

Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin,
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



Untersuchung von T Zell-vermittelten Immunantworten in der murinen und humanen kutanen Leishmaniasis

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Michael Fischer

geboren am 23.08.1977
in Ettenheim

Mainz, März 2012

Dekan: **[gelöscht]**

1. Berichterstatter: **[gelöscht]**

2. Berichterstatter: **[gelöscht]**

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2012

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Mitteln und Hilfen angefertigt habe, die ich angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg - Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

Michael Fischer

Mainz, 06. März 2012

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Leishmaniasis	3
2.2 Der Lebenszyklus von <i>L. major</i>	5
2.3 Experimentelle murine kutane Leishmaniasis	6
2.3.1 T-Zell-Immunantworten	6
2.3.2 Modell der schützenden Immunantwort	7
2.3.3 Genetisch bedingte Einflussfaktoren in C57BL/6 und BALB/c Mäusen	8
2.3.4 Experimentelle Mauseinfektionen	9
2.4 TNF in der Leishmaniasis	10
2.4.1 TNF und seine Rezeptoren	10
2.4.2 Der TNF-R1-Signalweg und FAN	11
2.5 Humane kutane Leishmaniasis	12
2.5.1 Zelluläre Mechanismen	12
2.5.2 Medikation, Vakzinierungsstrategien und ihre Grenzen	13
2.5.3 Humanisierte Mausmodelle	14
2.6 Ziel der Arbeit	17
3 ERGEBNISSE	18
3.1 Genetische Determinierung des Phänotyps von <i>L. major</i>-Infektionen in Mäusen	18
3.1.1 Knochenmarkstransfer in C57BL/6 und BALB/c Mäuse	18
3.1.2 Knochenmarkstransfer in BALB/c x C57BL/6 – F1 Mäuse	19
3.1.3 Knochenmarkstransfer in BALB/c Rag1 ^{-/-} x C57BL/6 Rag1 ^{-/-} F1 Mäuse	20
3.2 Die Rolle des Adapterproteins FAN in der murinen Leishmaniasis	22
3.2.1 Einfluss einer FAN-Defizienz auf den Krankheitsverlauf	22
3.2.2 Zytokinprofile in C57BL/6 WT und FAN ^{-/-} Mäusen	25
3.2.3 Zelluläre Zusammensetzung von Infektionsstelle und Lymphknoten	27
3.2.4 Experimentelle Blockade von IFN- γ in C57BL/6 FAN ^{-/-} Mäusen	31
3.3 Etablierung eines PBMC-Transfermodells für die humane, kutane Leishmaniasis	32
3.3.1 Läsionsentwicklung in immundefizienten Stämmen	32
3.3.2 <i>In vitro</i> -Infektion von murinen M Φ und Aktivierung durch humanes IFN- γ	33
3.3.3 Einfluss humaner PBMC auf die Läsionsentwicklung und Parasitenzahl in immundefizienten Mäusen	34
3.3.4 Nachweis humaner Zellen in der Milz und an der Infektionsstelle	40
3.3.5 Antigen-spezifische, humane Antworten in immundefizienten Mäusen	45
3.3.6 Verbesserung der Antigenpräsentation in PBMC-transferierten Mäusen	47
3.3.7 Induktion xenogener GvHD in <i>L. major</i> -infizierten, PBMC-transferierten Mäusen	52
3.3.8 Xenotransplantation und Etablierung von <i>L. major</i> -Infektionen in humanen Hauttransplantaten	57

4	<i>DISKUSSION</i>	61
4.1	Genetische Determinierung des Phänotyps von <i>L. major</i>-Infektionen in Mäusen	61
4.2	Die Rolle des Adapterproteins FAN in der murinen Leishmaniasis	64
4.3	Etablierung eines PBMC-Transfermodells der humanen, kutanen Leishmaniasis	71
4.4	Ausblick	84
5	<i>MATERIAL UND GERÄTE</i>	85
5.1	Zellen und Gewebe	85
5.2	Immunologische Nachweise	86
5.3	Sonstige Materialien	88
5.4	Geräte	91
6	<i>EXPERIMENTELLE METHODEN</i>	93
6.1	Zellbiologische Methoden	93
6.1.1	Ermittlung der Lebendzellzahl	93
6.1.2	Kultivierung von promastigoten <i>L. major</i>	93
6.1.3	Isolation von metazyklischen, promastigoten <i>L. major</i>	93
6.1.4	Intradermale Infektion in die Ohren	94
6.1.5	Isolation amastigoter <i>L. major</i>	94
6.1.6	Herstellung von löslichem Leishmanien-Antigen (SLA)	94
6.1.7	Bestimmung von Läsionsentwicklung	94
6.1.8	Bestimmung von Parasitenlasten	94
6.1.9	Isolation von Zellen aus Lymphknoten und Milz	95
6.1.10	Zytokinprofile restimulierter Lymphknoten- und Milzzellen	95
6.1.11	Isolation intradermaler Leukozyten aus dem Ohr	95
6.1.12	Isolation von Knochenmark	96
6.1.13	Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark (BMDC)	96
6.1.14	Lethale Bestrahlung von Mäusen mit einer Cäsium-Quelle	96
6.1.15	Rekonstitution durch retroorbitale Injektion von Knochenmark	96
6.1.16	Gewinnung von inflammatorischen Makrophagen aus Biogel	97
6.1.17	Infektion von dendritischen Zellen und Makrophagen mit Amastigoten	97
6.1.18	Zytospins	97
6.1.19	Nachweis der Proliferation von T-Zellen mittels CFSE	98
6.1.20	Gewinnung von humanen PBMC und autologem Plasma aus Buffy coat	98
6.1.21	Generierung von humanen DCs aus Monozyten	98
6.1.22	Intraperitoneale Injektion	99
6.1.23	Kryokonservierung und Auftauen von PBMC	99
6.1.24	Blutentnahmen aus der Schwanzvene	100
6.1.25	Serumpräparation aus Mäuseblut und GPT (ALT) Bestimmung	100
6.1.26	Leukozytengewinnung aus Mausblut	100
6.1.27	Vorbereiten von humanen Hauttransplantaten	100
6.1.28	Hauttransplantation	100
6.1.29	Biopsie	101
6.1.30	Intradermale Transplantat-Infektion mit promastigoten <i>L. major</i>	101
6.1.31	Histologie	101

6.2 Immunologische Methoden	102
6.2.1 Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	102
6.2.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	102
6.3 Statistische Analysen und Software	103
7 ANHANG	104
8 LITERATURVERZEICHNIS	106
9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	116

1 Zusammenfassung

Für die Ausheilung von *L. major*-Infektionen ist eine effektive Th1-/Tc1-Antwort unerlässlich.

Dennoch sind bis heute nicht alle Mechanismen der schützenden Immunabwehr beim Menschen und in der Maus endgültig geklärt. Deshalb bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, Th1-/Tc1-Antworten und damit die Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem eingehender zu untersuchen.

Für diesen Ansatz wurde zunächst der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den Verlauf der Infektion anhand von BALB/c- und C57BL/6-Zellen analysiert. Als entscheidender Faktor für Heilung und Suszeptibilität wurde mit Hilfe von Knochenmarkschimären die Herkunft der T und/oder B Zellen identifiziert.

Erst die Aktivierung durch Th1-/Tc1-Zellen versetzt *L. major*-infizierte Makrophagen in die Lage, die intrazellulären Parasiten abzutöten. In diesem Aktivierungsprozess spielt die TNF-induzierte Signalweiterleitung über den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) eine wichtige Rolle. TNF-R1 ist mit dem Signalmolekül FAN assoziiert. In dieser Arbeit konnte anhand von Mäusen, denen FAN fehlt, die Involvierung dieses Moleküls in der Induktion eines Th1-Zytokinprofils und in der Kontrolle der Parasitenzahl sowie der lokalen Begrenzung der Infektion gezeigt werden.

Weiterhin wurde unter Verwendung immundefizienter Mäuse die Realisierbarkeit eines PBMC-Transfermodells geprüft. Ein solches wird zur Validierung an Mäusen gewonnener Erkenntnisse und als präklinisches Testsystem der humanen kutanen Leishmaniasis dringend benötigt. In allen getesteten Stämmen ließ sich durch den Transfer humaner PBMC die *L. major*-Infektion beeinflussen. Humane CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen waren an den Infektionsstellen präsent und es konnten antigenspezifische Immunreaktionen nachgewiesen werden.

Das PBMC-Transfermodell konnte durch die Transplantation humaner Haut auf immundefiziente Mäuse zusätzlich entscheidend verbessert werden. In diesen Transplantaten ließen sich *L. major*-Infektionen etablieren und durch zusätzlichen Transfer von PBMC die Zahl humaner CD45⁺ Zellen an der Infektionsstelle deutlich steigern.

In ihrer Gesamtheit trägt die vorliegende Arbeit wesentlich zum Verständnis der Determinanten von Heilung und Suszeptibilität der kutanen Leishmaniasis bei und zeigt neue Ansatzpunkte für eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes auf. Die Etablierung eines präklinischen Testmodells der humanen Leishmaniasis ist entscheidend, um das Wissen über die murine Leishmaniasis auf die humane Erkrankung zu übertragen. So kann dem dauerhaften Problem der Entwicklung von Vakzinen an Mäusen, die keine Wirksamkeit gegen die humane Erkrankung zeigen, begegnet werden. Ein vollständig etabliertes Modell wird es ermöglichen, der humanen Erkrankung zugrundeliegende Mechanismen zu untersuchen und Patienten-spezifisch aber auch allgemeingültig Vakzinierungs-Ansätze und Therapien unter experimentellen Bedingungen zu testen.

Summary

It is known that healing of *L. major* infections requires an effective Th1/Tc1 immune response. However, many mechanisms leading to a protective immune response in humans and mice remain elusive. For this reason, the aim of this thesis was to further investigate Th1/Tc1 responses and the connection between innate and adaptive immune responses.

To achieve this, we first analysed the importance of the genetic background on the course of murine *L. major* infections using BALB/c and C57BL/6 cells. In this thesis, the origin of T and/or B cells was identified as the key factor for healing or susceptibility.

Before infected macrophages are able to kill the intracellular *L. major* parasites these cells have to be activated by Th1/Tc1 cells. During this activation process, TNF signalling via the TNF receptor-1 (TNF-R1) plays an important role. The signal transduction molecule FAN is associated with TNF-R1, but no involvement of this molecule in immune responses during infection has been published yet. Here, for the first time, the involvement of this protein in the induction of Th1 cytokine profiles, control of *L. major* parasite numbers and restricting the infection to the inoculation site was shown by using FAN-deficient mice.

Furthermore, the feasibility of establishing a PBMC transfer model for *L. major* infections using immunodeficient mice was tested. Such a system is urgently needed to validate findings discovered in the murine model of cutaneous leishmaniasis and for preclinical testing using human cells. In all tested mouse strains, the transfer of human PBMC altered the course of disease. Human CD4⁺ and CD8⁺ T cells were present at the site of infection and antigen-specific humane immune responses were detected.

The usage of human skin transplants further improved the PBMC transfer model for human cutaneous leishmaniasis. We were able to establish *L. major* infections within the human transplant and increased the number of human cells at the infection site by transferring PBMC intraperitoneally.

This work contributes substantially to the understanding of the determinant factors of healing and susceptibility during cutaneous leishmaniasis and shows new targets to influence the course of disease. The establishment of a preclinical model is essential to transfer knowledge gained by using mice onto the human disease. The utilization of such a model may overcome the continuous problem of developing murine vaccines showing no protective effect in humans. A fully established humanized model will allow analysing human leishmaniasis and the underlying mechanisms as well as testing patient-specific and general vaccination strategies under experimental conditions.

2 Einleitung

2.1 Leishmaniasis

Leishmania ist eine Gattung protozoischer Parasiten, die durch den Stich von Sandmücken (*Phlebotominae*) übertragen werden und Krankheiten auslösen, die zusammengefasst als Leishmaniasis bezeichnet werden. Auch wenn die Leishmaniasis keine der Infektionskrankheiten ist, deren Namen jedem geläufig ist, ist sie mit 350 Millionen Gefährdeten und etwa 12 Millionen Infizierten eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit¹.

Die WHO zählt sie zu den „neglected tropical diseases“, die vor allem in armen Ländern endemisch sind. Von den 88 Ländern, in denen die Leishmaniasis derzeit präsent ist, zählen allein 72 zu den Entwicklungsländern, 13 davon zu den am wenigsten entwickelten Ländern, auch vierte Welt genannt (Abb. 1)¹. Durch eine zunehmende Ausweitung des Verbreitungsraumes der Sandmücke ist inzwischen auch vermehrt die erste Welt betroffen. Vermutlich vektorkompetente Sandmücken sind bereits in Deutschland nachgewiesen worden². Gesicherte, autochthone Leishmaniasisfälle sind in Deutschland jedoch noch nicht bekannt geworden.

Die humane Leishmaniasis zeigt eine Vielzahl klinischer Symptome. Diese große Bandbreite an Manifestierungen resultiert aus dem variablen genetischen Hintergrund der Patienten und der genetischen Diversität der Parasiten. Es werden drei Hauptformen der Erkrankung unterschieden: die kutane, die mukokutane und die viszerale Leishmaniasis.

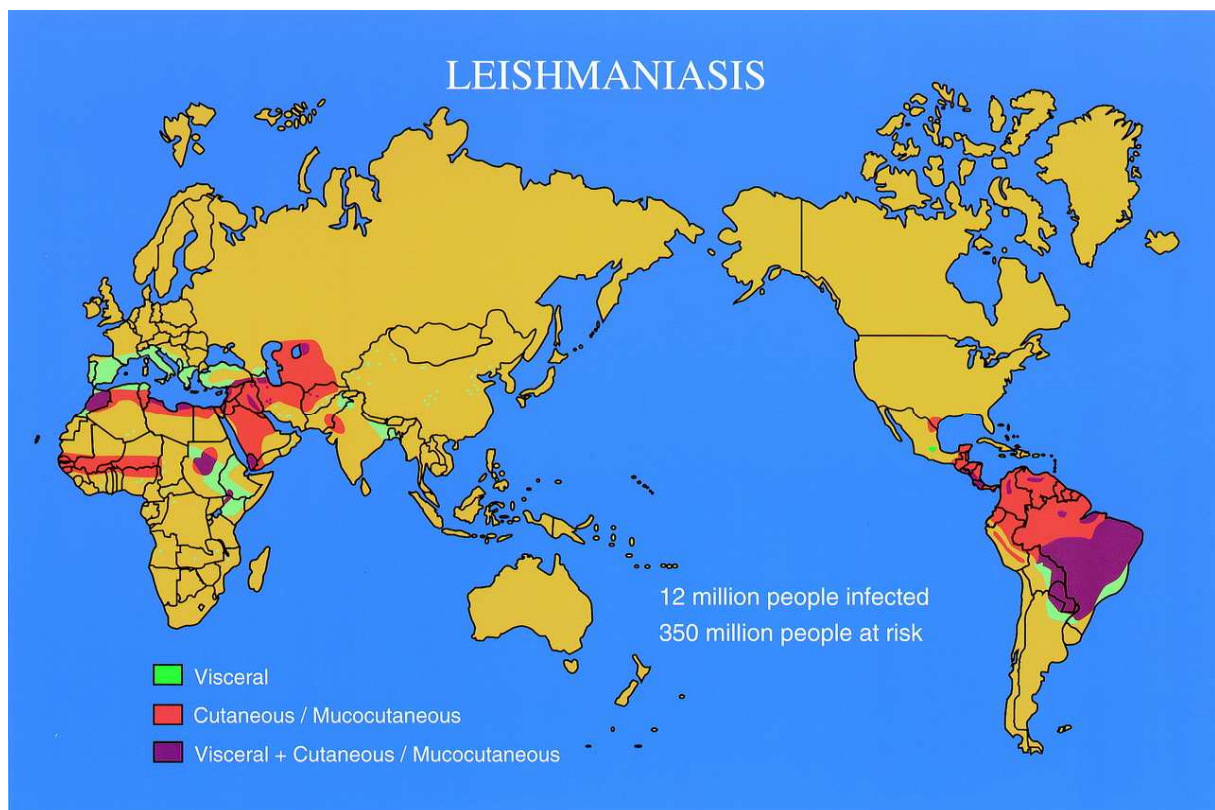


Abb. 1: Verbreitungsgebiet der Leishmaniasis. Auf der Karte sind die Verbreitungsgebiete der viszeralen (grün), kutanen und mukokutanen (hellrot) Leishmaniasis und die Gebiete markiert, in denen alle drei Formen der Erkrankung (violett) auftreten (aus ³).

Kutane Leishmaniasis

Die kutane Leishmaniasis (CL) ist die häufigste Form der Erkrankung. In den meisten Regionen wird sie ausgelöst durch eine Infektion mit *L. major* oder *L. tropica*, in der neuen Welt hingegen in der überwiegenden Zahl der Fälle durch *L. mexicana*, *L. (Viannia) braziliensis* oder *L. panamensis* (siehe auch Tabelle 1)⁴. Die Erkrankung äußert sich üblicherweise mit Ulkusbildung an den exponierten Körperstellen wie Armen, Beinen und Gesicht. Oftmals entsteht dabei eine große Zahl von Parasiten-tragenden Läsionen. Der weitere Verlauf der Erkrankung hängt vom Immunstatus des Patienten ab. In immunkompetenten Patienten heilen die Läsionen meist spontan unter Narbenbildung ab. In unzureichend behandelten oder HIV-koinfizierten Personen hingegen kann die CL auf die Mucosa übergreifen⁵⁻⁷. Ein entsprechender Immunstatus kann im ungünstigsten Fall dazu führen, dass CL-verursachende Parasiten eine viszerale Leishmaniasis (VL) auslösen⁸.

Mukokutane Leishmaniasis

Die mukokutane Leishmaniasis ist potentiell lebensbedrohlich⁹. Ausgelöst von Parasiten des Subgenus *Viannia* ist die Entwicklung zu einer mukosalen Erkrankung von der Kombination der zellulären Immunität des Patienten und der Virulenz des Parasiten abhängig. In einer Population infizierter Personen greift nur in etwa 1-10% der Fälle die Infektion auf die Mukosa der Patienten über⁴. Ist das jedoch der Fall, führt die Infektion in der Folge zu einer teilweisen oder vollständigen Zerstörung der Schleimhäute von Mund, Nase und Rachen.

Viszerale Leishmaniasis

Die Spezies *L. donovani* und *L. infantum* verursachen die viszerale Leishmaniasis, auch als Kala-Azar bekannt. Sie manifestiert sich im Anschwellen von Leber und Milz und wird begleitet von Fieberschüben, deutlichem Gewichtsverlust und teilweise lebensbedrohlicher Anämie. Ohne Behandlung führt diese schwere Form der Leishmaniasis in Entwicklungsländern binnen 2 Jahren zu einer Mortalitätsrate von bis zu 100%. Erst seit Kurzem sind wirkungsvolle Medikamente verfügbar, die inzwischen systematisch in Kombinationen getestet werden. Allerdings sind diese Medikamentenkombinationen oft nur regional begrenzt wirksam¹⁰.

Tabelle 1: Die *Leishmania*-Hauptspezies der humanen Leishmaniasis. (aus ¹¹).

Main disease manifestation	Species
Old World, subgenus Leishmania	
Visceral leishmaniasis	<i>Leishmania donovani</i> and <i>Leishmania infantum</i>
Cutaneous leishmaniasis	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> and <i>Leishmania aethiopia</i>
Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. aethiopia</i>
New World, subgenus Leishmania	
Visceral leishmaniasis	<i>L. infantum</i>
Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanol</i> and <i>Leishmania amazonensis</i>
Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. mexicana</i> and <i>L. amazonensis</i>
New World, subgenus Viannia	
Cutaneous leishmaniasis	<i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> and <i>Leishmania peruviana</i>
Mucocutaneous leishmaniasis	<i>L. braziliensis</i> and <i>L. panamensis</i>

Das Hauptproblem der Epidemiologie der Leishmaniasis liegt in der hohen Durchseuchungsrate von Nagern und Hunden, die in den endemischen Gebieten in unmittelbarer Nachbarschaft mit den Menschen leben und als Reservoir für Parasiten dienen. Aber auch der Mensch selbst ist hier nicht auszunehmen. So wird Patienten mit dermalen

Post-Kala-Azar-Leishmaniasis eine wichtige Rolle bei der Erhaltung und Unterstützung der Übertragung von Parasiten in der VL zugeschrieben¹.

Kürzlich wurden zwei neue Medikamente zur Behandlung der Leishmaniasis in die WHO Liste der essentiellen Medikamente aufgenommen. Jedoch ist die Behandlung nach wie vor für die meisten Betroffenen kaum erschwinglich¹.

Ein effektives Vakzin, das präventiv gegen die Leishmaniasis eingesetzt werden kann, konnte bislang noch nicht entwickelt werden.

2.2 Der Lebenszyklus von *L. major*

Die Sandmücke ist überwiegend dämmerungs- und nachtaktiv. Auf ihrer Suche nach Blut, das für die Entwicklung der Eier benötigt wird, überträgt eine infizierte, weibliche Sandmücke mit ihrem Speichel *Leishmania spp.* Dabei gelangt die begeißelte, metazyklische, promastigote Form des Parasiten in die Dermis der Haut. Diese Form des Parasiten ist hochinfektiös und optimal auf die Bedingungen in der Säugetierhaut vorbereitet¹². Bei einem einzelnen Stich werden 10-1000 Parasiten übertragen und zügig von gewebsständigen Makrophagen (MΦ) phagozytiert. Die über den Komplement-Rezeptor 3 vermittelte Phagozytose dient dem Parasiten als Evasionsmechanismus¹³. Der Parasit ist in der Lage, sich im Phagolysosom der MΦ in die obligat intrazelluläre, amastigote Form umzuwandeln und dort zu proliferieren. Diese unbegeißelte Form des Parasiten wird ins Gewebe freigesetzt und kann dort weitere MΦ infizieren oder während einer Blutmahlzeit erneut von einer Sandmücke aufgenommen werden. Im Mitteldarm der Mücke bildet sich wiederum die promastigote Form des Parasiten aus, die in diesem Milieu optimale Proliferationsbedingungen wiederfindet, bevor sie vom Mittel- in den Vorderdarm der Sandmücke wandert. Damit schließt sich der Lebenszyklus (Abb. 2)¹¹.

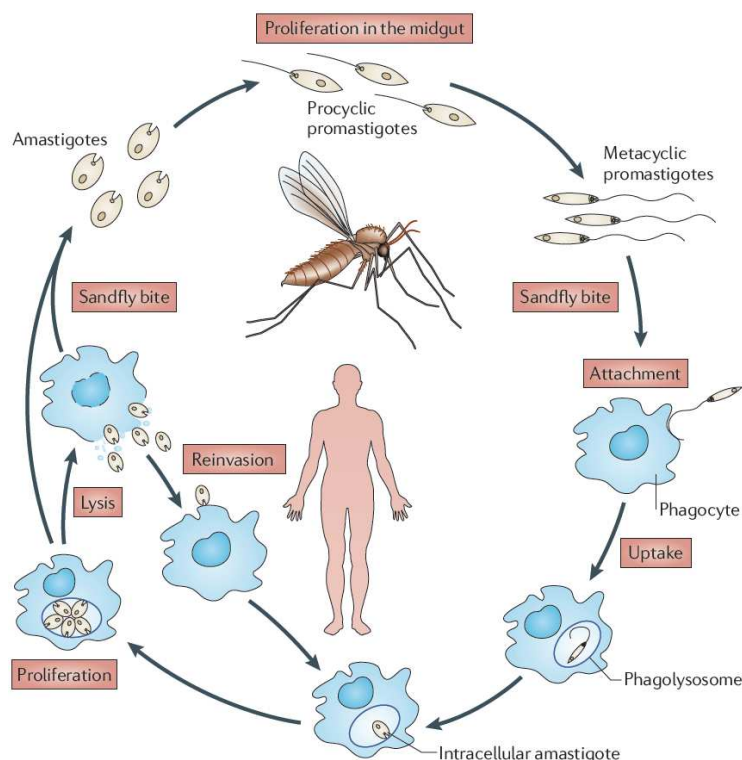


Abb. 2: Lebenszyklus von *Leishmania*. Der Lebenszyklus schließt sowohl eine Infektion von Säugetieren wie auch eine Passage in Sandmücken ein (aus ¹¹).

2.3 Experimentelle murine kutane Leishmaniasis

2.3.1 T-Zell-Immunantworten

Zelluläre Immunmechanismen spielen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von Infektionen mit dem Parasiten *Leishmania*. Die ersten Hinweise auf die Relevanz des Verhältnisses von T-Helferzell (Th)1/Th2-Immunantworten für den Ausgang der Krankheit wurden bereits vor über 15 Jahren entdeckt¹⁴⁻¹⁶. Einige Mausstämme definierter genetischer Hintergründe erwiesen sich als suzeptibel, andere konnten die Infektion kontrollieren und ausheilen. Sie waren gegen eine weitere Infektion mit dem gleichen Parasiten immun. Suszeptible Mausstämme entwickelten präferentiell eine Th2-Immunantwort mit entsprechend hohen Interleukin (IL-)4-Titern und damit eine humorale Immunantwort. Die induzierte Antikörperantwort war jedoch nicht in der Lage, effektiv gegen die intrazellulär vorliegenden Parasiten vorzugehen. In resistenten Stämmen hingegen konnte eine IL-12 und Interferon- (IFN-)γ-vermittelte Th1-Antwort nachgewiesen werden. Bereits in den 1980er Jahren wurde gezeigt, dass eine CD4⁺ Th1-Antwort protektiv gegen die Parasiteninfektion wirkt^{15;17}. In den vergangenen Jahren zeigte sich jedoch, ausgelöst durch die Entdeckung zuvor unbekannter Subtypen, dass eine Reihe weiterer T-Zellen eine Rolle in der Immunantwort gegen *L. major* spielen. Inzwischen weiß man, dass von resistenten Stämmen sowohl eine Th1- als auch eine zytotoxische T-Zell (Tc1)-Antwort mit einer IFN-γ-Freisetzung durch beide Zellpopulationen induziert wird¹⁸. Die Haut weist zudem eine hohe Zahl ruhender, sogenannter natürlicher regulatorischer T-Zellen (nTregs) auf. Sie limitieren Gewebeschäden durch inflammatorische Immunreaktionen, in dem sie selbst anti-inflammatorisch wirken. Ihre Präsenz in der Haut scheint dadurch das Überleben von *Leishmania*-Parasiten fördern. Sie wirken hierbei über IL-10-abhängige und -unabhängige Mechanismen¹⁹⁻²². Die proinflammatorisch wirkende, IL-17 freisetzende CD4⁺ Population der Th17 Zellen wurde erst vor wenigen Jahren beschrieben. Inzwischen wurde gezeigt, dass IL-17 in der Rekrutierung, Migration und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (NΦ) eine Rolle spielt. Th17-Zellen schützen Oberflächen vor extrazellulären Bakterien und Pilzen, können jedoch auch pathologisch wirken^{23;24}. Für *L. major*-Infektionen wurde gezeigt, dass die IL-17A-Freisetzung durch CD4⁺ T-Zellen und NΦ in suszeptiblen Mäusen zur Parasitenpersistenz beiträgt²⁵.

C57BL/6 Mäuse sind resistent gegen Infektionen mit *L. major* und reagieren mit einer Th1/Tc1-Antwort auf die Infektion mit diesem Parasiten. Die experimentelle Infektion dieses Mausstammes wird deshalb als Modell für die humane, kutane Leishmaniasis immunkompetenter Patienten eingesetzt. Der Stamm BALB/c hingegen ist aufgrund einer dominanten Th2/Th17/Treg-Antwort genetisch suzeptibel und fungiert als Modell für die viszerale Form der Erkrankung (Abb. 3).

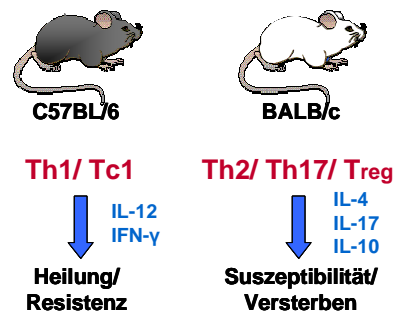


Abb. 3: Mausmodelle der experimentellen Leishmaniasis. C57BL/6 Mäuse sind resistent gegenüber einer Infektion mit dem Parasiten *L. major* und werden als Modell für die humane, kutane Leishmaniasis eingesetzt. BALB/c Mäuse hingegen sind aufgrund ihrer Suszeptibilität ein beliebtes Modell zur Erforschung der viszeralen Leishmaniasis.

2.3.2 Modell der schützenden Immunantwort

In der kutanen Leishmaniasis werden nach der Inokulation der promastigoten Parasiten zunächst M Φ infiziert, in denen sich *Leishmania* in die amastigote Form umwandelt. Es kommt zu einer stillen Phase der Infektion, denn eine Aktivierung der M Φ findet nicht statt. Erst die von M Φ freigesetzten Amastigoten können von DCs effektiv aufgenommen werden²⁶⁻²⁸. Und erst diese Zellen werden durch die Infektion aktiviert und migrieren in den Lymphknoten. In resistenten Mäusen kommt es dort zu einem Priming von Th1- und Tc1-Zellen, die an der Infektionsstelle infizierte M Φ IFN- γ -vermittelt aktivieren²⁹. Durch die dabei induzierte NO²⁻ Produktion werden die M Φ in die Lage versetzt, die intrazellulären Parasiten abzutöten (siehe auch Abb. 4)^{30,31}.

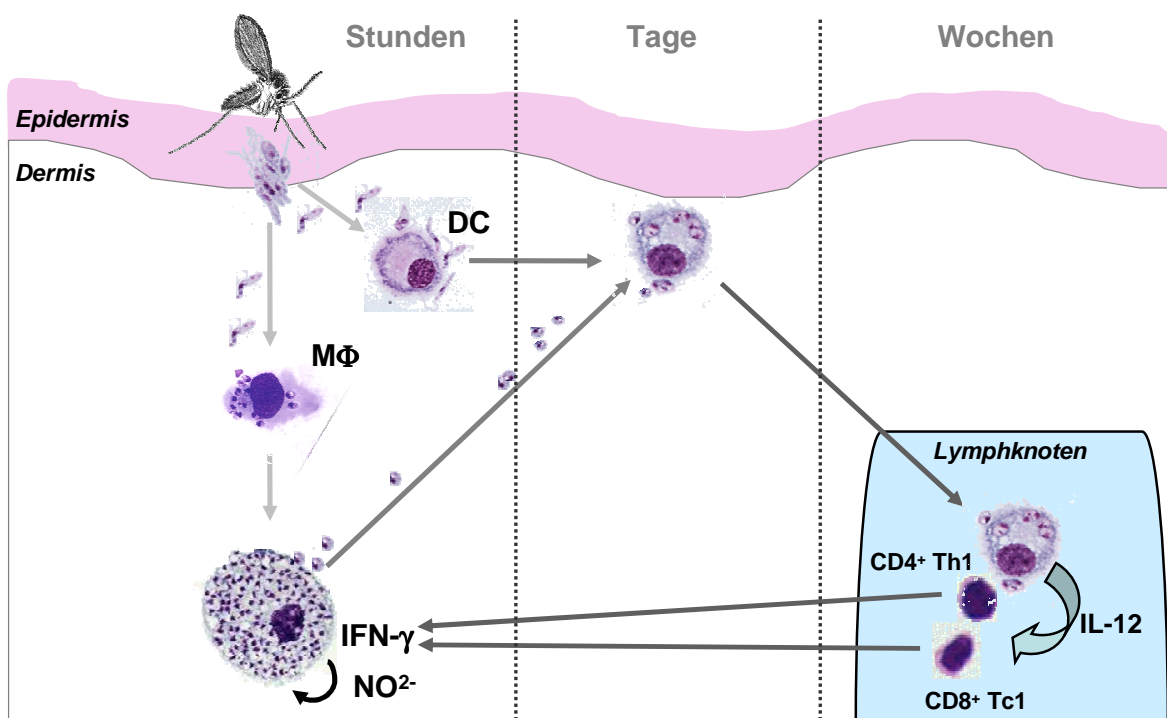


Abb. 4: Paradigma der kutanen Leishmaniasis. Die Hauptaspekte einer schützenden Immunantwort sind mit den relevanten Zellpopulationen über die Zeit dargestellt (Quelle: Esther von Stebut).

2.3.3 Genetisch bedingte Einflussfaktoren in C57BL/6 und BALB/c Mäusen

Es sind eine ganze Reihe von Genloci bekannt, die mit Resistenz gegen *L. major*-Infektionen assoziiert werden¹¹. Allerdings konnten keine stammesspezifischen Polymorphismen in diesen Genen nachgewiesen werden, sodass eine Identifizierung dieser Resistenzfaktoren allein nicht ausreicht, um die unterschiedlichen Verläufe von *L. major*-Infektionen in C57BL/6 und BALB/c Inzuchtstämmen zu beschreiben.

Die Suszeptibilität manifestiert sich unter anderem auf Ebene der T-Zellen. Sie ist assoziiert mit einer Th2-Antwort, die sich neben hohen Konzentrationen an IL-10 und IL-13 in einer Freisetzung größerer Mengen IL-4 zeigt. IL-4 ist in der Lage, die Th1-Entwicklung zu inhibieren und führt zu einer Th2-Polarisierung naiver Th0-Zellen. Zu frühen Zeitpunkten freigesetztes IL-4 wurde in BALB/c Mäusen als ein Faktor identifiziert, der mitbestimmend für den progressiven Verlauf der Erkrankung ist. Dieses IL-4 wird von einer Population $V\beta 4V\alpha 8^+CD4^+$ T-Zellen freigesetzt, die spezifisch das *Leishmania homologue of receptors for activated C kinase* erkennt³². Jedoch widersprechen sich hier die Daten der Literatur. Eine solche IL-4-Produktion wurde in gleichem Maße auch in resistenten C57BL/6 Mäusen beschrieben^{33;34}. Es ist allerdings bekannt, dass die geringere Th1-Antwort in BALB/c Mäusen erwartungsgemäß zu einer reduzierten IFN- γ -Freisetzung führt¹¹. Ein weiterer Einflussfaktor scheint ein Defekt in der Hochregulation des Chemokinrezeptors CXCR3 auf BALB/c T-Zellen zu sein, mit Hilfe dessen IFN- γ -produzierende Th1- und Tc1-Zellen an den Infektionsort gelockt werden. Es wurde gezeigt, dass C57BL/6 CXCR3⁺ T-Zellen Immunität gegen *L. major*-Infektionen vermitteln. In BALB/c Mäusen wird dieser Rezeptor jedoch vermindert exprimiert³⁵. Außerdem zeigen BALB/c Mäuse eine erhöhte Th17-Antwort.¹⁷⁸

Auf der Ebene von DCs finden sich in vielen Bereichen keine Unterschiede. So ist die phagozytotische Aktivität der DCs, ihre Rekrutierung und Antigenpräsentation sowie ihre Migration bei suszeptiblen und resistenten Mausstämmen vergleichbar³⁶. Allerdings unterscheiden sich die DCs in ihrer Fähigkeit, Th1- und Th2- aus Th0-Zellen zu polarisieren^{29;37}. Das von M Φ , N Φ und DCs im Lymphknoten freigesetzte IL-12 ist für eine protektive Immunantwort absolut notwendig³⁸. In *L. major*-infizierten Mäusen scheinen die Hauptquelle des frühen IL-12 jedoch DCs zu sein, die damit eine wichtige Rolle in der Weichenstellung zu einer schützenden Th1-Antwort spielen²⁶. Allerdings konnten zwischen DC aus C57BL/6 und BALB/c keine Unterschiede in der IL-12p40- und IL-12p70-Freisetzung beobachtet werden, wobei in BALB/c jedoch vermehrt das inhibitorische IL-12p40-Homodimer IL-12p80 nachgewiesen werden konnte^{36;39}. Eine lokale Applikation von IL-12p80 an die Infektionsstelle resultierte in vergrößerten Läsionen und verringerter Th1-Antwort in C57BL/6 und BALB/c Mäusen. Außerdem produzieren DCs von BALB/c Mäusen weniger IL-1 α/β im Vergleich zu resistenten C57BL/6 Mäusen⁴⁰. Es wurde bereits zuvor gezeigt, dass IL-1 α synergistisch mit IL-12 eine Th1-Antwort fördert⁴¹.

