurde in beiden Ansätzen die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant unterdrückt. Dies zeigt, dass der Inhibitionsmechanismus unabhängig von MHC-Kontakt ist und über Mausstammgrenzen hinweg funktioniert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur autologen T-Zellproliferation zeigten, dass die Aktivierung Basophiler Granulozyten mit IL-3 zu einer stärkeren Unterdrückung der T-Zellteilung führte. Einen solchen Effekt ließ sich in MLR-Versuchen nicht nachweisen. Dies liegt vermutlich an der Isolierung der Basophilen Granulozyten über das Oberflächen Molekül IgE. Kreuzvernetzung von IgE auf der Zelloberfläche von Basophilen Granulozyten führt zur Aktivierung dieses Zelltyps [18]. Somit besteht die Möglichkeit, dass Basophile Granulozyten durch die Isolation bereits maximal aktiviert waren und sich daher keine Verstärkung der T-Zellunterdrückung durch IL-3 erreichen ließ. Darüber hinaus führt dieses Zytokin nicht nur zur Aktivierung von Basophilen Granulozyten, es dient auch als Überlebenssignal für diese [18; 267]. Ein verlängertes Überleben führt zu einer länger anhaltenden Sekretion von Zytokinen, was wiederum einen erhöhten Zytokinspiegel nach Addition von IL-3, erklären würde.

Kulturen mit B6 Basophile Granulozyten enthielten höhere IL-4 und IL-6 Konzentrationen, im Vergleich zu Kulturen mit Bc Basophilen Granulozyten. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt, wenn Basophile Granulozyten durch IL-3 aktiviert wurden. Dies könnte zum einen bedeuten, dass B6 Basophile Granulozyten generell größere Mengen von Zytokinen produzieren. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dass es doch zu einer Interaktion zwischen Basophilen Granulozyten und T-Zellen kommt, die eine verstärkte Zytokinproduktion zur Folge hat, wenn beide Zelltypen aus dem gleichen Mausstamm gewonnen wurden.

Zur genaueren Klärung des Wirkmechanismus Basophiler Granulozyten könnte man sog. Trans-Well-Assays durchführen. Bei einem solchen Assay würden Milz- sowie T-Zellen am Boden einer Zellkulturplatte kultiviert. Basophile Granulozyten würde man ebenfalls in diese Platte geben, jedoch durch eine Membran von T- und Milzzellen getrennt, inkubieren. Von Basophilen Granulozyten produzierte Zytokine können die Membran passieren, die Zellen selbst jedoch nicht. Würde man in diesen Assays auch eine gesteigerte Zytokinkonzentration, in Anwesenheit von B6 Basophilen Granulozyten, finden, würde dies auf eine generell erhöhte Zytokinsekretion durch B6 Basophile Granulozyten deuten. Auch die Umkehrung der MLR könnte zur Klärung dieser Frage hilfreich sein. Dabei würde man B6 Splenozyten mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Bc Mäusen kultivieren und jeweils Basophile Granulozyten eines der beiden Mausstämme hinzufügen. Würde man bei diesen Versuchen verstärkt Zytokine, in Ansätzen, die Bc Basophile Granulozyten enthalten, finden, würde dies für eine direkte Interaktion zwischen T-Zellen und Basophilen Granulozyten sprechen.

Im Gegensatz dazu steht jedoch, dass eine allgemein verstärkte Zytokinproduktion, gerade von T<sub>H</sub>2-Zytokinen, durch B6 Mäuse unwahrscheinlich ist, da B6 Mäuse zu einer T<sub>H</sub>1 Immunantwort neigen. Dies zeigte sich insbesondere bei Versuchen mit Leishmanieninfektionen. Dieser intrazelluläre Erreger kann nur abgewehrt werden, wenn der infizierte Organismus eine T<sub>H</sub>1 Antwort generiert. Bc Mäuse sind nicht in der Lage eine Leishmaniose zu bekämpfen, da ihre Immunzellen zu T<sub>H</sub>2 Antworten neigen, B6 Mäuse sind hierzu jedoch fähig [292]. Daher ist es überraschend, dass die, für T<sub>H</sub>2-Antworten zugänglicheren, Balb/c Basophilen Granulozyten weniger T<sub>H</sub>2 Zytokine produzieren.

Interessanterweise führte die Addition von Basophilen Granulozyten zur MLR zu einer Verschiebung des Zytokinmilieus. Es kam zu einer signifikanten Reduktion des T<sub>H</sub>1 Zytokins IFN- $\gamma$  und zur signifikanten Steigerung der T<sub>H</sub>2 Zytokine IL-4, -6 und -13. Dies ist ein klares Indiz für eine Verschiebung im T-Zellphänotyp, da *IFN -  $\gamma$*  und IL-13 von T-Zellen [82], nicht aber von Basophilen Granulozyten sezerniert werden. Diese Veränderung wurde vermutlich durch die von Basophilen Granulozyten produzierten Zytokine IL-4 und IL-6 ausgelöst. Beide Zytokine führen zur Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen. T<sub>H</sub>2-Zytokine (IL-4, -6, -13) unterdrücken die Entstehung von IFN- $\gamma$  produzierenden T<sub>H</sub>1-Zellen [91; 87]. Dies erklärt die verminderte IFN- $\gamma$  Konzentration, in Anwesenheit von Basophilen Granulozyten in MLR-Ansätzen. Überdies führte die Neutralisation des T<sub>H</sub>2-Induktionszytokins IL-4 (vergleiche Kapitel 2.1.2.2) zu einem Abfall der IL-13, aber zu einem Anstieg der IFN- $\gamma$  Konzentration, was das zuvor beschriebe Prinzip bestätigt.

## 7.2 Basophile Granulozyten sorgen für einen schwächeren Verlauf der GvHD

Die Verschiebung des Zytokinmilieus von T<sub>H</sub>1 hin zu T<sub>H</sub>2-Zytokinen, die in der MLR-Ansätzen mit Basophilen Granulozyten beobachtet wurde, wäre eine mögliche Erklärung für den schwächeren Verlauf der GvHD.

ren Verlauf der GvHD in der nicht von Basophilen Granulozyten depletierten Gruppe (Kontroll-Gruppe). Troutt, Allen und DeWit *et al.* konnten bereits zeigen, dass in der akuten GvHD  $T_{H1}$  Zytokine vorherrschen. In der schwächer verlaufenden chronischen GvHD findet man vermehrt  $T_{H2}$  Zytokine [226; 227; 228].

Die GvHD-Überlebensversuche dieser Arbeit zeigten, dass die Depletion Basophiler Granulozyten vor der GvHD-Induktion zu einer signifikanten Verschlechterung aller beobachteten GvHD Parameter führte. Wurden Basophile Granulozyten erst an Tag 10 nach GvHD-Induktion depletiert, hatte dies keinen Einfluss auf den Verlauf der GvHD. Dies zeigt, dass Basophile Granulozyten vor allem in der Entstehungsphase positiv auf die GvHD einwirken können, was die These der T-Zellphänotyp-Verschiebung von  $T_{H1}$  hin zu  $T_{H2}$  unterstützen würde. Wenn Basophile Granulozyten also in einer frühen Phase der GvHD, durch die Ausschüttung der  $T_{H2}$ -Zytokine IL-4 und -6, zur Stabilisierung des  $T_{H2}$ -Phänotyps beitragen, könnte sich das positiv auf den Verlauf der Erkrankung auswirken. Andere Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass sich bestimmte Zelltypen zu frühen Zeitpunkten vorteilhaft auf die GvHD auswirken. Olson *et al.*, sowie Leveson-Gower *et al.* konnten zeigen, dass der adoptive Transfer von NK-Zellen bzw. NKT-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt, die GvHD, durch die Ausschüttung von IL-4 durch NKT-Zellen signifikant abschwächte. Späterer Transfer dieser Zellen hatte keinen positiven Effekt auf den Verlauf der GvHD [241; 293].

Olson *et al.* nutzen jedoch das Oberflächenmolekül CD49b um NK-Zellen anzureichern. Da Basophile Granulozyten ebenfalls CD49b auf ihrer Oberfläche tragen, haben sie also keine reinen NK-Zellen appliziert. Somit wäre es denkbar, dass Olson *et al.* bereits den positiven Effekt Basophiler Granulozyten beobachtet haben, ohne dies in Betracht zu ziehen.

Für IL-4 konnte ein positiver Einfluss auf den Verlauf der GvHD nachgewiesen werden. Pillai *et al.* zeigten, dass NK-Zellen, die vor der GvHD-Einleitung injiziert wurden, durch ihre Sekretion von IL-4 die experimentelle GvHD beinahe vollständig unterdrückten. Als Wirkmechanismus lag eine IL-4 abhängige Vermehrung regulatorischer T-Zellen zu Grunde [284]. Auch ich konnten in Lymphknoten der Kontroll-Gruppe einen Trend zu mehr  $CD4^+Foxp3^+$  Tregs erkennen. Jedoch zeigten die von uns durchgeführten MLR keine Erhöhung der IL-10 Konzentration, was eine Wirkung von Tregs unwahrscheinlich macht.

Zubiaga *et al.* bewiesen, dass IL-4 selektiv  $T_{H2}$ -Zellen vor der durch Kortikosteroiden ausgelösten Apoptose schützt [294]. Vor allem wegen dieser Ergebnisse wäre es interessant zu analysieren, ob Basophile Granulozyten auch das Überleben von T-Zellen unter Einfluss von Kortikosteroiden erhöhen.

Da in den GvHD-Versuchen vor allem in den mesenterialen Lymphknoten der von Basophilen Granulozyten depletierten Tiere signifikant erhöhte  $CD4^+$  T- und  $CD45^+$  -Zellzahlen detektiert wurden, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass der positive Effekt Basophiler Granulozyten in der verringerte T-Zellzahl begründet ist und nicht in einer Verschiebung des Zytokinmilieus. T-Zellen

sind der Auslöser der GvHD, daher wirkt sich deren Reduktion positiv auf den Verlauf der Erkrankung [209; 210].

Die reduzierte Anzahl von Basophilen Granulozyten in der Milz zeigte, dass die Depletion der Basophilen Granulozyten erfolgreich war. Ebenso zeigen die geringen B-Zellzahlen der Milz eine erfolgreiche Induktion der GvHD, da B-Zellmangel ein klares Indiz für eine ablaufende GvHD ist [272].

In den mesenterialen Lymphknoten zeigten sich klare Unterschiede in der Zellverteilung. Depletierte Tiere zeigten mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD45<sup>+</sup> Zellen. Überraschenderweise ließen sich in Lymphknoten der depletierten Gruppe auch mehr CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen. Eine mögliche Erklärung für den positiveren Verlauf der GvHD, trotz der erhöhten Mengen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen, in der nicht depletierten Gruppe, ist die Erkenntnis von Svajger *et al.* Sie beobachteten *in vitro*, dass eine IFN- $\gamma$  reiche Umgebung DZ dazu veranlasst, zytotoxische Immunantworten herunter zu regulieren [295]. Dies würde bedeuten, dass die entstehende GvHD, trotz hoher IFN- $\gamma$  Werte schwächer verlaufen würde. Darüber hinaus zeigten sowohl Koenecke, als auch Yang *et al.* einen positiven Effekt für IFN- $\gamma$  in der GvHD [235; 234].

Auch die erhöhten IL-2 Werte in der Kontroll-Gruppe müssen nicht gegen den positiven Effekt Basophiler Granulozyten sprechen. Bereits 1996 veröffentlichte Michael Lenardo die Beobachtung, dass IL-2 nicht nur Proliferation in Maus-T-Zellen auslösen kann, sondern auch, dass T-Zellen, die vor einer Antigenstimulation IL-2 ausgesetzt waren, bei anschließendem Antigenkontakt apoptotisch wurden [296].

Dass keine Unterschiede zwischen der von Basophilen Granulozyten depletierten Gruppe und der Kontrollgruppe in der Milz zu beobachten waren, aber in den mesenterialen Lymphknoten, liegt vermutlich am Zeitpunkt der Analyse. Spender-Zellen wandern zunächst in die Milz, von dort aus dann weiter zu Schleimhäuten und anderen sekundären Lymphatischen Organen [293; 297; 232].

Ob der positive Effekt Basophiler Granulozyten wirklich auf die Verschiebung des Zytokinmilieus zurückgeht, bleibt fraglich, da ich *in vivo* keine Unterschiede in der Verteilung von T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen finden konnte. Jedoch wäre eine Stabilisierung des T<sub>H</sub>2-Phänotyps, durch Basophile Granulozyten, in einer GvHD durchaus möglich, da sowohl IL-4 als auch IL-6, als T<sub>H</sub>2-Induktoren beschrieben wurden [298; 1].

Die in dieser Arbeit entdeckte Inhibition der T-Zellproliferation durch Basophile Granulozyten ist in meinen Augen die wichtigste Erklärung für den schwächeren Verlauf der GvHD in der nicht depletierten Gruppe.

### 7.3 Unterschiede zu anderen Publikationen

Den Ergebnissen dieser Arbeit steht eine Veröffentlichung von Tawara *et al.* gegenüber, welche postuliert, dass Basophile Granulozyten des Empfängers keine Rolle in der Entwicklung der GvHD spielen[299].