BALB/c Mäuse rekrutieren in den ersten Stunden nach Inokulation von *L. major*-Parasiten ausschließlich N Φ an den Infektionsort und der Anteil dieser Zellen am Inokulationsort liegt nach 12 Tagen noch immer bei etwa 60%.⁴² C57BL/6 Mäuse hingegen weisen mit etwa 60% bereits in den ersten Stunden deutlich weniger N Φ auf. Ihr Anteil an den Gesamtzellen in den Läsionen fällt zudem bereits innerhalb der ersten beiden Tage auf unter 10%. N Φ sind während *L. major*-Infektionen als Quelle von inhibitorischen IL-12p80 bekannt⁴³. Dieses wird jedoch nur von BALB/c N Φ exprimiert, wobei C57BL/6 N Φ das biologisch aktive IL-12p70 sowie IL-10 freisetzen. BALB/c N Φ hingegen exprimieren kein IL-10. Zusätzlich wurde in diesen Zellen nach *L. major*-Infektion weniger TLR2-, TLR7- und TLR9-mRNA nachgewiesen.

C57BL/6 Mäusen weisen eine robustere M Φ -Antwort nach *L. major*-Infektionen auf. Bereits einige Tage nach Infektion sind Unterschiede in der Rekrutierung von F4/80⁺ M Φ

zu erkennen. Läsionen von C57BL/6 Mäusen weisen eine erhöhte Zahl maturer MΦ gegenüber BALB/c Läsionen auf⁴⁴. Es handelt sich dabei um einen T-Zell-unabhängigen Effekt. Auch in C57BL/6 Knochenmarks (KM) -Kulturen steigt die Zahl F4/80-positiver MΦ schneller an als in Kulturen mit BALB/c Knochenmark. In Läsionen von BALB/c Mäusen hingegen ist vermehrt eine diffuse Akkumulation von MRP14⁺ Granulozyten und inflammatorischen Monozyten erkennbar. Steinbrink et al. konnten zeigen, dass inflammatorische MRP14⁺ Monozyten *L. major*-Parasiten nur ineffektiv zu eliminieren vermögen⁴⁵.

Neben hämatopoetischen Zellen wurden auch Keratinozyten auf Mausstamm-spezifische, regulatorische Mechanismen hin in *L. major*-Infektionen untersucht. So wurde gezeigt, dass die Epidermis eine Hauptquelle von Immunmodulatoren in der frühen Phase der Infektion ist. Es kommt zu einer Hochregulation verschiedenster Gene, die eine Th1-Entwicklung fördern. Resistente Stämme zeigten eine vermehrte Aktivität in den *il-12*-, *il-1beta*-, *osteopontin*- und *il-4*-Genen, die zeitlich auf die Th1-/Th2-Entwicklung begrenzt ist⁴⁶.

Es wurde bereits eine Vielzahl von Faktoren beschrieben, die den unterschiedlichen Krankheitsverlauf in verschiedenen Inzuchtmausstämmen beeinflussen und in Suszeptibilität oder Resistenz gegen eine *L. major*-Infektion resultieren. Diese Faktoren involvieren neben Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems auch Stromazellen. Ob nur diese Vielzahl von Faktoren zusammen den Unterschied zwischen progressivem Krankheitsverlauf und Heilung ausmachen oder ob der genetische Hintergrund einer einzelnen Zellpopulation ausreicht, um den einen oder anderen Verlauf der Infektion zu verursachen, ist derzeit noch unklar. Dieser Aspekt soll hier beleuchtet werden.

Um der Frage nach den entscheidenden Zellpopulationen des jeweiligen genetischen Hintergrundes nachzugehen, wurde für diese Arbeit das Modell der Knochenmarkschimären gewählt, das es ermöglicht, Empfängertiere mit dem Immunsystem von Mäusen eines anderen genetischen Hintergrundes zu rekonstituieren.

2.3.4 Experimentelle Mausinfektionen

Die experimentelle Leishmaniasis ist ein hervorragendes Modell zur Analyse von Th1-/Th2-Antworten und wurde in der Vergangenheit vielfach erfolgreich für die Erforschung von Parasiten-Wirt-Interaktionen eingesetzt. Derzeit gibt es in der experimentellen Leishmaniasis noch kein Standardmodell. Stattdessen werden zur Nachahmung der humanen Erkrankung von 100 bis zu mehreren Millionen Parasiten unterschiedlichster Stämme eingesetzt. Zusätzlich werden in vielen Arbeiten nicht nur die bei der natürlichen Infektion übertragenen metazyklischen Promastigoten, sondern auch Mischkulturen mit verschiedensten Parasitenstadien zur Infektion verwendet. Die Inokulation der Parasiten findet in der Natur an exponierten Körperteilen statt und die Parasiten werden dabei intradermal in die Haut eingebracht. Die oft verwendete subkutane Inokulation in die Fußsohlen der Mäuse oder intravenöse (i.v.) Infektion sind deshalb als unphysiologisch anzusehen. Um Erkenntnisse zu gewinnen, die sich auf die humane Erkrankung übertragen lassen, sollte deshalb die natürliche Infektion möglichst exakt imitiert werden.

Eine intradermale Infektion in die Ohren erlaubt eine dreidimensionale Größenbestimmung der entstehenden Läsionen. Abb. 5 zeigt schematisch den Verlauf der Läsionsentwicklung in BALB/c und C57BL/6 Mäusen.

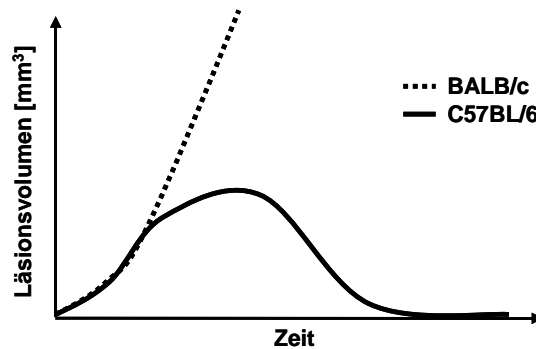


Abb. 5: Schematische Darstellung der Läsionsentwicklung in BALB/c und C57BL/6 Mäusen nach intradermaler Infektion. Die Läsionsentwicklung in BALB/c Mäusen zeigt einen progressiven Verlauf, wohingegen in C57BL/6 Mäusen die größten Ohrschwellungen nach 6-9 Wochen erreicht sind und die Läsionen anschließend abheilen.

2.4 TNF in der Leishmaniasis

2.4.1 TNF und seine Rezeptoren

Der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) spielt eine zentrale Rolle in der Abwehr intrazellulärer Parasiten und induziert verschiedenste Mechanismen der angeborenen Immunantwort wie die Zellrekrutierung und Zelldifferenzierung. Dabei kann TNF sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkung zeigen. Allerdings sind die Wirkmechanismen dieses von vielen Zellpopulationen exprimierten Zytokins und sein Beitrag zum Schutz vor intrazellulären Parasiten noch nicht vollständig verstanden⁴⁷. Eine der ersten identifizierten Funktionen von TNF war die Induktion von Apoptose^{48;49}. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass dieses oft proinflammatorisch wirkende Zytokin in Infektionssituationen überwiegend von MΦ produziert wird und besonders bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene eine wichtige Rolle spielt^{50;51}. Der intrazelluläre Parasit *L. major* wird beispielweise von infizierten humanen MΦ durch NO²⁻ abgetötet, dessen Produktion durch TNF induziert wird⁵². *L. major*-infizierte Mäuse, denen rekombinantes TNF verabreicht wurde, zeigen deutlich kleinere Läsionen und weniger Parasiten, während die Applikation eines TNF-neutralisierenden Antikörpers die Erkrankung in resistenten Mäusen verschlechtert. Es kommt zu einem verzögerten Abheilen und keinem vollständigen Ausheilen der Läsionen⁵³⁻⁵⁶. Wird TNF dauerhaft neutralisiert, indem Mäuse konstitutiv ein TNF-R1-Ig-Fusionsprotein exprimieren, sind sie suszeptibel gegenüber *L. major*-Infektionen⁵⁷. Wilhelm et al. bestätigten diese Ergebnisse, indem sie zeigen konnten, dass TNF^{-/-} Mäuse nach Infektion mit *L. major* rasch versterben⁵⁸. Eine weitere, die wichtige Rolle von TNF unterstützende Beobachtung war das Wiederauftreten von Leishmaniasis-Symptomen in infizierten Patienten, die wegen einer rheumatoiden Arthritis mit anti-TNF behandelt wurden⁵⁹.

Die Ergebnisse der Literatur in Bezug auf die Rolle von TNF in der Leishmaniasis sind jedoch nicht eindeutig. TNF besitzt zwei Rezeptoren, die auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden: TNF-R1 und TNF-R2. Im Gegensatz zu TNF^{-/-} Mäusen induzieren Mäuse mit einer Defizienz für den TNF-R2 oder die TNF-R1/2 überraschenderweise eine protektive Th1- und IFN-γ-Antwort (gemischter genetischer Hintergrund C57BL/6 x129)⁶⁰. Fehlt nur der TNF-R2, sind die Mäuse in der Lage, die Läsionen auszuheilen. TNF-R1^{-/-} Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund sind hingegen dazu nicht vollständig in der Lage, kontrollieren jedoch das Parasitenwachstum und produzieren IFN-γ sowie Stickstoffmonoxid-Radikale⁶¹.

Auch über 30 Jahre nach der ersten Beschreibung von TNF sind die vielfältigen Wirkmechanismen von TNF noch nicht völlig geklärt. Um weitere Klarheit zu schaffen, wird

im Folgenden die Rolle des an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligten Moleküls FAN in der Leishmaniasis untersucht.

2.4.2 Der TNF-R1-Signalweg und FAN

Neutrale Sphingomyelinasen (nSMasen) vermitteln die Stress-induzierte Ceramid-Produktion und sind in einer Vielzahl von Prozessen wie Inflammation, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod sowie Atherosklerose und Alzheimer involviert⁶²⁻⁶⁴. Es wurden inzwischen drei nSMase Gene in Säugetieren identifiziert. Mindestens die Aktivierung der nSMase2 und 3 erfolgt nach TNF Bindung über den TNF-R1⁶⁵⁻⁶⁸. Bereits 1996 wurde beschrieben, dass diese Aktivierung über das intrazellulär an den TNF-R1 gebundene Protein FAN (Faktor assoziiert mit der Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase) vermittelt wird⁶⁹, ein Prozess, der im Menschen auf gleiche Weise unter Beteiligung des humanen FAN-Proteins abläuft⁷⁰. Dabei rekrutiert FAN das Protein RACK1 an den TNF-R1-Komplex und moduliert so die Aktivität der nSMase⁷¹.

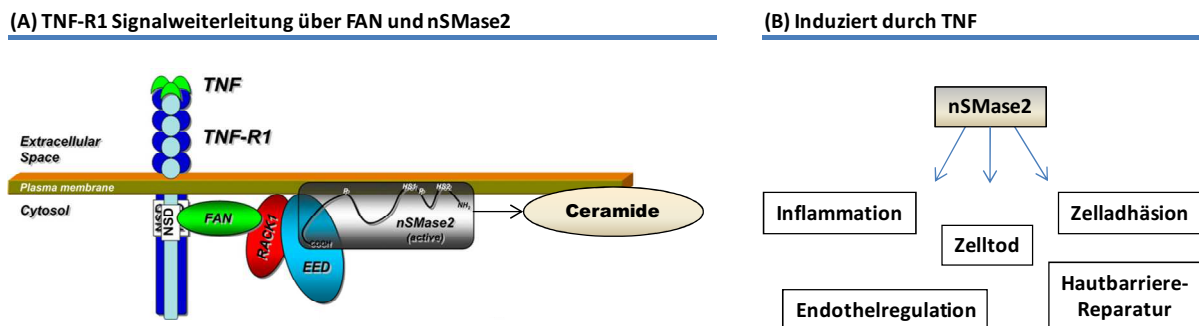


Abb. 6: FAN und nSMase2 in der TNF-R1-Signalweiterleitung. (A) Die Bindung von TNF an den TNF-R1 führt zur Aktivierung der nSMase2 und 3, vermittelt über FAN (verändert nach^{64;72}). (B) nSMasen sind nach TNF-vermittelter Aktivierung an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt.

FAN ist jedoch nicht mit dem TNF-R2 assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass FAN nach TNF:TNF-R1-Bindung Funktionen in der Regulation inflammatorischer Antworten übernimmt⁶⁹. Neben dem TNF-R1 ist FAN mit dem zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehörenden Molekül CD40 assoziiert und ist an der Apoptose-induzierenden Signalweiterleitung beteiligt^{73;74}. Weiterhin spielt es eine Rolle in der Aktin-Reorganisation von Fibroblasten und ist an der Reparatur der Hautbarriere beteiligt^{75;76}. Die Rolle von FAN in der lysosomalen Permeabilisierung sowie in der IL-6-Sekretion ist bereits beschrieben⁷⁷. Eine Assoziation von FAN mit dem Cannabinoid Type 1-Rezeptor wurde ebenfalls publiziert⁷⁸. Trotz allem ist der genaue Signalweg, in dem FAN eine Rolle spielt, und dessen Vernetzung mit weiteren zellulären Prozessen, noch nicht vollständig aufgeklärt.

Interessanterweise zeigen FAN^{-/-} Mäuse keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit den intrazellulären Erregern *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* und *Toxoplasma gondii*⁷⁹. Der Einfluss eines Knock Outs von FAN in der kutanen Leishmaniasis wurde bisher nicht untersucht.

2.5 Humane kutane Leishmaniasis

2.5.1 Zelluläre Mechanismen

Wie in der murinen Erkrankung sind M Φ in der humanen Leishmaniasis die primär infizierten Zellen und TNF ist auch hier ein wichtiger Mediator der NO²⁻-Freisetzung, der zum Abtöten der intrazellulären Amastigoten führt⁵². Neben diesem verlaufen weitere Prozesse in der humanen Leishmaniasis ähnlich wie in den murinen Modellen. So sind die Marker-Zytokine IFN- γ und IL-4 ebenso im humanen Krankheitsbild relevant, wie es bereits für die murine Infektion gezeigt wurde^{80;81}. Allerdings ist das Wissen über die humane Leishmaniasis beschränkt.

Anfang bis Mitte des vergangenen Jahrhunderts wurden vereinzelt experimentelle Infektionen mit *Leishmania spp.* an Menschen durchgeführt⁸². Auch wenn solche Experimente sehr kritisch zu sehen sind, haben sie doch zum heutigen Verständnis der Leishmaniasis beigetragen. Durch Sandmücken- und Nadelinokulation von Parasiten ließen sich lokale, Parasiten-tragende Läsionen und viszerale Leishmaniasis auslösen, die mit den natürlichen Erkrankungen vergleichbar waren. Es zeigte sich, dass der Krankheitsverlauf spezifisch für die verschiedenen Leishmanien-Spezies ist. Suszeptibilität ist individuell von den Patienten abhängig und eine ausgeheilte Infektion induziert Immunität gegenüber einer wiederholten Infektion mit dem gleichen und je nach Subspezies auch gegen andere Leishmanien-Spezies.

In der murinen wie auch in der humanen Leishmaniasis ist die Produktion Th1-assoziiertes Zytokine unerlässlich für die Kontrolle des Parasitenwachstums und das Ausheilen der Erkrankung. Die viszerale und diffuse, kutane Leishmaniasis (DCL) sind charakterisiert durch einen negativen Hauttest auf Leishmanien Antigenen und das Fehlen von Th1-Zytokinen, wohingegen die lokale, kutane Leishmaniasis einen positiven Hauttest zeigt und die peripheren, mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) der Patienten in der Lage sind, IFN- γ zu produzieren⁸¹. Schon seit langem wird auch in der humanen, kutanen Leishmaniasis IFN- γ mit Heilung assoziiert⁸³. Zudem führte eine systemische Applikation von IFN- γ bei einem 4-jährigen Patienten zum Ausheilen einer persistierenden, ulzerierenden CL⁸⁴.

Allerdings wird im Gegensatz zur murinen experimentellen Leishmaniasis die Th1-/Th2-Dichotomie in der Peripherie von Patienten mit CL nicht immer deutlich. Stattdessen ist oft eine gemischte Th1-/Th2-Antwort nachweisbar^{85;86}. Antigen-spezifisch restimulierte PBMC aus Patienten mit einem milden Verlauf weisen überwiegend Th1-dominierte Antworten mit hohen Mengen an IFN- γ und nicht nachweisbaren Konzentrationen an IL-4 auf. PBMC von Patienten mit schweren Verläufen hingegen exprimieren häufig geringe Mengen an IFN- γ , was in den meisten Fällen zusammen mit einer Freisetzung von IL-4 auftritt⁸⁶. In Patienten mit aktiven Läsionen kommt es neben der Produktion von IFN- γ auch zur Freisetzung von TNF- α und IL-10⁸⁷. Restimulierte PBMC ausgeheilter Patienten sekretieren dagegen nur IFN- γ in erhöhten Mengen⁸⁸.

In den vergangenen Jahren wurden zunehmend die Läsionen von Patienten untersucht. Die lokal ablaufenden Immunantworten sind wahrscheinlich entscheidend für den Verlauf der lokalen CL. In der frühen Phase der Infektion lässt sich zunächst eine vorübergehende lokale Freisetzung der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 beobachten, auch wenn es in den Patienten anschließend zu einer schützenden Th1-Antwort mit IFN- γ -Freisetzung kommt⁷⁶. Geiger et al. analysierten Hautbiopsien von 20 CL-Patienten und konnten zeigen, dass die überwiegende Zahl der in den Läsionen befindlichen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen positiv für den Chemokinrezeptor CXCR3 waren⁸⁹. Das deutet darauf hin, dass es sich dabei um IFN- γ -produzierende Th1- und zytotoxische T-Zellen des Typs 1 (Tc1-Zellen) handelt. Th2-Zellen waren nicht nachzuweisen. IFN- γ in Läsionen wird regelmäßig mit Heilung in

Verbindung gebracht, wohingegen IL-10 nur in persistierenden Läsionen zu finden ist^{29;90}. Als Quelle des schützenden IFN- γ konnten, wie in Mäusen, CD4⁺ Th1- und CD8⁺ Tc1-Zellen identifiziert werden⁹¹.

Humane M Φ phagozytieren wie ihre murinen Gegenstücke sowohl promastigote wie auch amastigote *L. major* und werden dadurch nicht aktiviert. Myeloide und dermale DCs werden jedoch durch die Parasitenaufnahme aktiviert und exprimieren IL-12p70⁹². Dieser Mechanismus ist ebenfalls aus dem Mausmodell bekannt. Die Adressierung dermalen DC bietet einen Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Vakzins, wobei jedoch vermieden werden sollte, dass Langerhans-Zellen mitaktiviert werden. Es wurde in Mäusen gezeigt, dass sie während *L. major*-Infektionen durch Aktivierung von Tregs als negative Regulatoren wirken können¹⁹.

2.5.2 Medikation, Vakzinierungsstrategien und ihre Grenzen

Die Behandlung der CL kann lokal oder auch systemisch erfolgen. Dabei ist die Therapie abhängig vom verursachenden Parasiten und dessen Stadium (promastigot oder amastigot), weshalb eine Speziesdiagnostik notwendig ist. In den meisten Fällen der alten Welt ist eine lokale Behandlung durch Exzision, Kryotherapie, Wärmetherapie oder lokale Chemotherapie mit beispielsweise Paromomycin und Methylbenzethoniumchlorid gegen *L. major* und *L. mexicana* ausreichend. Eine systemische Behandlung sollte bei diffuser, rezidivierender und mukokutaner CL eingesetzt werden. CL, ausgelöst durch Infektionen mit einigen südamerikanischen *Leishmania spp.*, erfordern ebenfalls systemische Therapien. Hier werden Pentamidine, liposomales Amphotericin B und oral verfügbares Miltefosin empfohlen. Allerdings zeigen inzwischen einige Parasiten Resistenzen, vor allem gegen das seit langem bekannte und eingesetzte liposomale Antimon. Viele Medikamente verursachen außerdem erhebliche Nebenwirkungen. Die Behandlung mit dem oral verabreichten Miltefosin ist sehr wirksam, jedoch teuer⁹³. Problematisch ist auch, dass Leishmaniasis in vielen Fällen den ärmsten Teil der Weltbevölkerung trifft, für die Medikamente generell wenig erschwinglich sind. Zudem sind Behandlungen in den endemischen Gebieten logistisch und organisatorisch oft problematisch, insbesondere wenn Behandlungen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden müssen.

Ein Vakzin, das durch einmalige Applikation wirksam ist, wäre deshalb das Mittel der Wahl. Leider ist derzeit trotz vielseitigem Bemühen kein Vakzin gegen die humane Leishmaniasis verfügbar. Es ist bekannt, dass abgeheilte Infektionen vor einer erneuten Infektion mit der gleichen Leishmanien-Spezies schützen. Das deutet darauf hin, dass die Entwicklung eines Vakzins möglich sein sollte. Tatsächlich ist eine Vakzinierung mit lebenden Leishmanien eine seit langem in den endemischen Gebieten verbreitete Impfmethode, wobei Kinder z.B. am Gesäß bewusst infiziert werden, um späteren Läsionen und damit Narben an exponierten Körperbereichen vorzubeugen (Leishmanization). Allerdings birgt die Leishmanization bei immunsupprimierten Personen das Risiko eines schweren, möglicherweise viszeralen Verlaufes, insbesondere bei Koinfektionen mit HIV. Außerdem ist eine Immunität i.d.R. nur gegen die gleiche Leishmanien-Spezies, in manchen Fällen sogar nur gegen den gleichen Stamm gegeben. Tatsächlich sehen Okwor und Uzonna eine Impfung mit lebenden, jedoch nicht virulenten Parasiten als erfolgversprechendste Vakzinierungsstrategie⁹⁴. Hier werden vor allem Knock Out-Parasiten erforscht, in denen essentielle Gene geblockt oder entfernt wurden. Ein Knock In, der eine Empfindlichkeit gegen Medikamente mit sich bringt, ist ebenfalls denkbar. Eine weitere Methode ist das Einbringen von sogenannten suicide cassettes, die dazu führen, dass der Parasit durch die Einnahme von harmlosen Substanzen für ihn selbst toxische Metabolite bildet⁹⁵. Bei

lebenden, genetisch modifizierten, nicht virulenten Erregern besteht jedoch immer die Gefahr, dass der Parasit seine Virulenz wieder ausbildet und damit eine Leishmaniasis auslöst.

Eine weitere Strategie ist die Verwendung von abgetöteten Parasiten. Hier wird derzeit jedoch noch kontrovers diskutiert, ob für einen dauerhaften Schutz im menschlichen Körper ein Reservoir an lebenden Parasiten vorhanden sein muss, was durch eine Impfung mit abgetöteten Parasiten nicht gegeben wäre. Zudem wurde in Feldtests nur ein mäßiger Erfolg mit solchen, oftmals autoklavierten Parasiten erzielt⁹⁵.

Ein weiterer Ansatz ist die Identifizierung immundominanter Peptide einzelner Leishmanien-Spezies bzw. ihrer jeweiligen Lebensform (promastigot, amastigot), die synthetisch hergestellt als Vakzin eingesetzt werden können.

Die Identifizierung von Vakzin-Kandidaten, die gegen die humane Leishmaniasis wirksam sind, scheiterte bisher daran, dass die Forschung in den allermeisten Fällen zunächst auf die Nutzung von Mausmodellen angewiesen ist. Viele Prozesse im Immunsystem des Menschen und der Maus laufen vergleichbar ab. Jedoch war bisher eine Übertragung des Wissens um die Leishmaniasis-Vakzinierung von Mäusen auf den Menschen nicht erfolgreich^{96,97}. Ein viel versprechender Ansatz, das Problem der limitierten Übertragbarkeit von Laborerkenntnissen auf den Menschen zu umgehen, ist der Einsatz von humanisierten Mausmodellen.

2.5.3 Humanisierte Mausmodelle

Die Mutation SCID (severe combined immune deficiency, auch als Prkdc scid bezeichnet) trat spontan in einer Kolonie von BALB/c-Ighb auf (C.B-17-Scid). Scid Mäusen mit homozygotem Genotyp fehlen T- und B-Zellen⁹⁸. Sie eignen sich deshalb für den Transfer allo- aber auch xenogener Transplantate⁹⁹⁻¹⁰¹. Das Anwachsen transferierter, humaner Zellen in C.B-17-Scid Mäusen ist jedoch gering und variabel. Eine deutliche Verbesserung konnte durch das Einbringen der Scid Mutation in non-obese diabetic (nicht fettleibig diabetisch, NOD) Mäuse erzielt werden (NOD-Scid). Diese Mäuse zeichnen sich jedoch durch eine sogenannte „leakiness“ aus, d.h. es kann im fortgeschrittenen Mausalter spontan zur Entwicklung von T- und B-Zellen kommen. Obwohl NOD-Scid Mäuse bereits 1995 beschrieben wurden und eine bessere Rekonstitution mit humanen Zellen ermöglichen als C.B-17-Scid Mäuse, bleibt auch hier das Anwachsen humaner Zellen nach intraperitonealer Injektion variabel und suboptimal (typischerweise 0,1-5% humane Zellen). Eine intravenöse Applikation von PBMC resultiert in sehr schlechten Rekonstitutionsergebnissen¹⁰². Allerdings zeigen diese Mäuse nach PBMC Transfer seltener eine xenogene Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD). Die Rekonstitutionsraten konnten jedoch deutlich erhöht werden, wenn zuvor die murinen NK-Zellen ausgeschaltet wurden¹⁰³⁻¹⁰⁶.

Recombination activating gen 1 und 2 ($Rag1^{-/-}$ und $Rag2^{-/-}$)-defiziente Mäuse sind ebenfalls durch das Fehlen von T- und B-Zellen charakterisiert. Auch sie eignen sich für den Transfer humaner Zellen¹⁰⁷.

Ein großer Fortschritt in der Entwicklung von Mäusen, die mit humanen Zellen rekonstituiert werden können, gelang mit der Beschreibung einer Mutation der IL-2-Rezeptor- γ -Kette ($IL2r\gamma null$, $\gamma c^{-/-}$). Es handelt sich dabei um die *common gamma chain*, eine Zytokinrezeptor-Kette, die neben dem IL-2 auch in den IL-4, -7, -9, -15, -21-Rezeptoren Verwendung findet. Dieser Knock Out führt zum kompletten Verlust von funktionellen NK-Zellen. Mäuse mit einer fehlenden funktionellen γc zeigen ein verbessertes Anwachsen und eine erhöhte Funktionalität von transferierten, humanen Zellen *in vivo*^{108;109}. H2d (BALB/c) $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ Mäuse zeigen nach PBMC-Transfer eine deutlich bessere Rekonstitution mit

humanen Zellen im Vergleich zu NOD-Scid, jedoch konnte auch hier die Variabilität des Rekonstitutionserfolges nicht völlig behoben werden¹⁰³.

Zur Verbesserung der Rekonstitution durch Reduktion der NK-Zellaktivität wurde ein neuer Ansatz auf NOD-Scid Hintergrund durchgeführt. NOD-Scid Mäuse mit einer Defizienz für das Beta-2-Mikroglobulin ($\beta 2m^{-/-}$) zeigen keine Expression von murinen MHC Klasse I-Molekülen und dadurch eine deutlich reduzierte NK-Zellzahl und -aktivität. Allerdings führte eine i.p.-Injektion von PBMC in diesen Mäusen nur zu einer transienten Rekonstitution¹⁰⁴.

Ein weiterer Ansatz war die Entwicklung von H2b (C57BL/6) $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ Mäusen. Rekonstitutionen dieser Mäuse mit PBMC und Tregs sind publiziert. Die Autoren beschreiben ein verlässliches Anwachsen der humanen Zellen^{110;111}.

Vor einigen Jahren wurde die Entwicklung von NOD-Scid $\gamma c^{-/-}$ beschrieben. NOD-Scid $\gamma c^{-/-}$ Mäuse lassen sich verlässlich durch i.p.- oder i.v.-Gabe von nur 5×10^6 humanen PBMC rekonstituieren, unabhängig vom PBMC-Spender. Diese humanen Zellen waren in der Lage, allogene, humane Inselzell-Transplantate in Mäusen innerhalb von 7-15 Tagen abzustößen¹¹².

Wie bereits deutlich wurde, gibt es eine Vielzahl von immundefizienten Mäusen, die einen oder mehrere der oben genannten Defekte aufweisen. Häufig eingesetzte Stämme sind NOD-Scid für PBMC-Transfers sowie NOD-Scid $\gamma c^{-/-}$ (je nach Herkunft als NOG oder NSG bezeichnet) und H2d (BALB/c) $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ für den Transfer von PBMC, hämatopoetischen Stammzellen sowie fötaler Leber und Thymus^{103;113-116}. Welcher Stamm Verwendung findet, variiert je nach Fragestellung.

Humanisierte Mausmodelle wurden bereits erfolgreich für virale und parasitäre Infektionsmodelle eingesetzt. Beispielweise können in humanisierten NOD-Scid Mäusen starke, Virus-spezifische, humane Immunreaktionen nach HIV-Infektionen hervorgerufen werden¹¹⁷. Sowohl eine humorale wie auch zelluläre Immunreaktion wurde nachgewiesen. Trotz der starken Immunreaktion blieben die HIV-Titer hoch, was auch in HIV-Patienten beobachtet wurde. In NSG Mäusen mit PBMC- oder Stammzell-Transfer konnte zudem eine erfolgreiche RNAi-Therapie etabliert werden¹¹⁸. Das Einbringen der RNA mit Hilfe eines CD7-spezifischen Antikörpers schützt T-Zellen vor der Infektion mit dem HI-Virus. Erfolgreich waren auch Ansätze, NSG Mäuse, die transgen für das humane MHC Klasse I-Molekül HLA-A2 sind, für antigenspezifische humane Immunantworten einzusetzen. In diesen Mäusen konnte nach Stammzell-Transfer eine virusspezifische, HLA-A2-restringierte $CD8^+$ T-Zellantwort gegen das Dengue-Virus induziert werden¹¹⁹. Der gleiche Ansatz war auch bei der Etablierung eines Epstein-Barr-Virus-Infektionsmodells erfolgreich¹²⁰. Als weiteres Infektionsmodell wurde kürzlich eine Studie mit *Plasmodium falciparum*, dem Malaria-Erreger, veröffentlicht¹²¹. Der Transfer von humanen Erythrozyten und die anschließende Infektion mit *Plasmodium falciparum* erlaubte die Testung mehrerer Malaria-Medikamente im humanisierten Maussystem.

Ein weiteres Beispiel für ein humanisiertes Mausmodell ist die Transplantation humaner Haut auf immundefiziente Mäuse. Diese Möglichkeit nutzten Erdag et al. zum Vergleich fötaler und neonataler Haut¹²². Ein ähnliches Modell wurde zur Aufklärung von Abstoßungsmechanismen allogener Hauttransplantate entwickelt^{123;124}. Hierfür wurden zunächst C.B-17-Scid und Scid/beige Mäuse eingesetzt, die ein Transplantat von gesunden Spendern erhielten. Den Mäusen wurden anschließend humane PBMC oder aus PBMC generierte, PHA-spezifische T-Zellen transplantiert, um den Einfluss dieser allogenen Zellen auf die humanen Kapillargefäße des Transplantats zu untersuchen. Durch den Transfer kam es innerhalb von 16 Tagen zu einer Schädigung der Kapillaren, die von humanen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen vermittelt wurde. Humane NK-Zellen konnten nicht nachgewiesen werden. Thrombose und Verschorfung des Transplantats waren Begleiterscheinungen.

Transplantationen auf NS β 2m^{-/-} Mäuse und ein anschließender Transfer allogener PBMC wurden ebenfalls als Modell für Transplantat-Abstoßungen genutzt¹²⁵. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine solche Transplantation mit einer ganzen Reihe immundefizienter Mausstämmen, u.a. NSG und BALB/c Rag1^{-/-} γ c^{-/-}, durchgeführt werden kann¹²⁶. Insbesondere NSG Mäuse zeigen sehr gute Transplantationsergebnisse. Histologien der Transplantate weisen auch nach dem Anwachsen eine klar erkennbare Epidermis/Dermis-Struktur auf. Es lassen sich erfolgreich humane CD45⁺ Leukozyten nach Transplantation im Transplantat nachweisen¹²⁷. Zusammen mit dem Transfer humaner PBMC lassen sich nicht nur Alloreaktionen beobachten, sondern auch Infektionsmodelle etablieren, mit denen neben peripheren humanen Blutzellen die Haut als weiteres humanes Gewebe untersucht werden kann. Weder ein PBMC-Transfermodell für Leishmaniasis noch ein Modell zur experimentellen Infektion humaner Hauttransplantate wurde bislang beschrieben.

2.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse von T-Zellantworten und der durch sie ausgelösten Mechanismen bei muriner und humaner kutaner Leishmaniasis. Hierbei wurde das Augenmerk in der murinen Erkrankung insbesondere auf die Rolle des genetischen Hintergrundes der T-Zellen sowie ihnen nachgeschalteter Prozesse während einer protektiven Immunantwort gegen den Parasiten gelegt. Außerdem sollten grundlegende humane T-Zellantworten in einem experimentellen PBMC-Transfermodell analysiert werden.

Hierzu wurde zunächst untersucht, auf welche Zellpopulationen der genetische Hintergrund der Inzuchtmausstämme C57BL/6 und BALB/c den entscheidenden Einfluss ausübt, der in Suszeptibilität oder Heilung einer kutanen Leishmaniasis resultiert. Dabei wurde das Augenmerk insbesondere auf den genetischen Hintergrund der lymphoiden Zellen gelegt. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Knochenmarkschimären eingesetzt. Empfängermause wurden mit einem kompletten hämatopoetischen System von C57BL/6 bzw. BALB/c Mäusen oder mit einem Mischknochenmark definierten genetischen Hintergrundes rekonstituiert und der Krankheitsverlauf nach *L. major*-Infektion untersucht.