Sie depletierten die Empfängertiere (Balb/c) der GvHD von Basophilen Granulozyten mit Hilfe des gegen den hochaffinen IgE-Rezeptor gerichteten Antikörpers MAR-1. Anschließend induzierten sie die GvHD durch die Transplantation von B6 Knochenmark und B6 CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Tawara *et al.* konnten keine Unterschiede im Überleben von depletierten und nicht depletierten Versuchstieren beobachten.

Dies liegt vermutlich an dem von ihnen gewählten Depletionsschema. Sie depletierten an den Tagen -1, 0 und +1. Dabei werden die Empfängertiere an Tag 0 bestrahlt, Tag +1 erfolgte die GvHD-Induktion. Aus eigenen Versuchen ist bekannt, dass der Depletionsantikörper (MAR-1) Basophile Granulozyten aktiviert, bevor sie depletiert werden, wobei große Mengen IL-4 und -6 ausgeschüttet werden [300]. Nach Depletion Basophiler Granulozyten konnten im Blut, bis zu drei Tage nach der ersten Gabe des Depletionsantikörpers, erhöhte IL-4 und -6 Spiegel nachgewiesen werden.

Dies würde bedeuten, dass Tawara *et al.* die Spenderzellen in Tiere injizierten, die bereits erhöhte IL-4 und -6 Spiegel hatten. Zusätzlich depletierten Tawara *et al.* am Tag des Zelltransfers, was vermutlich auch zur Aktivierung und Depletion von Basophilen Granulozyten, die im Spender-Knochenmark enthalten waren, führte. Dies hatte wiederum eine weitere Erhöhung der IL-4 und -6 Konzentration zur Folge.

Das in dieser Arbeit verwendete Depletionsschema umgeht diese Problematik. Die Depletion der Empfänger- und Spendertiere stellt sicher, dass mit dem applizierten Knochenmark keine neuen Basophilen Granulozyten in den Empfänger gelangen. Vor allem erfolgt die Gabe des Depletionsantikörpers (MAR-1) an den Tagen -4, -3, -2, gefolgt von einem Ruhetag (Tag -1). Dieser Ruhetag stellt sicher, dass keine erhöhten Zytokinkonzentrationen in den Empfängertieren zu finden sind, wenn sie an Tag 0 bestrahlt werden und das Spenderknochenmark und T-Zellen erhalten.

Somit dürfte das in dieser Arbeit gewählte Vorgehen vorteilhafter zu sein, um den Einfluss Basophiler Granulozyten auf die GvHD zu untersuchen.

### 7.4 IL-4 in der GvHD-Therapie

Da sich positive Effekte von IL-4 bzw. Basophilen Granulozyten sowohl in der MLR als auch in einem murinen Modell der GvHD feststellen ließen, wären Basophile Granulozyten oder das Zytokin IL-4 ein interessanter Therapieansatz für eine GvHD.

Die direkte Gabe von IL-4 als GvHD Therapie wäre denkbar. Momentan existiert eine Phase-I-Studie, bei der *in vitro* mit IL-4 kultivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zusammen mit hämatopoetischen Stammzellen, verabreicht werden. Patienten, die mit IL-4 vorbehandelte CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhalten hatten, wiesen zwar ein beschleunigtes Anwachsen der Spenderzellen auf, die GvHD-Rate zwischen der behandelten und der Kontroll-Gruppe unterschied sich jedoch nicht [301]. Allerdings stellt diese klinische Studie den Effekt Basophiler Granulozyten nicht nach. Sie untersucht viel mehr den Einfluss von T<sub>H</sub>2 Zellen auf den Verlauf der GvHD. Systemische Administration von IL-4 wäre eine Möglichkeit den Effekt Basophiler Granulozyten nachzustellen. Allerdings könnte dies unter Umständen toxisch sein oder eine Vielzahl von anderen Zelltypen beeinflussen und so die Risiken unkalkulierbar machen.

Die Zelltherapie mit Basophilen Granulozyten wäre eine Alternative zur Therapie mit IL-4. Die lokale Ausschüttung von IL-4 durch Basophile Granulozyten ist der systemischen Gabe von IL-4 unter Umständen überlegen, da sie direkt im Gewebe auf die Zellen in ihrer Umgebung wirken könnte.

## 7.5 Zelltherapie mit Basophilen Granulozyten in der GvHD - Ausblick

Die MLR-Ansätze dieser Arbeit zeigten, dass sowohl syngene als auch allogene Basophile Granulozyten die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterdrücken. Allogene Basophile Granulozyten führten sogar zu einer stärkeren Zytokinproduktion und somit zu einer stärkeren Verschiebung ins T<sub>H</sub>2 Zytokinmilieu, welches sich positiv auf den Verlauf der GvHD auswirken könnte.

Die Spender der hämatopoetischen Stammzellen werden mit G-CSF behandelt, um Stammzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie zu verlagern [196]. Aus dem Blut des Spenders werden sie dann mittels Leukapherese gewonnen und dem Empfänger transplantiert. Es wäre auch möglich, neben G-CSF dem Spender IL-3 zu verabreichen. IL-3 führt zu einer verstärkten Bildung von Granulozyten im Allgemeinen [302]. So könnten auch Basophile Granulozyten über die Leukapherese gewonnen werden, um sie dem Empfänger zu verabreichen.

Es wäre ebenso möglich, eine Knochenmarkspunktion am Spender durchzuführen, um größere Mengen Basophiler Granulozyten zu erhalten. Da diese Prozedur jedoch sehr schmerhaft ist, wäre die *ex vivo* Generierung von Basophilen Granulozyten eine zu bevorzugende Methode. Gurzler *et al.* gelang es 2013, *in vitro* murine Basophile Granulozyten zu generieren, jedoch mussten sie dafür auf transgene Vorläuferzellen zurückgreifen [303].

Der adoptive Transfer von Basophilen Granulozyten stellt wohl noch die sicherste Therapievariante dar, denn die Wirkungsdauer Basophiler Granulozyten ist durch ihre kurze Halbwertszeit limitiert.

Bevor man Basophile Granulozyten als Therapeutikum einsetzen kann, muss jedoch ihr genauer Wirkmechanismus geklärt werden. Auch die genaue Analyse des Inhibitionsmechanismus auf der T-Zellseite steht noch aus. Ebenso muss geklärt werden, ob weitere Zellen, wie Tregs, DZ oder M2 Makrophagen, an der T-Zellinhibition beteiligt sind, da für die von Basophilen Granulozyten sezernierten Zytokine IL-4 und -6, bisher nur Proliferation fördernde Funktionen beschrieben wurden.

Da die Abwesenheit von Basophilen Granulozyten jedoch zu einer signifikanten Verschlechterung der GvHD führte, sollten Konditionierungsschemata erstellt werden, die Basophile Granulozyten nicht oder nur in geringem Maße in Mitleidenschaft ziehen.

## 8 Eigene Publikationen

### 8.1 Veröffentlichungen

1. Chondroitin sulfate activates B cells *in vitro* but suppresses humoral immune responses *in vivo*. Hilke Brühl, Josef Cihak, Nicole Goebel, Yvonne Talke, Kerstin Renner, **Fabian Hermann**, Manuel Rodriguez Gomez, Barbara Reich, Jiri Plachy, Manfred Stangas-singer, and Matthias Mack. *Journal of Leukocyte Biology*, eingereicht, im Review-Prozess.
2. Basophils control T-cell responses and limit disease activity in experimental murine colitis. Rodriguez Gomez M, Talke Y, Hofmann C, Ketelsen I, **Hermann F**, Reich B, Goebel N, Schmidbauer K, Dunger N, Bruehl H, Syed SN and Mack M. *Mucosal Immunol.* 2013 Jun 12; PMID: 23757302
3. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, **Hermann FJ**, Goebel N, Bruehl H, Ketelsen I, Talke Y and Mack M. *Kidney Int.* 2013 Mar 13; PMID: 23486523
4. Basophils support the survival of plasma cells in mice. Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, **Hermann F**, Reich B and Mack M. *J Immunol.* 2010 Dec 15; PMID: 21068399

### 8.2 Poster

1. Basophils as regulators of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation in GvHD. **Hermann FJ**, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Syed SN, Reich B, Doser K, Goebel N, Schmidbauer K and Mack M. *Cellular Therapy* 2013 Mar, Erlangen Germany.
2. Basophils as regulators of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation in GvHD. **Hermann FJ**, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Reich B, Doser K, Goebel N, Schmidbauer K and Mack M. *15th international congress of immunology* 2013 Aug, Milan Italy.
3. Basophils as regulators of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation in GvHD. **Hermann FJ**, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Reich B, Doser K, Goebel N, Schmidbauer K and Mack M. *43rd Annual Meeting of German Society for Immunology*, 2013, Mainz, Germany.

### 8.3 Vorträge

Basophils as regulators of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation in GvHD. **Hermann FJ**, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Reich B, Doser K, Goebel N, Schmidbauer K and Mack M. *43rd Annual Meeting of German Society for Immunology*, 2013, Mainz, Germany.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen den Menschen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Herrn Prof. Matthias Mack danke ich für das ermöglichen dieser Arbeit und für hilfreiche fachliche Unterstützung.

Ebenso gilt mein Dank meinen Mentoren des Rigel Graduiertenkollegs, Herrn Prof. Längst und Herrn Prof. Schweda, die mir hilfreiche Denkanstöße während meiner beiden Forschungsberichte gaben.

Ganz besonderer Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mack.

Herrn Dr. Manuel Rodriguez Gomez danke ich für fachliche Gespräche, Motivation sowie unerhaltsame Konversationen während Versuchsenden. Meiner Mit-Doktorandin, jetzt Frau Dr. Barbara Reich und Frau Dr. Gabriela Schiechl für fachliche Unterstützung.

Und natürlich bedanke ich mich auch bei Yvonne Talke für unermüdliche Unterstützung bei Versuchsenden und für Zellkulturarbeiten. Ebenso Danke ich Nicole Göbel für ihre Unterstützung im Tierstall und bei Versuchsenden. Kathrin Schmidbauer danke ich für diverse qPCR.

Auch Frau Dr. Kristina Doser bin ich zu Dank verpflichtet, da sie uns gezeigt hat, wie man eine GvHD initiiert.

Ebenso möchte ich mich besonders bei Sophia Scharl bedanken, die mir während meiner gesamten Promotion seelisch-moralischen Beistand leistete und damit zu einem großen Teil für die Existenz dieser Arbeit gesorgt hat. Florian Lausser danke ich für Unterstützung im Kampf gegen L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, fürs Korrekturlesen und Layouthilfe.

Auch meiner Familie möchte ich hiermit danken, insbesondere meinem Bruder, der mir bei der Strukturierung dieser Arbeit sehr geholfen hat. Des Weiteren danke ich meiner Schwester und meiner Mutter für Korrekturlesungen, ebenso danke ich meinem Vater für stetige Unterstützung während meines Studiums.

Ohne meine Familie wäre ich nie an diesen Punkt in meinem Leben gelangt. Danke.

## Literaturverzeichnis

- 1 Kenneth Murphy. *Janeways Immuno Biology*. Garland Science, Taylor and Francis Group, 8th edition, 2012. 2.1, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.2.1, 2.2, 7.2, 9
- 2 DA Kimbrell and B Beutler. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet*, 2(4):256–267, Apr 2001. 2.1.1
- 3 CA Janeway, Jr. Approaching the asymptote? evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1:1–13, 1989. 2.1.1
- 4 A Poltorak, X He, I Smirnova, MY Liu, C Van Huffel, X Du, D Birdwell, E Alejos, M Silva, C Galanos, M Freudenberg, P Ricciardi-Castagnoli, B Layton, and B Beutler. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396):2085–2088, Dec 1998. 2.1.1
- 5 A Poltorak, I Smirnova, X He, M Y Liu, C Van Huffel, O McNally, D Birdwell, E Alejos, M Silva, X Du, P Thompson, EK Chan, J Ledesma, B Roe, S Clifton, SN Vogel, and B Beutler. Genetic and physical mapping of the lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis*, 24(3):340–355, Sep 1998. 2.1.1
- 6 R Medzhitov, P Preston-Hurlburt, and CA Janeway, Jr. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394–397, Jul 1997. 2.1.1
- 7 R Medzhitov. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity*, 30(6):766–775, Jun 2009. 2.1.1
- 8 CA Janeway, Jr and R Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197–216, 2002. 2.1.1
- 9 DJ Lenschow, TL Walunas, and JA Bluestone. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14:233–258, 1996. 2.1.1
- 10 B Beutler. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, 40(12):845–859, Feb 2004. 2.1.1
- 11 SR Krutzik, B Tan, H Li, MT Ochoa, PT Liu, SE Sharfstein, TG Graeber, PA Sieling, Y Liu, TH Rea, BR Bloom, and RL Modlin. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*, 11(6):653–660, Jun 2005. 2.1.1
- 12 P Gros, FJ Milder, and BJC Janssen. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*, 8(1):48–58, Jan 2008. 2.1.1
- 13 MJ Walport. Complement. first of two parts. *N Engl J Med*, 344(14):1058–1066, Apr 2001. 2.1.1

- 14** LL Lanier. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 23:225–274, 2005. 2.1.1
- 15** R Kiessling, E Klein, and H Wigzell. "Natural"killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 5(2):112–117, Feb 1975. 2.1.1
- 16** RB Herberman, ME Nunn, and DH Lavrin. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*, 16(2):216–229, Aug 1975. 2.1.1
- 17** K Obata, K Mukai, Y Tsujimura, K Ishiwata, Y Kawano, Y Minegishi, N Watanabe, and H Karasuyama. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood*, 110(3):913–920, Aug 2007. 2.1.1, 2.1.1.1
- 18** D Voehringer. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat Rev Immunol*, 13(5):362–375, May 2013. 2.1.1, 2.1.1.1, 6.3, 6.4, 7.1.2
- 19** Paul Ehrlich. *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung*. Dissertation, Universität Leipzig, 1878. 2.1.1.1
- 20** Paul Ehrlich. Beiträge zur kenntnis der granulierten bindegewebszellen und der eosinophilen leukozyten. *Archiv für Anatomie und Physiologie, Physiologische Abteilung*, pages 166–169, Januar 1879. 2.1.1.1
- 21** Paul Ehrlich. Zur geschichte der granula. *Farbanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes*, 1:166–168, 1891. 2.1.1.1
- 22** CM de Barros, LR Andrade, S Allodi, C Viskov, PA Mourier, MCM Cavalcante, AH Straus, HK Takahashi, VH Pomin, VF Carvalho, MA Martins, and MSG Pavao. The hemolymph of the ascidian *styela plicata* (chordata-tunicata) contains heparin inside basophil-like cells and a unique sulfated galactogluconan in the plasma. *J Biol Chem*, 282(3):1615–1626, Jan 2007. 2.1.1.1
- 23** KF Mead, M Borysenko, and SR Findlay. Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *chelydra serpentina*, possess cytophilic surface antibody with reaginic function. *J Immunol*, 130(1):334–340, Jan 1983. 2.1.1.1
- 24** AJ Macfarlane, OM Kon, SJ Smith, K Zeibecoglou, LN Khan, LT Barata, AR McEuen, MG Buckley, AF Walls, Q Meng, M Humbert, NC Barnes, DS Robinson, S Ying, and AB Kay. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol*, 105(1 Pt 1):99–107, Jan 2000. 2.1.1.1
- 25** C Ohnmacht and D Voehringer. Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood*, 113(12):2816–2825, Mar 2009. 2.1.1.1

- 26** M Mack, MA Schneider, C Moll, J Cihak, H Brühl, JW Ellwart, MP Hogarth, M Stangas-singer, and D Schlöndorff. Identification of antigen-capturing cells as basophils. *J Immunol*, 174(2):735–741, Jan 2005. 2.1.1.1
- 27** SZ Ben-Sasson, G Le Gros, DH Conrad, FD Finkelman, and WE Paul. 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(4):1421–1425, Feb 1990. 2.1.1.1, 6.3
- 28** RA Seder, WE Paul, AM Dvorak, SJ Sharkis, A Kagey-Sobotka, Y Niv, FD Finkelman, SA Barbieri, SJ Galli, and M Plaut. 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(7):2835–2839, Apr 1991. 2.1.1.1, 6.3
- 29** E Mitre, RT Taylor, J Kubofcik, and TB Nutman. Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections. *J Immunol*, 172(4):2439–2445, Feb 2004. 2.1.1.1
- 30** A Denzel, UA Maus, M Rodriguez Gomez, C Moll, M Niedermeier, C Winter, R Maus, S Hollingshead, DE Briles, LA Kunz-Schughart, Y Talke, and M Mack. Basophils enhance immunological memory responses. *Nat Immunol*, 9(7):733–742, Jul 2008. 2.1.1.1, 5.3.3, 6.3
- 31** M Rodriguez Gomez, Y Talke, N Goebel, F Hermann, B Reich, and M Mack. Basophils support the survival of plasma cells in mice. *J Immunol*, 185(12):7180–7185, Dec 2010. 2.1.1.1, 6.3
- 32** T Yoshimoto, K Yasuda, H Tanaka, M Nakahira, Y Imai, Y Fujimori, and K Nakanishi. 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(7):706–712, Jul 2009. 2.1.1.1, 6.2, 6.3
- 33** H Hammad, M Plantinga, K Deswarthe, P Pouliot, MAM Willart, M Kool, F Muskens, and BN Lambrecht. Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med*, 207(10):2097–2111, Sep 2010. 2.1.1.1, 2.1.2.3
- 34** Yusuke Tsujimura, Kazushige Obata, Kaori Mukai, Hideo Shindou, Masayuki Yoshida, Hi-deto Nishikado, Yohei Kawano, Yoshiyuki Minegishi, Takao Shimizu, and Hajime Karasuyama. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-g-mediated but not immunoglobulin-e-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*, 28(4):581–589, Apr 2008. 2.1.1.1
- 35** GW Litman, JP Rast, and SD Fugmann. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 10(8):543–553, Aug 2010. 2.1.2
- 36** GJ Nossal and J Lederberg. Antibody production by single cells. *Nature*, 181(4620):1419–1420, May 1958. 2.1.2

- 37** FM Burnet. A modification of jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin*, 26(2):119–121, 1976. 2.1.2
- 38** GF Mitchell and JF Miller. Cell to cell interaction in the immune response. II. the source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med*, 128(4):821–837, Oct 1968. 2.1.2
- 39** J Rogers, P Early, C Carter, K Calame, M Bond, L Hood, and R Wall. Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell*, 20(2):303–312, Jun 1980. 2.1.2
- 40** P Early, J Rogers, M Davis, K Calame, M Bond, R Wall, and L Hood. Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell*, 20(2):313–319, Jun 1980. 2.1.2
- 41** SE Dierks, WC Bartlett, RL Edmeades, HJ Gould, M Rao, and DH Conrad. The oligomeric nature of the murine Fc epsilon RII/CD23. implications for function. *J Immunol*, 150(6):2372–2382, Mar 1993. 2.1.2
- 42** WW Karakawa, A Sutton, R Schneerson, A Karpas, and WF Vann. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated staphylococcus aureus by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*, 56(5):1090–1095, May 1988. 2.1.2
- 43** JR Dunkelberger and W Song. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20(1):34–50, Jan 2010. 2.1.2
- 44** NR Cooper. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol*, 37:151–216, 1985. 2.1.2
- 45** AW Chung, E Rollman, RJ Center, SJ Kent, and I Stratov. Rapid degranulation of NK cells following activation by HIV-specific antibodies. *J Immunol*, 182(2):1202–1210, Jan 2009. 2.1.2
- 46** A Sulica, P Morel, D Metes, and RB Herberman. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Int Rev Immunol*, 20(3-4):371–414, Jun 2001. 2.1.2
- 47** S Tonegawa. Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: further evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(1):203–207, Jan 1976. 2.1.2
- 48** M Weigert, R Perry, D Kelley, T Hunkapiller, J Schilling, and L Hood. The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature*, 283(5746):497–499, Jan 1980. 2.1.2

- 49** B Bertocci, A De Smet, J Weill, and C Reynaud. Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity*, 25(1):31–41, Jul 2006. 2.1.2
- 50** M Pepper and MK Jenkins. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol*, 12(6):467–471, Jun 2011. 2.1.2
- 51** R Ahmed and D Gray. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*, 272(5258):54–60, Apr 1996. 2.1.2
- 52** J Sprent. T and B memory cells. *Cell*, 76(2):315–322, Jan 1994. 2.1.2
- 53** Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. the MHC sequencing consortium. *Nature*, 401(6756):921–923, Oct 1999. 2.1.2.1
- 54** R Holdsworth, CK Hurley, SGE Marsh, M Lau, HJ Noreen, JH Kempenich, M Setterholm, and M Maiers. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens*, 73(2):95–170, Feb 2009. 2.1.2.1, 2.3
- 55** M Bouvier. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol Immunol*, 39(12):697–706, Jan 2003. 2.1.2.1
- 56** J Ruppert, J Sidney, E Celis, RT Kubo, HM Grey, and A Sette. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74(5):929–937, Sep 1993. 2.1.2.1
- 57** M Bouvier and DC Wiley. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, 265(5170):398–402, Jul 1994. 2.1.2.1
- 58** KC Parker, ML Silver, and DC Wiley. An HLA-A2/beta 2-microglobulin/peptide complex assembled from subunits expressed separately in escherichia coli. *Mol Immunol*, 29(3):371–378, Mar 1992. 2.1.2.1
- 59** DH Fremont, WA Hendrickson, P Marrack, and J Kappler. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science*, 272(5264):1001–1004, May 1996. 2.1.2.1
- 60** A Dessen, CM Lawrence, S Cupo, DM Zaller, and DC Wiley. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA\*0101, DRB1\*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*, 7(4):473–481, Oct 1997. 2.1.2.1
- 61** DH Fremont, M Matsumura, EA Stura, PA Peterson, and IA Wilson. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science*, 257(5072):919–927, Aug 1992. 2.1.2.1
- 62** R Abele and R Tampe. Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta*, 1461(2):405–419, Dec 1999. 2.1.2.1

- 63** MJ Androlewicz and P Cresswell. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity*, 1(1):7–14, Apr 1994. 2.1.2.1
- 64** PM van Endert, R Tampe, TH Meyer, R Tisch, JF Bach, and HO McDevitt. A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity*, 1(6):491–500, Sep 1994. 2.1.2.1
- 65** HC Guo, DR Madden, ML Silver, TS Jardetzky, JC Gorga, JL Strominger, and DC Wiley. Comparison of the P2 specificity pocket in three human histocompatibility antigens: HLA-A\*6801, HLA-A\*0201, and HLA-B\*2705. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17):8053–8057, Sep 1993. 2.1.2.1
- 66** PJ Bjorkman, MA Saper, B Samraoui, WS Bennett, JL Strominger, and DC Wiley. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329(6139):506–512, 1987. 2.1.2.1
- 67** AM Norment, RD Salter, P Parham, VH Engelhard, and DR Littman. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*, 336(6194):79–81, Nov 1988. 2.1.2.1
- 68** PA Roche and P Cresswell. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature*, 345(6276):615–618, Jun 1990. 2.1.2.1
- 69** F Castellino, F Zappacosta, JE Coligan, and RN Germain. Large protein fragments as substrates for endocytic antigen capture by MHC class II molecules. *J Immunol*, 161(8):4048–4057, Oct 1998. 2.1.2.1
- 70** R Busch, I Cloutier, RP Sekaly, and GJ Haemmerling. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 15(2):418–428, Jan 1996. 2.1.2.1
- 71** Y Zhu, AY Rudensky, AL Corper, L Teyton, and IA Wilson. Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide-binding motif. *J Mol Biol*, 326(4):1157–1174, Feb 2003. 2.1.2.1
- 72** JJ Neefjes, V Stollorz, PJ Peters, HJ Geuze, and HL Ploegh. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell*, 61(1):171–183, Apr 1990. 2.1.2.1
- 73** EM Hiltbold and PA Roche. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr Opin Immunol*, 14(1):30–35, Feb 2002. 2.1.2.1
- 74** S Viville, J Neefjes, V Lotteau, A Dierich, M Lemeur, H Ploegh, C Benoist, and D Mathis. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell*, 72(4):635–648, Feb 1993. 2.1.2.1
- 75** PE Jensen, DA Weber, WP Thayer, X Chen, and CT Dao. HLA-DM and the MHC class II antigen presentation pathway. *Immunol Res*, 20(3):195–205, 1999. 2.1.2.1

- 76** JA Villadangos. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol*, 38(5):329–346, Sep 2001. 2.1.2.1
- 77** F Castellino and RN Germain. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity*, 2(1):73–88, Jan 1995. 2.1.2.1
- 78** L Pond and C Watts. Functional early endosomes are required for maturation of major histocompatibility complex class II molecules in human B lymphoblastoid cells. *J Biol Chem*, 274(25):18049–18054, Jun 1999. 2.1.2.1
- 79** V Brachet, G Pehau-Arnaudet, C Desaymard, G Raposo, and S Amigorena. Early endosomes are required for major histocompatibility complex class II transport to peptide-loading compartments. *Mol Biol Cell*, 10(9):2891–2904, Sep 1999. 2.1.2.1
- 80** C Doyle and JL Strominger. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*, 330(6145):256–259, 1987. 2.1.2.1
- 81** TR Mosmann, H Cherwinski, MW Bond, MA Giedlin, and RL Coffman. Two types of murine helper T cell clone. i. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7):2348–2357, Apr 1986. 2.1.2.2, 2.1.2.2
- 82** J Zhu, H Yamane, and WE Paul. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*, 28:445–489, 2010. 2.1.2.2, 2.1.2.2, 7.1.2
- 83** SL Reiner. Development in motion: helper T cells at work. *Cell*, 129(1):33–36, Apr 2007. 2.1.2.2
- 84** JJ O’Shea and WE Paul. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, 327(5969):1098–1102, Feb 2010. 2.3, 9
- 85** CS Hsieh, SE Macatonia, CS Tripp, SF Wolf, A O’Garra, and KM Murphy. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by listeria-induced macrophages. *Science*, 260(5107):547–549, Apr 1993. 2.1.2.2
- 86** AA Lighvani, DM Frucht, D Jankovic, H Yamane, J Aliberti, BD Hissong, BV Nguyen, M Gadina, A Sher, WE Paul, and JJ O’Shea. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26):15137–15142, Dec 2001. 2.1.2.2
- 87** FW Fitch, MD McKisic, DW Lancki, and TF Gajewski. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol*, 11:29–48, 1993. 2.1.2.2, 7.1.2
- 88** T Usui, JC Preiss, Y Kanno, ZJ Yao, JH Bream, JJ O’Shea, and W Strober. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFN- $\gamma$  gene acetylation and transcription. *J Exp Med*, 203(3):755–766, Mar 2006. 2.1.2.2