Die T-Zell-induzierte Aktivierung *L. major*-infizierter M Φ wird über die IFN- γ -Freisetzung von Th1- und Tc1-Zellen und die Bindung von CD40 durch CD40L, exprimiert auf T-Zellen, vermittelt. Die daraus resultierende TNF-Expression und Hochregulation von CD40 sowie TNF-Rezeptoren wird mit Heilung assoziiert. Um zu verstehen, worin eine fehlerhafte, intrazelluläre Weiterleitung des Signals nach TNF-R1-Stimulation resultiert, wurde der Einfluss eines Knock Outs von FAN auf die zelluläre Zusammensetzung relevanter Organe sowie die Zytokinfreisetzung an der Immunreaktion beteiligter Zellpopulationen untersucht.

Um diese und weitere Ergebnisse aus der murinen Leishmaniasis-Forschung optimal auf die humane Erkrankung übertragen zu können, und um in der Lage zu sein, Vakzinkandidaten zu identifizieren und zu testen, war es das Ziel, zusätzlich ein präklinisches, humanes, kutanes Leishmaniasis-Testmodell in Form von PBMC-transferierten Mäusen zu etablieren. Die Auswahl geeigneter Mausstämmen erfolgte durch den Transfer humaner PBMC freiwilliger Spender mit anschließender Infektion der Tiere. Das erlaubte die Analyse humaner T-Zellantworten unter experimentellen Bedingungen in Form von Zytokinprofilen. Weiterhin wurde der Krankheitsverlauf mit Läsionsvolumina und Parasitenlasten unter Berücksichtigung von Humanisierungsparametern untersucht. Außerdem wurde das Einwandern humaner Zellen in die Milz und an die Infektionsstelle durchflusszytometrisch analysiert.

3.1.2 Knochenmarkstransfer in BALB/c x C57BL/6 – F1 Mäuse

Eine GvHD resultiert aus der Erkennung allogener MHC-Moleküle. Im vorangegangenen Experiment wurde die GvHD vermutlich durch T-Zellen ausgelöst, die mit dem Knochenmark des anderen genetischen Hintergrundes transferiert wurden. Ein gemischter genetischer Hintergrund der Empfängertiere ermöglicht es, Mäuse ohne Anzeichen einer GvHD zu rekonstituieren.

Es wurden deshalb C57BL/6 oder BALB/c Knochenmark in BALB/c x C57BL/6 F1 Empfängertiere transferiert. Als Kontrollen dienten unbestrahlte Mäuse des gleichen Stammes, denen r.o. PBS verabreicht wurde sowie bestrahlte Tiere, die Geschwisterknochenmark erhielten. 6 Wochen nach Knochenmarkstransfer konnten in allen Gruppen eine erfolgreiche Rekonstitution anhand von hämatopoetische Zellen positiv für CD3e, B220 oder Gr1 sowie CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nachgewiesen werden (Abb. 8).

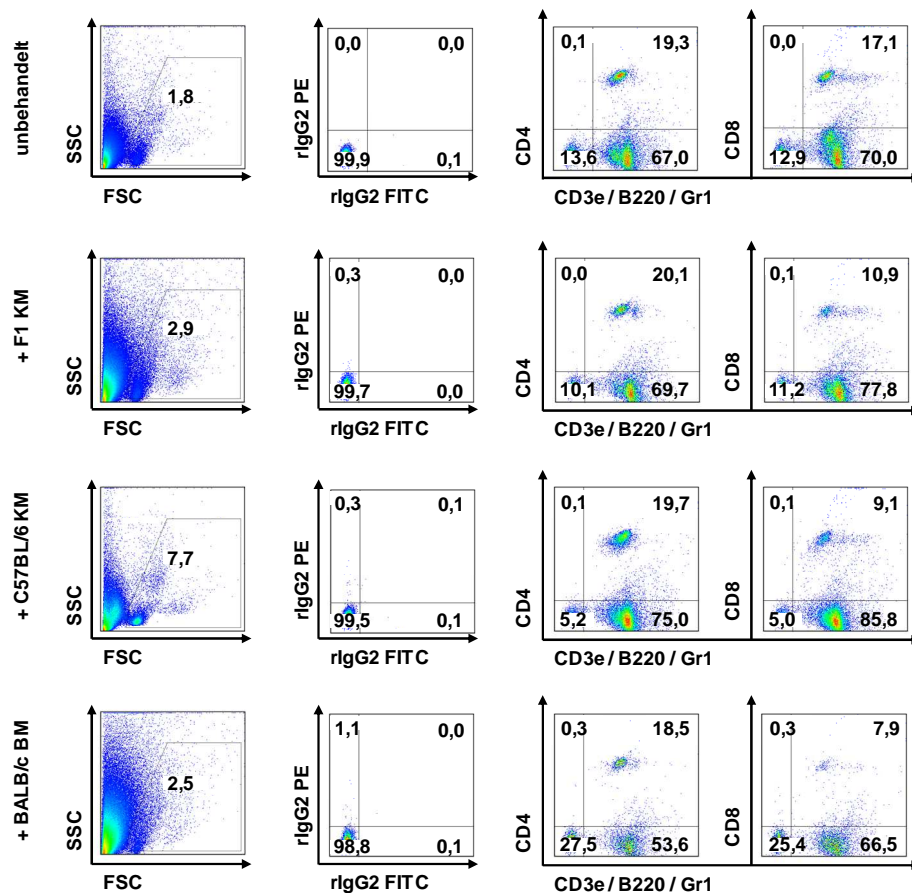


Abb. 8: Rekonstitution in BALB/c x C57BL/6 Mäusen 6 Wochen nach Knochenmarkstransfer. BALB/c x C57BL/6 F1 Mäuse wurden radioaktiv bestrahlt (9 Gy) und r.o. mit 5×10^6 Knochenmarkszellen aus BALB/c, C57BL/6 oder BALB/c x C57BL/6 F1 Mäusen rekonstituiert. Unbehandelte BALB/c x C57BL/6 F1 Mäuse dienen als Kontrollen. Der Rekonstitutionserfolg wurde 6 Wochen nach Knochenmarkstransfer mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse des peripheren Blutes bestimmt. Die Proben wurden entweder mit Isotyp-Antikörpern oder mit einem Antikörpermix gegen CD3e, B220 und Gr1 im FL-1 Kanal und CD4 oder CD8-T-Zellen markiert (FL-2 Kanal). Aus jeder Gruppe ist der repräsentative Rekonstitutionserfolg einer einzelnen Maus dargestellt.

Die rekonstituierten Mäuse wurden mit 2×10^6 metazyklischen *L. major*-Promastigoten in beide Ohren infiziert und die Läsionen über 15 Wochen vermessen (Abb. 9).

Unbehandelte Mäuse und Empfängertiere mit Knochenmark des eigenen genetischen Hintergrundes zeigten nicht ausheilende Läsionen, deren Volumen jedoch im

Mittel 20 mm^3 nicht überstieg. Empfängertiere mit BALB/c Knochenmark zeigten einen suszeptiblen Krankheitsverlauf, wohingegen Mäuse mit dem hämatopoetischen System einer C57BL/6 Maus 4 Wochen nach Infektion die größten Läsionen aufwiesen und in Woche 15 ausgeheilt waren. Die Unterschiede zwischen der C57BL/6 und BALB/c Gruppe waren ab Woche 3 signifikant.

Um einzugrenzen, auf welchen Zellpopulationen diese Ergebnisse beruhen, wurde für weitere Experimente ein modifizierter Empfängermäusestamm verwendet.

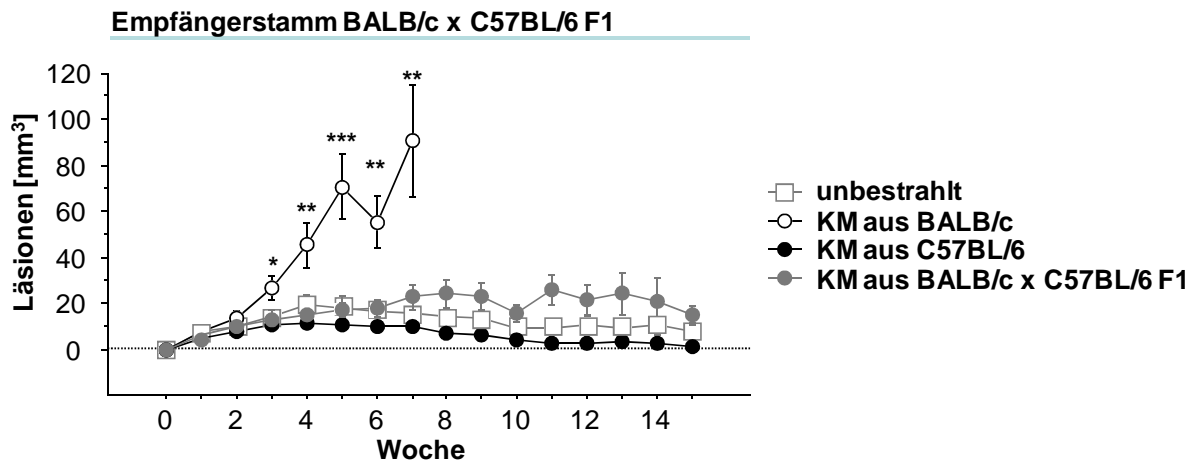


Abb. 9: Läsionsvolumina Hochdosis-infizierter, rekonstituierter BALB/c x C57BL/6-F1 Mäuse. BALB/c x C57BL/6-F1 Mäuse wurden radioaktiv bestrahlt (9 Gy) und mit 5×10^6 Knochenmarkszellen aus BALB/c, C57BL/6 oder BALB/c x C57BL/6 F1 Mäusen r.o. rekonstituiert. Nach erfolgreicher Rekonstitution wurden die Tiere i.d. mit 2×10^5 *L. major* in beide Ohren infiziert. Als Kontrollgruppe dienten ebenfalls infizierte, unbestrahlte BALB/c x C57BL/6-F1 Mäuse, denen retroorbital PBS injiziert wurde. Die entstehenden Läsionen wurden wöchentlich gemessen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (je Behandlung 9-12 Tiere, n=2 unabhängige Experimente, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,002$).

3.1.3 Knochenmarkstransfer in BALB/c $\text{Rag1}^{-/-}$ x C57BL/6 $\text{Rag1}^{-/-}$ F1 Mäuse

Um die bisher beobachteten Ergebnisse auf den Einfluss des genetischen Hintergrundes weniger Zellpopulationen zu reduzieren, wurde im weiteren Verlauf ein gemischtes Knochenmarksmodell eingesetzt. Es wurden immundefiziente BALB/c $\text{Rag1}^{-/-}$ x C57BL/6 $\text{Rag1}^{-/-}$ F1 Empfängertiere eingesetzt, die aufgrund einer Mutation im *recombination activating gen 1* (*rag1*) nicht in der Lage sind, reife T- und B-Zellen zu differenzieren.

Die Empfängertiere erhielten Knochenmark von Geschwistermäusen zusammen mit C57BL/6 CD45.1 (Ly5.1) Knochenmark. Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 CD45.1 sind phänotypisch unauffällig, tragen jedoch ein spontan entstandenes, verändertes Allel des CD45 Moleküls. Die verwendeten Empfängermäuse hingegen trugen ausschließlich das CD45.2 Allel. Das ermöglichte es, Leukozyten, die sich aus dem transferierten C57BL/6 CD45.1 Knochenmark entwickelten, auch nach Rekonstitution zu identifizieren.

6 Wochen nach Knochenmarkstransfer wurde den Tieren Blut entnommen und die Leukozyten durchflusszytometrisch auf ihre genetische Herkunft untersucht (Abb. 10). Es zeigte sich, dass CD3^+ T-Zellen wie erwartet aus dem CD45.1^+ Knochenmark der C57BL/6 Mäuse rekonstituierten (93,7 % $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ Th-Zellen, 91,0 % $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ Tc-Zellen, 75,9 % $\text{CD3}^+\text{CD49b}^+$ NKT-Zellen). Myeloide wie auch NK-Zellen wiesen hingegen fast ausschließlich das CD45.2 Allel auf (bis zu 99%).

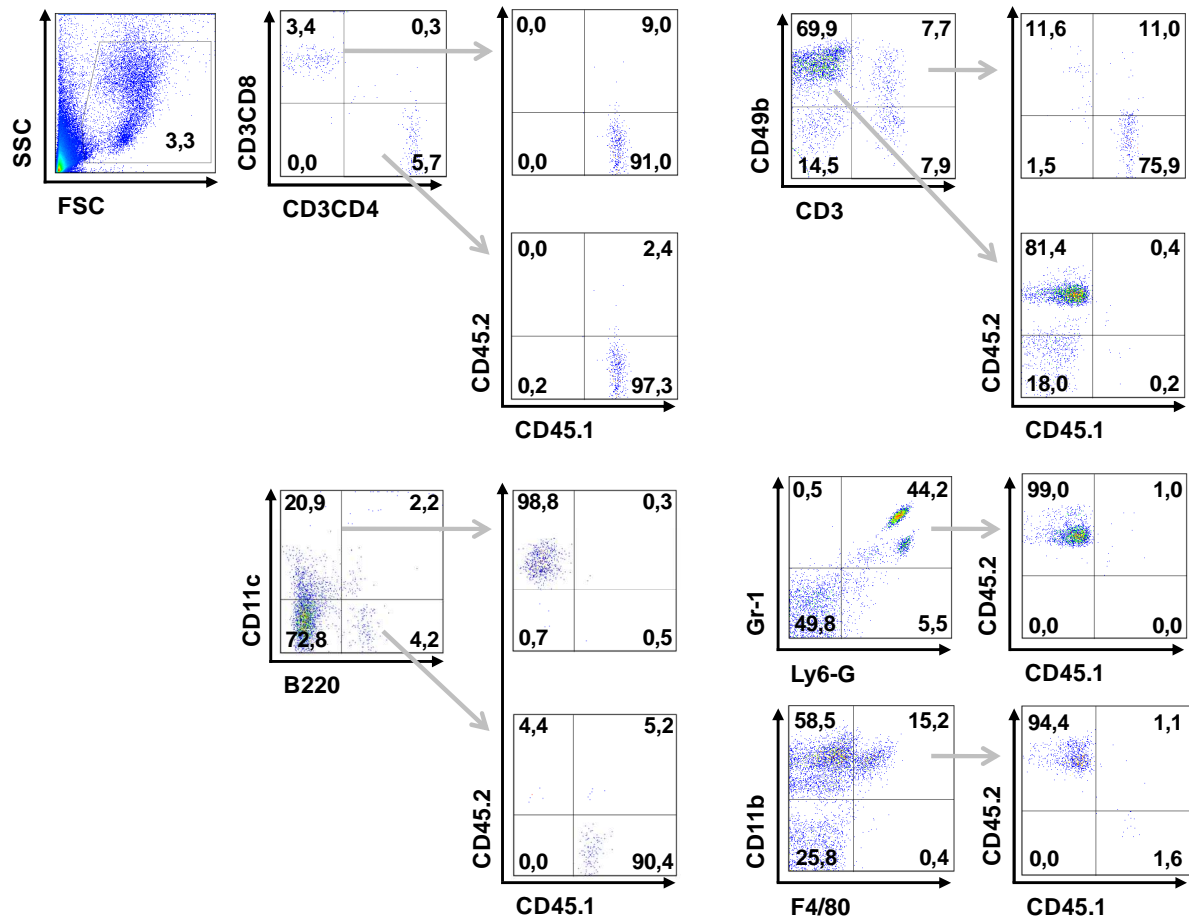


Abb. 10: Genetischer Hintergrund hämatopoetischer Zellen des peripheren Blutes. Peripheres Blut von zwei BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1 Mäusen auf CD45.2-Hintergrund rekonstituiert mit 5x10⁶ Knochenmarkszellen (80% Geschwister-/20% C57BL/6 CD45.1⁺ Zellen) wurde 6 oder 9 Wochen nach Rekonstitution entnommen und durchflusszytometrisch auf seine Zellzusammensetzung und genetischen Hintergrund hin untersucht (B220 und CD11c: Maus 1, weitere Marker: Maus 2). Nur in FSC/SSC ausgewählte Zellen wurden weiter analysiert (n=1).

Für weitere Experimente wurden BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1 Mäuse mit Knochenmark von Geschwistermäusen und 10-20% C57BL/6 oder BALB/c Knochenmark rekonstituiert. Als Kontrollen wurden BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1 Mäuse ausschließlich mit Geschwister- oder BALB/c x C57BL/6 F1 Knochenmark rekonstituiert. 6-10 Wochen nach Knochenmarkstransfer wurden die rekonstituierten Tiere mit 2x10⁵ *L. major*-Promastigoten infiziert und die Läsionen über 13 Wochen einmal wöchentlich vermessen (Abb. 11).

Erhielten die Tiere BALB/c Knochenmark, verlief die Läsionsentwicklung progressiv. Aufgrund zunehmender Gewebeschäden an den infizierten Ohren wurden diese Tiere in Woche 7 aus dem Experiment genommen. Mäuse mit einem Anteil an C57BL/6 Knochenmark zeigten signifikant kleinere Läsionen als Tiere mit BALB/c Knochenmark. Maximale Läsionsvolumina waren in Woche 5 zu sehen. Sie verringerten sich im weiteren Verlauf stetig. Ein ähnlicher Verlauf ist in Tieren zu sehen, die mit BALB/c x C57BL/6 F1 Knochenmark rekonstituiert wurden. Sie wiesen ebenfalls die größten Läsionen in Woche 5 auf. Die anschließende Verringerung der Läsionsvolumina verlief jedoch im Vergleich verzögert. Waren die Tiere aufgrund fehlender T- und B-Zellen auch nach Rekonstitution nicht immunkompetent (ausschließlich BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} Knochenmark), zeigten die Mäuse einen suszeptiblen Phänotyp.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass bereits die Zellen des lymphoiden Kompartiments allein in der Lage sind, einen Krankheitsverlauf zu induzieren, der für Mäuse mit dem genetischen Hintergrund dieser Zellpopulationen typisch ist.

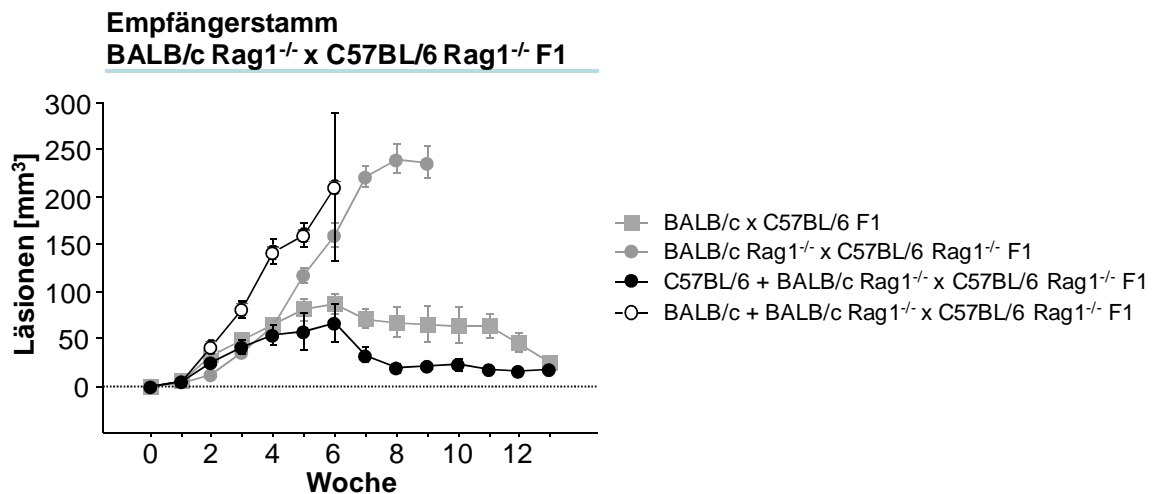


Abb. 11: Läsionsvolumina Hochdosis-infizierter, rekonstituierter Balb/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1 Mäuse. BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-}-F1 Mäuse wurden mit 9 Gy radioaktiv bestrahlt und mit 5×10^6 Knochenmarkszellen r.o. rekonstituiert. Es wurde hierzu 100% BALB/c x C57BL/6 F1 Knochenmark, 100% Geschwister- oder 80-90% Geschwister- mit 10-20% C57BL/6 CD45.1 bzw. BALB/c Knochenmark verwendet. Nach erfolgreicher Rekonstitution wurden die Tiere i.d. mit 2×10^5 *L. major* in beide Ohren infiziert. Die entstehenden Läsionen wurden wöchentlich gemessen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (5-13 Tiere je Gruppe, n=2).

3.2 Die Rolle des Adapterproteins FAN in der murinen Leishmaniasis

3.2.1 Einfluss einer FAN-Defizienz auf den Krankheitsverlauf

TNF-Expression, Bindung und Signalweiterleitung in T-Zell-aktivierten M Φ sind Prozesse, die mit dem Ausheilen von *L. major*-Infektionen assoziiert werden⁵². Ob das mit TNF-R1 und CD40 assoziierte Molekül FAN in *L. major*-Infektionen involviert ist, sollte hier geklärt werden. Ein phänotypisch veränderter Krankheitsverlauf nach Infektion von FAN^{-/-} Mäusen wäre ein erster Hinweis auf eine Rolle von FAN in der kutanen Leishmaniasis. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6 (WT) und C57BL/6 FAN^{-/-} (FAN^{-/-}) Mäuse mit 2×10^5 oder 1×10^3 *L. major* infiziert und die Läsionen über 17 Wochen beobachtet (Abb. 12). Die Infektion erfolgte intradermal in beide Ohren. Es wurden hierfür metazyklische *L. major*-Promastigote verwendet. Dies gilt, soweit nicht anders vermerkt, für alle Experimente des Versuchskomplexes 3.2.

Unabhängig von der Zahl injizierter Leishmanien zeigt sich ein deutlich schlechterer Krankheitsverlauf in Tieren mit einem Knock Out für FAN. Die Unterschiede in den Läsionsgrößen zwischen FAN^{-/-} und WT sind ab Woche 2 bzw. 3 signifikant. In beiden Infektionssituationen kommt es jedoch nach dem Erreichen der maximalen Läsionsgröße (Woche 4-8) zu einer deutlichen Abnahme der Läsionsvolumina, wobei FAN^{-/-} Mäuse nicht in der Lage sind, die Läsionen vollständig auszuheilen.

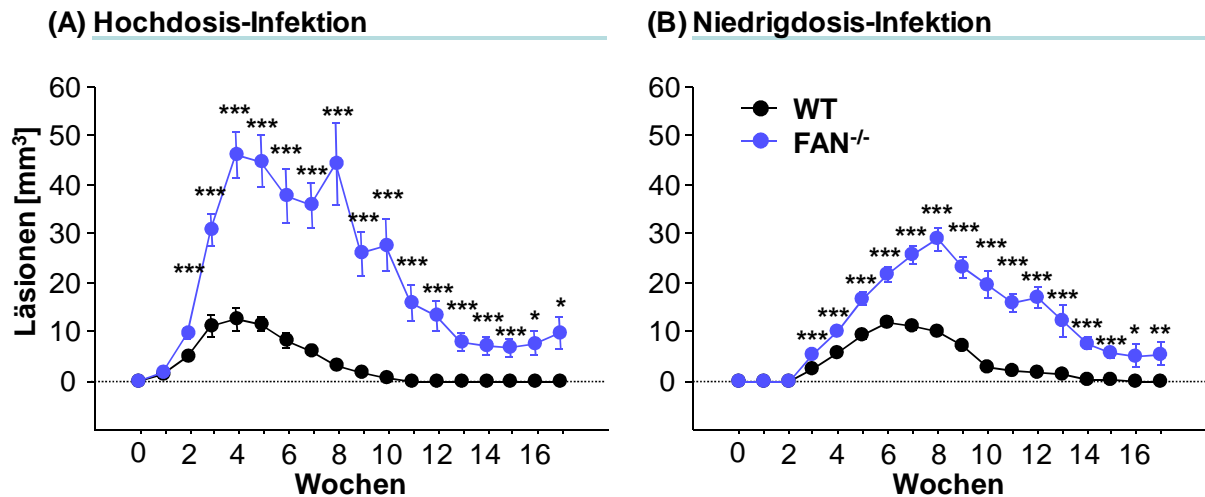


Abb. 12: Vergleich der Läsionsvolumina Hochdosis- und Niedrigdosis-infizierter $FAN^{-/-}$ und WT Mäuse. $FAN^{-/-}$ Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden mit 2×10^5 oder 1×10^3 *L. major* infiziert und die entstehenden Läsionen über 17 Wochen in 3 Dimensionen gemessen. Infizierte WT Tiere dienten als Vergleichsgruppe. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 2$ unabhängige Experimente; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,002$).

Der Effekt des Fehlens von FAN ist demnach nicht nur bei artifizuell hohen Dosen des Erregers (2×10^5), sondern auch nach Inokulationen geringer Parasitenzahlen zu erkennen. Aus diesem Grunde wurden die folgenden Experimente ausschließlich im physiologisch relevanteren Niedrigdosis-Modell (1×10^3 *L. major*-Parasiten) durchgeführt.

Nachdem bereits für $TNF-R1/2^{-/-}$ Mäuse auf C57BL/6 x 129 Hybridhintergrund ein vergleichbarer Krankheitsverlauf wie bei hier eingesetzten $FAN^{-/-}$ Mäusen publiziert wurde, sollten diese Tiere als Vergleichsgruppe herangezogen werden. In dieser Arbeit wurden jedoch hierfür $TNF-R1/2^{-/-}$ Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund verwendet, um auszuschließen, dass die Unterschiede im Krankheitsverlauf im Vergleich zu den $FAN^{-/-}$ Mäusen (C57BL/6 $FAN^{-/-}$) auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen sind.

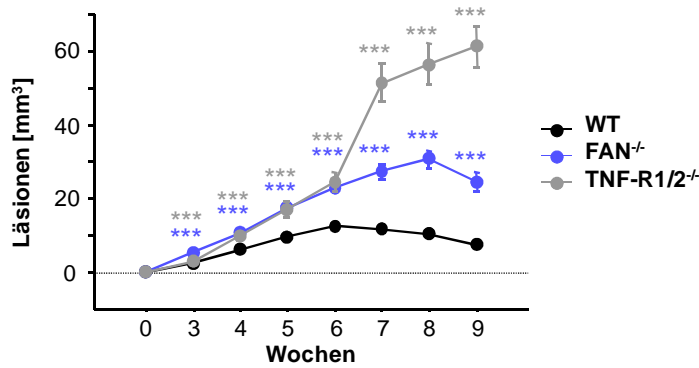
$TNF-R1/2^{-/-}$, $FAN^{-/-}$ und WT Mäuse wurden mit *L. major* infiziert und die Läsionen über 9 Wochen gemessen bzw. den Mäusen in den Wochen 6, 9 und 15 die Ohren und die Milz entnommen und deren Parasitenlasten bestimmt (Abb. 13). $FAN^{-/-}$ und WT Mäuse zeigten hierbei den bereits zuvor beschriebenen Verlauf der Läsionsentwicklung. Allerdings verlief die Erkrankung in den $TNF-R1/2^{-/-}$ Tieren progressiv, so dass die Mäuse in Woche 9 aus dem Versuch genommen werden mussten.

Unterschiede in der Zahl der Parasiten an der Infektionsstelle traten zwischen WT und $FAN^{-/-}$ Mäusen in Woche 6 nicht auf. Allerdings waren zu späteren Zeitpunkten die Parasitenzahlen in $FAN^{-/-}$ Mäusen erhöht. Die maximale Parasitenzahl zeigten WT Mäuse in Woche 6, wohingegen dieser Punkt in $FAN^{-/-}$ Tieren erst in Woche 9 erreicht war. Die Parasitenlasten in $TNF-R1/2^{-/-}$ zeigten in Woche 6 erhöhte Werte gegenüber WT, wobei diese in Woche 9 unauffällig blieben.

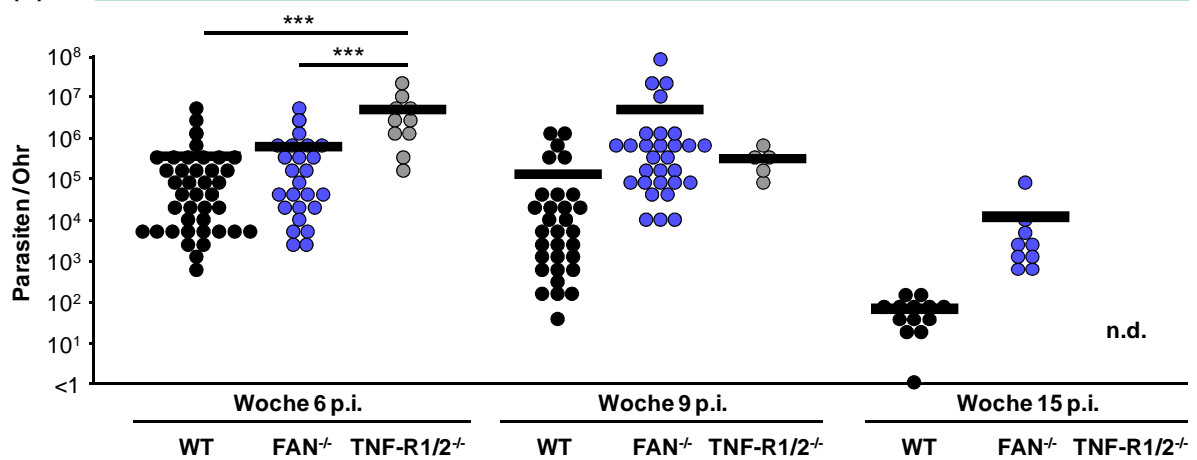
Als Indikator für eine Viszeralisierung der *L. major*-Infektion diene die Bestimmung der Parasitenzahl in der Milz. Sowohl $TNF-R1/2^{-/-}$ als auch $FAN^{-/-}$ Mäuse zeigen hier zu späteren Zeitpunkten eine Tendenz zur Viszeralisierung mit signifikant erhöhten Parasitenzahlen in Woche 9 und 15.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass FAN sowohl die Kontrolle der Läsionsgröße als auch die Zahl der Parasiten beeinflusst. Welche Zellpopulationen hierbei eine Rolle spielen, sollte im Folgenden näher untersucht werden.

(A) Läsionvolumina Ohr



(B) Parasitenlasten Ohr



(C) Parasitenlasten Milz

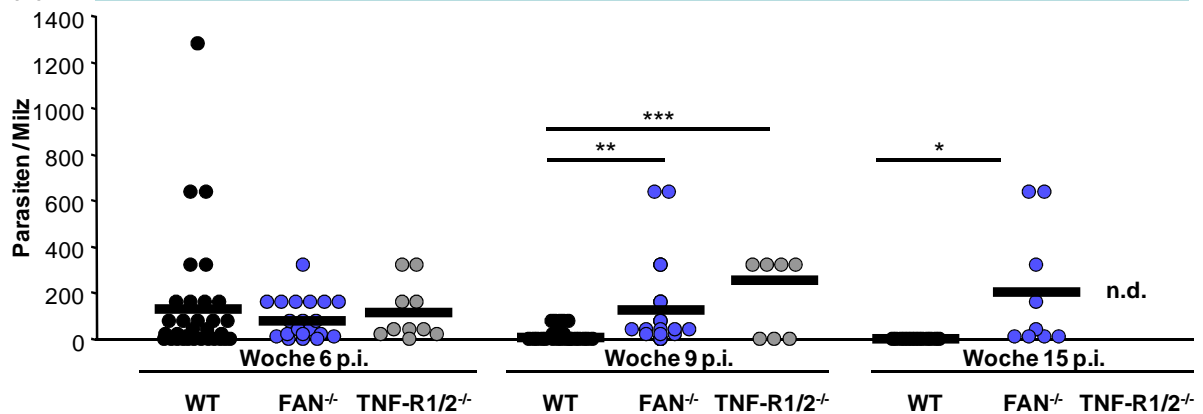


Abb. 13: Vergleich der Läsionsvolumina und Parasitenlasten Niedrigdosis-infizierter TNF-R1/R2^{-/-}, FAN^{-/-} und WT Mäuse. TNF-R1/R2^{-/-}, FAN^{-/-} und WT Mäuse desselben genetischen Hintergrundes wurden mit 1×10^3 *L. major* infiziert. (A) Die entstehenden Läsionen wurden über 9 Wochen gemessen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 2$ unabhängige Experimente). (B) Die Parasitenzahl in den Ohren und der Milz wurden nach 6, 9 oder 15 Wochen mittels der limited dilution-Methode bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die Parasitenzahl eines Ohres. Die Balken verdeutlichen den arithmetischen Mittelwert (Woche 6 $n=5$, TNF-R1/R2^{-/-} $n=1$; Woche 9 $n=6$, TNF-R1/R2^{-/-} $n=1$; Woche 15 $n=1$ unabhängige Experimente; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,002$).

3.2.2 Zytokinprofile in C57BL/6 WT und FAN^{-/-} Mäusen

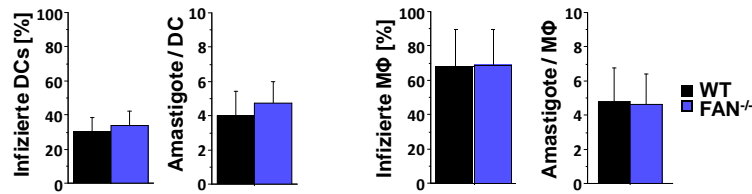
Der TNF-R1 wird mit Ausnahme der Erythrozyten von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert und stellt damit einen verbreitet genutzten Signalweg dar. Der Knock Out eines Moleküls der intrazellulären Weiterleitung eines so häufig genutzten, immunologisch relevanten Signalweges hat möglicherweise Auswirkungen auf das Zytokinprofil in diesen Tieren.

DCs und MΦ werden im Laufe der Erkrankung mit *L. major* infiziert und spielen deshalb eine zentrale Rolle. Um zunächst das Zytokinprofil dieser beiden Populationen der FAN^{-/-} Mäuse unter Infektionsbedingungen zu analysieren, generierten wir unreife BMDCs aus Knochenmark und isolierten inflammatorische Biogel-MΦ aus WT und FAN^{-/-} Mäusen.