- 89** F Cruz-Guilloty, ME Pipkin, IM Djuretic, D Levanon, J Lotem, MG Lichtenheld, Y Groner, and A Rao. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med*, 206(1):51–59, Jan 2009. 2.1.2.2
- 90** SJ Szabo, BM Sullivan, SL Peng, and LH Glimcher. Molecular mechanisms regulating th1 Timmune responses. *Annu Rev Immunol*, 21:713–758, 2003. 2.1.2.2
- 91** JJ Lafaille. The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9(2):139–151, Jun 1998. 2.1.2.2, 7.1.2
- 92** RS Liblau, SM Singer, and HO McDevitt. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today*, 16(1):34–38, Jan 1995. 2.1.2.2
- 93** A O’Garra, L Steinman, and K Gijbels. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 9(6):872–883, Dec 1997. 2.1.2.2
- 94** S Pai, ML Truitt, and I Ho. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7):1993–1998, Feb 2004. 2.1.2.2
- 95** DH Zhang, L Cohn, P Ray, K Bottomly, and A Ray. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem*, 272(34):21597–21603, Aug 1997. 2.1.2.2
- 96** W Zheng and RA Flavell. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89(4):587–596, May 1997. 2.1.2.2
- 97** RL Coffman and T von der Weid. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *J Exp Med*, 185(3):373–375, Feb 1997. 2.1.2.2
- 98** J Stavnezer, JE J Guikema, and CE Schrader. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*, 26:261–292, 2008. 2.1.2.2
- 99** RS Geha, HH Jabara, and SR Brodeur. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*, 3(9):721–732, Sep 2003. 2.1.2.2
- 100** KM Toellner, SA Luther, DM Sze, RK Choy, DR Taylor, IC MacLennan, and H Acha-Orbea. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J Exp Med*, 187(8):1193–1204, Apr 1998. 2.1.2.2
- 101** RK Grencis. Th2-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352(1359):1377–1384, Sep 1997. 2.1.2.2
- 102** H Haas, FH Falcone, MJ Holland, G Schramm, K Haisch, BF Gibbs, A Bufe, and M Schlaak. Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 119(2):86–94, Jun 1999. 2.1.2.2
- 103** CM Lloyd and S Saglani. T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. *J Allergy Clin Immunol*, 131(5):1267–74; quiz 1275, May 2013. 2.1.2.2

- 104** N Charles, D Hardwick, E Daugas, GG Illei, and J Rivera. Basophils and the T helper 2 environment can promote the development of lupus nephritis. *Nat Med*, 16(6):701–707, Jun 2010. 2.1.2.2
- 105** S Romagnani. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol*, 12:227–257, 1994. 2.1.2.2
- 106** S Aggarwal, N Ghilardi, M Xie, Frederic J de Sauvage, and AL Gurney. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278(3):1910–1914, Jan 2003. 2.1.2.2
- 107** R Nurieva, XO Yang, G Martinez, Y Zhang, AD Panopoulos, L Ma, K Schluns, Q Tian, SS Watowich, AM Jetten, and C Dong. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448(7152):480–483, Jul 2007. 2.1.2.2
- 108** LE Harrington, RD Hatton, PR Mangan, H Turner, TL Murphy, KM Murphy, and CT Weaver. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6(11):1123–1132, Nov 2005. 2.1.2.2, 2.3.2
- 109** H Park, Z Li, XO Yang, S Chang, R Nurieva, Y Wang, Y Wang, L Hood, Z Zhu, Q Tian, and C Dong. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6(11):1133–1141, Nov 2005. 2.1.2.2, 2.3.2
- 110** M Veldhoen, RJ Hocking, CJ Atkins, RM Locksley, and B Stockinger. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2):179–189, Feb 2006. 2.1.2.2
- 111** II Ivanov, BS McKenzie, L Zhou, CE Tadokoro, A Lepelley, JJ Lafaille, DJ Cua, and DR Littman. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6):1121–1133, Sep 2006. 2.1.2.2
- 112** E Bettelli, M Oukka, and VK Kuchroo. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*, 8(4):345–350, Apr 2007. 2.1.2.2
- 113** V Dardalhon, T Korn, VK Kuchroo, and AC Anderson. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun*, 31(3):252–256, Nov 2008. 2.1.2.2
- 114** Y Nishizuka and T Sakakura. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166(3906):753–755, Nov 1969. 2.1.2.2
- 115** MD Rosenblum, IK Gratz, JS Paw, K Lee, A Marshak-Rothstein, and AK Abbas. Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues. *Nature*, 480(7378):538–542, Dec 2011. 2.1.2.2
- 116** AJ Caton, C Cozzo, J Larkin, MA Lerman, A Boesteanu, and MS Jordan. CD4(+) CD25(+) regulatory T cell selection. *Ann N Y Acad Sci*, 1029:101–114, Dec 2004. 2.1.2.2

- 117** G Wirnsberger, M Hinterberger, and L Klein. Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes. *Immunol Cell Biol*, 89(1):45–53, Jan 2011. 2.1.2.2
- 118** S Sakaguchi, N Sakaguchi, M Asano, M Itoh, and M Toda. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3):1151–1164, Aug 1995. 2.1.2.2
- 119** S Hori, T Nomura, and S Sakaguchi. Control of regulatory T cell development by the transcription factor foxp3. *Science*, 299(5609):1057–1061, Feb 2003. 2.1.2.2
- 120** Y Zheng and AY Rudensky. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*, 8(5):457–462, May 2007. 2.1.2.2
- 121** T Bopp, C Becker, M Klein, S Klein-Hessling, A Palmetshofer, E Serfling, V Heib, M Becker, J Kubach, S Schmitt, S Stoll, H Schild, MS Staegge, M Stassen, H Jonuleit, and E Schmitt. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, 204(6):1303–1310, Jun 2007. 2.1.2.2
- 122** RK Gershon, P Cohen, R Hencin, and SA Liebhaber. Suppressor T cells. *J Immunol*, 108(3):586–590, Mar 1972. 2.1.2.2
- 123** EM Shevach, RS McHugh, CA Piccirillo, and AM Thornton. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev*, 182:58–67, Aug 2001. 2.1.2.2
- 124** TRF Smith and V Kumar. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol*, 29(7):337–342, Jul 2008. 2.1.2.2
- 125** LM Williams and AY Rudensky. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol*, 8(3):277–284, Mar 2007. 2.1.2.2
- 126** JD Fontenot, MA Gavin, and AY Rudensky. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4):330–336, Apr 2003. 2.1.2.2
- 127** HL Weiner. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 182:207–214, Aug 2001. 2.1.2.2
- 128** Y Chen, VK Kuchroo, J Inobe, DA Hafler, and HL Weiner. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 265(5176):1237–1240, Aug 1994. 2.1.2.2
- 129** ME Brunkow, EW Jeffery, KA Hjerrild, B Paepke, LB Clark, SA Yasayko, JE Wilkinson, D Galas, SF Ziegler, and F Ramsdell. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27(1):68–73, Jan 2001. 2.1.2.2

- 130** CL Bennett, J Christie, F Ramsdell, ME Brunkow, PJ Ferguson, L Whitesell, TE Kelly, FT Saulsbury, PF Chance, and HD Ochs. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 27(1):20–21, Jan 2001. 2.1.2.2
- 131** K Oh, T Shen, G Le Gros, and B Min. Induction of Th2 type immunity in a mouse system reveals a novel immunoregulatory role of basophils. *Blood*, 109(7):2921–2927, Apr 2007. 2.1.2.3
- 132** CL Sokol, GM Barton, AG Farr, and R Medzhitov. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*, 9(3):310–318, Mar 2008. 2.1.2.3
- 133** JG Perrigoue, SA Saenz, MC Siracusa, EJ Allenspach, BC Taylor, PR Giacomin, MG Nair, Y Du, C Zaph, N van Rooijen, MR Comeau, EJ Pearce, M Laufer, and D Artis. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(h)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol*, 10(7):697–705, Jul 2009. 2.1.2.3, 6.3
- 134** H Tang, W Cao, SP Kasturi, R Ravindran, HI Nakaya, K Kundu, N Murthy, TB Kepler, B Malissen, and B Pulendran. The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nat Immunol*, 11(7):608–617, Jul 2010. 2.1.2.3
- 135** C Ohnmacht, C Schwartz, M Panzer, I Schiedewitz, R Naumann, and D Voehringer. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity*, 33(3):364–374, Sep 2010. 2.1.2.3
- 136** S Kim, M Prout, H Ramshaw, AF Lopez, G LeGros, and B Min. Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *J Immunol*, 184(3):1143–1147, Feb 2010. 2.1.2.3
- 137** Y Matsuzaki, J Gyotoku, M Ogawa, S Nishikawa, Y Katsura, G Gachelin, and H Nakauchi. Characterization of c-kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation. *J Exp Med*, 178(4):1283–1292, Oct 1993. 2.1.2.4
- 138** L Wu, R Scollay, M Egerton, M Pearse, GJ Spangrude, and K Shortman. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature*, 349(6304):71–74, Jan 1991. 2.1.2.4
- 139** A Wilson, HR MacDonald, and F Radtke. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med*, 194(7):1003–1012, Oct 2001. 2.1.2.4
- 140** F Radtke, A Wilson, G Stark, M Bauer, J van Meerwijk, HR MacDonald, and M Aguet. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of notch1. *Immunity*, 10(5):547–558, May 1999. 2.1.2.4

- 141** M Merkenschlager, D Graf, M Lovatt, U Bommhardt, R Zamoyska, and AG Fisher. How many thymocytes audition for selection? *J Exp Med*, 186(7):1149–1158, Oct 1997. 2.1.2.4
- 142** RN Germain. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2(5):309–322, May 2002. 2.4, 9
- 143** C Borowski, C Martin, F Gounari, L Haughn, I Aifantis, F Grassi, and H von Boehmer. On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol*, 14(2):200–206, Apr 2002. 2.1.2.4
- 144** EC Dudley, HT Petrie, LM Shah, MJ Owen, and AC Hayday. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity*, 1(2):83–93, May 1994. 2.1.2.4
- 145** SS Pang, R Berry, Z Chen, L Kjer-Nielsen, MA Perugini, GF King, C Wang, S Chew, NL La Gruta, NK Williams, T Beddoe, NP Cowieson, DI Godfrey, AW Purcell, MCJ Wilce, J McCluskey, and J Rossjohn. The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor. *Nature*, 467(7317):844–848, Oct 2010. 2.1.2.4
- 146** H von Boehmer. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol*, 5(7):571–577, Jul 2005. 2.1.2.4
- 147** C Huang, BP Sleckman, and O Kanagawa. Revision of T cell receptor alpha chain genes is required for normal T lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40):14356–14361, Oct 2005. 2.1.2.4
- 148** B Scott, H Bluethmann, HS Teh, and H von Boehmer. The generation of mature T cells requires interaction of the alpha beta T-cell receptor with major histocompatibility antigens. *Nature*, 338(6216):591–593, Apr 1989. 2.1.2.4
- 149** HS Teh, P Kisielow, B Scott, H Kishi, Y Uematsu, H Bluethmann, and H von Boehmer. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*, 335(6187):229–233, Sep 1988. 2.1.2.4
- 150** J Kaye, ML Hsu, ME Sauron, SC Jameson, NR Gascoigne, and SM Hedrick. Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature*, 341(6244):746–749, Oct 1989. 2.1.2.4
- 151** LJ Berg, AM Pullen, B Fazekas de St Groth, D Mathis, C Benoist, and MM Davis. Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell*, 58(6):1035–1046, Sep 1989. 2.1.2.4
- 152** K Yasutomo, C Doyle, L Miele, C Fuchs, and RN Germain. The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature*, 404(6777):506–510, Mar 2000. 2.1.2.4

- 153** RM Zinkernagel and PC Doherty. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*, 251(5475):547–548, Oct 1974. 2.1.2.4
- 154** RM Zinkernagel and PC Doherty. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(450):701–702, Apr 1974. 2.1.2.4
- 155** RM Zinkernagel, GN Callahan, J Klein, and G Dennert. Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus. *Nature*, 271(5642):251–253, Jan 1978. 2.1.2.4
- 156** PJ Fink and MJ Bevan. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J Exp Med*, 148(3):766–775, Sep 1978. 2.1.2.4
- 157** KA Hogquist, AJ Tomlinson, WC Kieper, MA McGargill, MC Hart, S Naylor, and SC Jameson. Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity*, 6(4):389–399, Apr 1997. 2.1.2.4
- 158** H Kishimoto and J Sprent. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med*, 185(2):263–271, Jan 1997. 2.1.2.4
- 159** T Zal, A Volkmann, and B Stockinger. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med*, 180(6):2089–2099, Dec 1994. 2.1.2.4
- 160** TM McCaughtry, TA Baldwin, MS Wilken, and KA Hogquist. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med*, 205(11):2575–2584, Oct 2008. 2.1.2.4
- 161** SR Webb and J Sprent. Tolerogenicity of thymic epithelium. *Eur J Immunol*, 20(11):2525–2528, Nov 1990. 2.1.2.4
- 162** D Mathis and C Benoist. Aire. *Annu Rev Immunol*, 27:287–312, 2009. 2.1.2.4
- 163** F Hubert, SA Kinkel, KE Webster, P Cannon, PE Crewther, AI Proetto, L Wu, WR Heath, and HS Scott. A specific anti-aire antibody reveals aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery. *J Immunol*, 180(6):3824–3832, Mar 2008. 2.1.2.4
- 164** MS Anderson, ES Venanzi, L Klein, Z Chen, SP Berzins, SJ Turley, H von Boehmer, R Bronson, A Dierich, C Benoist, and D Mathis. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298(5597):1395–1401, Nov 2002. 2.1.2.4

- 165** U Bommhardt, Y Scheuring, C Bickel, R Zamoyska, and T Hünig. MEK activity regulates negative selection of immature CD4+CD8+ thymocytes. *J Immunol*, 164(5):2326–2337, Mar 2000. 2.1.2.4
- 166** PG Ashton-Rickardt, A Bandeira, JR Delaney, L Van Kaer, HP Pircher, RM Zinkernagel, and S Tonegawa. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell*, 76(4):651–663, Feb 1994. 2.1.2.4
- 167** KA. Hogquist, SC. Jameson, WR. Heath, JL. Howard, MJ. Bevan, and FR. Carbone. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76(1):17–27, Jan 1994. 2.1.2.4
- 168** JN Blattman, R Antia, DJD Sourdive, X Wang, SM Kaech, K Murali-Krishna, JD Altman, and R Ahmed. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med*, 195(5):657–664, Mar 2002. 2.2
- 169** K Murali-Krishna, JD Altman, M Suresh, DJ Sourdive, AJ Zajac, JD Miller, J Slansky, and R Ahmed. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*, 8(2):177–187, Feb 1998. 2.2
- 170** DF Tough and J Sprent. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med*, 179(4):1127–1135, Apr 1994. 2.2
- 171** JC Howard. The life-span and recirculation of marrow-derived small lymphocytes from the rat thoracic duct. *J Exp Med*, 135(2):185–199, Feb 1972. 2.2
- 172** C Viret, FS Wong, and CA Janeway, Jr. Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity*, 10(5):559–568, May 1999. 2.2
- 173** P Muranski, B Chmielowski, and L Ignatowicz. Mature CD4+ T cells perceive a positively selecting class II MHC/peptide complex in the periphery. *J Immunol*, 164(6):3087–3094, Mar 2000. 2.2
- 174** Q Ge, VP Rao, BK Cho, HN Eisen, and J Chen. Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1728–1733, Feb 2001. 2.2
- 175** Y Modigliani, G Coutinho, O Burlen-Defranoux, A Coutinho, and A Bandeira. Differential contribution of thymic outputs and peripheral expansion in the development of peripheral T cell pools. *Eur J Immunol*, 24(5):1223–1227, May 1994. 2.2
- 176** A Le Campion, C Bourgeois, F Lambolez, B Martin, S Laument, N Dautigny, C Tanchot, C Ponit, and B Lucas. Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(7):4538–4543, Apr 2002. 2.2

- 177** S Oehen and K Brduscha-Riem. Naive cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies? *Eur J Immunol*, 29(2):608–614, Feb 1999. 2.2
- 178** J Bender, T Mitchell, J Kappler, and P Marrack. CD4+ T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *J Exp Med*, 190(3):367–374, Aug 1999. 2.2
- 179** C Ferreira, T Barthlott, S Garcia, R Zamoyska, and B Stockinger. Differential survival of naive CD4 and CD8 T cells. *J Immunol*, 165(7):3689–3694, Oct 2000. 2.2
- 180** SC Jameson. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2(8):547–556, Aug 2002. 2.2
- 181** KS Schluns, K Williams, A Ma, X X Zheng, and L Lefrancois. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol*, 168(10):4827–4831, May 2002. 2.2
- 182** AW Goldrath, PV Sivakumar, M Glaccum, MK Kennedy, MJ Bevan, C Benoist, D Mathis, and EA Butz. Cytokine requirements for acute and basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med*, 195(12):1515–1522, Jun 2002. 2.2
- 183** JC Rathmell, EA Farkash, W Gao, and CB Thompson. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol*, 167(12):6869–6876, Dec 2001. 2.2
- 184** JT Tan, E Dudl, E LeRoy, R Murray, J Sprent, KI Weinberg, and CD Surh. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15):8732–8737, Jul 2001. 2.2
- 185** LA Napolitano, RM Grant, SG Deeks, D Schmidt, SC De Rosa, LA Herzenberg, BG Hern-dier, J Andersson, and JM McCune. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med*, 7(1):73–79, Jan 2001. 2.2
- 186** TK Teague, P Marrack, JW Kappler, and AT Vella. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol*, 158(12):5791–5796, Jun 1997. 2.2, 7.1
- 187** A Vella, TK Teague, J Ihle, J Kappler, and P Marrack. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med*, 186(2):325–330, Jul 1997. 2.2
- 188** S Maury, B Salomon, D Klatzmann, and JL Cohen. Division rate and phenotypic differences discriminate alloreactive and nonalloreactive T cells transferred in lethally irradiated mice. *Blood*, 98(10):3156–3158, Nov 2001. 2.2

- 189** MC Pasquini, Z Wang, MM Horowitz, and RP Gale. 2010 report from the center for international blood and marrow transplant research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin Transpl*, pages 87–105, 2010. 2.3
- 190** DW Barnes, MJ Corp, JF Loutit, and FE Neal. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J*, 2(4993):626–627, Sep 1956. 2.3
- 191** DW Barnes, JF Loutit, and HS Micklem. Secondary disease of radiation chimeras: a syndrome due to lymphoid aplasia. *Ann N Y Acad Sci*, 99:374–385, Oct 1962. 2.3
- 192** DW van Bekkum, MJ de Vries, and D van der Waay. Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras. *J Natl Cancer Inst*, 38(2):223–231, Feb 1967. 2.3
- 193** RE Billingham. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*, 62:21–78, 1966. 2.3
- 194** BR Blazar, WJ Murphy, and M Abedi. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*, 12(6):443–458, Jun 2012. 2.3, 2.3.2, 2.6, 9
- 195** F Aosai, C Ohlen, HG Ljunggren, P Höglund, L Franksson, H Ploegh, A Townsend, K Kärre, and HJ Stauss. Different types of allospecific CTL clones identified by their ability to recognize peptide loading-defective target cells. *Eur J Immunol*, 21(11):2767–2774, Nov 1991. 2.3
- 196** WD Shlomchik. Antigen presentation in graft-vs-host disease. *Exp Hematol*, 31(12):1187–1197, Dec 2003. 2.3, 7.5
- 197** R Lechler, WF Ng, and RM Steinman. Dendritic cells in transplantation—friend or foe? *Immunity*, 14(4):357–368, Apr 2001. 2.3
- 198** P Hornick and R Lechler. Direct and indirect pathways of alloantigen recognition: relevance to acute and chronic allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 12(9):1806–1810, Sep 1997. 2.3, 2.3.2
- 199** JM den Haan, NE Sherman, E Blokland, E Huczko, F Koning, JW Drijfhout, J Skipper, J Shabanowitz, DF Hunt, and VH Engelhard. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science*, 268(5216):1476–1480, Jun 1995. 2.3.1
- 200** DB Miklos, HT Kim, KH Miller, L Guo, E Zorn, SJ Lee, EP Hochberg, CJ Wu, EP Alyea, C Cutler, V Ho, RJ Soiffer, JH Antin, and J Ritz. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood*, 105(7):2973–2978, Apr 2005. 2.3.1

- 201** W. Wang, L. R. Meadows, J. M. den Haan, N. E. Sherman, Y. Chen, E. Blokland, J. Shabanowitz, A. I. Agulnik, R. C. Hendrickson, and C. E. Bishop. Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science*, 269(5230):1588–1590, Sep 1995. 2.3.1
- 202** J.M den Haan, LM Meadows, W Wang, J Pool, E Blokland, TL Bishop, C Reinhardus, J Shabanowitz, R Offringa, DF Hunt, VH Engelhard, and E Goulmy. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science*, 279(5353):1054–1057, Feb 1998. 2.3.1
- 203** M de Bueger, A Bakker, JJ Van Rood, F Van der Woude, and E Goulmy. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. *J Immunol*, 149(5):1788–1794, Sep 1992. 2.3.1
- 204** P Fontaine, G Roy-Proulx, L Knafo, C Baron, DC Roy, and C Perreault. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med*, 7(7):789–794, Jul 2001. 2.3.1
- 205** FR Appelbaum. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*, 411(6835):385–389, May 2001. 2.3.1
- 206** EW Petersdorf, TA Gooley, C Anasetti, PJ Martin, AG Smith, EM Mickelson, AE Woolfrey, and JA Hansen. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood*, 92(10):3515–3520, Nov 1998. 2.3.1
- 207** EW Petersdorf, GM Longton, C Anasetti, EM Mickelson, SK McKinney, AG Smith, PJ Martin, and JA Hansen. Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*, 89(5):1818–1823, Mar 1997. 2.3.1
- 208** MM Horowitz, RP Gale, PM Sondel, JM Goldman, J Kersey, HJ Kolb, AA Rimm, O Ringden, C Rozman, and B Speck. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75(3):555–562, Feb 1990. 2.3.1, 2.5, 9
- 209** R Korngold and J Sprent. Variable capacity of L3T4+ T cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. *J Exp Med*, 165(6):1552–1564, Jun 1987. 2.3.2, 7.2
- 210** NA Kernan, NH Collins, L Juliano, T Cartagena, B Dupont, and RJ O'Reilly. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*, 68(3):770–773, Sep 1986. 2.3.2, 7.2
- 211** JH Antin and JL Ferrara. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood*, 80(12):2964–2968, Dec 1992. 2.3.2

- 212** JLM Ferrara, KR Cooke, and T Teshima. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol*, 78(3):181–187, Oct 2003. 2.3.2
- 213** W Krenger, GR Hill, and JL Ferrara. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*, 64(4):553–558, Aug 1997. 2.3.2
- 214** KR Cooke, GR Hill, JM Crawford, D Bungard, YS Brinson, J Delmonte, Jr, and JL Ferrara. Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, 102(10):1882–1891, Nov 1998. 2.3.2
- 215** GR Hill, JM Crawford, KR Cooke, YS Brinson, L Pan, and JL Ferrara. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*, 90(8):3204–3213, Oct 1997. 2.3.2, 2.3.3
- 216** CQ Xun, JS Thompson, CD Jennings, SA Brown, and MB Widmer. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted scid mice. *Blood*, 83(8):2360–2367, Apr 1994. 2.3.2
- 217** EP Alyea, HT Kim, V Ho, C Cutler, DJ DeAngelo, R Stone, J Ritz, JH Antin, and RJ Soiffer. Impact of conditioning regimen intensity on outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant*, 12(10):1047–1055, Oct 2006. 2.3.2
- 218** BE Anderson, J McNiff, J Yan, H Doyle, M Mamula, MJ Shlomchik, and WD Shlomchik. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, 112(1):101–108, Jul 2003. 2.3.2
- 219** H Zheng, C Matte-Martone, H Li, BE Anderson, S Venkatesan, H Sheng Tan, D Jain, J McNiff, and WD Shlomchik. Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood*, 111(4):2476–2484, Feb 2008. 2.3.2
- 220** A Beilhack, S Schulz, J Baker, GF Beilhack, CB Wieland, EI Herman, EM Baker, Y Cao, CH Contag, and RS Negrin. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*, 106(3):1113–1122, Aug 2005. 2.3.2
- 221** Y Zhang, J Louboutin, J Zhu, AJ Rivera, and SG Emerson. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, 109(10):1335–1344, May 2002. 2.3.2
- 222** WD Shlomchik, MS Couzens, CB Tang, J McNiff, ME Robert, J Liu, MJ Shlomchik, and SG Emerson. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, 285(5426):412–415, Jul 1999. 2.3.2