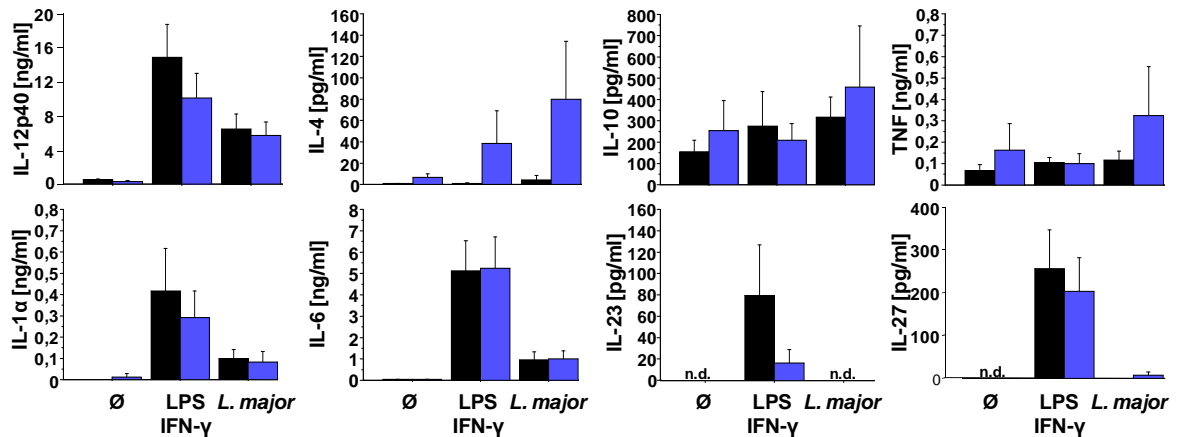
Um einen Effekt des FAN-Knock Outs auf die phagozytotische Aktivität dieser Zellen vorab auszuschließen, infizierten wir diese *in vitro* mit Amastigoten und bestimmten die Infektionsrate. Je Ansatz wurden 200 Zellen unter dem Mikroskop untersucht (Abb. 14A). Es wurden jedoch keine Unterschiede in der phagozytotischen Aktivität deutlich, weder im Anteil infizierter Zellen noch in der Zahl pro Zelle zu findender Parasiten. Dies gilt sowohl für DCs als auch für MΦ.

Zur Analyse der Zytokinprofile wurden die Überstände der infizierten Makrophagen und DCs gesammelt und mittels ELISA die Konzentrationen relevanter Zytokine bestimmt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte und LPS-/IFN- γ -stimulierte DCs und MΦ. Das Zytokinprofil von FAN^{-/-} DCs zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu WT DCs (Abb. 14B). Allerdings war in den Überständen der infizierten FAN^{-/-} Zellen tendentiell mehr IL-4 und TNF nachweisbar. Das Zytokinprofil von FAN^{-/-} MΦ wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu WT MΦ auf (Abb. 14C).

(A) Phagozytotische Aktivität



(B) Zytokinprofil Dendritische Zellen



(C) Zytokinprofil Makrophagen

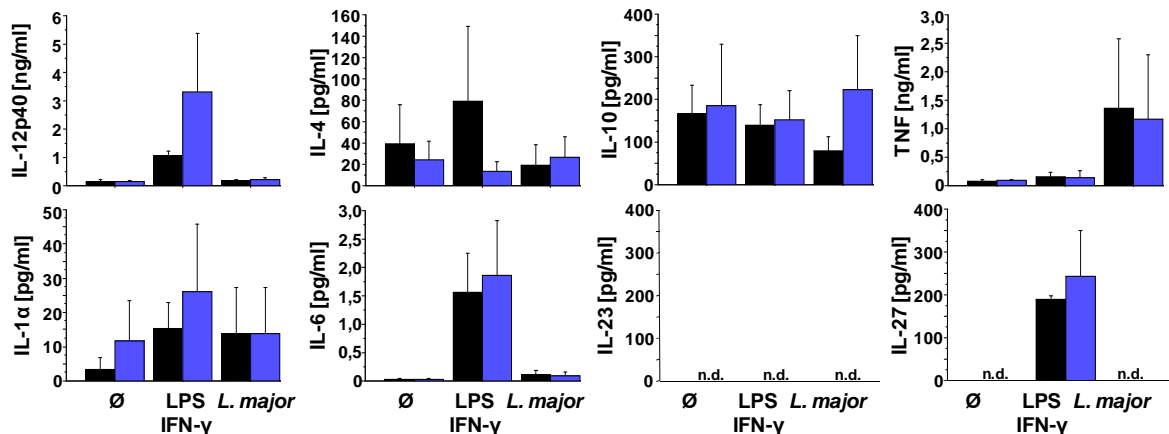


Abb. 14: Vergleich der phagozytotischen Aktivität und der Zytokinprofile von WT und FAN^{-/-} Phagozyten. Inflammatorische Biogel-MΦ oder unreife BMDC aus WT und FAN^{-/-} Mäusen wurden für 18 h *in vitro* 1:5 mit Amastigoten infiziert. (A) Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert, mit Diff-Quick gefärbt und die Infektionsraten der Zellen mikroskopisch bestimmt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten. (B+C) Die Zytokin-Konzentrationen der Kulturüberstände wurden mittels ELISA gemessen. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte, als Positivkontrolle nicht infizierte und mit 100 ng/ml LPS und 1000 U/ml IFN- γ stimulierte Zellen. Die bestimmten Konzentrationen sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n=4 unabhängige Experimente).

Um das Zytokinprofil in FAN^{-/-} Mäusen nach *in vivo*-Infektion zu untersuchen, isolierten wir Zellen drainierender Lymphknoten aus infizierten FAN^{-/-} und WT Mäusen. Diese wurden *ex vivo* antigenspezifisch mit SLA restimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Mittels ELISA wurden die Zytokin-Konzentrationen in den Kulturüberständen bestimmt (Abb. 15). Hier zeigte sich in den Überständen der FAN^{-/-} Mäuse eine signifikant verringerte Sekretion des Th1-Markerzytokins IL-12p40 (Woche 6 und 9) und signifikant erhöhte Konzentrationen des Th2-Markerzytokins IL-4 (Woche 9). Allerdings war die Gesamtkonzentration an IL-4 gering. Weiterhin wurden zu späten Zeitpunkten (Woche 9 und 15) eine gesteigerte Produktion von IL-10 und IFN- γ nachgewiesen.

Lymphknoten

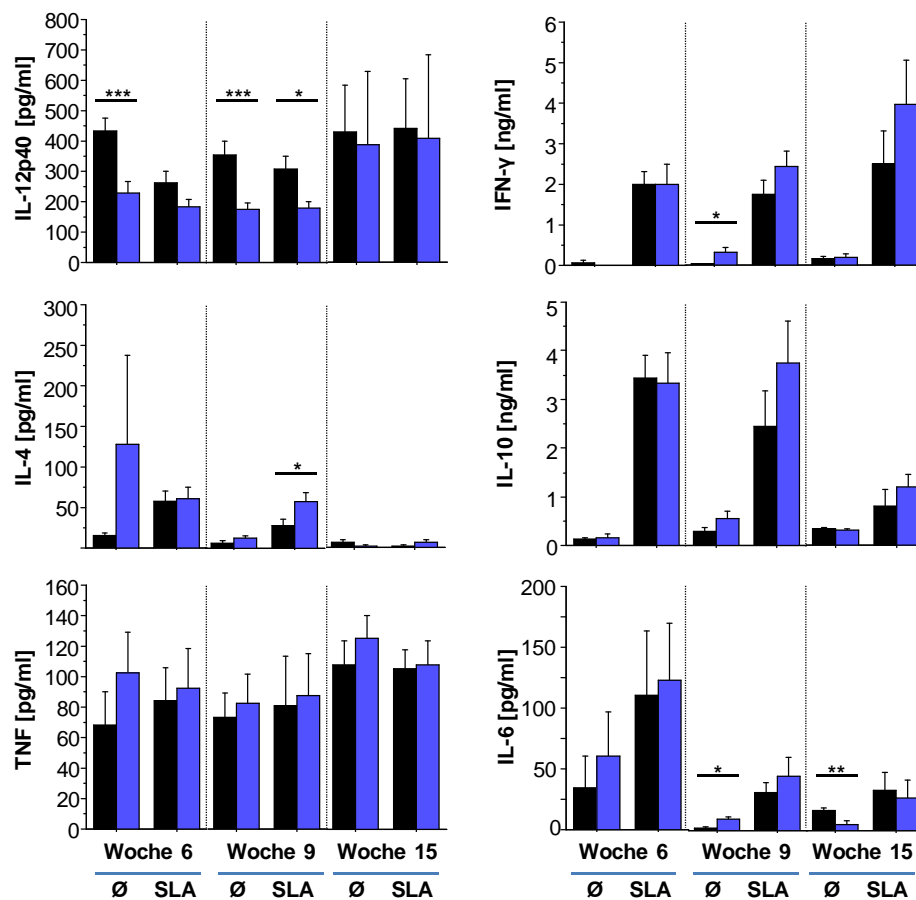


Abb. 15: Zytokinprofil restimulierter Lymphknotenzellen in C57BL/6 WT und FAN^{-/-} Mäusen. 6, 9 oder 15 Wochen nach Infektion wurden Zellen drainierender Lymphknoten isoliert und mit SLA restimuliert bzw. unstimuliert als Kontrollen eingesetzt. Nach 48 h wurden die Überstände geerntet und auf deren Zytokin-Konzentration hin untersucht. Die Abbildung zeigt die arithmetischen Mittelwerte ± SEM (Woche 6 n=4, Woche 9 n=5, Woche 15 n=1).

3.2.3 Zelluläre Zusammensetzung von Infektionsstelle und Lymphknoten

Die FAN^{-/-} Mäuse wurden bereits zuvor als phänotypisch unauffällig beschrieben⁶⁴. Sie zeigen eine zelluläre Zusammensetzung der Lymphorgane und eine NK- sowie CTL-Aktivität, die mit der von WT Mäusen vergleichbar ist. Eine veränderte zelluläre Zusammensetzung der Lymphknoten und der Infektionsstelle im Vergleich zu WT Mäusen würde demnach auf der Entzündungsreaktion beruhen, die in den Experimenten dieser Arbeit durch eine *L. major*-Infektion hervorgerufen wurde.

Um eingehender zu untersuchen, welche Zellpopulationen durch das Fehlen von FAN beeinflusst werden, wurde die zelluläre Zusammensetzung der Infektionsstelle und der drainierenden Lymphknoten von FAN^{-/-} und WT Mäusen analysiert.

FAN^{-/-} und WT Mäuse wurden mit *L. major* infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion Zellen aus den Ohren und den drainierenden Lymphknoten isoliert.

Die Lymphknoten FAN-defizienter Mäuse waren auffällig größer und aus ihnen ließen sich in den Wochen 9 und 15 signifikant mehr Zellen isolieren (Abb. 16). 9 Wochen nach Infektion waren zudem signifikant mehr Zellen aus den infizierten FAN^{-/-} Ohren

isolierbar, weshalb die folgende Analyse der zellulären Zusammensetzung nicht nur auf prozentualer Ebene sondern auch in absoluten Zellzahlen durchgeführt wurde.

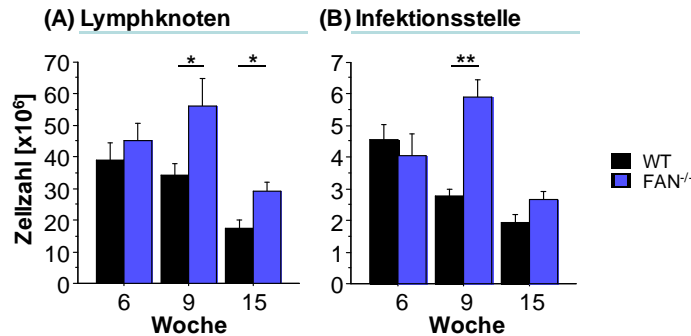
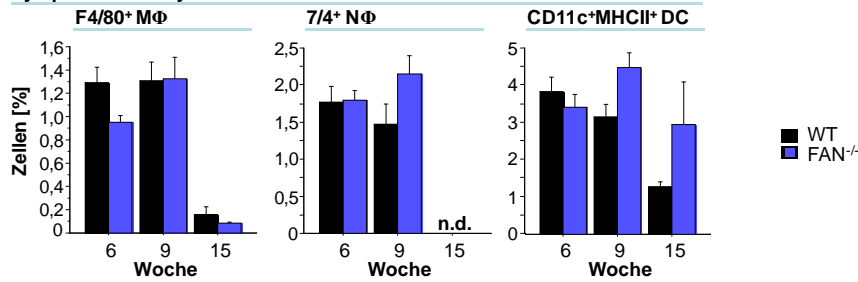


Abb. 16: Absolute Zellzahlen in drainierenden Lymphknoten und an der Infektionsstelle. C57BL/6 WT und FAN^{-/-} wurden mit 1×10^3 Promastigoten infiziert und an den genannten Zeitpunkten getötet. Die infizierten Ohren und drainierenden Lymphknoten wurden entnommen. Die Zellen der Lymphknoten wurden mechanisch und die intrazellulären Leukozyten des Ohres mechanisch und enzymatisch isoliert und gezählt. Die Zellzahlen sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM aufgetragen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$).

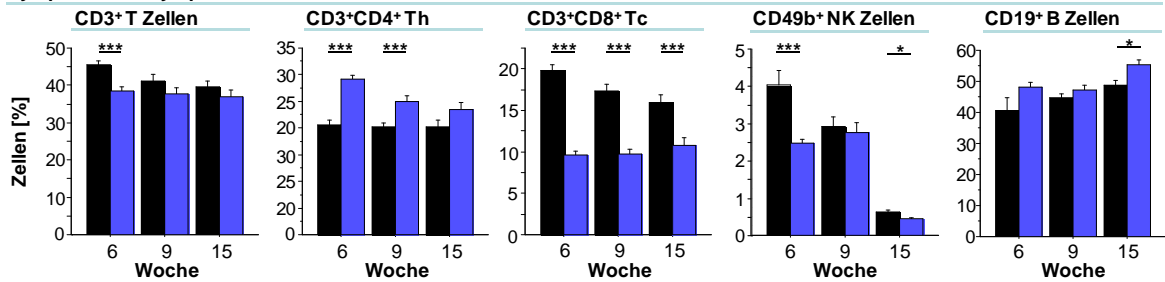
Die zelluläre Zusammensetzung in den Lymphknoten zeigte ein differentielles Bild in FAN^{-/-} und WT Mäusen (Abb. 17A). Auf prozentualer Ebene waren in FAN^{-/-} in Woche 3 tendenziell weniger F4/80⁺ MΦ, jedoch vermehrt 7/4⁺ NΦ vorhanden (Woche 9 bzw. Woche 9 und 15). Zudem zeigten sich das T-Zellkompartiment und die NK-Zellen durch die FAN-Defizienz beeinflusst. Mehr CD3⁺CD4⁺ Th-Zellen, jedoch weniger CD3⁺CD8⁺ Tc-Zellen und NK-Zellen waren präsent. Die Zahl der B-Lymphozyten war ebenfalls erhöht (Woche 15).

In absoluten Zellzahlen zeigt sich ein teilweise anderes Bild (Abb. 17B). Es finden sich in den FAN^{-/-} Mäusen in Woche 9 signifikant mehr F4/80⁺ MΦ, jedoch, wie auch prozentual bereits gesehen, erhöhte Zahlen an 7/4⁺ NΦ und CD11c⁺MHCII⁺ DCs. Auffällig waren wiederum die Unterschiede im T-Zellkompartiment und die NK-Zellzahlen. Es fanden sich zum frühen Zeitpunkt weniger CD3⁺ T-Zellen, resultierend aus signifikant weniger CD3⁺CD8⁺ T-Zellen. Ab Woche 6 ist die Zahl der CD3⁺ T-Zellen zum Teil signifikant erhöht, was sich in erhöhten Zahlen an CD3⁺CD4⁺ Th-Zellen und leicht erhöhten Zahlen an CD3⁺CD8⁺ Tc-Zellen widerspiegelt. NK-Zellen und B-Lymphozyten sind ebenfalls signifikant erhöht (Woche 9).

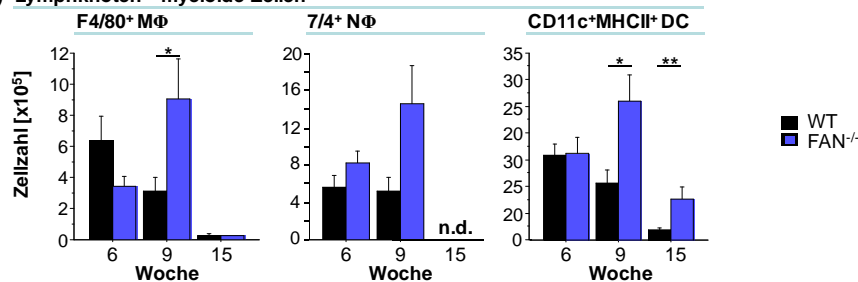
(A) Lymphknoten – myeloide Zellen



Lymphknoten – lymphoide Zellen



(B) Lymphknoten – myeloide Zellen



Lymphknoten – lymphoide Zellen

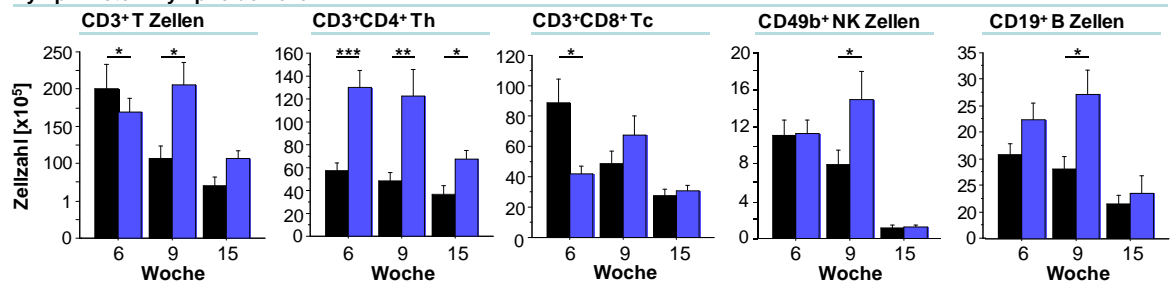


Abb. 17: Zelluläre Zusammensetzung der drainierenden Lymphknoten infizierter C57BL/6 WT und FAN^{-/-} Mäuse. C57BL/6 WT und FAN^{-/-} wurden mit *L. major* infiziert und in Woche 6, 9 oder 15 die drainierenden Lymphknoten geerntet. Die Zellen wurden isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Es sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM aufgetragen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,002$). (A) stellt die Anteile der Zellpopulationen an den Gesamtzellen in Prozent dar, während (B) die absolute Zellzahl zeigt (Wochen 6 und 9 $n=3$, Woche 15 $n=1$).

Auch an der Infektionsstelle zeigten sich Unterschiede zwischen FAN^{-/-} und WT Mäusen (Abb. 18). Die prozentualen Verhältnisse waren im Bereich der MΦ, DCs und T- und NK-Zellen deutlich verschoben (Abb. 18A). So zeigten sich signifikant weniger F4/80⁺ MΦ (alle Zeitpunkte) und CD11c⁺MHCII⁺ DCs (Woche 9 und 15) in den FAN^{-/-} Tieren. Zudem fanden sich signifikant weniger CD3⁺CD8⁺ Tc- und CD49b⁺ NK-Zellen an den Infektionsstellen der Knock Out Mäuse (Woche 9).

Betrachtet man die absoluten Zellzahlen, so waren signifikant weniger F4/80⁺ MΦ (Woche 3) und mehr 7/4⁺ NΦ (Woche 6 und 9) zu finden (Abb. 18B). Weiterhin war die Zahl der CD3⁺ T-Zellen in Woche 6 signifikant reduziert.

Es zeigten sich demnach neben weiteren Unterschieden reduzierte T Zellzahlen in den drainierenden Lymphknoten und der Infektionsstelle zum frühesten beobachteten Zeitpunkt.

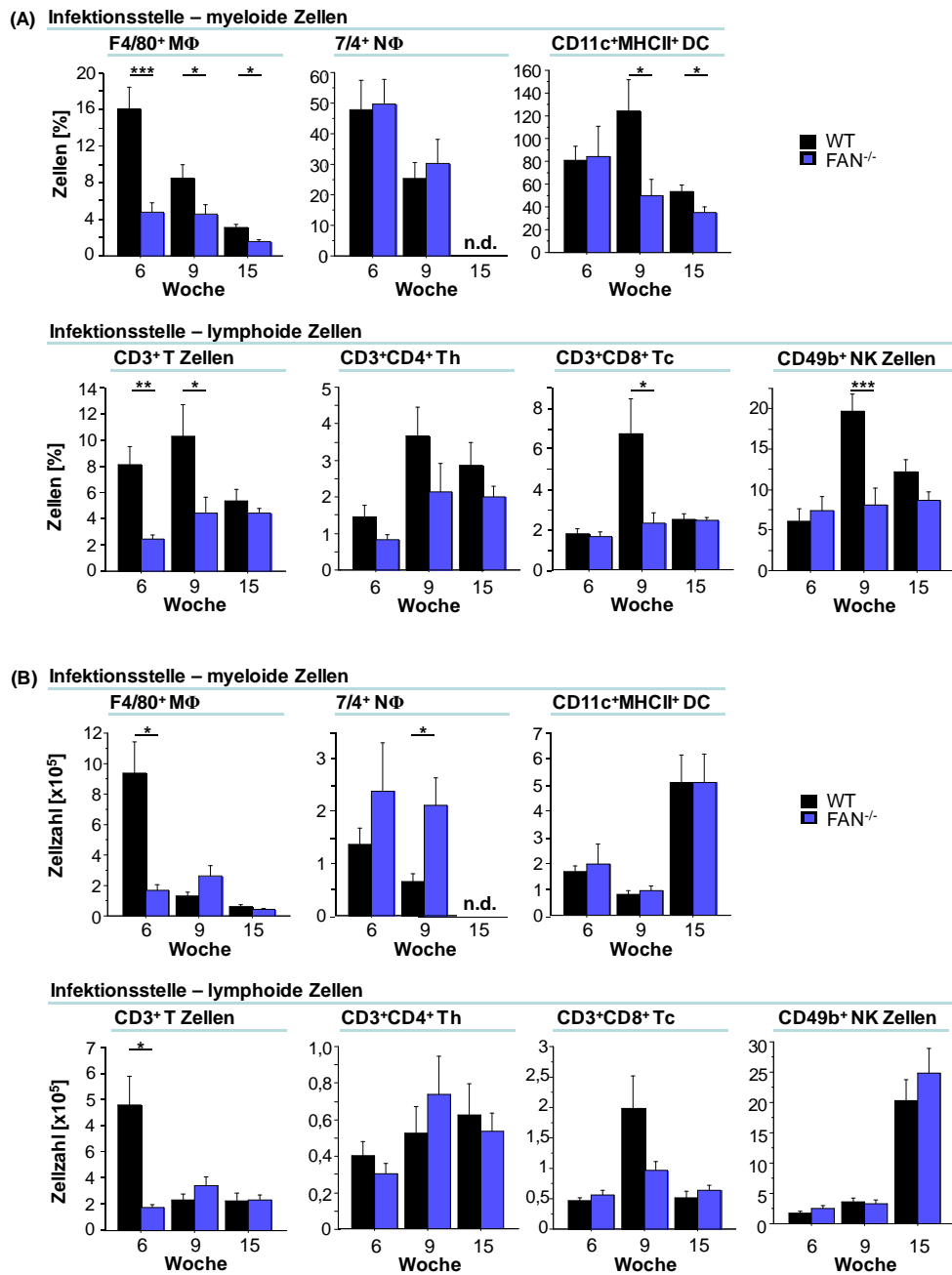


Abb. 18: Zelluläre Zusammensetzung der Infektionsstelle infizierter C57BL/6 WT und FAN^{-/-} Mäuse. C57BL/6 WT und FAN^{-/-} Mäuse wurden mit *L. major* infiziert und in Woche 6, 9 oder 15 die Ohren geerntet. Die Zellen wurden isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Es sind die arithmetischen Mittelwerte ± SEM aufgetragen (* p≤0,05, ** p≤0,005, *** p≤0,002). (A) stellt die Anteile der Zellpopulationen an den Gesamtzellen in Prozent dar, während (B) die absolute Zellzahl zeigt (Wochen 6 und 9 n=3, Woche 15 n=1).

3.2.4 Experimentelle Blockade von IFN- γ in C57BL/6 FAN^{-/-} Mäusen

Bereits in den ersten Experimenten konnte eine verstärkte Produktion von IFN- γ in antigenspezifisch restimulierten Lymphknotenzellen nachgewiesen werden. Um weiter zu untersuchen, ob diese proinflammatorisch wirkende Komponente die beobachtete Vergrößerung der Läsionen verursacht, infizierten wir wiederum FAN^{-/-} und WT Mäuse. Ab Woche 6 wurde eine Gruppe der FAN^{-/-} Mäuse mit anti-IFN- γ -Antikörper behandelt, um den Effekt einer überschießenden IFN- γ -Produktion zu neutralisieren.

Jedoch zeigte weder die Behandlung mit anti-IFN- γ -Antikörper noch die Applikation von Kulturüberstand einen reduzierenden Effekt auf die Läsionsvolumina (Abb. 19). Stattdessen kommt es in Woche 7 und 8, nach anti-IFN- γ -Behandlung auch in Woche 9, sogar zu einem leichten Anstieg der Läsionsgrößen. Zudem resultierte die Behandlung in einer signifikanten Erhöhung der Parasitenzahl an der Infektionsstelle.

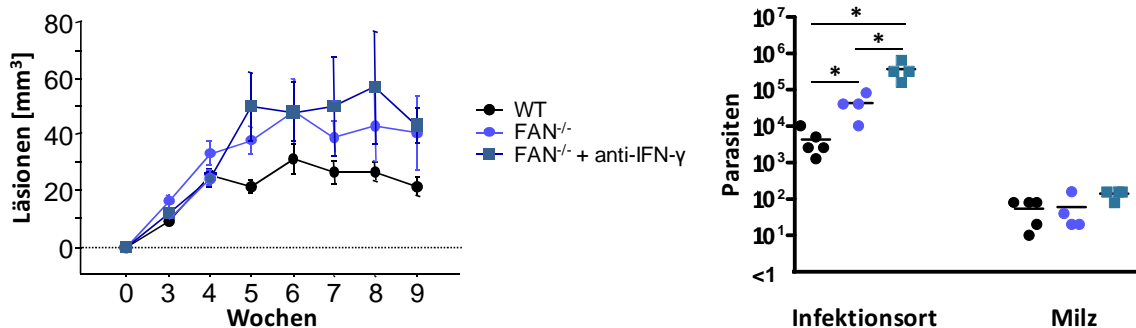


Abb. 19: Behandlung von FAN^{-/-} Mäusen mit anti-IFN- γ -Antikörper. FAN^{-/-} Mäuse wurden mit *L. major* infiziert und beginnend in Woche 6 zweimal wöchentlich mit 50 μ g/Maus anti-IFN- γ -Antikörper behandelt. Als Kontrollgruppe dienten infizierte WT Mäuse (Gruppengrößen 4-5 Tiere, n=1; * p<0,05). (A) Die entstehenden Läsionen wurden wöchentlich gemessen und sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt. (B) Infizierte Ohren und Milzen wurden in Woche 9 entnommen und mittels limited dilution-Verfahren die Parasitenzahl bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die Parasitenzahl eines Ohres bzw. einer Milz. Der Balken verdeutlicht den arithmetischen Mittelwert.

Das Fehlen des Moleküls FAN in C57BL/6 Mäusen, dem Mausmodell für die lokale, humane, kutane Leishmaniasis, zeigte einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und resultiert u.a. in größeren, nicht vollständig ausheilenden Läsionen und erhöhten Parasitenlasten. Der Nachweis eines humanen Homologs von FAN und die Bestätigung, dass das Molekül auch im Menschen die Aktivität der nSMase reguliert⁵⁸, lässt vermuten, dass dieses Signalmolekül auch in der humanen Erkrankung eine Rolle spielt.

3.3 Etablierung eines PBMC-Transfermodells für die humane, kutane Leishmaniasis

Obwohl bei Mensch und Maus ähnliche Mechanismen für die Entstehung einer Immunität gegen die kutane Leishmaniasis verantwortlich zu sein scheinen, sind viele Erkenntnisse aus dem Mausmodell nicht ohne Weiteres auf die menschliche Leishmaniasis übertragbar. Dies zeigt sich darin, dass zahlreiche Vakzinierungsansätze aus der Maus bei ihrer Umsetzung in klinischen Studien scheiterten. Derzeit ist kein wirkungsvolles Vakzin für den Menschen verfügbar. Ein PBMC-Transfermodell würde die Möglichkeit bieten, die Mechanismen der humanen Leishmaniasis unter experimentellen Bedingungen zu analysieren und neue Lösungsansätze für die Entwicklung eines Vakzins zu finden.

3.3.1 Läsionsentwicklung in immundefizienten Stämmen

Immundefiziente Mausstämmen bilden die Basis für einen effizienten Transfer humaner Zellen in Mäuse und deren *in vivo*-Beobachtung unter experimentellen Bedingungen. Um zunächst zu überprüfen, wie sich die Mausstämmen, die für die Etablierung des PBMC-Transfermodells in Frage kommen, bei einer *L. major*-Infektion verhalten, wurden diese mit 1×10^3 metazyklischen *L. major*-Promastigoten intradermal in beide Ohren infiziert und über 15 Wochen beobachtet. Sofern nicht anders vermerkt, wurde dieser Infektionsansatz in allen Experimenten des Kapitels 3.3 eingesetzt. Als Kontrolle dienten infizierte BALB/c und C57BL/6 Mäuse. Die entstehenden Läsionen wurden über 15 Wochen in 3 Dimensionen gemessen (Abb. 20).

Die eingesetzten, immundefizienten Stämme H2b (C57BL/6-like) $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ (H2b $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$), NOD-Scid (NS), NOD-Scid-tg(HLA-A0201) (NS-tg(HLA-A0201)) und NOD-Scid $\gamma c^{-/-}$ (NSG) erwiesen sich durchweg als suzeptibel (Abb. 20). Hierbei entwickelten die T- und B-Zell-defizienten Stämme NS und NS-tg(HLA-A0201) kleinere Läsionen als die zusätzlich NK-Zell-defizienten Stämme NSG und H2b $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$. Jedoch waren die Läsionen in allen immundefizienten Stämmen kleiner als in BALB/c Mäusen. Die BALB/c Tiere mussten aufgrund des stark progressiven Verlaufs der Erkrankung bereits in Woche 11 aus den Versuchen genommen werden.

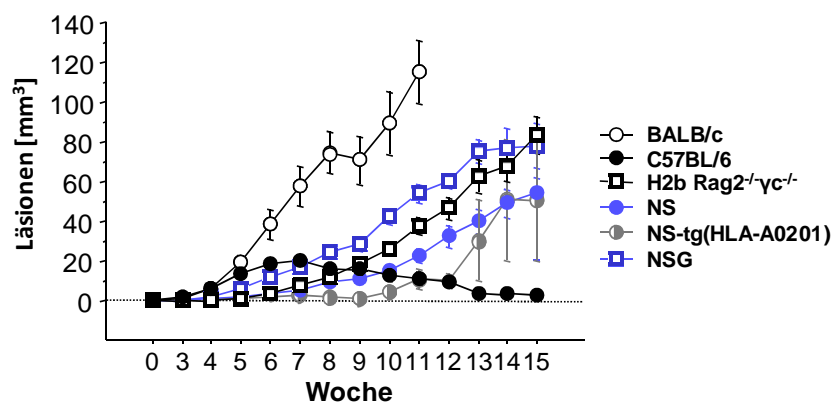


Abb. 20: Etablierung einer *L. major*-Infektion in immundefizienten Mäusen. 5-9 Wochen alte Tiere der immundefizienten Mausstämmen H2b $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$, NS, NS-tg(HLA-A0201) und NSG wurden mit 1×10^3 *L. major* intradermal in beide Ohren infiziert und die Größe der entstehenden Läsionen über 15 Wochen bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten ebenfalls infizierte BALB/c WT und C57BL/6 WT Mäuse. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 2$ unabhängige Experimente, 15-52 Mäuse je Gruppe).

3.3.2 *In vitro*-Infektion von murinen M Φ und Aktivierung durch humanes IFN- γ

Ein PBMC Transfermodell setzt voraus, dass bis zu einem gewissen Grad eine Interaktion von murinen und humanen Immunzellen möglich ist. Das Abtöten der intrazellulär in M Φ vorliegenden Parasiten wird durch die Aktivierung dieser Zellen erreicht. Diese Aktivierung wird durch IFN- γ vermittelt. Die verwendeten immundefizienten Mäuse besitzen jedoch keine muren T-Zellen, weshalb im PBMC-Transfermodell die Hauptquelle für IFN- γ die transferierten, humanen T-Zellen sein müssen. Deshalb war es zunächst wichtig, zu prüfen, ob die M Φ der verwendeten, immundefizienten Stämme in der Lage sind, auf humanes IFN- γ mit dem Abtöten intrazellulärer Leishmanien zu reagieren. Hierzu wurden M Φ aus Biogel isoliert, das 4-5 Tage zuvor NS oder C57BL/6 Mäusen subkutan appliziert wurde. Die isolierten Makrophagen wurden über Nacht mit Amastigoten infiziert und anschließend mit murinem oder humanem IFN- γ stimuliert. Einigen Ansätzen war zusätzlich LPS zugesetzt worden. Nach 2 Tagen erfolgte eine Diff-Quick-Färbung der Zellen und die Infektionsraten wurden unter dem Mikroskop bestimmt. Wie in Abb. 21B zu sehen ist, unterschieden sich die Infektionsraten zwischen den Stämmen der beiden genetischen Hintergründe C57BL/6 und NS nicht. Bei beiden Stämmen sankt der Anteil infizierter M Φ nach Stimulation mit murinem IFN- γ auf ca. 80%. Der Anteil infizierter M Φ nach Zugabe von humanem IFN- γ blieb jedoch hoch ($\geq 90\%$, Abb. 21C).

Betrachtet man allerdings die relative Parasitenzahl je infiziertem M Φ , wird deutlich, dass sie sowohl bei Stimulation mit murinem wie auch mit humanem IFN- γ in M Φ beider Stämme reduziert war (um 9% bzw. 22% in NS M Φ und 32% bzw. 18% in C57BL/6 M Φ , in Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, Abb. 21D).