- 223** M Koyama, RD Kuns, SD Olver, NC Raffelt, YA Wilson, AL J Don, KE Lineburg, M Cheong, RJ Robb, KA Markey, A Varelias, B Malissen, GJ Hämmerling, AD Clouston, CR Engwerda, P Bhat, KPA MacDonald, and GR Hill. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med*, 18(1):135–142, Jan 2012. 2.3.2
- 224** M Murai, H Yoneyama, T Ezaki, M Suematsu, Y Terashima, A Harada, H Hamada, H Asakura, H Ishikawa, and K Matsushima. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol*, 4(2):154–160, Feb 2003. 2.3.2
- 225** H Li, AJ Demetris, J McNiff, C Matte-Martone, H Tan, DM Rothstein, FG Lakkis, and WD Shlomchik. Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction. *J Immunol*, 188(8):3804–3811, Apr 2012. 2.3.2
- 226** AB Troutt and A Kelso. Enumeration of lymphokine mRNA-containing cells in vivo in a murine graft-versus-host reaction using the PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12):5276–5280, Jun 1992. 2.3.2, 7.2
- 227** RD Allen, TA Staley, and CL Sidman. Differential cytokine expression in acute and chronic murine graft-versus-host-disease. *Eur J Immunol*, 23(2):333–337, Feb 1993. 2.3.2, 7.2
- 228** D De Wit, M Van Mechelen, C Zanin, JM Doutrelepont, T Velu, C Gerard, D Abramowicz, JP Scheerlinck, P De Baetselier, and J Urbain. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J Immunol*, 150(2):361–366, Jan 1993. 2.3.2, 7.2
- 229** WJ Murphy, LA Welniak, DD Taub, RH Wiltzout, PA Taylor, DA Vallera, M Kopf, H Young, DL Longo, and BR Blazar. Differential effects of the absence of interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Clin Invest*, 102(9):1742–1748, Nov 1998. 2.3.2
- 230** I Tawara, Y Maeda, Y Sun, KP Lowler, C Liu, T Toubai, ANJ McKenzie, and P Reddy. Combined Th2 cytokine deficiency in donor T cells aggravates experimental acute graft-vs-host disease. *Exp Hematol*, 36(8):988–996, Aug 2008. 2.3.2
- 231** B Nikolic, S Lee, RT Bronson, MJ Grusby, and M Sykes. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest*, 105(9):1289–1298, May 2000. 2.3.2
- 232** J Choi, ED Ziga, J Ritchey, L Collins, JL Prior, ML Cooper, D Piwnica-Worms, and JF DiPersio. IFN signaling mediates alloreactive T-cell trafficking and GVHD. *Blood*, 120(19):4093–4103, Nov 2012. 2.3.2, 7.2
- 233** K Sun, H Hsiao, M Li, E Ames, M Bouchlaka, LA Welniak, T Hagino, J Jagdeo, C Pai, M Chen, BR Blazar, M Abedi, and WJ Murphy. IFN-ceptor-deficient donor T cells mediate

- protection from graft-versus-host disease and preserve graft-versus-tumor responses after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol*, 189(4):2033–2042, Aug 2012. 2.3.2
- 234** YG Yang, BR Dey, JJ Sergio, DA Pearson, and M Sykes. Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J Clin Invest*, 102(12):2126–2135, Dec 1998. 2.3.2, 7.2
- 235** C Koenecke, C Lee, K Thamm, L Föhse, M Schafferus, H Mitträcker, S Floess, J Huehn, A Ganser, R Förster, and I Prinz. IFN- $\alpha$ duction by allogeneic foxp3 $^{+}$  regulatory T cells is essential for preventing experimental graft-versus-host disease. *J Immunol*, 189(6):2890–2896, Sep 2012. 2.3.2, 7.2
- 236** MJ Carlson, ML West, JM Coghill, A Panoskaltsis-Mortari, BR Blazar, and JS Serody. In vitro-differentiated Th17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood*, 113(6):1365–1374, Feb 2009. 2.3.2
- 237** LW Kappel, GL Goldberg, CG King, DY Suh, OM. Smith, C Ligh, AM Holland, J Grubin, NM Mark, C Liu, Y Iwakura, G Heller, and MR?M. van den Brink. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood*, 113(4):945–952, Jan 2009. 2.3.2
- 238** T Yi, D Zhao, C Lin, C Zhang, Y Chen, I Todorov, T LeBon, F Kandeel, S Forman, and D Zeng. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood*, 112(5):2101–2110, Sep 2008. 2.3.2
- 239** LM Fulton, MJ Carlson, JM Coghill, LE Ott, ML West, A Panoskaltsis-Mortari, DR Littman, BR Blazar, and JS Serody. Attenuation of acute graft-versus-host disease in the absence of the transcription factor ROR. *J Immunol*, 189(4):1765–1772, Aug 2012. 2.3.2
- 240** HP Brok, JM Vossen, and PJ Heidt. IFN-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: pharmacodynamic studies and influence on proliferative capacity of chimeric spleen cells. *Bone Marrow Transplant*, 22(10):1005–1010, Nov 1998. 2.3.2
- 241** DB Leveson-Gower, JA Olson, EI Sega, RH Luong, J Baker, R Zeiser, and RS Negrin. Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4-dependent mechanism. *Blood*, 117(11):3220–3229, Mar 2011. 2.3.2, 7.2
- 242** PJ Heidt and JM Vossen. Experimental and clinical gnotobiotics: influence of the microflora on graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Med*, 23(3–4):161–173, 1992. 2.3.3
- 243** F Baron, JE Baker, R Storb, TA Gooley, BM Sandmaier, MB Maris, DG Maloney, S Heimfeld, D Oparin, E Zellmer, JP Radich, FC Grumet, KG Blume, TR Chauncey, and M Little. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*, 104(8):2254–2262, Oct 2004. 2.3.3

- 244** BD Kahan. Cyclosporine. *N Engl J Med*, 321(25):1725–1738, Dec 1989. 2.3.3
- 245** J Jolivet, KH Cowan, GA Curt, NJ Clendeninn, and BA Chabner. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med*, 309(18):1094–1104, Nov 1983. 2.3.3
- 246** B Neven, S Leroy, H Decaluwe, F Le Deist, C Picard, D Moshous, N Mahlaoui, M Debra, J Casanova, L Dal Cortivo, Y Madec, S Hacein-Bey-Abina, G de Saint Basile, J de Villartay, S Blanche, M Cavazzana-Calvo, and A Fischer. Long-term outcome after hematopoietic stem cell transplantation of a single-center cohort of 90 patients with severe combined immunodeficiency. *Blood*, 113(17):4114–4124, Apr 2009. 2.3.3
- 247** S Miltenyi, W Müller, W Weichel, and A Radbruch. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2):231–238, 1990. 5.1.5, 5.2, 9
- 248** AB Lyons and CR Parish. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 171(1):131–137, May 1994. 5.1.6
- 249** G Koopman, CP Reutelingsperger, GA Kuijten, RM Keehnen, ST Pals, and MH van Oers. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5):1415–1420, Sep 1994. 5.1.9
- 250** B Schutte, R Nuydens, H Geerts, and F Ramaekers. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J Neurosci Methods*, 86(1):63–69, Dec 1998. 5.1.9
- 251** SA Latt. Fluorescent probes of chromosome structure and replication. *Can J Genet Cytol*, 19(4):603–623, Dec 1977. 5.1.9
- 252** Kierano. Abbildung zytometer, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:cytometer.svg>. Wikipedia, October 2012. 5.3, 9
- 253** S Sabban. *Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high- affinity Fc $\epsilon$ RI receptor*. PhD thesis, The University of Sheffield, 2011. 5.4, 9
- 254** S Avrameas and B Guilbert. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol*, 1(5):394–396, Nov 1971. 5.2.2
- 255** E Engvall and P Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, Sep 1971. 5.2.2
- 256** TB Dunn. Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. *J Natl Cancer Inst*, 14(6):1281–1433, Jun 1954. 5.5, 9

- 257** KR Cooke, L Kobzik, TR Martin, J Brewer, J Delmonte, Jr, JM Crawford, and JL Ferrara. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*, 88(8):3230–3239, Oct 1996. 5.3.6
- 258** H Von Boehmer and PB Adams. Syngeneic mixed lymphocyte reaction between thymocytes and peripheral lymphoid cells in mice: strain specificity and nature of the target cell. *J Immunol*, 110(2):376–383, Feb 1973. 6.1
- 259** ML Howe. Isogeneic lymphocyte interaction: responsiveness of murine thymocytes to self antigens. *J. Immunol.*, 110(4):1090–1096, April 1973. 6.1
- 260** NM Ponzio, JH Finke, and JR Battisto. Adult murine lymph node cells respond blastogenically to a new differentiation antigen on isologous and autologous B lymphocytes. *J Immunol*, 114(3):971–975, Mar 1975. 6.1, 7.1.2
- 261** R Steinman, B Gutchinov, M Witmer, and M Nussenzweig. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med.*, 157(2)(0022-1007 (Linking)):613–27, Feb 1983. 6.1, 7.1.2
- 262** LH Glimcher, DL Longo, I Green, and RH Schwartz. Murine syngeneic mixed lymphocyte response. I. Target antigens are self ia molecules. *J Exp Med*, 154(5):1652–1670, Nov 1981. 6.1
- 263** MC Nussenzweig and RM Steinman. Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J Exp Med*, 151(5):1196–1212, May 1980. 6.1
- 264** SA Didichenko, N Spiegl, T Brunner, and CA Dahinden. IL-3 induces a pim1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils. *Blood*, 112(10):3949–3958, Nov 2008. 6.2
- 265** BC Poulsen, LK Poulsen, and BM Jensen. Detection of MHC class II expression on human basophils is dependent on antibody specificity but independent of atopic disposition. *J Immunol Methods*, 381(1-2):66–69, Jul 2012. 6.3
- 266** CL Sokol, N Chu, S Yu, SA Nish, TM Laufer, and R Medzhitov. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol*, 10(7):713–720, Jul 2009. 6.3
- 267** E Schneider, N Thieblemont, ML De Moraes, and M Dy. Basophils: new players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw*, 21(3):142–153, Sep 2010. 6.3, 6.4, 7.1.2
- 268** RA Seder, WE Paul, SZ Ben-Sasson, GS LeGros, A Kagey-Sobotka, FD Finkelman, JH Pierce, and M Plaut. 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(1-4):137–140, 1991. 6.3

- 269** MV Dhodapkar, RM Steinman, J Krasovsky, C Munz, and N Bhardwaj. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*, 193(2):233–238, Jan 2001. 6.3
- 270** Harald Wajant. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296(5573):1635–1636, May 2002. 6.3
- 271** R Zhai, A Jiang, H Wang, L Ma, X Ren, J Jiang, L Wu, J Wei, and J Wang. Histamine enhances HIV-1-induced modulation of dendritic cells to skew naive T cell differentiation toward regulatory T cells. *Virology*, 442(2):163–172, Aug 2013. 6.4
- 272** K Doser. *Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation*. PhD thesis, Universität Regensburg, 2011. 6.11.2, 7.2
- 273** AL Wurster, DJ Withers, T Uchida, MF White, and MJ Grusby. Stat6 and IRS-2 cooperate in interleukin 4 (IL-4)-induced proliferation and differentiation but are dispensable for IL-4-dependent rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol*, 22(1):117–126, Jan 2002. 7.1
- 274** MH Kaplan, C Daniel, U Schindler, and MJ Grusby. Stat proteins control lymphocyte proliferation by regulating p27Kip1 expression. *Mol Cell Biol*, 18(4):1996–2003, Apr 1998. 7.1
- 275** A Rebollo, L Dumoutier, JC Renauld, A Zaballos, V Ayllon, and C Martinez-A. Bcl-3 expression promotes cell survival following interleukin-4 deprivation and is controlled by AP1 and AP1-like transcription factors. *Mol Cell Biol*, 20(10):3407–3416, May 2000. 7.1
- 276** DA Morgan, FW Ruscetti, and R Gallo. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 193(4257):1007–1008, Sep 1976. 7.1
- 277** D. A. Cantrell and K. A. Smith. The interleukin-2 t-cell system: a new cell growth model. *Science*, 224(4655):1312–1316, Jun 1984. 7.1
- 278** K. A. Smith. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, 240(4856):1169–1176, May 1988. 7.1
- 279** C Conticello, F Pedini, A Zeuner, M Patti, M Zerilli, G Stassi, A Messina, C Peschle, and R De Maria. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *J Immunol*, 172(9):5467–5477, May 2004. 7.1
- 280** VA Illera, CE Perandones, LL Stunz, DA Mower, Jr, and RF Ashman. Apoptosis in splenic B lymphocytes. regulation by protein kinase C and IL-4. *J Immunol*, 151(6):2965–2973, Sep 1993. 7.1
- 281** JT Opferman, A Letai, C Beard, MD. Sorcinelli, CC. Ong, and SJ Korsmeyer. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 426(6967):671–676, Dec 2003. 7.1