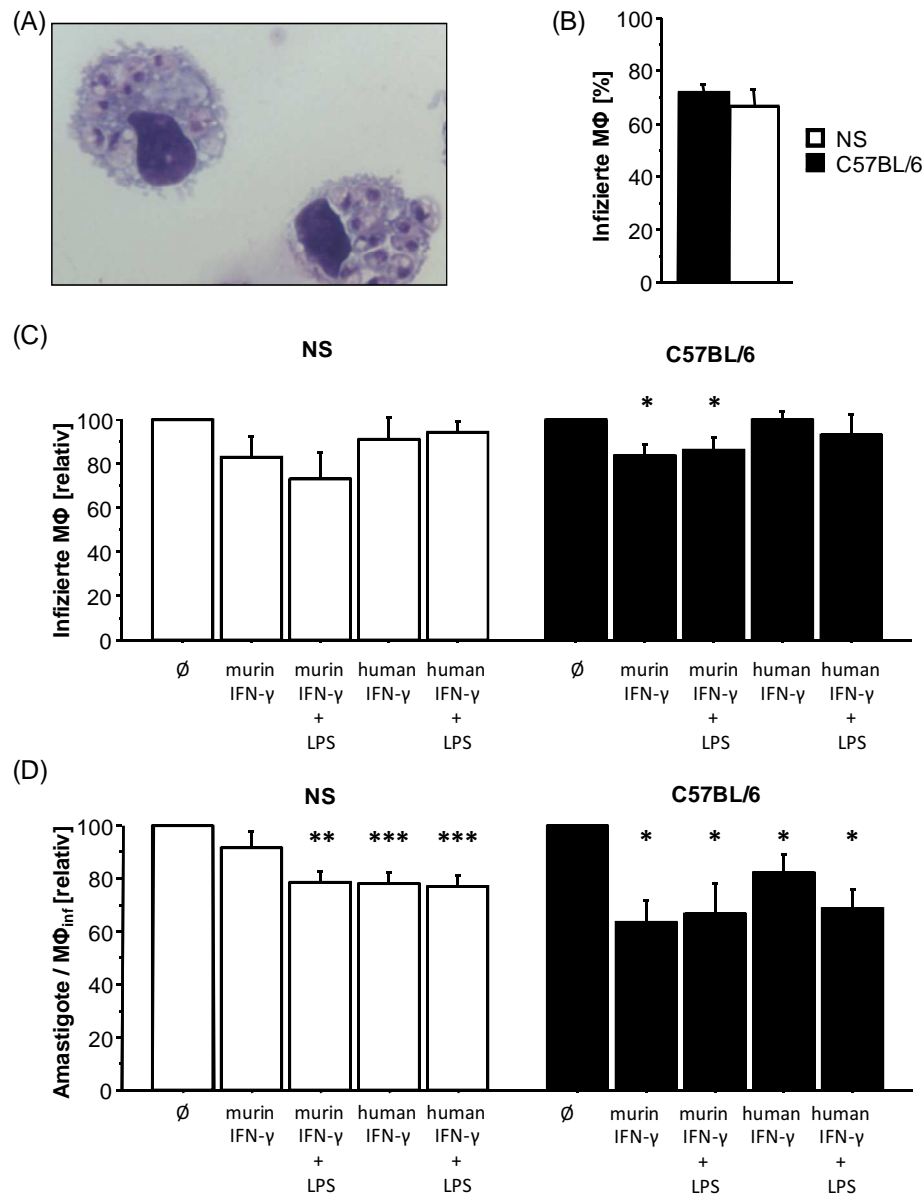


Abb. 21: Phagozytische Aktivität und Aktivierbarkeit von C57BL/6 und NS MΦ durch humanes IFN-γ. Inflammatorische C57BL/6 und NS MΦ aus Biogel wurden *in vitro* 1:5 mit frisch isolierten Amastigoten infiziert und nach 18 h aktiviert (murines IFN-γ 1.000 U/ml, humanes IFN-γ 1.000 U/ml, LPS 100 ng/ml). 48 h später erfolgte die Herstellung von Zytospin-Präparaten. Mit Diff-Quick gefärbte Zytospins wurden auf ihre Infektionsraten hin ausgezählt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (n=4; * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,002). (A) zeigt die mikroskopische Ansicht eines gefärbten Zytospins, (B) den Anteil infizierter Makrophagen nach Inkubation in Prozent, (C) den relativen Anteil infizierter, stimulierter Makrophagen je Gruppe in Relation zur Zahl infizierter Makrophagen der unstimulierten Gruppe und (D) die relative Zahl intrazellulärer Amastigote je infiziertem MΦ bezogen auf deren Zahl in unbehandelten Makrophagen.

3.3.3 Einfluss humaner PBMC auf die Läsionsentwicklung und Parasitenzahl in immundefizienten Mäusen

Der Transfer von PBMC oder isolierter Zellpopulationen in immundefiziente Mäuse ist eine etablierte, in den vergangenen Jahren häufig eingesetzte Methode, die es ermöglicht, humane Zellen experimentell in einem *in vivo* System zu untersuchen¹²⁹⁻¹³². Für

die kutane Leishmaniasis findet sich in der Literatur allerdings noch kein PBMC-Transfermodell. Um ein solches präklinisches Testmodell zu etablieren, untersuchten wir den Effekt des Transfers von humanen PBMC aus gesunden Spendern in infizierte Mäuse der Stämme NS, NSG und H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-}.

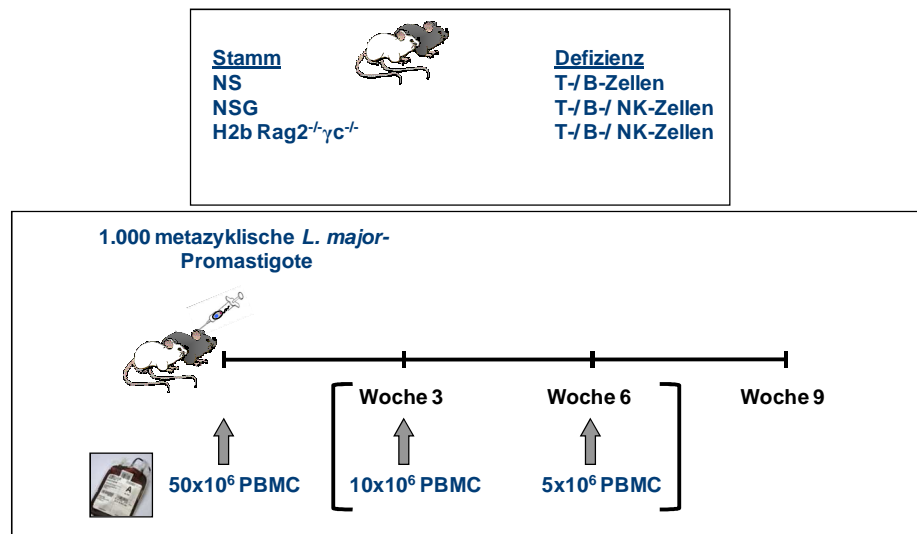


Abb. 22: Versuchsaufbau der PBMC-Transferexperimente. T- und B-Zell-defiziente Mäuse wurden mit *L. major* intradermal in die Ohren infiziert und zum gleichen Zeitpunkt i.p. 50x10⁶ PBMC injiziert. Die Tiere wurden über 9 Wochen beobachtet. Je nach Experiment erhielten die Tiere des Stammes NS in Woche 3 und 6 zusätzlich PBMC desselben Spenders.

Hierzu transferierten wir einmalig zum Zeitpunkt der Infektion i.p. 50x10⁶ PBMC in infizierte, immundefiziente Mäuse und bestimmten im Abstand von 2 Wochen den Anteil humaner CD45⁺ Leukozyten im peripheren Blut. Als Kontrollen dienten infizierte oder PBMC-transferierte Mäuse des gleichen Stammes. Abb. 23 zeigt exemplarisch die Rekonstitution in einem Mausstamm ohne (NS) und mit (NSG) NK-Zelldefizienz. Je Behandlungsgruppe ist die Rekonstitution in einer Maus über 9 Wochen dargestellt. In beiden Mausstämmen waren bereits eine Woche nach PBMC-Transfer humane CD45⁺ Zellen im peripheren Blut nachweisbar. Der Anteil humaner Zellen stieg in den Folgewochen weitgehend an. Allerdings waren Schwankungen in den Prozentzahlen zu beobachten und es waren nicht in jeder Maus nach PBMC-Transfer humane Zellen nachzuweisen. Kam es bereits in den ersten Wochen nach Transfer zu einer rapiden Rekonstitution der Mäuse, verstarben diese i.d.R. noch vor dem Versuchsende in Woche 9 (z.B. Abb. 23B, PBMC).

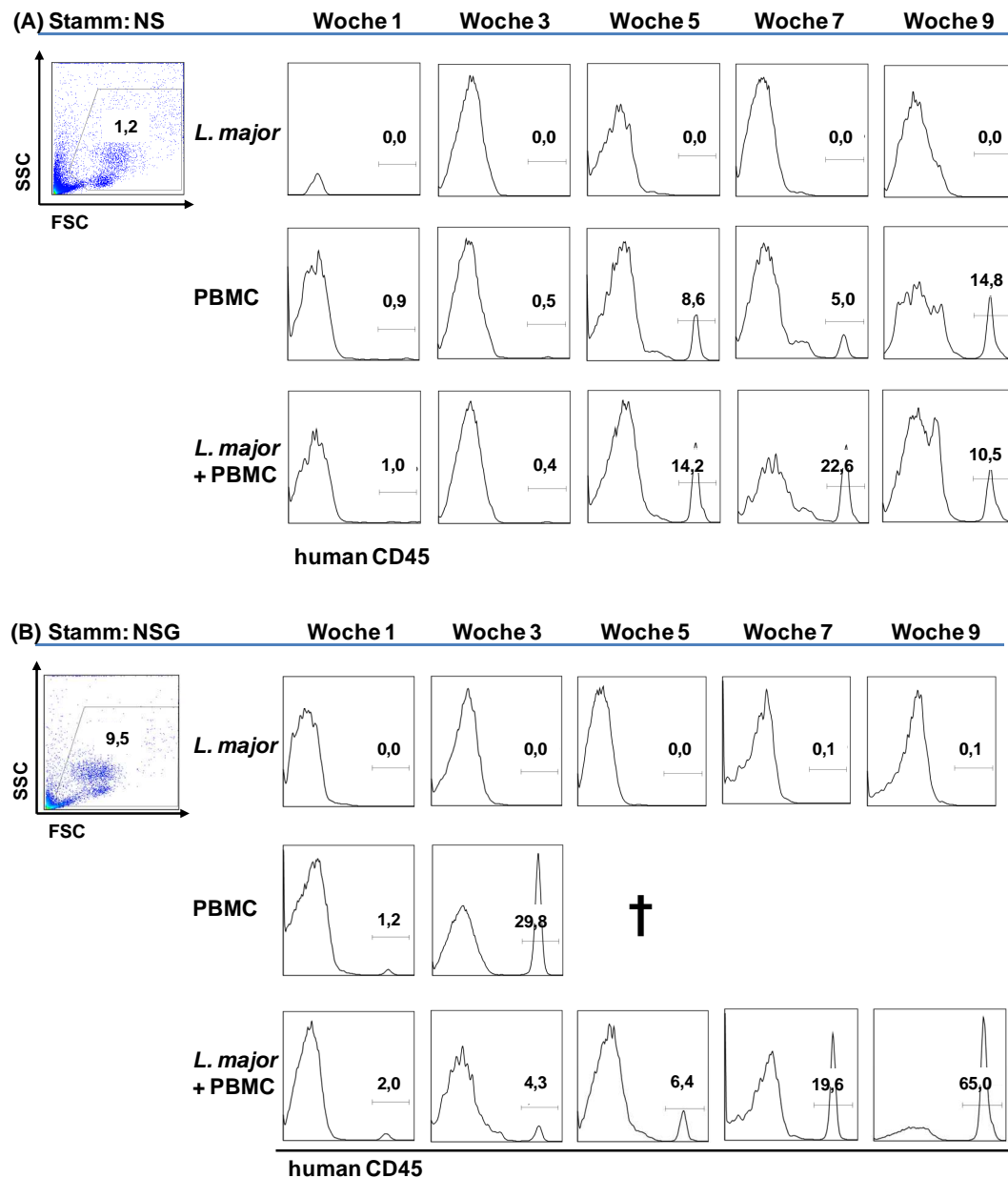


Abb. 23: Rekonstitutionsverlauf nach PBMC-Transfer. Die Abbildung zeigt beispielhaft den Rekonstitutionsverlauf in immundefizienten Mäusen mit bzw. ohne murine NK-Zellen. Mäusen der Stämme NS und NSG wurden i.p. 50×10^6 PBMC transferiert und je nach Gruppe mit *L. major* infiziert. Über die Schwanzvene entnommenes Blut wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und durchflusszytometrisch die Frequenz humaner CD45⁺ Leukozyten bestimmt (in %). Es ist exemplarisch je Stamm und Gruppe die Rekonstitution in einer Maus über 9 Wochen dargestellt. † verdeutlicht das Versterben der beobachteten Maus (n=1).

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Rekonstitution in Mäusen mit einem zusätzlichen Knock Out für das Gen *common gamma chain* häufiger erfolgreich verläuft.¹⁰⁸ Betrachtet man den Anteil humaner CD45⁺ Leukozyten in der Milz 9 Wochen nach Versuchsbeginn, sind in NS Mäusen 45-67% der Rekonstitutionen erfolgreich, in NS-tg(HLA-A0201) 20-100% ($\geq 1\%$ human CD45⁺, Abb. 24, Tabelle 2). 42-67% bzw. 20-100% der Mäuse weisen 10% oder mehr humane Zellen in der Milz auf. In den γc -defizienten Stämmen NSG und H2b Rag2^{-/-} γc ^{-/-} finden sich in 25-67% bzw. 80-100% der Tiere $\geq 1\%$ humane CD45⁺ Zellen in der Milz. Hier liegt der Anteil der Mäuse mit mehr als 10% humanen Zellen bei 25-33% bzw. 20-67%.

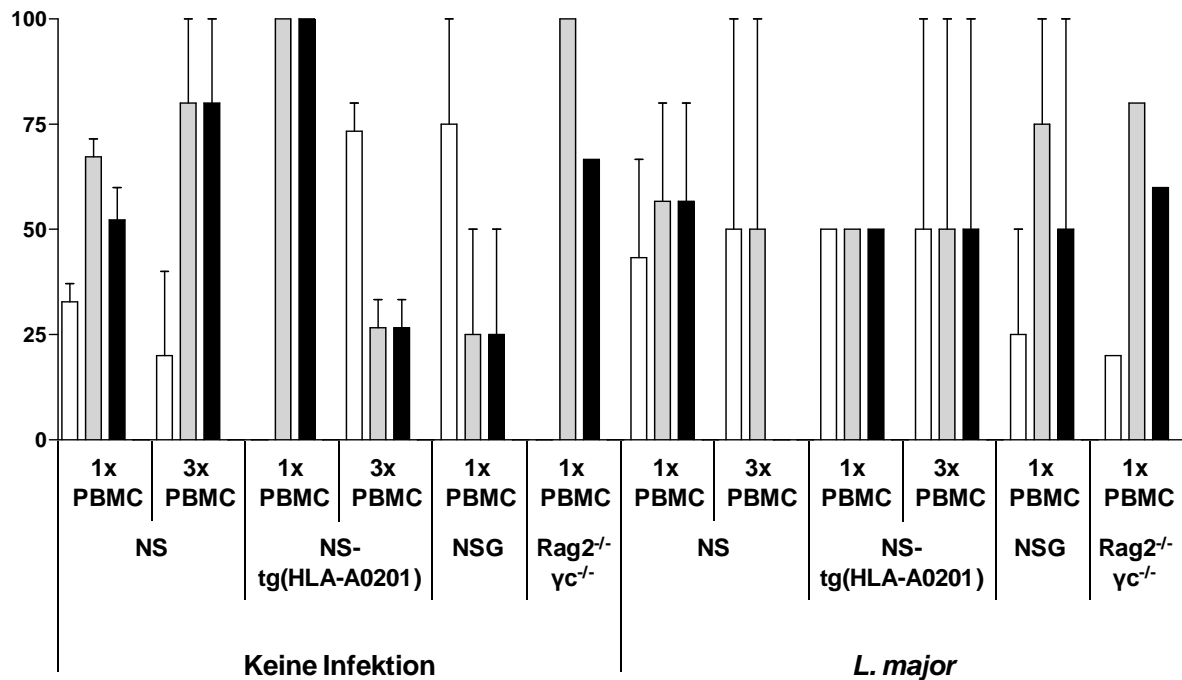


Abb. 24: Anteil in Woche 9 lebender Mäuse, deren Anteil humaner CD45⁺ Zellen in der Milz getestet wurde. 9 Wochen PBMC-Transfer wurden den noch lebenden Mäusen die Milz entnommen und Einzelzellsuspensionen der Milz durchflusszytometrisch auf ihren Anteil an humanen CD45⁺ Leukozyten untersucht. Die Tierzahlen zu dieser Abbildung können der Tabelle 2 entnommen werden (n≥1 unabhängige Experimente, Mittelwerte ± SEM).

Tabelle 2: Anzahl in Woche 9 lebender Mäuse, deren Anteil humaner CD45⁺ Zellen in der Milz getestet wurde. ≥1% beinhaltet alle Tiere mit mehr als 1% humaner CD45⁺ Zellen in der Milz, 9 Wochen nach PBMC-Transfer und Infektion. ≥10% repräsentiert die Zahl der Mäuse aus Spalte ≥1% mit mehr als 10% humanen CD45⁺ Zellen in der Milz.

	NS			NS-tg (HLA-A0201)			NSG			H2b Rag2 ^{-/-} γC ^{-/-}		
	<1%	≥1%	≥10%	<1%	≥1%	≥10%	<1%	≥1%	≥10%	<1%	≥1%	≥10%
Infektion	21	-	-	12	-	-	5	-	-	5	-	-
PBMC (1x)	4	8	5	0	1	1	3	1	1	0	6	4
PBMC (3x)	2	4	4	6	3	6	n.d.			n.d.		
PBMC (1x) + L. major	6	5	5	1	1	1	1	2	1	1	4	1
PBMC (3x) + L. major	2	2	1	4	1	1	n.d.			n.d.		

Um zu untersuchen, ob durch einen Transfer humaner PBMC in immundefiziente, *L. major*-infizierte Mäuse der Verlauf der Erkrankung beeinflusst werden kann, wurden H2b Rag2^{-/-} γC^{-/-} Mäuse infiziert und zum gleichen Zeitpunkt i.p. 50x10⁶ PBMC transferiert. Die Läsionen wurden über 9 Wochen beobachtet (Abb. 24). Tiere mit zusätzlichem PBMC Transfer zeigten erhöhte Läsionvolumina. Um zunächst zu klären, welches das für die Auswertung geeignete Maß an Rekonstitution ist, wurden Tiere für die Analyse anhand des Anteils humaner CD45⁺ Zellen in der Milz aufgeteilt (Grenzen 1%, 5% und 10%) und die

Läsionsvolumina untersucht. Insbesondere gut rekonstituierte Mäuse mit mehr als 10% humanen CD45⁺ Zellen in der Milz zeigten deutliche Unterschiede zu nur infizierten Tieren bzw. zu Mäusen mit weniger als 10% humaner CD45⁺ Zellen in der Milz. Aus diesem Grund wurden im Folgenden – sofern möglich – die PBMC-transferierten Mäuse in Gruppen mit <10% und ≥10% humanen CD45⁺ Zellen in der Milz aufgeteilt und getrennt ausgewertet. Die Bestimmung des Anteils humaner Zellen in der Milz erfolgte jeweils zum Ende des Experimentes im Durchflusszytometer.

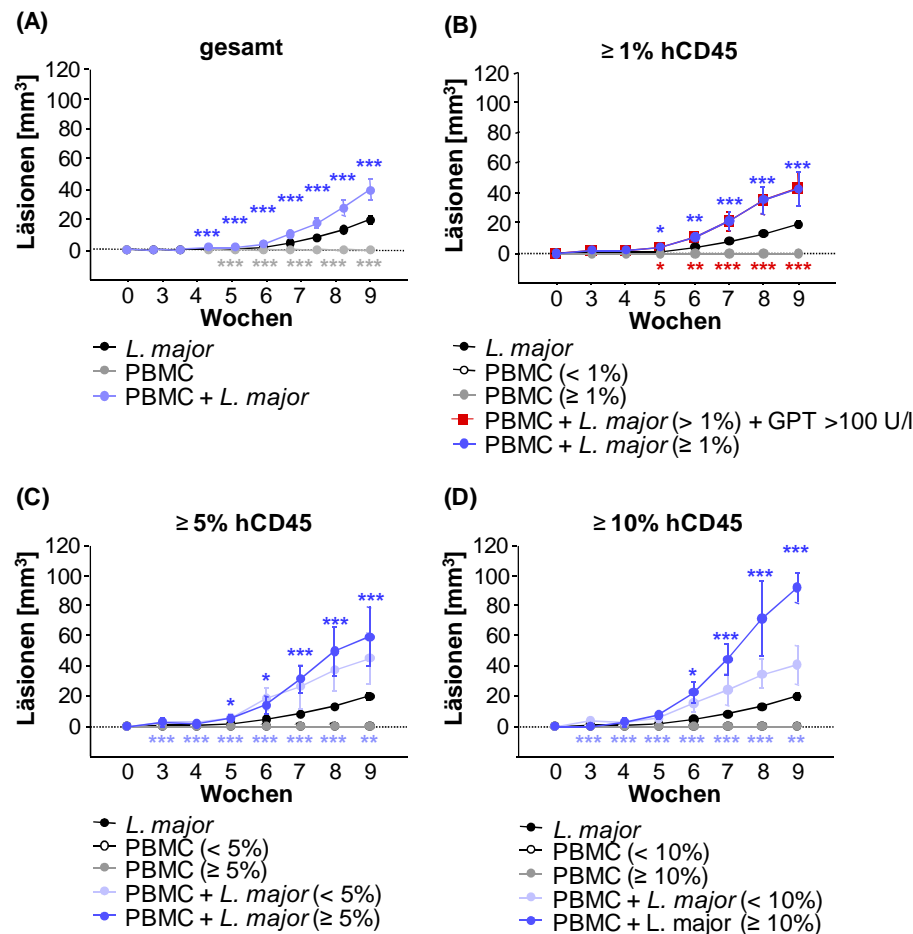


Abb. 24: Analyse der Läsionsvolumina PBMC-transferierter Mäuse unter Berücksichtigung des Rekonstitutionserfolges. H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse wurden mit *L. major* infiziert und zum Zeitpunkt der Infektion i.p. 50x10⁶ PBMC gesunder Spender transferiert. Die entstehenden Läsionen wurden über 9 Wochen wöchentlich in 3 Dimensionen vermessen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte ±SEM. Die Gruppen der PBMC-transferierten Mäuse mit und ohne Infektion wurden anhand des Rekonstitutionserfolges (Anteil humaner CD45⁺ Leukozyten in der Milz, Woche 9 p.i.) getrennt aufgetragen. Teilabbildung (A) zeigt die Läsionen aller in den Experimenten eingesetzten Mäuse unabhängig von der Frequenz humaner Zellen, (B-D) zeigt Läsionsvolumina der Tiere aufgetrennt nach dem Anteil humaner CD45⁺ Zellen in der Milz (1-33 Mäuse je Gruppe, n≥2 unabhängige Experimente, * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,002).

Neben H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} wurden weiterhin die Stämme NS und NSG als PBMC-Empfänger getestet. Hierfür transferierten wir wiederum i.p. 50x10⁶ PBMC in *L. major*-infizierte Mäuse. Zusätzlich erhielt eine Gruppe von NS Mäusen nicht nur zum Zeitpunkt der Infektion, sondern auch in Woche 3 und 6 nach Infektion PBMC des gleichen Spenders (10x10⁶ bzw. 5x10⁶ Zellen i.p.; siehe Abb. 22, Versuchsaufbau). Als Kontrolle dienten infizierte bzw. PBMC transferierte Mäuse. Die entstehenden Läsionen wurden über 9 Wochen gemessen.

Alle Mausstämmen zeigten nach Infektion und einmaligem PBMC-Transfer erhöhte Läsionsvolumina gegenüber nur infizierten Tieren (Abb. 25A). In NS und H2b Rag2^{-/-}

$\gamma c^{-/-}$ Mäusen zeigten sich sowohl bei den Tieren mit $<10\%$ also auch mit $\geq 10\%$ humanen $CD45^{+}$ Zellen in der Milz signifikant vergrößerte Läsionen. Die deutlichsten Unterschiede zu Infektion allein traten jedoch bei allen Stämmen in den Gruppen mit $\geq 10\%$ humanen $CD45^{+}$ Leukozyten auf. Repetitiver PBMC-Transfer verursachte zusätzlich vergrößerte Läsionen in NS Mäusen. Die Kontrollgruppen ohne Infektion zeigen keine Ohrschwellung.

Die Parasitenlast ist ein etabliertes Maß für die schwere des Krankheitsverlaufes. Wir bestimmten deshalb in diesen Mäusen 9 Wochen nach Infektion die Zahl der Parasiten am Infektionsort und in der Milz.

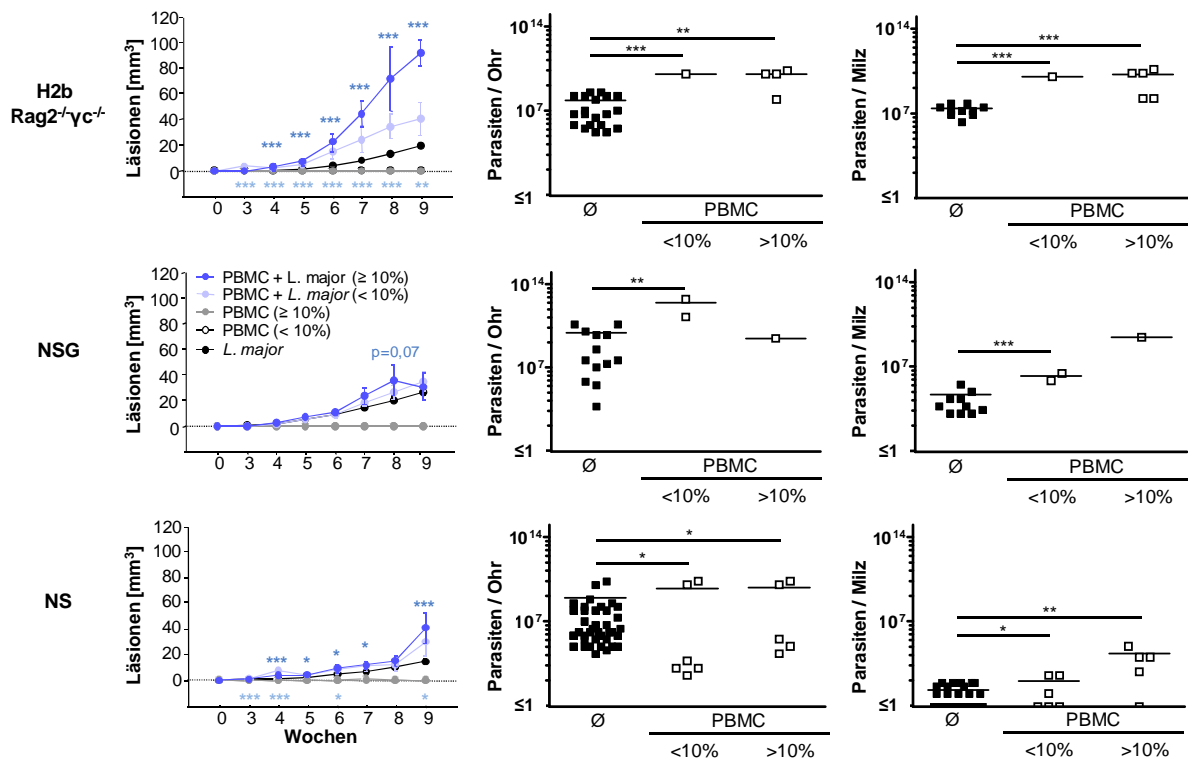
Nach einmaligem PBMC-Transfer war in NS Mäusen die Zahl der Parasiten an der Infektionsstelle signifikant erhöht (Abb. 25A). Die Infektionsstelle von NSG Mäusen zeigte ein vergleichbares Bild mit jedoch deutlich höheren Parasitenzahlen in Mäusen mit weniger als 10% humanen Zellen in der Milz. Ein gut rekonstituiertes Tier ($\geq 10\%$ humane $CD45^{+}$ Zellen) wies jedoch weniger als die durchschnittliche Parasitenzahl der Mäuse auf, die nur eine Infektion erhielten. Der Transfer von PBMC in H2b $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ Mäuse resultierte ebenfalls in erhöhten Parasitenzahlen, unabhängig vom Grad der Humanisierung. Allerdings waren infizierte Mäuse ohne PBMC-Transfer besser als NS und NSG in der Lage, die Parasitenzahl zu kontrollieren. Die Parasitenzahlen lagen bei den PBMC-transferierten H2b $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ Mäusen etwa auf dem Niveau der NS Mäuse. Allerdings zeigten die Mäuse dieses Stammes die höchsten Parasitenzahlen in der Milz.

Generell weisen Mäuse die mit fehlender γc (NSG, H2b $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$) im Vergleich zu NS Mäusen deutlich höhere Parasitenzahlen in der Milz auf (Abb. 25A). Ein PBMC Transfer erhöhte in allen Mausstämmen nochmals die Zahl der Parasiten in der Milz. Eine Rekonstitution mit $\geq 10\%$ humanen Zellen erhöhte dabei zusätzlich die Viszeralisierungstendenz.

Die Parasitenlasten nach repetitivem PBMC-Transfer zeigten ein Bild, das dem nach einmaligem PBMC-Transfer entspricht. Allerdings zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Parasitenzahlen in der Milz, wie er nach einmaligem PBMC-Transfer zu beobachten war (Abb. 25B).

Ein PBMC-Transfer beeinflusst demnach die Läsionsvolumina sowie die Zahl der Parasiten an der Infektionsstelle und resultiert in einer verstärkten Viszeralisierung der Infektion. Ob die erhöhten Läsionsvolumina auch auf die Präsenz humaner Zellen im Organismus, vor allem in den Läsionen zurückzuführen sind, sollte im Folgenden geklärt werden.

(A) Einmaliger PBMC-Transfer



(B) Repetitiver PBMC-Transfer

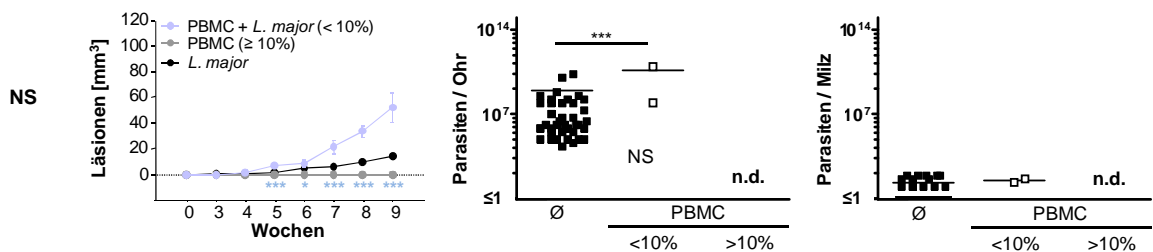


Abb. 25: Einfluss des PBMC-Transfers auf Läsionsvolumina und Parasitenlast nach *L. major*-Infektion. Immundefiziente Tiere wurden mit *L. major* infiziert und PBMC transferiert. Die entstehenden Läsionen sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede zwischen PBMC-transferierten, infizierten Mäusen (blau) und nur infizierten Mäusen (schwarz) sind markiert. PBMC-transferierte Mäuse wurden anhand des Rekonstitutionserfolges in die Gruppen <10% und \geq 10% getrennt. (A) Die Läsionsvolumina und Parasitenlasten nach einmaligem Transfer von 50×10^6 PBMC (zum Zeitpunkt der Infektion) sind nach Stämmen getrennt dargestellt (Läsionen: NS 4-66 Tiere je Gruppe, $n \geq 6$; NSG 2-31 Tiere je Gruppe, $n \geq 4$; H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} 1-33 Mäuse je Gruppe, $n \geq 2$, Parasitenzahlen: NS $n \geq 4$, NSG $n \geq 3$, H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} $n=1-3$). (B) zeigt Läsionsvolumina der Mäuse des NS Stammes nach repetitivem PBMC-Transfer (zusätzlich in Woche 3 bzw. 6 nach Infektion 10×10^6 bzw. 5×10^6 PBMC; Läsionen: 3-66 Tiere je Gruppe, $n \geq 2$; Parasiten: $n=1$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,002$).

3.3.4 Nachweis humaner Zellen in der Milz und an der Infektionsstelle

Neben dem Anteil humaner CD45⁺ Gesamtzellen in der Milz war es zudem relevant, aus welchen Populationen diese Zellen bestehen und welche Zellpopulationen damit in diesem lymphoiden Organ für Immunreaktionen zur Verfügung stehen. Um dies zu überprüfen, wurden 9 Wochen nach Infektion den PBMC-transferierten Mäusen die Milzen entnommen und daraus isolierte Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Es konnten in Mäusen aller Mausstämme humane CD45⁺ Zellen nachgewiesen werden (Abb. 26). Die

Anteile je Maus waren jedoch variabel und nicht in jedem einzelnen Tier führten die PBMC-Transfers zu einer Rekonstitution mit humanen Zellen.

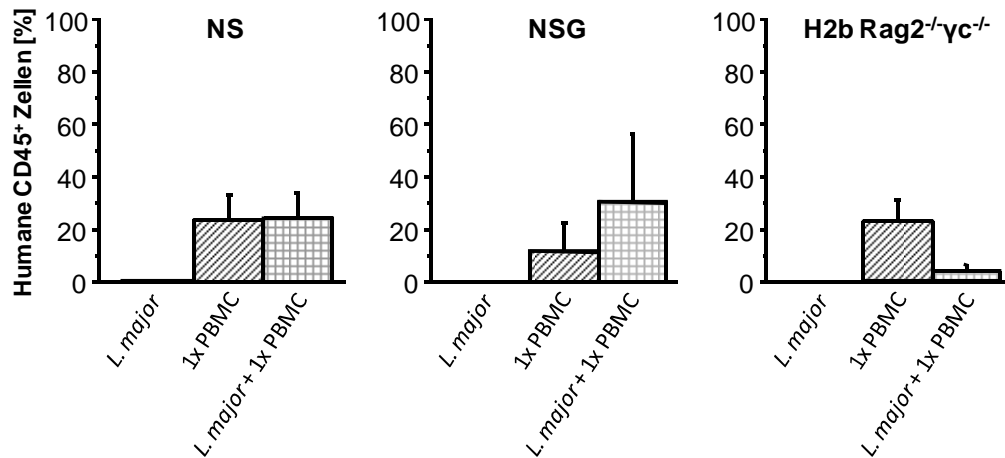


Abb. 26: Rekonstitutionserfolg 9 Wochen nach PBMC-Transfer. Die Abbildung zeigt die durchschnittlich nachgewiesenen Prozentsätze an humanen CD45⁺ Zellen in der Milz, 9 Wochen nach PBMC-Transfer. Die Tiere erhielten an Tag 0 i.p. 50x10⁶ PBMC. Die indizierten Gruppen wurden zum gleichen Zeitpunkt mit 1x10³ metazyklischen, promastigoten *L. major* infiziert. Nach der Entnahme der Milz in Woche 9 erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen (NS: n=3-5 unabhängige Experimente, 11-21 Tiere/Gruppe; NSG: n=2 unabhängige Experimente, 3-5 Tiere/Gruppe, H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-}: n=1 unabhängiges Experiment, 5-6 Tiere/Gruppe).

Bei den nachgewiesenen humanen CD45⁺ Zellen handelte es sich fast ausschließlich um CD3⁺ T-Zellen (bis zu 99,9% bestehend aus CD3⁺CD4⁺ Th-Zellen und CD3⁺CD8⁺ Tc-Zellen, Abb. 27). Es waren nur <1% humane CD19⁺ B-Zellen nachweisbar. Humane DCs lassen sich prinzipiell als lin⁻CD11c⁺MHCII⁺ Zellen identifizieren¹³³⁻¹³⁵. Lin⁻ steht für eine Ausschlussfärbung. Das heißt nur Zellen, die negativ für CD3, CD14, CD19 und CD56 sind, kommen als DCs in Frage. Allerdings zeigten sich in den Experimenten keine negative Populationen und damit keine potentiellen DCs.

Generell konnten in ausschließlich PBMC-transferierten Tieren die gleichen Zellpopulationen nachgewiesen werden.

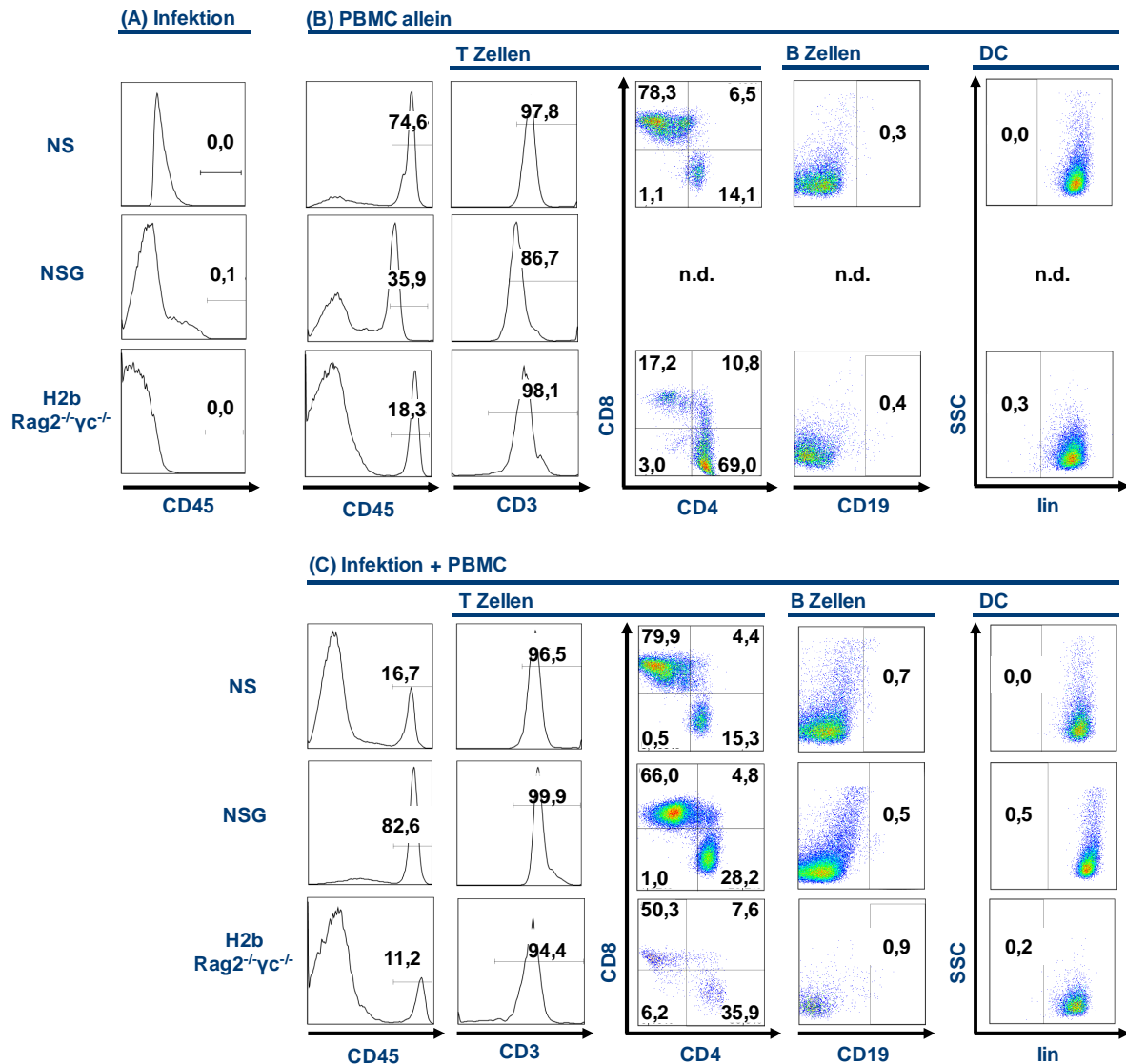


Abb. 27: Humane Zellen in der Milz PBMC-rekonstituierter Mäuse. Die Mäuse der angegebenen Stämme wurden in die Ohren infiziert und erhielten zum gleichen Zeitpunkt 50×10^6 PBMC. 9 Wochen nach Infektion wurden Milzzellen isoliert und durchflusszytometrisch auf humane Zellen untersucht. (A) Als Kontrolle wurden nur infizierte bzw. (B) PBMC-transferierte Tiere eingesetzt. (C) zeigt Ergebnisse PBMC-transferierter Mäuse mit Infektion. Nur human CD45⁺ Zellen wurden auf weitere humane Marker analysiert. Lin repräsentiert eine kombinierte CD3/CD14/CD19/CD56 Färbung. Zellen negativ für lin, jedoch CD11c⁺MHCII⁺ wären humane DCs. Da keine abgegrenzte Population lin⁻ Zellen identifiziert werden konnte, wurde auf die Darstellung von CD11c und MHCII verzichtet. Die Abbildung zeigt exemplarisch Analyseergebnisse individueller Mäuse (n_≥2).

Eine effektive Immunreaktion gegen den intrazellulär in MΦ als Hauptwirtszelle vorliegenden Parasiten setzt die Aktivierung der infizierten MΦ voraus. Die Aktivierung wird durch IFN-γ vermittelt, das von Th1- und Tc1-Zellen ausgeschüttet wird. Um die Aktivierung zu ermöglichen, müssen diese Zellen an den Infektionsort gelangen. Deshalb war es wichtig zu prüfen, ob die transferierten PBMC, vor allem die darin enthaltenen CD4⁺ Th-Zellen und CD8⁺ Tc-Zellen nach i.p. Transfer an den Ort der Entzündung wandern. Um dies zu untersuchen, wurden 9 Wochen nach Infektion die Ohren von PBMC-transferierten Mäusen entnommen und die intradermalen Leukozyten isoliert. Diese Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 28). In Mäusen aller Stämme waren 9 Wochen nach PBMC-Transfer humane Zellen nachweisbar. Es handelte sich dabei großteils um CD3⁺ T-Zellen (CD3⁺CD8⁺ Tc- und CD3⁺CD4^{low} Th-Zellen, Abb. 28C). Der Anteil humaner CD45⁺

Leukozyten und damit auch der CD3⁺ T-Zellen war sowohl zwischen als auch innerhalb der jeweiligen Stämme variabel (Abb. 29). Die größten Anteile humaner CD45⁺ Zellen am Infektionsort fanden sich in NS Mäusen (bis zu 18%, NSG bis zu 1,5%, H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} bis zu 2%). Jedoch waren in Mäusen, die nur einen PBMC-Transfer erhielten und nicht infiziert wurden, ebenfalls humane Zellen der gleichen Populationen im Ohr zu finden (Abb. 28B). Es waren ohne Infektion sogar teilweise höhere Anteile humaner CD45⁺ Zellen nachweisbar (NS bis zu 24%, NSG bis zu 10%, H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} bis zu 2%).

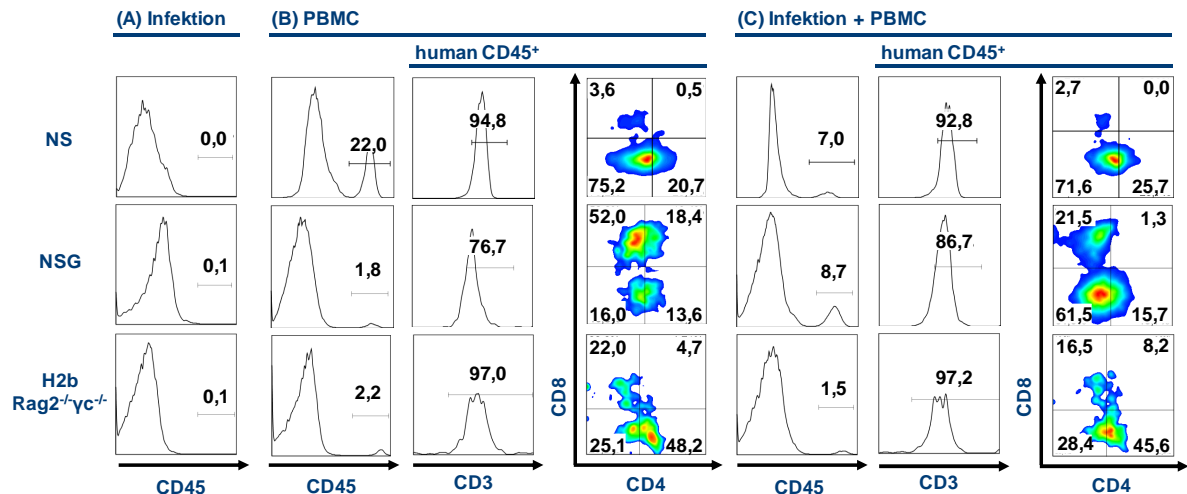


Abb. 28: Nachweis humaner Zellen an der Infektionsstelle. (C) Die Mäuse der angegebenen Stämme wurden intradermal in die Ohren infiziert und erhielten i.p. zum gleichen Zeitpunkt 50×10^6 PBMC. 9 Wochen nach Infektion wurden die Ohren geerntet und die intradermalen Leukozyten isoliert. Diese wurden durchflusszytometrisch auf humane Zellen untersucht. Als Kontrolle wurden (A) infizierte bzw. (B) nur PBMC transferierte Tiere eingesetzt. Die Abbildung zeigt exemplarisch Analyseergebnisse individueller Mäuse ($n \geq 2$).

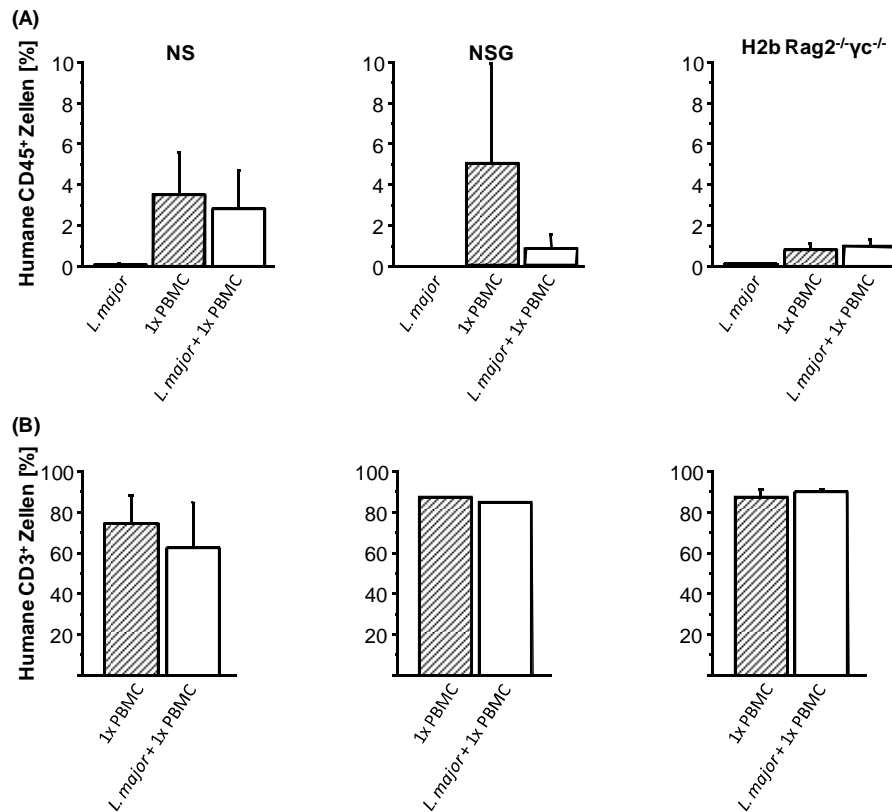


Abb. 29: Humane Zellen an der Infektionsstelle 9 Wochen PBMC-Transfer. Die Abbildung zeigt die durchschnittlich nachgewiesenen Prozentsätze an humanen CD45⁺ Zellen an der Infektionsstelle, 9 Wochen nach PBMC-Transfer. Die Tiere erhielten an Tag 0 i.p. 50×10^6 PBMC. Die indizierten Gruppen wurden zum gleichen Zeitpunkt mit 1×10^3 metazyklischen, promastigoten *L. major* infiziert. Nach der Entnahme der der Ohren und der Isolation intradermaler Zellen aus dem Gewebe in Woche 9 erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen. (A) zeigt den Anteil humaner CD45⁺ Zellen an der Infektionsstelle (NS: 10-16 Tiere/Gruppe, n=3-5 unabhängige Experimente, 11-21 Tiere, NSG: 1-2 Tiere/Gruppe, n=1 unabhängiges Experiment, H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-}: 5–6 Tiere/Gruppe, n=1 unabhängiges Experiment). (B) zeigt den Anteil CD3⁺ T-Zellen an den CD45⁺ Zellen. Um Hintergrund zu reduzieren, wurden nur Daten von Tieren in die Auswertung aufgenommen, die eine deutlich abgesetzte Population ($\geq 1\%$) humaner CD45⁺ Zellen zeigten (NS: 2-3 Tiere/Gruppe, n=1-2 unabhängige Experimente, NSG: 1 Tier/Gruppe, n=1 unabhängiges Experiment, H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-}: 5-6 Tiere/Gruppe, n=1 unabhängiges Experiment).

Durch die Infektion wurden außerdem murine Zellen an den Infektionsort rekrutiert. Wie in Abb. 30 zu sehen ist, sind in allen Tieren CD11c⁺ DCs, F4/80⁺ MΦ und Ly-6G⁺ bzw. 7-4⁺ NΦ in den Ohren präsent. Interessanterweise unterscheiden sich bei NS Mäusen die Anteile der nachgewiesenen Zellen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen nicht deutlich, obwohl für die Darstellung der Gruppen PBMC und PBMC + *L. major* Mäuse verwendet wurden, die in den Ohren zusätzlich humane Zellen aufwiesen.

Anders verhält es sich bei NSG Mäusen. Hier sind ohne Infektion kaum Neutrophile in den Ohren nachweisbar. Der Anteil an F4/80⁺ MΦ ist jedoch höher als nach Infektion. Der Anteil dieser Zellen in infizierten Ohren ist relativ unabhängig von der Präsenz humaner Zellen. Sind humane Zellen in den Ohren präsent, ist tendentiell die Zahl muriner CD11c⁺ DC erhöht.

In nicht infizierten H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} sind ohne Infektion ebenfalls nur wenig NΦ in der Dermis vorhanden. Der Anteil an F4/80⁺ MΦ und CD11c⁺ DC ist ebenfalls gering. Allerdings finden sich bei diesem Stamm unter allen Bedingungen wenige DC in der Dermis. Wie auch bei den NΦ steigt der Anteil an F4/80⁺ MΦ mit Infektion deutlich an.

Insgesamt werden durch die genutzten Marker teilweise nur etwa 20% der Zellen erreicht.

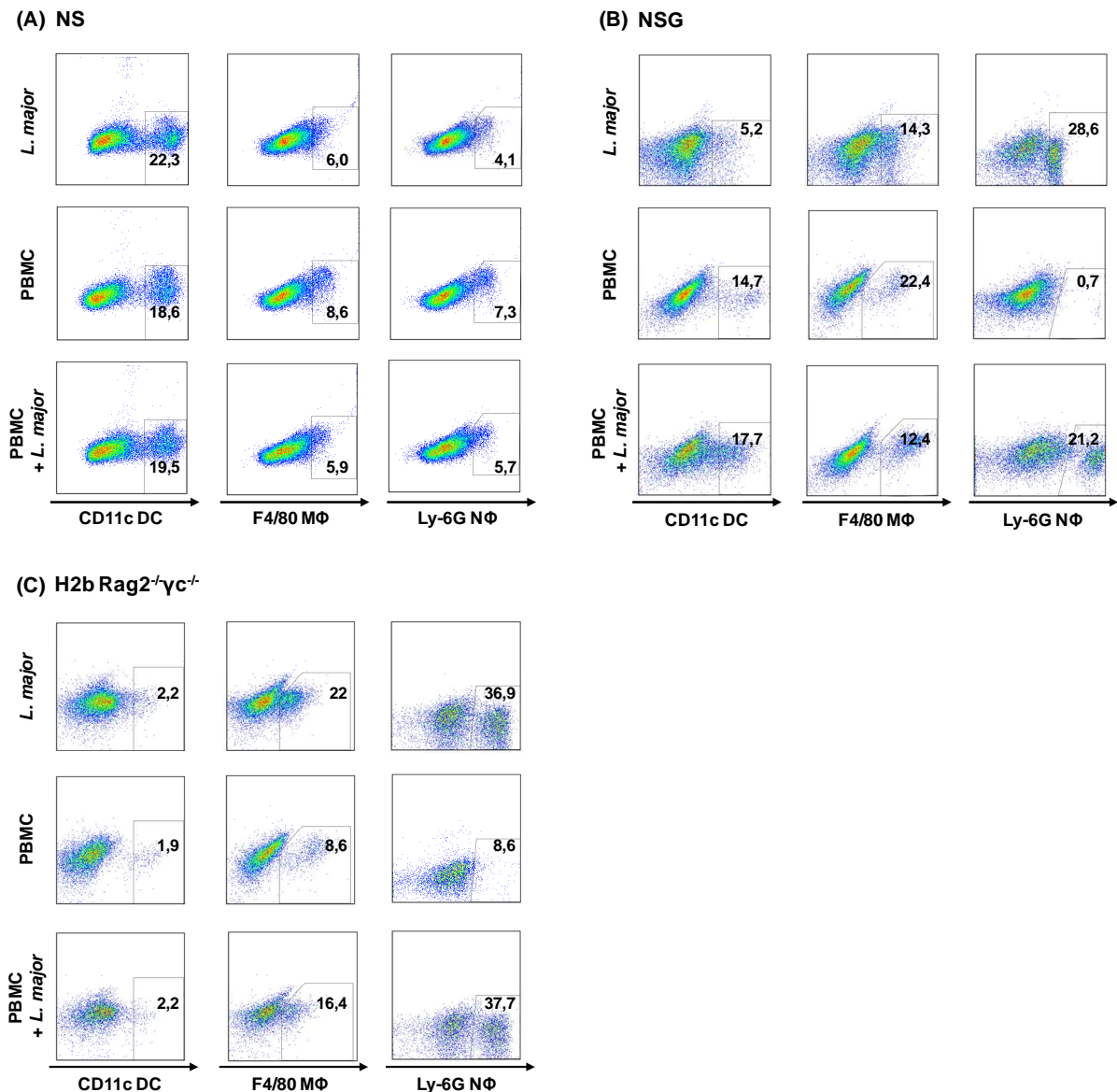


Abb. 30: Nachweis muriner Zellen an der Infektionsstelle. Die Ohren von Tieren der angegebenen Stämme wurden 9 Wochen nach Infektion bzw. PBMC-Transfer abgetrennt, daraus intradermale Leukozyten isoliert und die Zellen nach Antikörpermarkierung durchflusszytometrisch analysiert. Murine DCs wurden als CD11c⁺ Zellen identifiziert, F4/80-spezifische Antikörper dienen zur Identifizierung von MΦ, Ly-6G Antikörper zum Nachweis von NΦ. Die Abbildung zeigt Daten von Mäusen der Stämme NS (A), NSG (B) und H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-}. Je Behandlung und Stamm sind die Daten eines einzelnen, repräsentativen Tieres dargestellt (n ≥ 2 unabhängige Experimente/Stamm).

3.3.5 Antigen-spezifische, humane Antworten in immundefizienten Mäusen

Nachdem an der Infektionsstelle und in der Milz humane Zellen nachgewiesen werden konnten, sollte geklärt werden, ob diese Zellen in der Lage sind, antigenspezifische Immunantworten zu induzieren. 9 Wochen nach Versuchsstart wurden Milzzellen aus NS, NSG und H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen isoliert. Die Mäuse wurden, wie zuvor beschrieben, infiziert und ein Teil der Tiere erhielt zusätzlich PBMC. Als Kontrolle dienten ausschließlich PBMC-transferierte Tiere. Die Milzzellen wurden *in vitro* für 48h anti-human CD3-Antikörper (Positivkontrolle) oder mit SLA (Antigen) restimuliert und die Überstände mittels ELISA auf die Konzentration der humanen Markerzytokine IFN-γ (Th1) und IL-4 sowie IL-

10 (Th2) hin untersucht. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Leider ließ sich anhand von Mittelwerten aller Mäuse eines Stammes keine antigenspezifische Freisetzung humaner Zytokine nachweisen. Abb. 31 zeigt exemplarisch die Freisetzung humaner Zytokine aus Milzzellen von NS Mäusen.

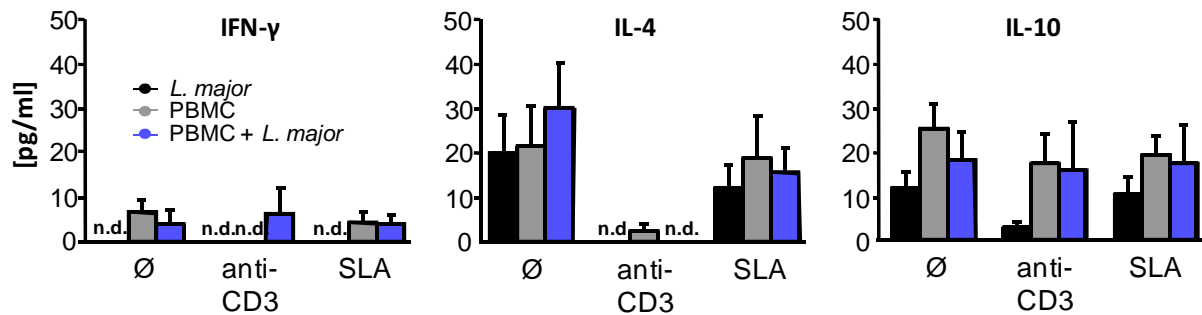


Abb. 31: Antigen-spezifische Zytokin-freisetzung von Milzzellen PBMC-transferierter NS. 9 Wochen nach PBMC-Transfer und Infektion wurden Milzzellen aus NS Mäusen isoliert und *in vitro* mit löslichem Leishmanien-Antigen (SLA) restimuliert. Nach 48 h wurden in den Überständen die Konzentrationen humaner Zytokine bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte bzw. mit anti-human-CD3-Antikörper stimulierte Zellen. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM. Die Abkürzung n.d. steht für nicht detektierbar.

Um dennoch Tiere zu identifizieren, bei denen eine antigenspezifische Zytokin-freisetzung induziert werden konnte, wurden die Tiere nochmals einzeln ausgewertet. Es fanden sich unter allen getesteten Mäusen insgesamt 3, die eine antigenspezifische Sekretion von Th2-Zytokinen aufwiesen (Abb. 32). Es handelt sich dabei in allen drei Fällen um Mäuse mit einem hohen Anteil humaner Zellen in der Milz (Abb. 32A 69%, B 45,2%, C 82,6%). Allerdings sind die sekretierten Zytokinmengen sehr gering. Spezifisch freigesetztes, humanes IFN- γ konnte nicht nachgewiesen werden. Mäuse des Stammes H2b Rag2^{-/-} γ c^{-/-} zeigten keine antigenspezifische Reaktion.

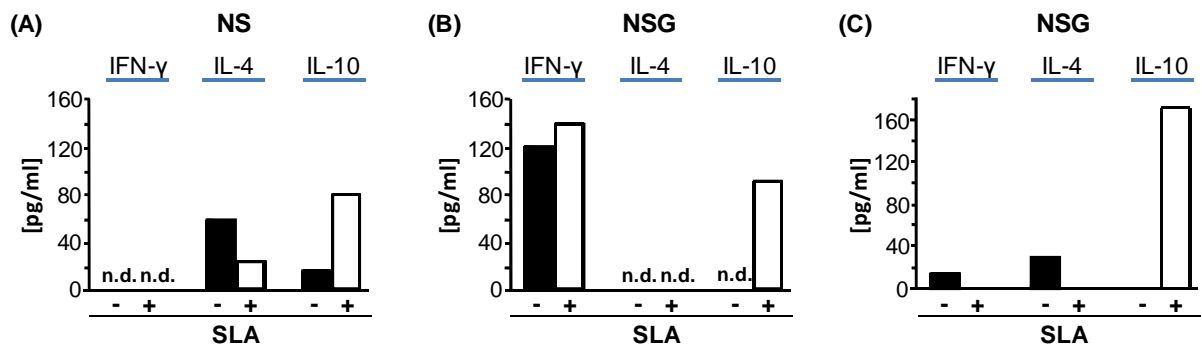


Abb. 32: Antigen-spezifische Freisetzung humaner Zytokine individueller Mäuse. 9 Wochen nach PBMC-Transfer ((A+C) 50×10^6 ; (B) 1×10^6) und Infektion wurden Milzzellen aus den Mäusen isoliert und *in vitro* mit löslichem Leishmanien-Antigen (SLA) restimuliert. Nach 48 h wurden die Überstände auf humane Zytokine getestet. Als Kontrolle dienten unstimulierte bzw. mit anti-human-CD3-Antikörper stimulierte Zellen. In (A) sind die nachgewiesenen Zytokine des Überstandes von Milzzellen einer NS Maus, in (B+C) von je einer NSG Maus dargestellt.

3.3.6 Verbesserung der Antigenpräsentation in PBMC-transferierten Mäusen

Eine antigenspezifische Zytokinfreisetzung ist unerlässlich für den Erfolg des PBMC-Transfermodells. Hierfür ist im bisher verwendeten Modell eine spezifische Erkennung muriner Peptid-MHC-Komplexe durch humane T-Zellrezeptoren notwendig. Dies birgt möglicherweise Probleme. Um die Antigenerkennung durch humane CD8⁺ Tc-Zellen zu verbessern, setzten wir NS Mäuse ein, die transgen für das humane MHC Klasse I-Molekül HLA-A0201 sind (NS-tg(HLA-A0201)). Wir infizierten Mäuse dieses Stammes und transferierten zum Zeitpunkt der Infektion 50×10^6 humane HLA-A0201⁺ PBMC. Die entstehenden Läsionen wurden über 9 Wochen beobachtet (Abb. 33). Nach einmaligem PBMC-Transfer zeigten sich im Gegensatz zu den NS Tieren keine signifikant erhöhten Ohrläsionen. Jedoch resultierte ein repetitiver Transfer von PBMC (Woche 0, 3 und 6; PBMC desselben Spenders) in signifikant vergrößerten Läsionen im Vergleich zu Infektion allein, unabhängig vom Maß der Rekonstitution. Die Läsionen waren insgesamt kleiner als bei NS Mäusen (vergleiche Abb. 26).

Die Ohren der PBMC-transferierten und infizierten Mäuse wiesen nur geringe Parasitenzahlen auf, die tendenziell niedriger waren als in Tieren ohne PBMC (Abb. 33A). Die PBMC-transferierten Mäuse zeigten zudem keine Viszeralisierung.

Sorgte man jedoch durch repetitiven PBMC-Transfer für eine höhere Verfügbarkeit humaner Zellen, stieg die Parasitenzahl signifikant gegenüber Tieren ohne PBMC-Transfer an. Eine Viszeralisierung war dennoch nicht zu erkennen (Abb. 33B).

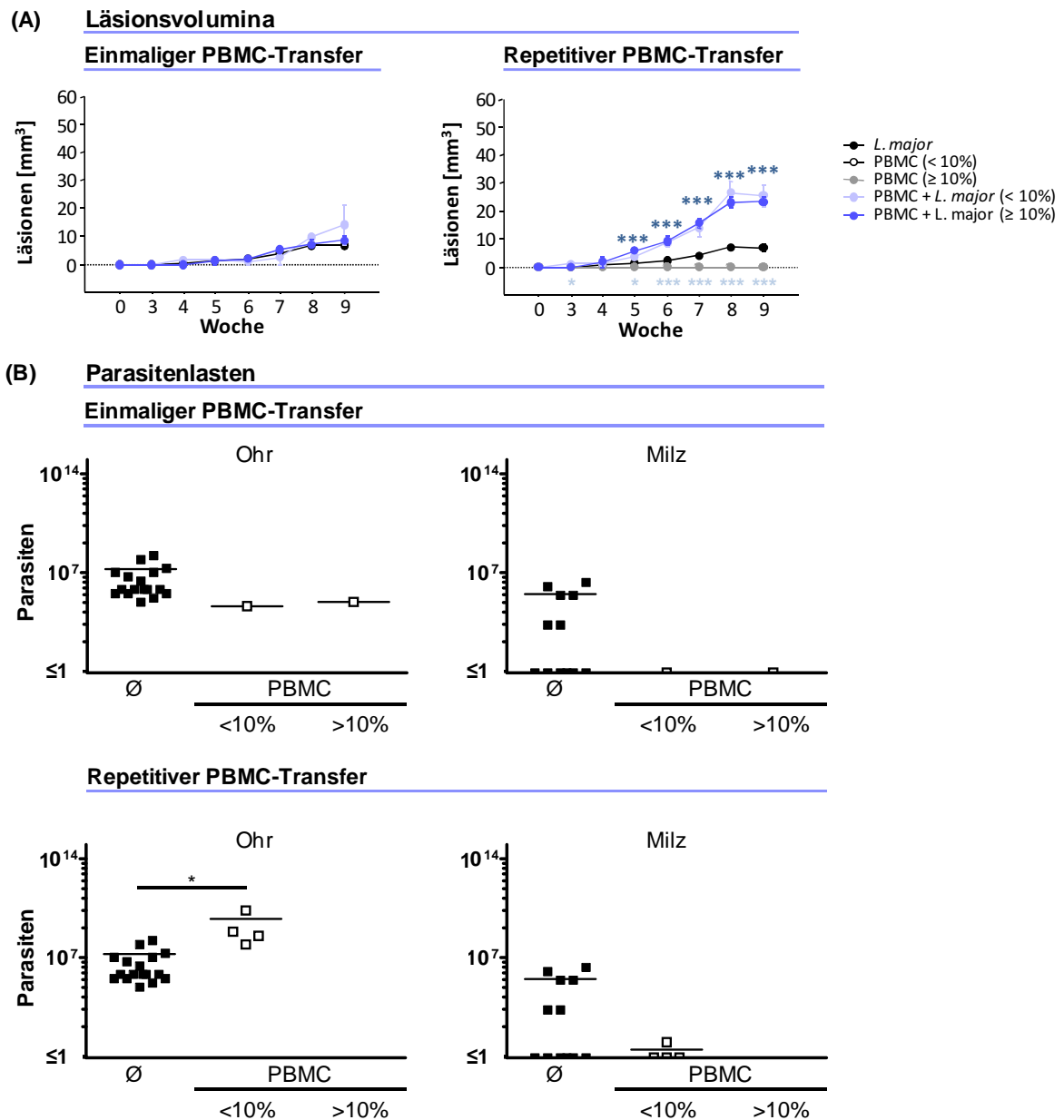


Abb. 33: Läsionsvolumen und Parasitenlasten nach PBMC-Transfer in NS Mäusen, transgen für humanes MHC Klasse I. NS-tg(HLA-A0201) wurden mit *L. major* in beide Ohren infiziert und zum Zeitpunkt der Infektion i.p. 50×10^6 PBMC gesunder Spender transferiert. Einige Tiere erhielten zusätzlich in Woche 3 und 6 nach Infektion 10×10^6 bzw. 5×10^6 PBMC (5-15 Tiere je Gruppe, $n \geq 2$). Die PBMC-transferierten Mäuse wurden anhand des Rekonstitutionserfolges in die Gruppen <10% und $\geq 10\%$ getrennt. (A) Die entstehenden Läsionen sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede der PBMC-transferierten, infizierten Mäuse (blau) im Vergleich zu nur infizierten Mäusen (schwarz) sind markiert (einmaliger PBMC Transfer: 2-15 Tiere je Gruppe, $n \geq 1$, repetitiver PBMC Transfer: 5-15 Tiere je Gruppe, $n \geq 2$). (B) 9 Wochen nach Infektion wurden Ohren und Milz geerntet und mittels der limited dilution-Methode die Parasitenzahlen bestimmt. Die Parasitenzahlen der Milz sind als Hinweis auf Viszeralisierung gezeigt. Jeder Punkt repräsentiert die Parasitenzahl in einem Ohr. Die arithmetischen Mittelwerte sind als Balken dargestellt ($n=1$, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,002$).

Nach Restimulation von Milzzellen aus 9 Wochen infizierten NS-tg(HLA-A0201) Mäusen zeigte sich jedoch weder nach einmaligem, noch nach repetitivem PBMC-Transfer eine antigenspezifische Sekretion humaner Zytokine (Abb. 34).