- 282** K Takeda, T Kaisho, N Yoshida, J Takeda, T Kishimoto, and S Akira. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific stat3-deficient mice. *J Immunol*, 161(9):4652–4660, Nov 1998. 7.1
- 283** A Skapenko, JR Kalden, PE Lipsky, and H Schulze-Koops. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box p3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol*, 175(9):6107–6116, Nov 2005. 7.1.1
- 284** AB Pillai, TI George, S Dutt, and S Strober. Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood*, 113(18):4458–4467, Apr 2009. 7.1.1, 7.2
- 285** X Chen, R Das, R Komorowski, A Beres, MJ Hessner, M Mihara, and WR Drobyski. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood*, 114(4):891–900, Jul 2009. 7.1.1
- 286** GV Shurin, Y Ma, and MR Shurin. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer. *Cancer Microenviron*, 6(2):159–167, Aug 2013. 7.1.1
- 287** H Hadeiba, T Sato, A Habtezion, C Oderup, J Pan, and EC Butcher. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol*, 9(11):1253–1260, Nov 2008. 7.1.1
- 288** K Steinbrink, M Woelfl, H Jonuleit, J Knop, and AH Enk. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*, 159(10):4772–4780, Nov 1997. 7.1.1
- 289** Q Chen, F He, J Kwang, JKY Chan, and J Chen. GM-CSF and IL-4 stimulate antibody responses in humanized mice by promoting T, B, and dendritic cell maturation. *J Immunol*, 189(11):5223–5229, Dec 2012. 7.1.1
- 290** A Prasse, M Germann, DV Pechkovsky, A Markert, T Verres, M Stahl, I Melchers, W Luttmann, J Müller-Quernheim, and G Zissel. IL-10-producing monocytes differentiate to alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 119(2):464–471, Feb 2007. 7.1.1
- 291** M Egawa, K Mukai, S Yoshikawa, M Iki, N Mukaida, Y Kawano, Y Minegishi, and H Karasuyama. Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity*, 38(3):570–580, Mar 2013. 7.1.1
- 292** N Noben-Trauth, P Kropf, and I Müller. Susceptibility to leishmania major infection in interleukin-4-deficient mice. *Science*, 271(5251):987–990, Feb 1996. 7.1.2

- 293** JA Olson, DB Leveson-Gower, S Gill, J Baker, A Beilhack, and RS Negrin. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*, 115(21):4293–4301, May 2010. 7.2
- 294** AM Zubiaga, E Munoz, and BT Huber. IL-4 and IL-2 selectively rescue Th cell subsets from glucocorticoid-induced apoptosis. *J Immunol*, 149(1):107–112, Jul 1992. 7.2
- 295** U Svajger, N Obermajer, and M Jeras. IFN- $\gamma$  environment programs dendritic cells toward silencing of cytotoxic immune responses. *J Leukoc Biol*, Aug 2013. 7.2
- 296** MJ Lenardo. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*, 353(6347):858–861, Oct 1991. 7.2
- 297** CA Wysocki, A Panoskaltsis-Mortari, BR Blazar, and JS Serody. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, 105(11):4191–4199, Jun 2005. 7.2
- 298** S Diehl, C Chow, L Weiss, A Palmetshofer, T Twardzik, L Rounds, E Serfling, RJ Davis, J Anguita, and M Rincon. Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *J Exp Med*, 196(1):39–49, Jul 2002. 7.2
- 299** I Tawara, E Nieves, C Liu, R Evers, T Toubai, Y Sun, M Alrubaie, and P Reddy. Host basophils are dispensable for induction of donor T helper 2 cell differentiation and severity of experimental graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17(12):1747–1753, Dec 2011. 7.3
- 300** T Kojima, K Obata, K Mukai, S Sato, T Takai, Y Minegishi, and H Karasuyama. Mast cells and basophils are selectively activated in vitro and in vivo through CD200r3 in an ige-independent manner. *J Immunol*, 179(10):7093–7100, Nov 2007. 7.3
- 301** DH Fowler, J Odom, SM Steinberg, CK Chow, J Foley, Y Kogan, J Hou, J Gea-Banacloche, C Sportes, S Pavletic, S Leitman, EJ Read, C Carter, A Kolstad, R Fox, GL Beatty, RH Vonderheide, BL Levine, CH June, RE Gress, and MR Bishop. Phase I clinical trial of costimulated, IL-4 polarized donor CD4+ T cells as augmentation of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 12(11):1150–1160, Nov 2006. 7.4
- 302** YC Yang, AB Ciarletta, PA Temple, MP Chung, S Kovacic, JS Witek-Giannotti, AC Leary, R Kriz, RE Donahue, and GG Wong. Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell*, 47(1):3–10, Oct 1986. 7.5
- 303** U Gurzeler, T Rabachini, CA Dahinden, M Salmanidis, G Brumatti, PG Ekert, N Echeverry, D Bachmann, HU Simon, and T Kaufmann. In vitro differentiation of near-unlimited numbers of functional mouse basophils using conditional hoxb8. *Allergy*, 68(5):604–613, May 2013. 7.5

## Abbildungsverzeichnis

2.1	<b>Zellen des Immunsystems und ihre Entstehung.</b> Sog. myeloide und lymphoide Vorläuferzellen des Knochenmarks sind der Ursprung aller Zellen des Immunsystems. Aus lymphoiden Vorläuferzellen reifen Zellen des adaptiven Immunsystems, aus myeloiden die des angeborenen Immunsystems. Gezeigt ist, in welchen Geweben man welche Zelltypen findet. Abbildung verändert nach Murphy <i>et al.</i> [1].	2
2.2	<b>Schematische Darstellung eines MHC Klasse I und Klasse II Moleküls</b> Tertiärstruktur und schematische Darstellung des MHC Klasse I Moleküls (links), MHC der Klasse II Moleküls (rechts). Abbildung verändert nach Murphy <i>et al.</i> [1].	7
2.3	<b>T-Zellsabtypen</b> Dargestellt ist eine naive T-Zelle, stimuliert durch eine APZ. Die Pfeile geben die Differenzierungsmöglichkeiten wieder und die dafür benötigten Transkriptionsfaktoren. In den Zellen ist der Signatur-Transkriptionsfaktor für den jeweiligen T-Zellsabtyp angeben, links der Zelle, die von der Zelle produzierten Schlüsselzytotoxine. Abbildung verändert nach O'Shea <i>et al.</i> [84].	8
2.4	<b>T-Zellreifung im Thymus.</b> Die lymphoide Vorläuferzelle gelangt in den Thymus und durchwandert zunächst den äußeren Kortex. Dort findet man doppelt negative (DN) T-Zellen von Typ 1 bis 4. Es folgt die Positivselektion an kortikalen Stroma-Zellen im inneren Kortex des Thymus über MHC-Moleküle der Klasse I oder II. Wird kein MHC-Molekül erkannt, begibt sich der T-Zellvorläufer in Apoptose. MHC Klasse I Erkennung führt zu CD8 <sup>+</sup> T-Zellen, MHC II Erkennung zu CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. In der Medulla findet die Negativselektion statt. Eigenantigen wird von Dentritischen und Stroma-Zellen präsentiert. Ist die Affinität der T-Zelle zu hoch, erfolgt der programmierte Zelltod, ist die Affinität ausreichend, verlässt die naive T-Zelle den Thymus in die Peripherie. Abbildung verändert nach Germain <i>et al.</i> [142].	11
2.5	<b>Leukämie-Rückfallsrate über die Zeit nach allogenem oder syngennem Stammzelltransfer.</b> Patienten mit akuter und chronischer GvHD (aGvHD + cGvHD) haben die geringste Rückfallrate. Sie ist höher bei Patienten die keine GvHD entwickeln. Patienten, die eine T-Zelldepletierte Spende oder eine Spende, von ihrem eineiigen Zwilling erhalten haben, ist die Rückfallsrate am höchsten. Abbildung verändert nach Horowitz <i>et al.</i> [208].	15
2.6	<b>Kaskade einer akuten GvHD.</b> Durch die Konditionierung des Patienten durch Chemo- und/oder Strahlentherapie entstehen Gewebsschäden. Diese führen zur Freisetzung von PAMPs (Pathogen assoziierte molecular Patterns), Chemokinen und konsensalen Bakterien aus dem Darm. Diese Reize führen zur Aktivierung diverser APZ (Antigenpräsentierende Zellen) und zur Migration von NK-Zellen, Neutrophilen und DZ zum Ort der Gewebsschäden aus. Die APZ sezernieren Zytokine und aktivieren CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. Auch die T-Zellen schütten Zytokine aus; der sog. Zytokinsturm entsteht, der die systemische Aktivierung zytotoxischer Zellen zur Folge hat, die Gewebsschäden verursachen. Abbildung verändert nach Blazar <i>et al.</i> [194].	17
5.1	<b>Aufbau einer Neubauerzählkammer.</b> Die zuzählenden Felder sind grau unterlegt.	30

5.2 <b>Aufbau eines MACS Microbead und Ablauf der MACS-Zell-Anreicherung.</b> (A) Biotinylierter Antikörper in Verbindung mit Streptavidin und Ferritdextran (MicroBead), gebunden an eine Zelloberfläche. (B) Nicht markierte Zellen durchwandern die Säule (weiß), markierte Zellen werden in der Säule gehalten. Außerhalb des Magnetfeldes lassen sie sich aus der Säule spülen, Abbildung verändert nach Miltenyi <i>et al.</i> 1990 [247]. . . . .	31
5.3 <b>Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.</b> Zellen in Suspension werden mittels hydrodynamischer Fokussierung in einer Kapillare perlschnurartig aufgereiht und durch den Laser geführt. Um die Intensität des Laserstrahls zu mindern, bevor es auf den Detektor trifft, wird es durch einen neutralen Dichtefilter geleitet. Die PMTs (Detektoren) nehmen die von der Zelle abgegebenen Lichtsignale auf und leiten sie an den Rechner weiter. Abbildung verändert nach Kierano <i>et al.</i> [252]. . . . .	35
5.4 <b>Aufbau eines Zellsorters.</b> Eine Zellsuspension wird wie im Durchflusszytometer durch einen Laserstrahl geleitet. Die Zielzellen werden an Hand ihrer Fluoreszenzmarkierung erkannt, die Trägerflüssigkeit in Tropfen vereinzelt, die mit Zielzellen (rot) beladenen Tropfen werden elektrisch geladen und mittels Magnet in Auffanggefäß geleitet. Abbildung verändert nach Sabban <i>et al.</i> [253]. . . . .	38
5.5 <b>Situs einer Maus verändert nach Dunn <i>et al.</i> [256].</b> Markiert sind lymphatische Organe die zur Analyse entnommen wurden. . . . .	41
5.6 <b>Depletion von Basophilen mit Mar-1 in Blut, Milz und Knochenmark</b> Durchflusszytometrische Analyse von Blut, Milz und Knochenmark (KM) sieben Tage nach der letzten Gabe von Mar-1. Die obere Zeile zeigt Gewebe Isotyp behandelter Tiere, die untere Zeile Gewebe Mar-1 behandelter Tiere. Lymphozyten wurden eingegrenzt, dann Basophile Granulozyten (BG) durch die Oberflächenmoleküle IgE und CD45 <sup>med</sup> diskriminiert . . . . .	42
5.7 <b>Anwachskontrolle der C57Bl/6 Zellen.</b> Lymphozyten wurden eingegrenzt, aus diesen die Marker für B6-Zellen (H2Kb) und für Bc-Zellen (H2Kd) dargestellt. . . . .	43
6.1 <b>CD49b<sup>+</sup> Zellen unterdrücken die syngene CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.</b> Milzzellen, von CD49b <sup>+</sup> Zellen depletiert (CD49b depletiert) oder mit CD49b <sup>+</sup> Zellen (Kontrolle). Dargestellt sind proliferierte (schwach CFSE positive oder CFSE negative) CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. . . . .	46
6.2 <b>Basophile Granulozyten, nicht NK-Zellen unterdrücken die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.</b> Gezeigt ist die CD4 <sup>+</sup> T-Zellproliferation von CD49b depletierten Milzzellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von Basophilen Granulozyten (CD49b <sup>+</sup> ) und NK-Zellen (CD49b <sup>+</sup> /IgE <sup>-</sup> ). CFSE negative Zellen wurden als proliferiert gewertet. Sterne über den Balken geben die Signifikanz zur Kontrolle ohne Basophile Granulozyten oder NK-Zellen an. (n=3) . . . . .	48