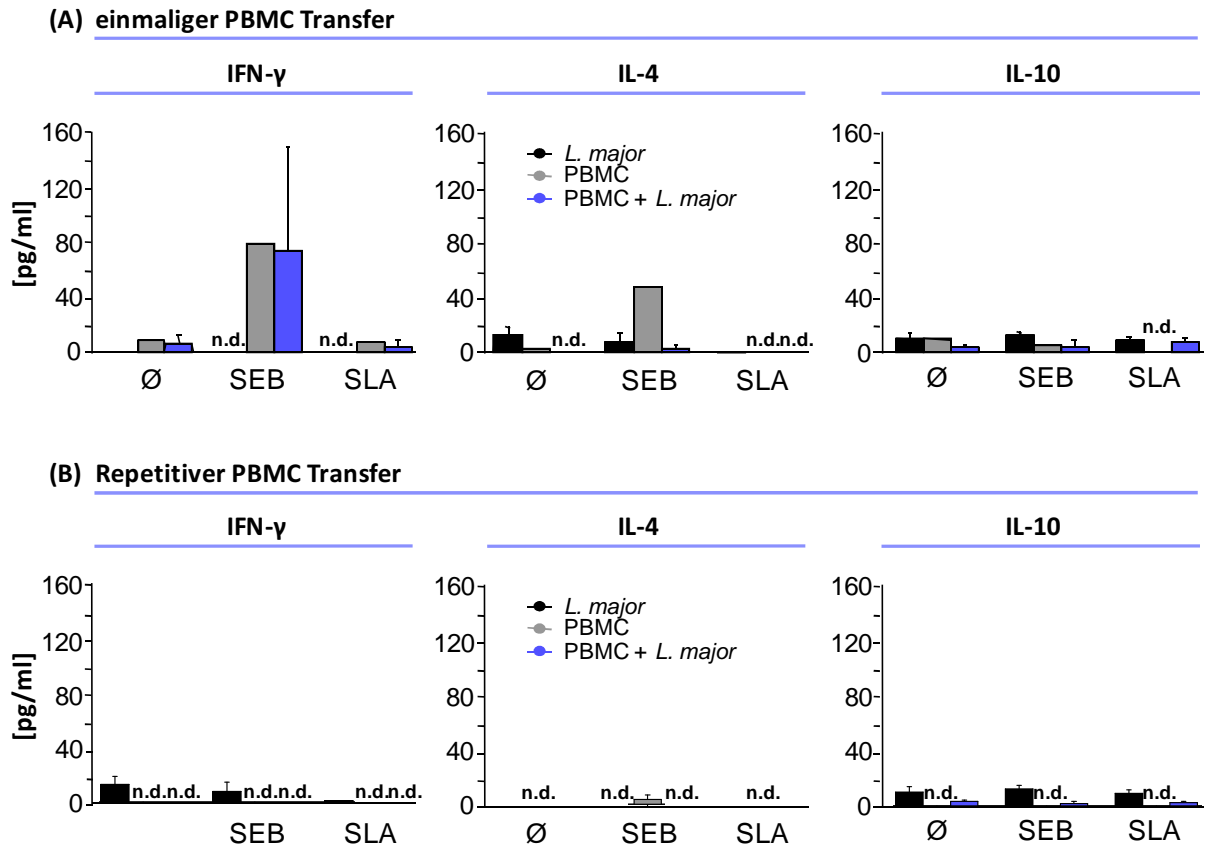


Abb. 34: Antigen-spezifische Zytokinfreisetzung restimulierter Milzzellen aus NS-tg(HLA-A0201) Mäusen. Milzzellen 9 Wochen infizierter und PBMC transferierter NS-tg(HLA-A0201) Mäuse wurden mit SLA bzw. SEB oder unstimuliert für 48 h kultiviert. Als Kontrolle dienten Milzzellen nur infizierter bzw. PBMC transferierter Mäuse. Die Überstände wurden mittels ELISA auf humane Zytokine hin untersucht. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte \pm SEM (A: n=1, B: n=2).

Der Transfer humaner DC bietet eine weitere Möglichkeit, die Effektivität der Antigenpräsentation gegenüber humanen T-Zellen zu verbessern. Dazu wurden aus Buffy coats Monozyten isoliert und daraus über 6 Tage unreife, humane DCs generiert. Die Reinheit der Kultur an Tag 6 zeigt die Darstellung unten (Abb. 35). Alle lebenden Zellen exprimierten HLA-DR und sind $CD80^+CD83^+CD86^{low}$. Es waren keine Verunreinigungen mit T-Zellen (CD2), Monozyten (CD14) und B-Zellen (CD19) detektierbar.

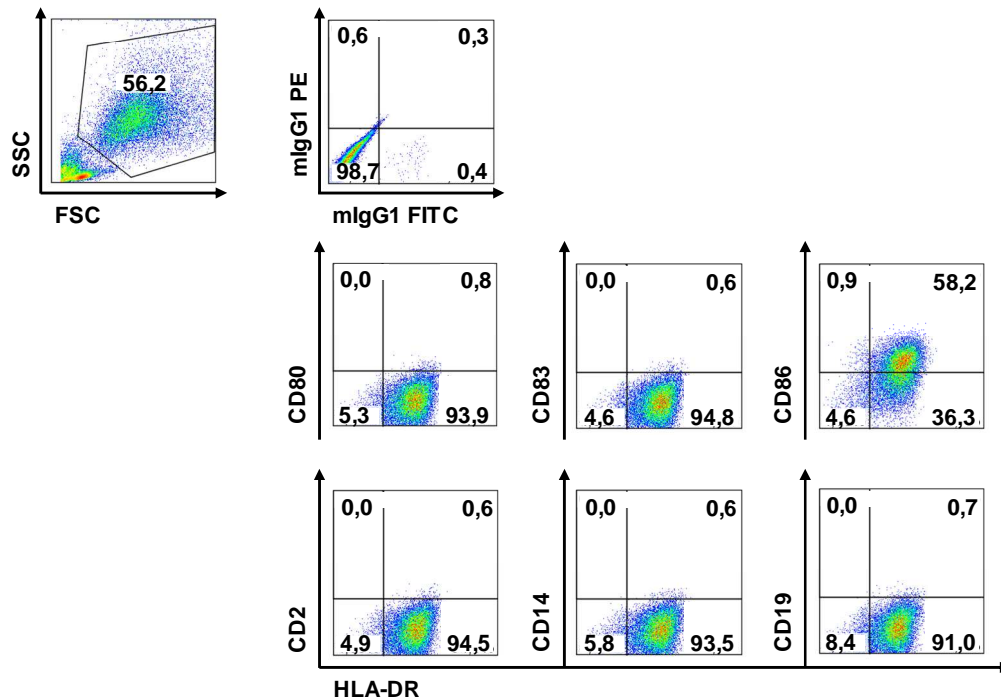


Abb. 35: Durchflusszytometrische Charakterisierung unreifer, humaner DCs vor Transfer. Humane DCs wurden aus Monozyten generiert und vor dem Transfer in Mäuse auf ihre Expression von Markermolekülen und auf Reinheit überprüft. Die Abbildung zeigt eine repräsentative, durchflusszytometrische Analyse der Zellen.

Zum Zeitpunkt der Infektion und des PBMC-Transfers erhielten die indizierten Gruppen zusätzlich $0,5 \times 10^6$ syngene, unreife, humane DCs (Abb. 36-C) oder anstatt einer Infektion *in vitro* infizierte, syngene, humane DCs (DC_{inf}) intradermal in beide Ohren (Abb. 36D). Der zusätzliche Transfer unreifer, nicht infizierter humaner DCs sorgte im Vergleich zu Infektion mit PBMC-Transfer (A-C) in allen Mausstämmen für keine signifikanten Unterschiede in den Läsionsvolumina. Jedoch zeigen sich erhöhte Läsionsvolumina nach DC_{inf} -Transfer in NS Mäuse. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass eine Infektion mit 1×10^3 Parasiten (Abb. 36A-C) nicht direkt mit einem Transfer $0,5 \times 10^6$ humaner, infizierter DCs (Abb. 36D) vergleichbar ist.

Ein Transfer von unreifen, humanen, syngenen DCs in NS Mäuse reduziert in gut rekonstituierten Mäusen (>10% humane $CD45^+$ in der Milz) die Parasitenzahl im Vergleich zu nur infizierten Tieren und Tieren mit zusätzlichem PBMC-Transfer (Abb. 36E). Mäuse, die DC_{inf} erhielten, wiesen trotz der größeren Zahl transferierter *L. major* nur Parasitenzahlen auf, die mit der PBMC + *L. major* Gruppe vergleichbar sind.

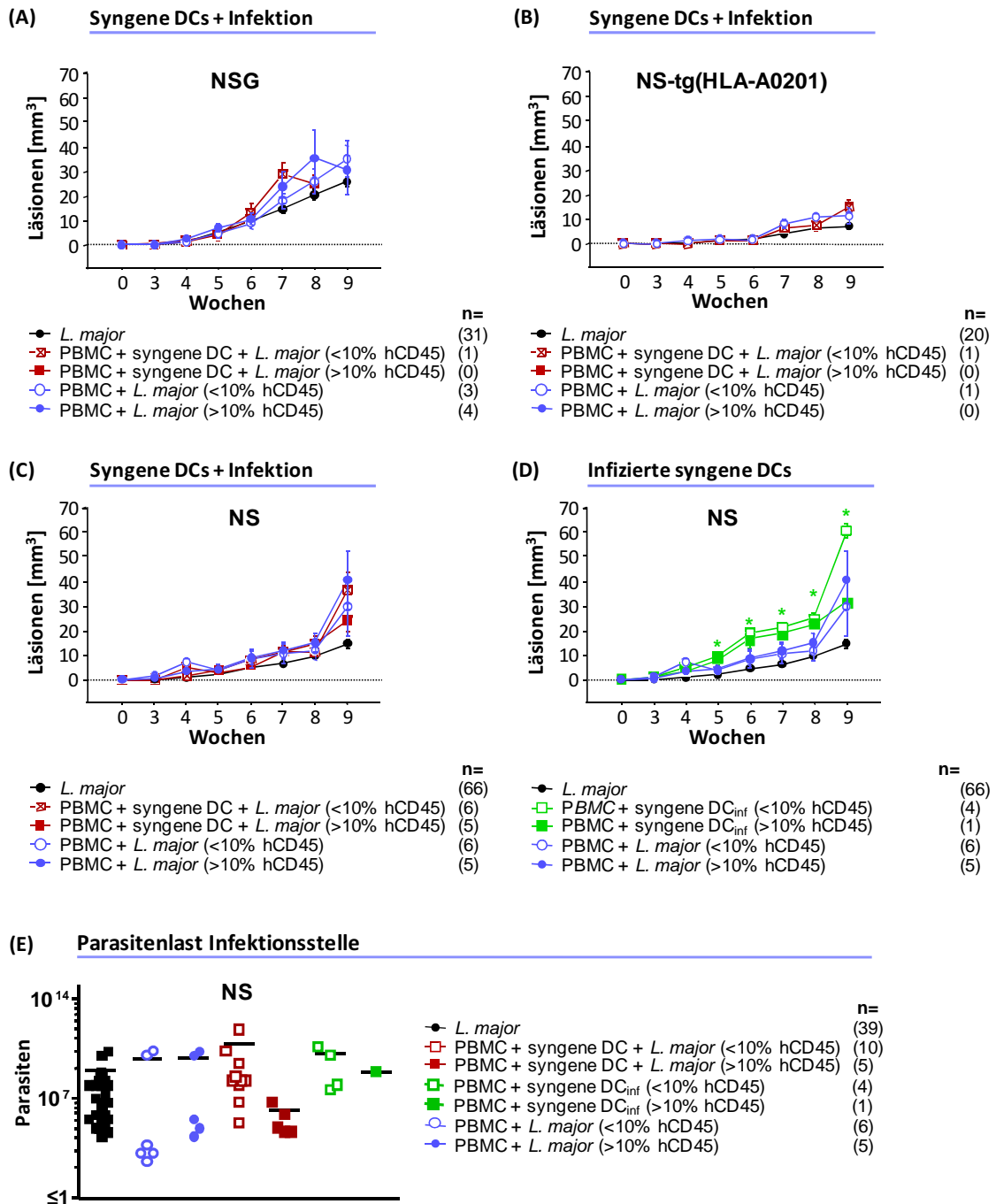


Abb. 36: Einfluss des Transfers syngener, humaner DCs auf die Läsionsentwicklung und Parasitenlasten. (A-C, E) Zusätzlich zu Infektion und Transfer von PBMC wurden den Mäusen der indizierten Gruppen $0,5 \times 10^6$ unreife, syngene, humane DCs in die Infektionsstelle injiziert. (D, F) Einer weiteren Gruppe wurden anstelle einer Infektion intradermal $0,5 \times 10^6$ *in vitro* infizierte, ebenfalls syngene DCs in beide Ohren gespritzt. Die Tiere sind nach dem Anteil humaner CD45⁺ Zellen in der Milz (Woche 9 oder bei früheren Versterben) in Gruppen unterteilt. (A-D) Die Volumina der Läsionen sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n gibt die Gruppengröße zu Versuchbeginn an (Gruppen mit zusätzlicher Injektion syngener, nicht infizierter DC: NSG n=1 unabhängiges Experiment, NS-tg(HLA-A0201) n=1 unabhängiges Experiment, NS: n=2-3; mit Injektion infizierter DCs: NS n=1). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit PBMC + syngene DC_{inf} (<10%) im Vergleich zu PBMC + *L. major* (<10%) sind mit * markiert (* $p \leq 0,05$). (E) 9 Wochen nach Infektion wurden mittels der limited dilution-Methode die Parasitenzahlen in den Läsionen der Tiere aus den Teilabbildungen C und D bestimmt. Der Balken repräsentiert den Mittelwert. Die Tiere wurden anhand des Anteils humaner CD45⁺ Zellen in der Milz in Gruppen unterteilt (je Behandlungsgruppe NS syngene DCs + Infektion n=4; NS infizierte, syngene DCs, n=1).

Jeweils eine Maus in der Gruppe mit unreifen DCs und eine in der Gruppe mit DC_{inf} zeigten eine geringe antigenspezifische Produktion von Th2-Zytokinen (Abb. 37). Es handelte sich in beiden Fällen um NS Mäuse. In der Milz der Mäuse wurden 29% (Abb. 37A) bzw. 48% (Abb. 37B) humane CD45⁺ Zellen nachgewiesen.

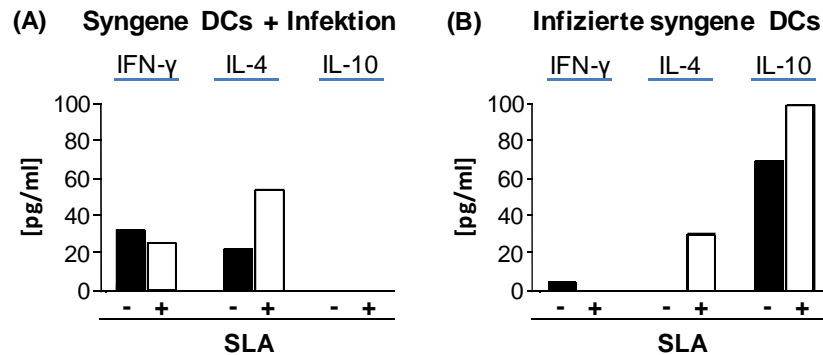


Abb. 37: Antigen-spezifische Zytokinproduktion nach Transfer humaner DCs. (A) Mäusen des NS Stammes wurden neben Infektion und i.p. Transfer von PBMC $0,5 \times 10^6$ unreife, syngene, humane DCs an die Infektionsstelle appliziert. (B) Weiteren Tieren wurden anstelle einer Infektion $0,5 \times 10^6$ *in vitro* infizierte, ebenfalls syngene DCs intradermal in beide Ohren gespritzt. 9 Wochen nach Infektion wurden Milzzellen isoliert und *in vitro* mit SLA restimuliert. Nach 48 h wurden die Konzentration humaner Zytokine in den überständen bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Milzzellen. Beide Abbildungen zeigen das Zytokinprofil jeweils einer individuellen NS Maus.

3.3.7 Induktion xenogener GvHD in *L. major*-infizierten, PBMC-transferierten Mäusen

Ein Transfer humaner Zellen in immundefiziente Mäuse birgt generell das Risiko einer xenogenen GvH-Reaktion der transferierten T-Zellen gegen murines Gewebe. Aus diesem Grund wurden in den Experimenten parallel Parameter untersucht, die es erlauben, eine auftretende GvHD zu identifizieren. Neben der Beobachtung von Körpergewicht und Überleben der Tiere wurde eine regelmäßige Bestimmung der Konzentration des Leberenzym GPT (ALT) im Serum des peripheren Bluts durchgeführt. Erhöhte Werte dieses Enzymes weisen auf eine Schädigung der Organe hin, wie sie während einer GvHD auftreten. Zusammen mit dem Parameter des Überlebens konnten wir die GPT-Konzentration als verlässlichen Indikator einer xenogenen GvHD identifizieren. Normalwerte gesunder Mäuse liegen bei 40 U/l. Wie Abb. 38 gezeigt, wurden im Blutserum aller Stämme nach PBMC-Transfer deutlich erhöhte Werte nachgewiesen (siehe auch Anhang I). Mäuse mit $\gamma c^{-/-}$ zeigten bereits früh erhöhte Werte. Die höchsten GPT-Konzentrationen waren bei NSG Mäusen zu finden (bis zu 2275 U/l). NS Mäuse wiesen im Mittel die geringsten Werte auf, wohingegen NS-tg(HLA-A0201) Mäuse im Vergleich zu NS schlechtere Mittel- und Einzelwerte zeigen (Woche 6 und 9, siehe auch Anhang I).

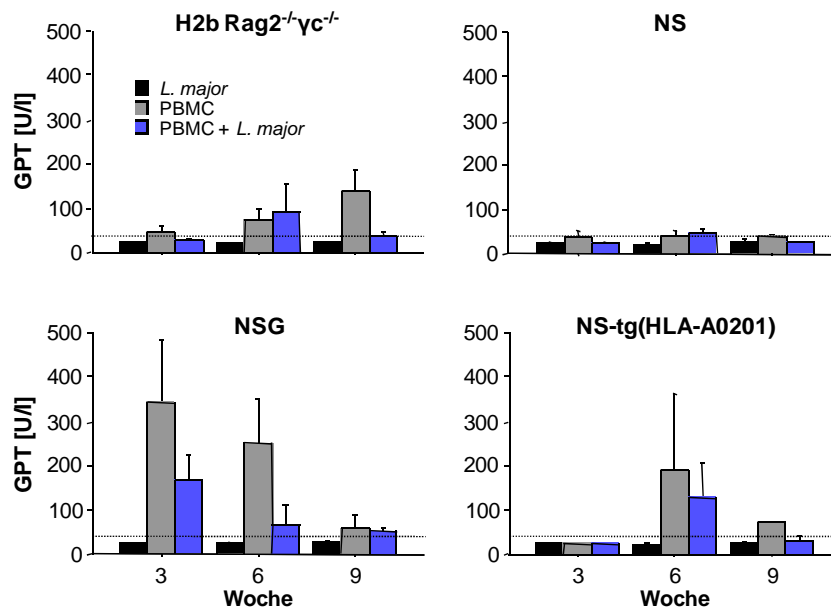


Abb. 38: Einfluss der *L. major*-Infektion und des PBMC-Transfers auf die GPT-Serumwerte. Blutseren der Mäuse wurden in den Wochen 3, 6 und 9 nach Infektion bzw. PBMC-Transfer auf die Konzentration von GPT untersucht. Die verwendeten Mausstämmen sind getrennt aufgetragen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (je Gruppe H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} n=3, NSG n \geq 4, NS \geq 5, NS-tg(HLA-A0201) n \geq 2). Normalwerte liegen bei einer GPT-Serumkonzentration von bis zu 40U/l (siehe Markierung).

Als weiterer Parameter für eine xenogene GvHD ist in Abb. 39 das Überleben der Versuchstiere aufgetragen. Stämme mit $\gamma c^{-/-}$ überlebten nach PBMC-Transfer seltener (nur 33% der NSG Mäuse in Woche 9). Die ersten Mäuse starben bereits in den ersten 3 Wochen nach Transfer. Ein Versterben von Mäusen der Stämme NS und NS-tg(HLA-A0201) trat hingegen erst später auf. Die ersten PBMC-transferierten Tiere verstarben in Woche 5. Erhielten diese Stämme zusätzlich in Woche 3 und 6 PBMC, verstarben die Tiere früher und im Fall von NS häufiger als nach einmaligen PBMC-Transfer. Das Überleben ist im beobachteten Zeitraum unabhängig von einer zusätzlichen Infektion.

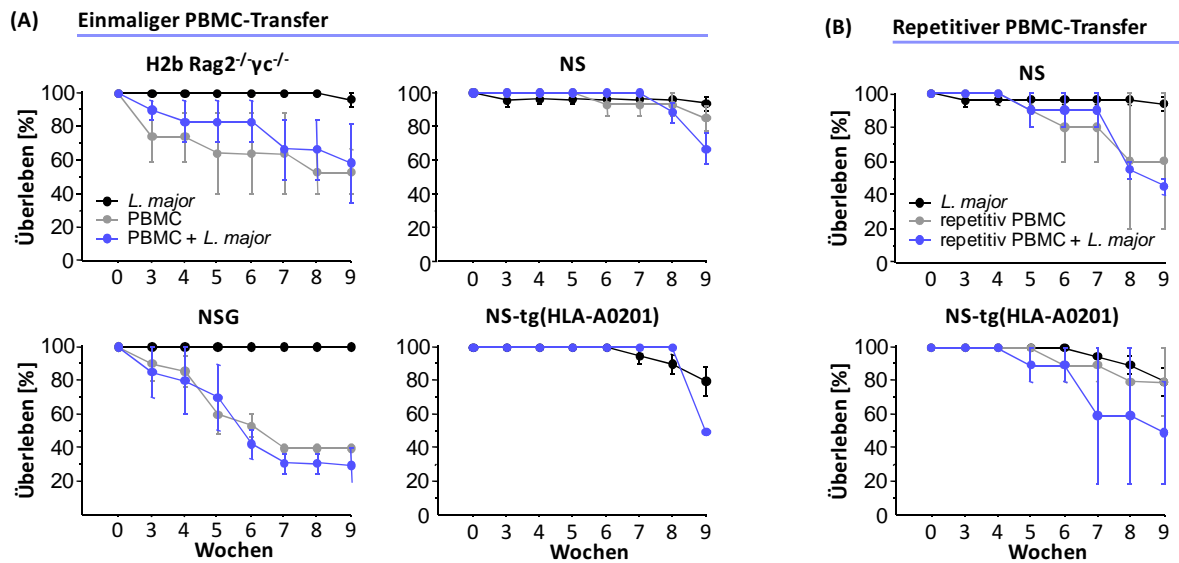


Abb. 39: Überleben immundefizienter Mäuse nach PBMC-Transfer und Infektion. Zu sehen sind die Überlebenskurven nach i.p. Transfer von PBMC über 9 Wochen. Hierbei geht sowohl spontanes Versterben als auch das Abtöten der Tiere nach mehr als 20% Körpergewichtsverlust in die Abbildungen ein. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM. (A) Die Mäuse erhielten 50×10^6 PBMC zum Zeitpunkt der Infektion (Rag2^{-/-}γc^{-/-}: je Gruppe 14-25 Tiere, n \geq 2; NSG: je Gruppe 21-31 Tiere, n \geq 4; NS: je Gruppe 19-66 Tiere, n \geq 6; NS-tg(HLA-A0201): je Gruppe 4-20 Tiere, n \geq 1). (B) Neben 50×10^6 PBMC zum Zeitpunkt der Infektion wurden in Woche 3 und 6 10×10^6 bzw. 5×10^6 PBMC des gleichen Spenders transferiert (NS: je Gruppe 8-66 Tiere, n \geq 2; NS-tg(HLA-A0201): je Gruppe 10-20 Tiere, n \geq 2).

3.3.7.1 Applikation von gp120

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die auftretende xenogene GvHD die gewünschte antigenspezifische Antwort der transferierten PBMC beeinflusst oder verschleiert. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten überprüft, ob die GvHD durch die Behandlung der Mäuse mit dem Glykoprotein gp120 unterdrückt werden kann. Dieses Hüllprotein des HI-Virus aktiviert die in den PBMC enthaltenen (negativ) regulatorischen T-Zellen (Tregs). Es wurde gezeigt, dass eine solche Behandlung in neonatalen NS Mäusen, in denen durch PBMC-Transfer eine GvHD induziert werden kann, zur dauerhaften Unterdrückung der GvHD führt¹³⁶. NSG Mäuse sind für die xenogene GvHD am anfälligsten und wurden deshalb für diesen Versuch gewählt. Die Tiere erhielten 50×10^6 PBMC. Die entsprechenden Gruppen erhielten zudem $5 \mu\text{g}$ gp120/Maus i.p. Einige Tiere wurden zusätzlich infiziert. Die gp120-Applikation wurde in Woche 3 und 6 wiederholt. Infizierte Mäuse ohne PBMC-Transfer dienten als Kontrolle. Die Läsionskurven der Gruppen PBMC + *L. major* und PBMC + *L. major* + gp120 zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Läsionsvolumina (Abb. 40A). 100% der ausschließlich infizierten Tiere lebten noch zum Zeitpunkt des Versuchsendes in Woche 9 (Abb. 40B). Dagegen überlebten nur 20 bzw. 40% der PBMC-transferierten Tiere ohne gp120-Gabe. Die Überlebensrate nach gp120-Applikation lag auffällig höher (60% in Woche 9). Die gemessenen GPT-Werte bestätigten die Überlebenskurve.

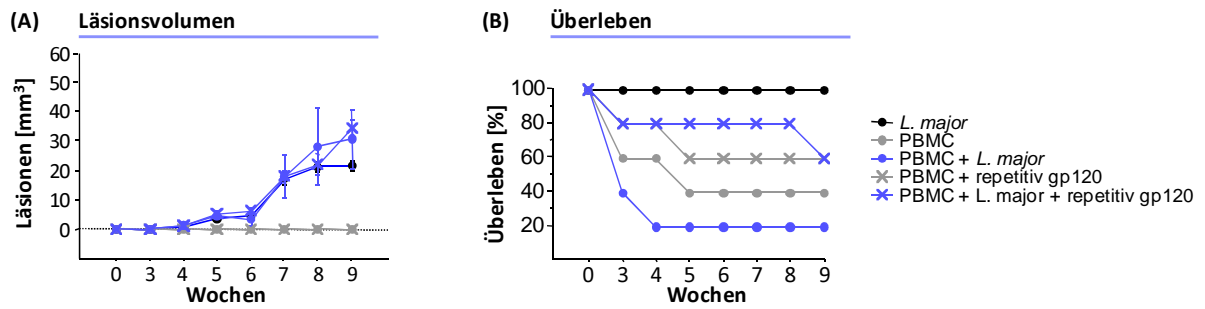


Abb. 40: Einfluss von gp120 auf das Läsionsvolumen und das Überleben bei NSG Mäusen. NSG Mäuse erhielten einen Transfer von 50×10^6 PBMC und wurden mit *L. major* infiziert. Die indizierten Gruppen erhielten zudem i.p. gp120 ($5 \mu\text{g}/\text{Maus}$ zusammen mit den PBMC, sowie in Woche 3 und 6; 5 Tiere je Gruppe; $n=1$). (A) Die Läsionsvolumina sind über den Zeitverlauf dargestellt (arithmetische Mittelwerte \pm SEM). (B) Das Überleben der Mäuse ist in Prozent der Ausgangstierzahl je Gruppe aufgetragen.

Abb. 41 zeigt die GPT-Werte der Mäuse des gleichen Experimentes mit und ohne gp120 Transfer. Es wird deutlich, dass vor allem Tiere mit hohen GPT-Werten bis zur nächsten GPT-Bestimmung verstarben. Insbesondere in Woche 3 waren hohe GPT-Werte nachweisbar.

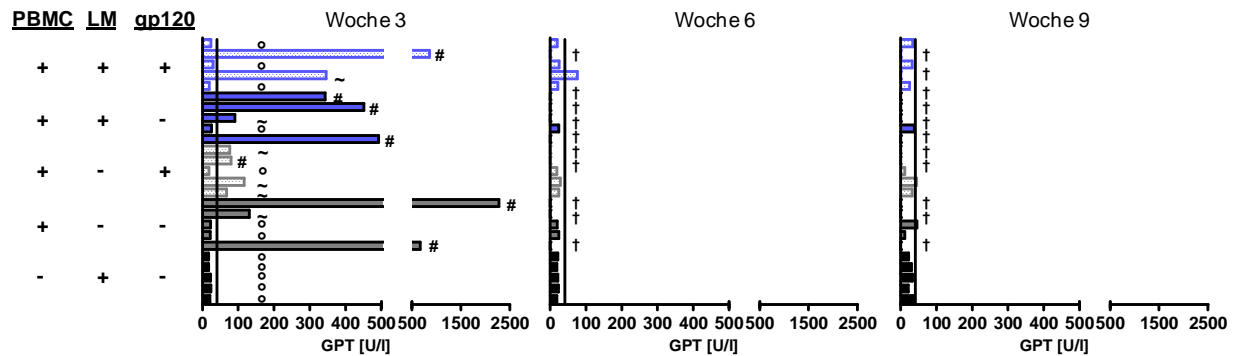


Abb. 41: GPT-Serumwerte nach repetitiver Behandlung mit gp120. Die GPT-Konzentration wurde in den Wochen 3, 6 und 9 in Blutserumproben der Mäuse bestimmt. Die Mäuse wurden wie angegeben behandelt (50×10^6 PBMC, 1×10^3 *L. major* (LM), $5 \mu\text{g}$ gp120/Maus in Woche 0, 3 und 6). Jeder Balken repräsentiert den Serumwert einer Maus. Verstorbene Mäuse sind gekennzeichnet (†). Normalwerte liegen bei einer GPT-Serumkonzentration von bis zu $40 \text{U}/\text{l}$ (siehe Linie). ° markiert Mäuse mit $<3\%$, ~ Mäuse mit $>20\%$ humanen $\text{CD}45^+$ Zellen im Blut (Woche 3). Mäuse markiert mit # verstarben in Woche 3 noch von der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils humaner $\text{CD}45^+$ Zellen im Blut.

3.3.7.2 Reduktion der PBMC Zahl

Eine hohe Zahl transferierter PBMC erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass diese xenoreaktive T-Zellen beinhalten. Eine Reduktion der Zellzahl wiederum verringert die Zahl potentiell *L. major*-spezifischer T-Zellen. Um dennoch zu überprüfen, ob eine reduzierte Zahl an PBMC die gleichen Effekte auf die Läsionsgröße hat und gleichzeitig die xenogene GvHD verringert, wurde Gruppen infizierter NSG Mäuse neben 50×10^6 auch 10 , 5 oder 1×10^6 PBMC transferiert. Die beobachteten Läsionen unterscheiden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant (Abb. 42). Jedoch weisen Mäuse mit 5×10^6 PBMC eine deutlich erhöhte Überlebensrate auf. In der Gruppe mit 1×10^6 Zellen überlebten sogar 100% der Mäuse über 9 Wochen. Anhand von Tabelle 3 wird deutlich, dass bei NSG Mäusen ein Transfer von 1×10^6 PBMC ausreicht, um in Woche 9 bei 75% der Tiere mehr als 10% humane $\text{CD}45^+$ Zellen in der Milz vorzufinden. Eine Rekonstitution mit mindestens 1% humanen $\text{CD}45^+$ Zellen in der Milz konnte in 100% der NSG Mäuse mit einem Transfer von 1×10^6 PBMC erreicht werden.

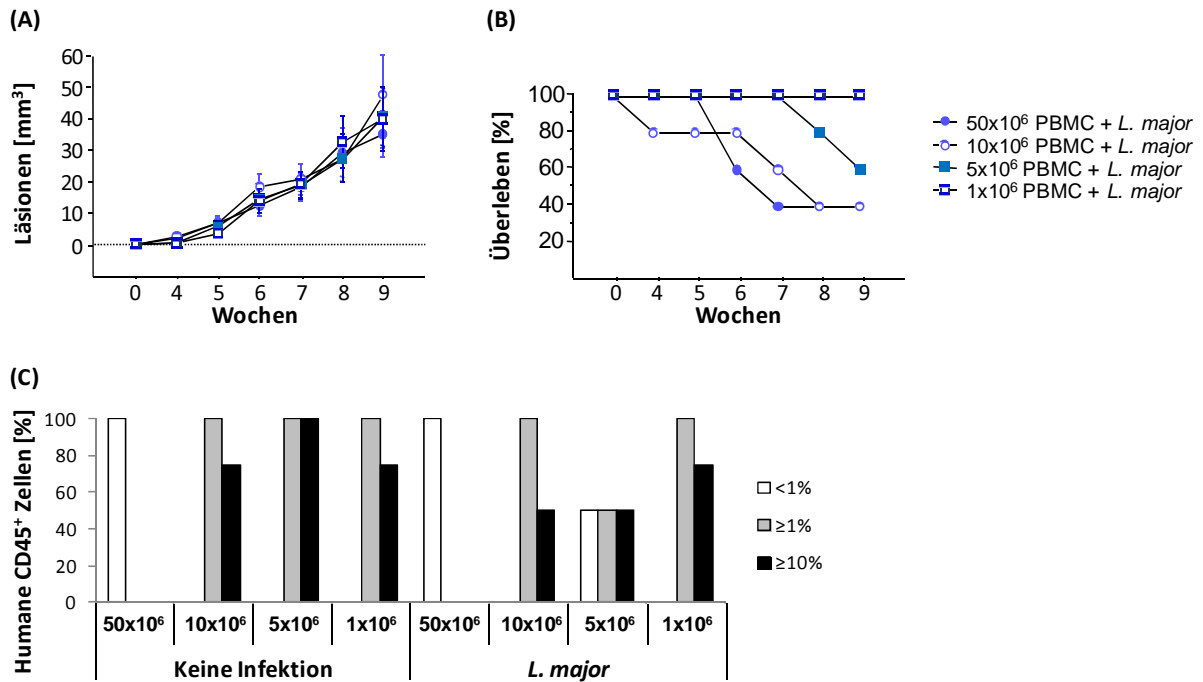


Abb. 42: Auswirkungen der PBMC-Zahl auf Läsionsgröße, Überleben und Rekonstitution. NSG Mäuse wurden mit *L. major* infiziert und erhielten i.p. 50x10⁶, 10x10⁶, 5x10⁶ oder 1x10⁶ PBMC. (A) Die entstehenden Läsionen sind dargestellt als Mittelwert ±SEM. (B) Das Überleben der Mäuse ist in Prozent der Ausgangstierzahl je Gruppe aufgetragen. (C) Der Rekonstitutionserfolg dieses Experimentes ist als Anteil humanes CD45⁺ Leukozyten in der Milz 9 Wochen nach PBMC-Transfer dargestellt. Es wurden nur die in Woche noch lebenden Tiere mit PBMC-Transfer sowie PBMC-Transfer und Infektion in diese Auswertung einbezogen. Die Zahl zu diesem Zeitpunkt lebender Tiere der jeweiligen Gruppen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Anzahl in Woche 9 lebender Mäuse nach PBMC-Titration. Die Mäuse wurden anhand des Anteils humaner CD45⁺ Zellen in der Milz in Gruppen eingeteilt.

	Stamm: NSG		
	<1%	≥1%	≥10%
PBMC (50x10 ⁶)	(2)	(0)	(0)
PBMC (50x10 ⁶) + <i>L. major</i>	(1)	(0)	(0)
PBMC (10x10 ⁶)	(0)	(4)	(3)
PBMC (10x10 ⁶) + <i>L. major</i>	(0)	(2)	(1)
PBMC (5x10 ⁶)	(0)	(4)	(4)
PBMC (5x10 ⁶) + <i>L. major</i>	(1)	(1)	(1)
PBMC (1x10 ⁶)	(0)	(4)	(3)
PBMC (1x10 ⁶) + <i>L. major</i>	(0)	(4)	(3)

3.3.8 Xenotransplantation und Etablierung von *L. major*-Infektionen in humanen Hauttransplantaten

Eine verbesserte Imitation der humanen Erkrankung und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für effektive Antigenpräsentationen ließe sich durch die Infektion humaner Haut erreichen, dem tatsächlich in der humanen Erkrankung infizierten Gewebe. Um das zu ermöglichen, wurde gesunde Spenderhaut auf Mäuse der immundefizienten Stämme NS und NSG transplantiert und nach dem Ausheilen der Wunde das humane Hauttransplantat infiziert. Die Infektion erfolgte zur Etablierung mit 2×10^5 Parasiten. Zusätzlich wurden einigen Tieren allogene PBMC transferiert. 3 Wochen nach Infektion erfolgten Biopsien der humanen Haut (Abb. 43).