6.3 <b>Mit IL-3 aktivierte Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellproliferation hoch effizient.</b> <b>A</b> Verwendete Eingrenzungsstrategie der Durchflusszytometrie: Es wurden Lymphozyten ausgewählt, dann CD4 <sup>+</sup> CFSE <sup>+</sup> Zellen eingegrenzt und anschließend anhand der CFSE Verdünnung die T-Zellproliferation bei unterschiedlicher Stimulation bestimmt. CFSE negative und schwach positive Zellen wurden als proliferiert gewertet. <b>B</b> CD49b depletierte Milzzellen (CFSE markiert) wurden in Kultur genommen und entweder mit IL-3, IgE <sup>+</sup> Basophilen Granulozyten (IgE <sup>+</sup> ), aktivierten Basophilen (IgE <sup>+</sup> + IL-3) oder mit IgE <sup>+</sup> Zellen aus <i>in vivo</i> Basophilen Granulozyten depletierten Mäusen inkubiert (IgE <sup>+</sup> Baso <sup>-</sup> ). Die T-Zellproliferation wurde über CFSE ermittelt. . . . .	49
6.4 <b>Proliferationsunterdrückung funktioniert unabhängig von FAS und MHC II.</b> <b>A</b> CD49b depletierte Milzzellen wurden mit Medium, IL-3, WT Basophilen (Basos (WT)), aktivierten Basophilen (Basos (WT) + IL-3), MHC II <sup>-/-</sup> Basophilen Granulozyten (Basos (MHC II <sup>-/-</sup> )), oder aktivierten MHC II <sup>-/-</sup> Basophilen Granulozyten (Basos (MHC II <sup>-/-</sup> )+IL-3) inkubiert. <b>B</b> CD49b <sup>-</sup> Splenozyten einer Fas <sup>-/-</sup> (weißer Balken) oder Wildtyp (schwarzer Balken) Maus wurden ohne Zusätze kultiviert (Medium), mit IL-3 behandelt (IL-3), mit Wildtyp Basophilen Granulozyten (Basos (WT)) oder mit aktivierten WT Basophilen Granulozyten (Basos (WT) + IL-3) behandelt. (n=3) . . . . .	50
6.5 <b>Histamin hat keinen Einfluss auf die T-Zellproliferation.</b> CD49b depletierte Splenozyten wurden mit unterschiedlichen Histamin-Konzentrationen, Basophilen Granulozyten (Baso) oder aktivierten Basophilen Granulozyten (Baso + IL-3) inkubiert. (n=3) . . . . .	51
6.6 <b>Überstand Basophiler Granulozyten unterdrückt die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen.</b> Zytokine wurden über ELISA, die Proliferation mittels CFSE Verdünnung bestimmt. <b>(A)</b> und <b>(B)</b> zeigen IL-4 und -6 ELISA von FACS aufgereinigten Basophilen Granulozyten nach 4 h (graue Balken, 4 h) und 24 h (schwarze Balken, 24 h). Die Aufreinigung erfolgte entweder über die Marker IgE (SN IgE <sup>+</sup> ) oder CD49b (SN CD49b <sup>+</sup> ). Basophile Granulozyten wurden mit IL-3 aktiviert (SN IgE <sup>+</sup> + IL-3; SN CD49b <sup>+</sup> + IL-3). Als Kontrolle dienten Medium und Medium mit IL-3 (IL-3). <b>(C)</b> Proliferation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in CD49b depletierten Splenozyten nach Inkubation mit dem Überstand Basophiler Granulozyten aus A und B. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zu Medium wieder. (n=3) . . . . .	52
6.7 <b>IL-4 und IL-6 unterdrücken die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.</b> <b>(A)</b> CD49b depletierte Splenozyten wurden mit IL-3,-4,-6 oder einer Kombination aus IL-4 und -6 in Kultur genommen. Nur in Medium kultivierte CD49b depletierte Splenozyten wurde als Kontrolle genutzt. <b>B</b> Milzzellen aus Wildtyp (WT) oder IL-4/6 <sup>-/-</sup> Mäusen wurde in Kultur genommen und die enthaltenen Basophilen Granulozyten mit IL-3 stimuliert (schwarzer Balken) oder nicht (weißer Balken). (n=3) . . . . .	53
6.8 <b>Basophile Granulozyten verringern den Anteil apoptotischer Zellen.</b> CD49b depletierte Milzzellen in Kultur mit (schwarze Balken) oder ohne Basophile Granulozyten (weiße Balken). IL-3 oder neutralisierende Antikörper für IL-4, IL-6 oder die Kombination beider Antikörper wurde zugesetzt. Apoptotische Zellen wurden durchflusszytometrisch als 7-AAD negativ und Annexin V positive Zellen identifiziert. Sterne über den schwarzen Balken geben die Signifikanz zum Ansatz Milzzellen und Basophile Granulozyten ohne Zusätze an. (n=3) . . . . .	54

6.9 <b>Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellenproliferation <i>in vivo</i>. A</b> Gating-Schema der <i>in vivo</i> Versuche. Eine Gruppe Versuchstiere erhielt T-Zellen zusammen mit Basophilen Granulozyten (Basos) und IL-3 (oberste Zeile); eine weitere Gruppe erhielt T-Zellen und IL-3 (mittlere Zeile); die dritte Gruppe erhielt T-Zellen und PBS (unterste Zeile). Die erste Spalte zeigt eingegrenzte Lymphozyten, die zweiten die gemessenen Spender CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (eingekreist). <b>B</b> Zusammenfassung von A. Quantifizierung CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz mittels Counting Beads. (n=5) . . . . .	55
6.10 <b>Basophile Granulozyten inhibieren die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation in der allogenen MLR.</b> Proliferation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in einer MLR unter Einfluss von Bc (A) oder B6 Basophile Granulozyten (B) aktiviert durch IL-3 (schwarze Balken) oder nicht aktiviert (weiße Balken). <b>A</b> Bc Basophile Granulozyten unterdrücken die T-Zellteilung signifikant (Baso Bc). Die Zugabe von $\alpha$ IL-4 hob diesen Effekt auf ( $\alpha$ IL-4 + Baso Bc). $\alpha$ IL-6 hat keinen Einfluss auf die T-Zellhemmung durch Basophile Granulozyten ( $\alpha$ IL-6 + Baso Bc). Die Aktivierung der Bc Basophilen Granulozyten (schwarze Balken) verstärkt die beschriebenen Effekte. <b>B</b> B6 Basophile unterdrücken die T-Zellproliferation (weiße Balken). Ihre Aktivierung verstärkt die Unterdrückung (schwarze Balken). Die Addition von IL-4 neutralisierendem Antikörper lässt die Inhibition verschwinden ( $\alpha$ IL-4 + Baso B6). Auch bei B6 Basophilen Granulozyten hat die Neutralisierung von IL-6 keinen Einfluss auf die Inhibition der T-Zellproliferation ( $\alpha$ IL-6 + Baso B6). Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zur Kontrolle ohne Basophile Granulozyten oder Antikörper der Gruppe wieder, bezogen auf IL-3 oder ohne Zusätze. Proliferation gemessen durch CFSE Verdünnung. (n=3) . . . . .	56
6.11 <b>Einfluss von IL-4 und IL-6 auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation in einer allogenen MLR.</b> Von T-Zellen und Basophilen Granulozyten befreite Balb/c Splenozyten wurden mit CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen einer C57BL/6 Maus in Kultur genommen und unterschiedlich stimuliert. Die Addition der kombinierten Zytokine IL-4 und -6 unterdrückte die T-Zellproliferation signifikant (IL-4 + IL-6). (n=3) . . . . .	58
6.12 <b>Einfluss von IL-4 und IL-6 auf die Zytokinproduktion in der allogene MLR.</b> Überstandsanalyse der MLR aus Abbildung 6.11. <b>A</b> Die IL-2 Sekretion verringerte sich signifikant nach Zugabe von IL-4 und -6. <b>B</b> IFN- $\gamma$ war nach Zugabe von IL-4 und -6 nicht mehr detektierbar (n.d.). <b>C</b> Die Zugabe von IL-4 und -6 hatte keinen Einfluss auf die IL-10 Konzentration. (n=3) . . . . .	59
6.13 <b>Basophile Granulozyten vermindern die Ausschüttung des TH1-Zytokins IFN-<math>\gamma</math>.</b> Analyse des Zellkulturüberstands der allogenen MLR. <b>A</b> Balb/c (Bc) Basophile Granulozyten (Baso Bc) senken den IFN- $\gamma$ -Spiegel im Überstand. Die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen IL-4 ( $\alpha$ IL-4 + Baso Bc) oder IL-6 ( $\alpha$ IL-6 + Baso Bc) hebt diesen Effekt wieder auf. Aktivierte Basophile Granulozyten (IL-3, schwarze Balken) verstärkten die Reduktion von IFN- $\gamma$ . <b>B</b> C57BL/6 (B6) Basophile Granulozyten hatten die gleiche Wirkung, reduzierten im unaktivierten Zustand die Konzentration jedoch stärker als Bc Basophile Granulozyten. Ebenso wie bei Bc Basophilen Granulozyten führte die Zugabe von $\alpha$ IL-4 oder $\alpha$ IL-6 zur Steigerung des IFN- $\gamma$ -Wertes. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zum Ansatz ohne Basophile wieder. (n=3) . . . . .	60

6.14 <b>Bc (A) und B6 (B) Basophile Granulozyten führten zur Ausschüttung von IL-6.</b> Die mittels ELISA gemessenen IL-6 Konzentrationen stiegen bei IL-3 Zugabe und bei Neutralisation von IL-4. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zum Ansatz ohne Basophile wieder. (n=3) . . . . .	61
6.15 <b>Basophile Granulozyten verstärken die Ausschüttung des TH2 Zytokins IL-4.</b> Analyse des Zellkulturüberstands der allogenen MLR. <b>A</b> Balb/c (Bc) Basophile Granulozyten erhöhen die Ausschüttung des TH2 Zytokins IL-4 (Baso Bc), vor allem nach Aktivierung der Basophilen Granulozyten mit IL-3 (Baso Bc, schwarzer Balken). Die Zugabe von $\alpha$ IL-6 senkte die Sekretion von IL-4 signifikant (Baso Bc). <b>B</b> In Ansätzen mit B6 Basophilen Granulozyten wurde unabhängig vom Aktivierungszustand der Basophilen Granulozyten wesentlich mehr IL-4 ausgeschüttet. Auch hier reduzierte die Blockade von IL-6 die IL-4 Konzentration. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zum Ansatz ohne Basophile wieder. (n=3) . . . . .	62
6.16 <b>Basophile Granulozyten steigern die Sekretion des TH2-Zytokins IL-13 in der MLR.</b> <b>A</b> Die Konzentration des TH2-Zytokins IL-13 stieg, wenn Bc Basophile Granulozyten in den Ansätzen vorhanden waren. Die Zugabe von IL-3 erhöhte diesen Wert. Die Ausschüttung von IL-13 ließ sich sowohl durch die Neutralisation von IL-4 als auch durch IL-6 unterbinden. <b>B</b> B6 Basophile Granulozyten führten, unabhängig von ihrer Aktivierung (Baso B6, weißer bzw. schwarzer Balken), zu einer stärkeren IL-13 Abgabe als Bc Basophile Granulozyten. Die Sekretion von IL-13 ließ sich nur durch die Neutralisation von IL-4 unterbinden ( $\alpha$ IL-4 + Baso B6, weißer bzw. schwarzer Balken). $\alpha$ IL-6 Antikörper hatten keinen Einfluss auf die IL-13 Konzentration. Sterne direkt über den Balken geben die Signifikanz zum Ansatz ohne Basophile wieder. (n=3) . . . . .	63
6.17 <b>Die Depletion Basophiler Granulozyten vor der GvHD-Induktion verschlechtert den Krankheitsverlauf.</b> Die Depletion von Basophilen Granulozyten mittels Mar-1 (rote Linie) führt zu einer signifikanten Erhöhung des GvHD-Scores, des Gewichtsverlusts, sowie zu einem verringerten Überleben, im Vergleich zur Isotyp behandelten Kontroll-Gruppe (schwarze Linie). (n=10) . . . . .	64
6.18 <b>Depletion Basophiler Granulozyten nach der GvHD-Induktion hat keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf.</b> Die Depletion Basophiler Granulozyten (rote Linie), von Tag 10 bis 12 (gekennzeichnet durch gepunktete vertikale Linien) nach der GvHD-Induktion, hat keinen dauerhaften Einfluss auf den GvHD-Score, den Gewichtsverlauf oder das Überleben der Mäuse. (n=10) . . . . .	65
6.19 <b>Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen zur Bestimmung des T-Zellphänotyps in einer GvHD nach Depletion Basophiler Granulozyten mit Mar-1.</b> <b>A</b> FACS-Analyse der Zellpopulationen in der Milz. <b>B</b> Intrazelluläre FACS-Analyse der Milzzellen. Analyse erfolgte 14 Tage nach Induktion der GvHD. (n=10) . . . . .	66
6.20 <b>Durchflusszytometrische Analyse der mesenterialen Lymphknoten zur Bestimmung des T-Zellphänotyps in einer GvHD nach Depletion Basophiler Granulozyten mit Mar-1.</b> <b>A</b> FACS-Analyse der Zellpopulationen in den mesenterialen Lymphknoten. <b>B</b> Intrazelluläre FACS-Analyse der Lymphknoten. Analyse erfolgte 14 Tage nach Induktion der GvHD. (n=10) . . . . .	66



## **Tabellenverzeichnis**

4.1	Laborgeräte 1 . . . . .	21
4.2	Laborgeräte 1.1 . . . . .	22
4.3	Gebrauchsfertige Kits . . . . .	22
4.4	Zellkultur-Mediums-Zusätze . . . . .	22
4.5	Glas- und Plastikwaren 1 . . . . .	23
4.6	Chemikalien, Puffer und Reaktionsmedien 1 . . . . .	24
4.7	Chemikalien, Puffer und Reaktionsmedien 1.1 . . . . .	25
4.8	Zytokine und Antikörper in der Zellkultur . . . . .	25
4.9	Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Zellkulturmedient . . . . .	26
4.10	Verwendete Antikörper . . . . .	27
4.11	Verwendete Software . . . . .	28
5.1	Elisa-Kits . . . . .	40
5.2	Verwendete Mausstämme . . . . .	40
5.3	Aufschlüsselung des GvHD-Score . . . . .	44
5.4	Zusammensetzung der Narkose . . . . .	44
5.5	Zusammensetzung des Antagonisten . . . . .	44

## **Eidesstattliche Erklärung**

- 1.** Ich, Fabian Johannes Hermann, 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.
- 2.** Nur die in der Danksagung erwähnten Personen haben mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen.
- 3.** Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die 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.
- 4.** Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

---

FABIAN JOHANNES HERMANN