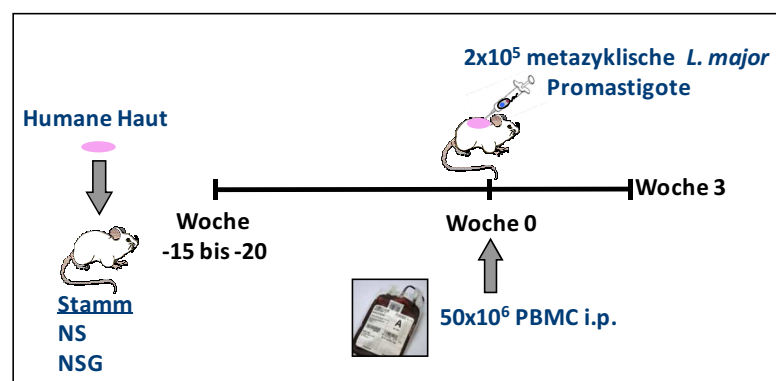


Abb. 43: Versuchsaufbau der experimentellen Infektion humaner Haut. Humane Haut ohne Unterhautfettgewebe wurde auf NS und NSG Mäuse transplantiert. Nach dem Ausheilen der Wunde wurden die Mäuse mit 2×10^5 *L. major* infiziert und allogene humane PBMC transferiert. 3 Wochen nach Infektion wurden die Transplantate entnommen und in Formalin konserviert.

Die Biopsien wurden in Formalin konserviert und mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Unter dem Mikroskop war nach Infektion ein deutliches perivaskuläres, inflammatorisches Infiltrat zu erkennen (Woche 3; Abb. 44). In 400-facher Vergrößerung zeigte sich deutlich die erfolgreiche Infektion des Transplantats in Form von gruppenweise in Histozyten vorliegenden, amastigoten *L. major*. Die Anordnung der Parasiten lässt auf eine intrazelluläre Lokalisation schließen.

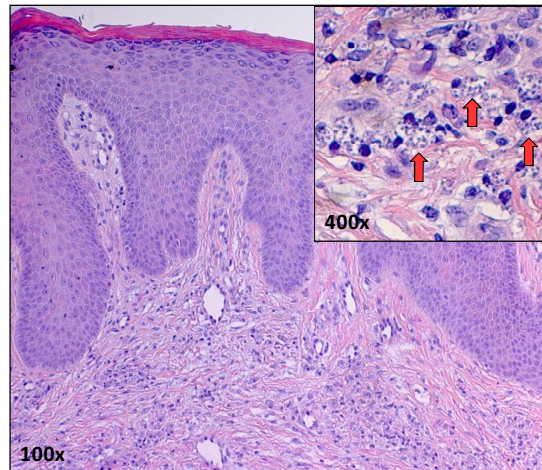


Abb. 44: Infiziertes humanes Transplantat 3 Wochen nach Infektion. 3 Wochen nach Infektion wurde eine Biopsie des Transplantats entnommen und gefärbt. Zu sehen ist eine HE-Färbung in 100-facher Vergrößerung. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die vorhandenen Parasiten, verdeutlicht durch Pfeile (400-fache Vergrößerung). Es ist ein repräsentatives Präparat gezeigt.

Bereits vor der Transplantation waren in der Spenderhaut humane $CD45^+$ Zellen nachweisbar (Abb. 44A+C). Dabei handelte es sich unter anderem um $CD3^+$ T-Zellen (Abb. 45B). Sowohl vor als auch nach Infektion waren in den Transplantaten humane $CD45^+$ Leukozyten zu erkennen (rot). Humane T-Zellen waren zu beiden Zeitpunkten nur wenige zu finden (Abb. 45B+D). Wurden mit der Infektion zusätzlich i.p. PBMC transferiert, waren in NSG Mäusen in Woche 3 signifikant erhöhte Zahlen humaner $CD45^+$ Leukozyten nachweisbar. Es handelte sich dabei Großteils um $CD3^+$ T-Zellen. Die Zahl humaner $CD45^+$ Leukozyten in NS Mäusen war nicht auffällig erhöht. Es war jedoch ein leichter Anstieg der $CD3^+$ T Zellzahl zu erkennen.

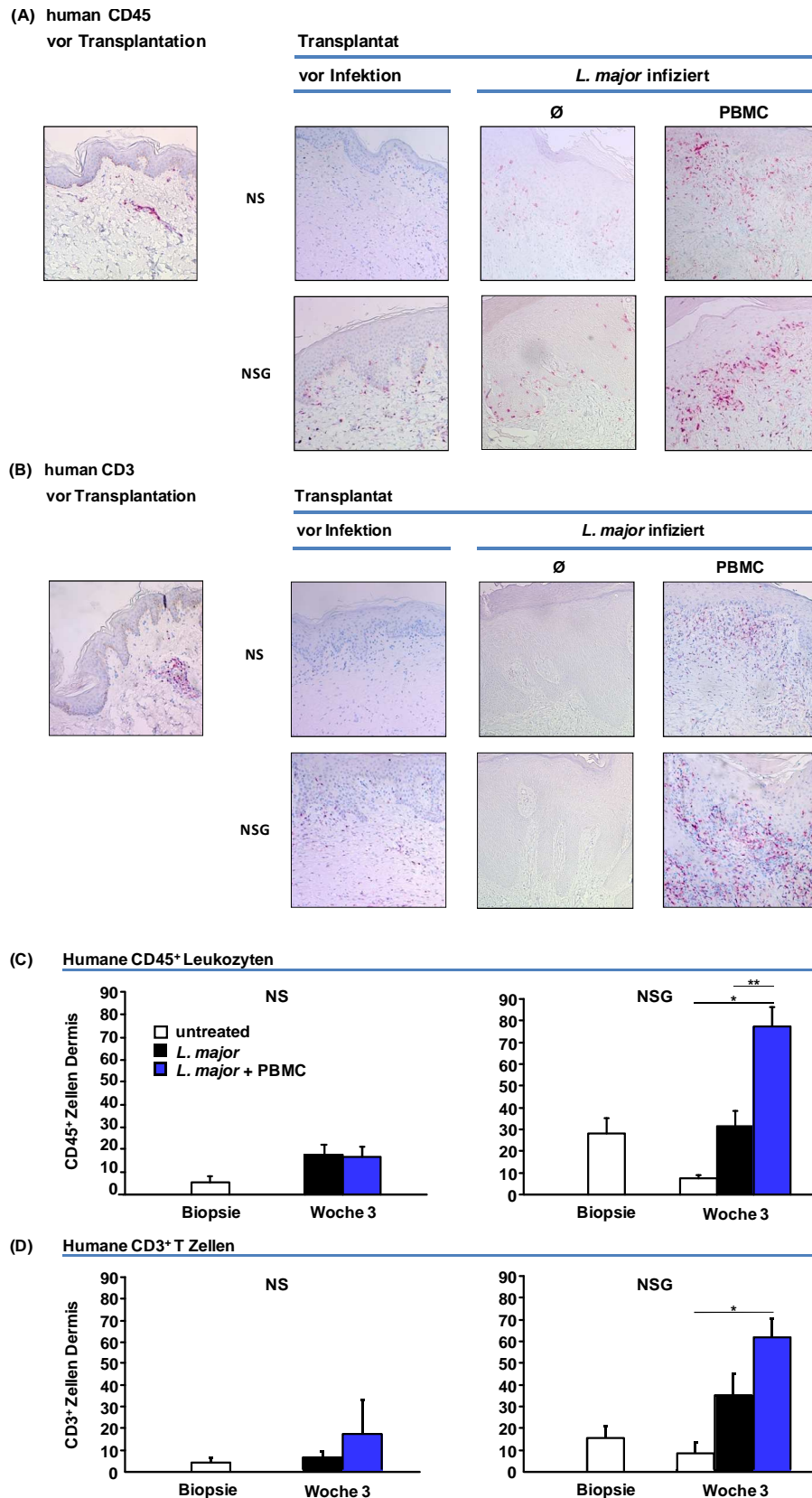


Abb. 45: Nachweis humaner Zellen in infizierten Transplantaten. 3 Wochen nach PBMC-Transfer und Infektion des Transplantats wurden die Transplantate entnommen und immunhistologisch mit Antikörpern gegen humanes CD45 und CD3 gefärbt. (A+B) Dargestellt sind repräsentative Schnitte in 100-facher Vergrößerung (n=2). (C+D) Die durchschnittlichen Zellzahlen pro Gesichtsfeld von 2-16 Schnitten/Gruppe sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n=1 unabhängige Experimente, * p<0,05, ** p<0,005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl in den Ohren von immundefizienten Mäusen wie auch in humanen Hauttransplantaten durch die intradermale Inokulation von promastigoten *L. major* Infektionen mit diesem Parasiten etablieren werden können, wobei alle Stämme einen progressiven Krankheitsverlauf zeigen. Zusätzlich transferierte humane Zellen sind in der Lage, in den getesteten Mausstämmen zu überleben und in das lymphatische Organ Milz und an die Infektionsorte zu wandern und somit potentiell anti-*Leishmania*-Immunantworten auszulösen. Nachweisbar sind insbesondere humane CD3⁺CD4⁺ Th-Zellen und CD3⁺CD8⁺ Tc-Zellen. Antigen-spezifische Antworten konnten vereinzelt in gut rekonstituierten Mäusen induziert werden. Die Rekonstitution nach PBMC Transfer ist noch variabel und induziert in einigen Fällen GvHD. Diese ist jedoch durch die Applikation von gp120 und durch den Transfer von weniger PBMC erfolgreich verzögerbar.

4 Diskussion

Eine der wichtigsten Funktionen der Haut ist es, den Organismus vor Pathogenen wie z.B. dem Parasiten *L. major* zu schützen. Nach der Inokulation dieses Erregers in die Haut tötet das Komplementsystem innerhalb weniger Minuten 90% der Parasiten ab¹³⁷. Die überwiegende Zahl an Inokulationen führt deshalb zu keiner erfolgreichen Wirtsinfektion¹³⁸. Sind die Parasiten jedoch in der Lage, MΦ zu infizieren, wird deren Aktivierung durch *Leishmania* aktiv unterdrückt. Das angeborene Immunsystem kann die Infektion nicht mehr erfolgreich zu bekämpfen. Der obligat intrazellulär vorliegende Erreger ist für Antikörper nicht erreichbar, weshalb eine humorale Immunantwort des adaptiven Immunsystems bei *L. major*-Infektionen nicht zur Heilung führt. Nur eine Th1-/Tc1-Antwort kann infizierte MΦ dazu aktivieren, die intrazellulären Parasiten abzutöten. Aus diesem Grund ist die T-Zelldifferenzierung ein entscheidender Schritt in der Parasitenabwehr und die richtige T-Zellantwort für die Heilung unerlässlich. Die Analyse dieser Antworten und der durch sie ausgelösten Mechanismen ist von enormer Bedeutung für das Verständnis der Erkrankung und die Entwicklung eines Vakzins.

Diese Arbeit ist in die folgenden Teilprojekte gegliedert:

- Identifizierung der Relevanz des genetischen Hintergrundes von T- und B-Zellen aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen bei *L. major* Infektionen
- Analyse des Krankheitsverlaufs, der Zellzusammensetzung und der T-Zellantworten in C57BL/6 Mäusen mit fehlendem TNF-R1- und CD40-assoziiertem Molekül FAN
- Etablierung eines PBMC-Transfermodells zur *in vivo*-Untersuchung humaner T-Zellantworten bei kutaner Leishmaniasis und zur Nutzung als präklinisches Testsystem

4.1 Genetische Determinierung des Phänotyps von *L. major*-Infektionen in Mäusen

Über Suszeptibilität oder Heilung einer *L. major*-Infektion entscheidet im Menschen wie in der Maus neben dem Immunstatus der genetische Hintergrund des Erkrankten¹³⁹⁻¹⁴¹. Welche Genloci oder Zellpopulationen den Krankheitsverlauf bestimmen, wird nach wie vor noch diskutiert.

Mit Ausnahme der strahlungsresistenten Langerhans-Zellen rekonstituieren Knochenmarkschimären vollständig mit einem Immunsystem des genetischen Hintergrundes des transferierten Knochenmarks. Suszeptible Mäuse, die einen Transfer von Knochenmark resistenter Stämme erhalten (*et vice versa*), verhalten sich in Infektionen mit dem Erreger *Listeria monocytogenes* entsprechend des genetischen Hintergrundes des Empfängertieres, unabhängig vom transferierten Knochenmark¹⁴². Gleiches ist für Infektionen mit einigen, die Atemwege befallenden Viren beschrieben¹⁴³. Ein Krankheitsverlauf entsprechend des genetischen Hintergrundes der Empfängertiere ist jedoch nicht in allen Chimärenmodellen zu beobachten. Das bestätigen Publikationen, in denen Knochenmarkstransfers der H2-kompatiblen Stämme C57BL/6 und BALB/b in den jeweils anderen Stamm durchgeführt und die Mäuse mit *L. tropica* (= *L. major*) infiziert wurden¹⁴⁰. Wurde C57BL/6 Knochenmark transferiert, waren die Mäuse resistent; mit BALB/b Knochenmark rekonstituierte Tiere

reagierten auf *L. tropica*-Infektionen mit progressiver Läsionsentwicklung. Um diese Läsionsverläufe zu erreichen, war also das hämatopoetische System des jeweiligen Stammes ausreichend, unabhängig vom genetischen Hintergrund des Empfängers. Demnach sind, anders als kürzlich beschrieben, die Keratinozyten der Haut nicht die entscheidende Zellpopulation, deren genetischer Hintergrund über den Krankheitsverlauf entscheidet⁴⁶. Übereinstimmend mit den für BALB/b und C57BL/6 publizierten Daten, zeigten in unseren Experimenten radioaktiv bestrahlte, *L. major*-infizierte BALB/c und C57BL/6 Mäuse, die mit dem jeweils anderen Knochenmark rekonstituiert wurden, einen Krankheitsverlauf, der mit dem der Knochenmarksspenderstämme annähernd vergleichbar war. Die für den Krankheitsverlauf entscheidenden Zellpopulationen beider Stämme waren demnach auch hier hämatopoetischen Ursprungs.

Durch Knochenmarkstransfers von BALB/c und C57BL/6 in den jeweils anderen Stamm traten bei einigen Mäusen Symptome einer GvHD auf. Zudem sind aufgrund der natürlichen Resistenz der Empfängermäuse gegen nicht histokompatible Knochenmarkstransfers die Überlebenschancen der transferierten Zellen potentiell eingeschränkt¹⁴⁴. Dies beruht auf der Erkennung allogener hämatopoetischer Histokompatibilitäts (Hh1)-Antigene der Knochenmarkszellen durch Empfänger-Zellen¹⁴⁵. Welche Zellen die daraus resultierende Zytotoxizität vermitteln, ist noch nicht abschließen geklärt. Hinweise legen eine Beteiligung von NK-Zellen (CD3⁺NK1.1⁺), zytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) und NK T-Zellen (NK1.1⁺CD3⁺) nahe^{144;146}. Um die Induktion einer GvHD zu vermeiden und die Abstoßung transferierten Knochenmarks zu umgehen, verwendeten wir für weitere Transfers BALB/c x C57BL/6 F1 Mäuse. Es ist bekannt, dass bereits 8 Tage nach Bestrahlung der Mäuse und anschließendem Transfer von 5×10^6 Knochenmarkszellen aus C.B-17 Mäusen (T-Zell-defiziente BALB/c Mäuse) in BALB/c x C57BL/6 F1 Empfängertieren koloniebildende Milzzellen nachweisbar sind¹⁴⁴. Diese konnten allerdings nach C57BL/6 Knochenmarkstransfer zum gleichen Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurde bereits zuvor eine Rekonstitution punktuell bestrahlter Knochen von BALB/c x C57BL/6 F1 Mäuse nach C57BL/6 Knochenmarkstransfer erreicht¹⁴⁷. Allerdings lassen die Autoren offen, ob es sich bei den anwachsenden Zellen tatsächlich um C57BL/6 Zellen handelt. Benett et al. zeigen, dass die von ihm getesteten F1-Hybride transferierte Knochenmarkszellen der parentalen Stämme nicht abstoßen¹⁴⁸. So stieß keiner der Mausstämme Knochenmarkszellen aus B10.D2-Mäusen (K^bI^bS^b/D^{dml}-positiv) ab. Gleiches gilt für Knochenmarkszellen aus F1-Hybriden von B10.D2 gekreuzt mit jedem anderen getesteten Mausstamm. Allerdings akzeptieren nicht alle F1-Hybrid-Empfängermäuse das parentale Knochenmark. Diese trotz vorheriger Bestrahlung vorwiegend NK-Zell-vermittelte Abstoßung transferierten, parentalen Knochenmarks wird als Hybridresistenz bezeichnet. F1-Hybride sollten Gewebetransplantate beider Eltern ohne Abstoßungsreaktion akzeptieren. Transfers von Knochenmark nehmen allerdings eine Sonderstellung ein. Als erste Ausnahme von dieser Regel wurde die Abstoßung von C57BL/6 Knochenmark durch C57BL/6 x C3H F1 Mäuse beschrieben¹⁴⁵. Bereits 1964 wurde publiziert, dass der Genlocus der Hh1-Antigene innerhalb oder in der Nähe des H2-Genkomplexes liegen muss. Die Mechanismen der Hybridresistenz sind noch nicht vollständig geklärt. Jedoch werden die Hh1-kodierten Gene anders als die in diesem Zusammenhang ebenfalls relevanten MHC Klasse I-Moleküle nicht kodominant sondern je nach Allel dominant oder rezessiv vererbt¹⁴⁶. Dadurch können abhängig vom genetischen Hintergrund der Eltern unterschiedliche Hh1-Gene in den F1-Hybriden zur Ausprägung kommen. Yu et al. beschreiben als eine Methode zur Bestimmung des Akzeptanz des transferierten Knochenmarks die Beobachtung des Langzeitüberlebens der Mäuse (> 30 Tage). Legt man diese einfache Methode zugrunde, war in unseren Experimenten der Transfer von BALB/c und C57BL/6 Knochenmark und die Rekonstitution der Mäuse erfolgreich. Zudem konnten nach 6 Wochen im peripheren Blut durchflusszytometrisch in allen Mausstämmen hämatopoetische Zellen, unter anderem CD4⁺

und CD8⁺ Zellen, nachgewiesen werden. Die Rekonstitution dieser Tiere war in unseren Händen also möglich.

Nach Infektion zeigten unbehandelte BALB/c x C57BL/6 F1 Mäuse den in der Literatur beschriebenen intermediären Phänotyp, wobei sowohl abheilende Läsionen, progressiver Verlauf als auch nicht ausheilende Läsionen beobachtet werden konnten. Diese divergierenden Ergebnisse bei unbehandelten BALB/c x C57BL/6 F1 Mäusen wurden bereits beschrieben, wobei die Infektion letztendlich tödlich verläuft¹⁴⁹. Die Determinierung des Krankheitsverlaufs bei *L. major*-Infektionen durch den genetischen Hintergrund der hämatopoetischen Zellen, die sich bereits bei Transfers in BALB/c und C57BL/6 Mäuse andeutete, konnte in unseren Experimenten auch in BALB/c x C57BL/6 F1 Mäuse gezeigt werden. Der genetische Hintergrund des hämatopoetischen Systems entschied über Heilung oder progressiven Verlauf.

Es sind eine Reihe von genetisch bedingten Unterschieden zwischen beiden Mausstämmen auf der Ebene der DCs bekannt^{29;36;37;39;40}. Um zu überprüfen, wie wichtig der Effekt der antigenpräsentierenden Zellen tatsächlich ist, nutzen wir ein Knochenmarksmodell, in dem sich nur die T- und B-Zellen aus entweder C57BL/6 oder BALB/c Knochenmark entwickeln. Damit waren wir in der Lage, die Unterschiede bei *L. major*-Infektionen in C57BL/6 und BALB/c Mäusen auf den Hintergrund der lymphoiden Zellen einzugrenzen. Eine Ausnahme bildeten die NK-Zellen, die keine Aktivierung durch DCs benötigen. Allerdings zeigten die Experimente der hier vorgelegten Arbeit, dass diese zumindest bei der Rekonstitution von BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1 Mäusen mit eigenem und zusätzlich C57BL/6 CD45.1 Knochenmark aus dem Knochenmark mit dem genetischen Hintergrund der Empfängermaus differenzieren. Geht man davon aus, dass gleiches in Mäusen mit BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1 + BALB/c Knochenmark geschieht, war in beiden Fällen der genetische Hintergrund der NK-Zellen identisch und deshalb der Effekt nicht auf sie zurückzuführen. Das bleibt jedoch zu zeigen. Myeloide Zellen als Ursache für die Unterschiede konnten ebenfalls ausgeschlossen werden. In den Experimenten differenzierten diese zu nahezu 100% aus Knochenmark mit dem genetischen Hintergrund BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1. Es kann derzeit jedoch noch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob möglicherweise die Rekonstitution mit gemischtem Knochenmark unterschiedlicher genetischer Hintergründe einen Einfluss auf die Entwicklung der hämatopoetischen Zellen und damit ihrer Funktionalität nimmt.

Zusammenfassung und Ausblick

Die vorgelegten Daten zeigen, dass das hämatopoetische System unabhängig vom genetischen Hintergrund der Stromazellen den Verlauf von *L. major*-Infektionen determiniert. Erstmals wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass alleine der genetische Hintergrund der Zellen des adaptiven Immunsystems in gemischten Knochenmarkschimären ausreichend ist, um den typischen Krankheitsverlauf des jeweiligen Stammes zu vermitteln. Um zu untersuchen, ob neben den phänotypischen Auswirkungen auf die Läsionsgröße auch die aus WT-Tieren bekannten T-Zell-Zytokinprofile (Th1/Tc1 oder Th2) und Parasitenlasten zu beobachten sind, müssen noch weitere Experimente durchgeführt werden. Insbesondere der Nachweis der entsprechenden T-Zell-Zytokinprofile in diesen Tieren wäre ein Hinweis auf eine mit Wildtyptieren vergleichbaren Funktionalität dieser Zellen. Weitere Knochenmarkskombinationen bieten zudem die Möglichkeit, genauer einzugrenzen, welche lymphoiden Zellpopulationen für die Ausprägung des Krankheitsphänotyps verantwortlich sind. Zunächst muss untersucht werden, ob in BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} Mäusen, rekonstituiert mit BALB/c Rag1^{-/-} Knochenmark und T- und B-Zellen aus C57BL/6 (oder

BALB/c) Mäusen, nach Infektion ein vergleichbarer Phänotyp zu sehen ist wie in Mäusen, die mit BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} Knochenmark rekonstituiert wurden und nur T- und B-Zellen aus C57BL/6 (oder BALB/c) Mäusen besitzen. Eine weitere Eingrenzung der für den Phänotyp ausschlaggebenden Zellpopulation ist durch gemischte Knochenmarkschimären unter Verwendung von überwiegend β̄δ̄ C57BL/6 Knochenmark mit einem geringen Anteil an BALB/c Knochenmark erreichbar, aus den sich potentiell ausschließlich BALB/c T-Zellen entwickeln. γ̄δ̄-T-Zellen als Determinanten des Krankheitsverlaufes lassen sich unter Verwendung von δ̄ C57BL/6 Knochenmark mit einem Anteil an BALB/c Knochenmark identifizieren. Auch eine Identifizierung von B-Zellen als Auslöser des Phänotyps ist durch Verwendung von JHT⁻ Knochenmark mit und ohne einem Anteil an WT-Knochenmark durchführbar. Dieses Experiment ist besonders interessant, da es bereits Hinweise auf eine negative Rolle von BALB/c B-Zellen auf die Resistenz gegen *L. major*-Infektionen gibt¹⁵⁰.

4.2 Die Rolle des Adapterproteins FAN in der murinen Leishmaniasis

Eine wichtige Rolle in der Abwehr intrazellulärer Parasiten wie *L. major* wird dem Zytokin TNF zugeschrieben. Nach der Aktivierung infizierter MΦ durch IFN-γ, sekretiert von Th1- oder Tc1-Zellen, kommt es, vermittelt durch TNF-Bindung, zur Produktion von NO²⁻ und damit zum Abtöten intrazellulärer Parasiten⁵². FAN ist hier an der intrazellulären Signalweiterleitung am TNF-R1 beteiligt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit der Krankheitsverlauf von FAN^{-/-} Mäusen nach Infektion mit *L. major* untersucht. Die Zusammensetzung lymphoider Organe ist in gesunden FAN^{-/-} Mäusen zunächst unauffällig⁷⁶. Auch die NF-κB vermittelte Genexpression ist nicht verändert¹⁵¹.

Um die Datengrundlage der folgenden Diskussion nochmals zu verdeutlichen, fasst Tabelle 4 die wichtigsten der bisher präsentierten Daten zusammen und stellt sie Literaturdaten relevanter Mausstämmen gegenüber.

Tabelle 4: Vergleich von Mausstämmen mit TNF-assoziierten Knock Outs. Die Tabelle enthält die im Rahmen dieser Arbeit erhobene Ergebnisse und Literaturdaten zu *L. major*-Infektionen relevanter Mausstämmen, wobei verwendete Parasitenzahlen und Infektionsstellen nicht zwangsläufig übereinstimmen. Die mit * gekennzeichneten Spalten enthalten Daten aus den Publikationen^{58;60;61;152}. Veränderungen, ausgedrückt durch Pfeile, sind als relativ zum jeweiligen Wildtypstamm zu verstehen (↑ bezeichnet leicht veränderte Werte, ↑↑/↓↓ = deutlich bzw. signifikant veränderte Werte, - = Werte nicht auffällig).

		FAN ^{-/-}	TNF ^{-/-} *	TNF-R1 ^{-/-} *	TNF-R2 ^{-/-} *	TNF-R1/2 ^{-/-}	TNF-R1/2 ^{-/-} *
Hintergrund		C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6 x129	C57BL/6	C57BL/6 x129
Läsionen		↑↑	↑↑	↑↑	-	↑↑ (progressiv)	↑↑ (teilw. abheilend)
Parasitenlast Infektionsort		↑ Wo 9/15		↑↑ (Wo 6/8/13)	-	↑↑ (Wo 6)	↑↑ (Wo 6)
Parasitenlast Milz		↑↑ (Wo 6/15)	↑↑ (Wo 6)			↑↑ (Wo 6)	
Zytokinprofil (rest. Lymphknoten)		Woche	Woche	Woche	Woche		Woche
		6 9 15	3	2 6 >13	2 14		2 14
	IFN-γ	- ↑ ↑	↑↑	↑ ↑ ↑	- ↑		- ↑
	IL-12p40	↓↓ ↓↓ -					
	IL-4	- ↑↑ -		- -	- -		- -
	IL-10	- ↑ -					
IL-6	- - -						
TNF	- - -		- - -				

FAN^{-/-} Mäuse zeigen persistierende Läsionen

C57BL/6 TNF^{-/-} Mäuse versterben rasch nach Infektionen mit *L. major*⁵⁸. Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass Mäuse, denen der TNF-R1 oder zusätzlich TNF-R2 fehlt, nur einen verschlechterten Verlauf in der *L. major*-induzierten kutanen Leishmaniasis gegenüber WT Mäusen aufweisen^{60;61}. Zudem führt bereits das alleinige Fehlen von TNF-R1 zu nicht vollständig ausheilenden, persistierenden Läsionen⁴⁹. Die Ursache ist das fehlende TNF-R1-Signal, für das membrangebundenes TNF relevant zu sein scheint^{152;153}. Übereinstimmend mit diesen Daten konnte hier gezeigt werden, dass Mäuse, denen das intrazellulär an der TNF-R1-Signalweiterleitung beteiligte Molekül FAN fehlt, einen verschlechterten Krankheitsverlauf und nicht ausheilende Läsionen aufweisen. Dieser Verlauf war nicht nur im Hochdosis-Modell sondern auch im physiologisch relevanteren Niedrigdosis-Modell zu beobachten. TNF-Bindung an den TNF-R1, jedoch auch Signale über das CD40 Molekül und damit auch FAN, werden unter anderem mit Zytotoxizität und Apoptoseinduktion assoziiert^{48;73;74;152;154}. In der Literatur wird das nicht vollständige Abheilen der Läsionen bei TNF-R1^{-/-} Mäusen mit einer reduzierten lokalen Apoptose von Lymphozyten in Verbindung gebracht¹⁵². Tatsächlich fanden sich in unseren Experimenten bei FAN^{-/-} Mäusen mit persistierenden Läsionen erhöhte Mengen an IFN- γ in den Überständen restimulierter Lymphknotenzellen. Das ließ auf eine erhöhte Zahl an T-Zellen schließen. Allerdings zeigten sich nur in den Lymphknoten, jedoch nicht an der Infektionsstelle leicht erhöhte T-Zellzahlen. Die dauerhaften Läsionen ließen sich folglich nicht eindeutig einer unkontrolliert weiterlaufenden T-Zellantwort zuschreiben. Eine ineffektive Apoptose weiterer inflammatorischer Zellen war ebenfalls unwahrscheinlich. Die Leukozyten-Gesamtzahl persistierender Läsionen unterschied sich nicht signifikant zwischen FAN^{-/-} und WT Mäusen.

C57BL/6 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse zeigten ab Woche 6 größere Läsionen als FAN^{-/-} Mäuse, was darauf schließen ließ, dass neben der Signalweiterleitung über FAN und damit der Regulation der nSMase2-Aktivität weitere, über die TNF-Rezeptoren ablaufende Signalwege einen Einfluss auf den Verlauf einer kutanen Leishmaniasis nehmen. Interessanterweise verlief die Läsionsentwicklung der C57BL/6 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse in unseren Experimenten progressiv, wohingegen für C57BL/6 x 126 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse ein Verlauf publiziert wurde, in dessen Zuge zwar größere Läsionen als in C57BL/6 WT Tieren auftreten, allerdings setzte nach 9 Wochen ein Abheilen der Läsionen ein⁶⁰. Zu diesem Zeitpunkt waren in unseren Experimenten die Läsionen der C57BL/6 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse bereits aufgebrochen und die Ohren soweit geschädigt, dass die Tiere getötet werden mussten.

Erhöhte Parasitenzahlen in TNF-R1^{-/-}2^{-/-} und FAN^{-/-} Mäusen

Es ist bekannt, dass C57BL/6 TNF-R1^{-/-} Mäuse an der Infektionsstelle signifikant höhere Parasitenzahlen im Vergleich zu WT Mäusen zeigen^{60;61}. C57BL/6x129 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse weisen im Vergleich die höchsten Parasitenlasten auf. In den persistierenden Läsionen ist die Parasitenzahl in beiden Stämmen jedoch nicht höher als bei WT Mäusen. Die Experimente der hier vorliegenden Arbeit zeigten in C57BL/6 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} ebenfalls erhöhte Parasitenlasten im Vergleich zu WT Tieren, allerdings waren diese im verwendeten Niedrigdosis-Modell bereits früher signifikant und in Woche 9 auf dem Niveau von WT Mäusen. Wie sich zeigte, unterschieden sich die in dieser Arbeit eingesetzten C57BL/6 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse im Krankheitsverlauf von dem für C57BL/6 x 129 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse publizierten. Aufgrund des progressiven Verlaufs der Infektion konnten in unseren

Experimenten die C57BL/6 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse nicht als Kontrolltiere zu späten Analysezeitpunkten eingesetzt werden.

Es wurden bereits zuvor FAN^{-/-} Mäuse für Infektionsexperimente mit intrazellulären Erregern verwendet. Dabei wurde gezeigt, dass die Tiere weder Infektionen mit *Toxoplasma gondii* noch *Listeria monocytogenes* oder *Streptococcus pneumoniae* erliegen. Zudem zeigten sich die *Toxoplasma*-Zystenbildung und die *Listeria*-Parasitenlasten in Leber und Milz nicht signifikant verändert¹⁵¹. Interessanterweise konnten wir jedoch zeigen, dass FAN^{-/-} Tiere nach *L. major*-Infektionen signifikante Unterschiede aufweisen. Der Knock Out des Proteins FAN resultiert in einem Anstieg der Parasitenzahl. Der Verlauf der Parasitenzahlen in FAN^{-/-} Mäusen ist mit dem von Vieira et al. für TNF-R1^{-/-} Mäuse publizierten Verlauf vergleichbar⁶¹, wobei in FAN^{-/-} Mäusen eine Verzögerung der Läsionsentwicklung zu beobachten war, die auf die geringere Zahl inokulierter Parasiten zurückzuführen sein dürfte. Zudem konnten wir in persistierenden Läsionen von FAN^{-/-} Mäusen mehr Parasiten nachweisen als in den zum gleichen Zeitpunkt weitgehend ausgeheilten Läsionen der WT Mäuse. Dieser für TNF-R1^{-/-} Mäuse nicht publizierte Effekt könnte ein Hinweis darauf sein, dass die CD40-Assoziation von FAN für die Leishmaniasis ebenfalls eine Rolle spielt.

Neben dem raschen Versterben nach *L. major*-Inokulation ist für C57BL/6 TNF^{-/-} Mäuse eine deutliche Viszeralisierung der Infektion publiziert. Die Parasitenlasten der Milz dieser Tiere entspricht etwa der suszeptibler BALB/c Mäuse⁵⁸. Für C57BL/6 TNF-R1^{-/-} und C57BL/6x129 TNF-R1^{-/-}2^{-/-} wurden bislang keine Viszeralisierungsdaten veröffentlicht, jedoch sind diese Mäuse in der Lage, die Parasitenzahlen an der Infektionsstelle soweit zu kontrollieren, dass es zu keinem Versterben der Mäuse kommt^{60;61}. Die hier untersuchten C57BL/6 FAN^{-/-} und TNF-R1^{-/-}2^{-/-} Mäuse waren dazu ebenfalls in der Lage. Sie zeigten zwar zum Zeitpunkt der größten Läsionen signifikant erhöhte Parasitenlasten in der Milz, insgesamt waren die Parasitenzahlen aber gering. Dass FAN jedoch nicht nur transient sondern dauerhaft Einfluss auf die Kontrolle der Parasitenzahlen und die Viszeralisierung hatte, zeigte sich in signifikant erhöhten Parasitenzahlen persistierender Läsionen.

FAN beeinflusst das Zytokinprofil der Lymphknotenzellen

Es wurde für FAN^{-/-} Mäuse eine im Vergleich zu WT Tieren verringerte Fähigkeit zur IL-6-Sekretion von Fibroblasten nach TNF-Aktivierung und von Peritoneal-MΦ nach LPS-Stimulation mittels ELISA nachgewiesen⁷⁷. In den Experimenten unserer Arbeit zeigte sich jedoch nach LPS-/IFN-γ-Stimulation weder in MΦ noch in DCs eine verminderte Freisetzung von IL-6. Antigen-spezifisch restimulierte Lymphknotenzellen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der IL-6 Expression.

Wie bereits publiziert wurde, sind *L. major*-infizierte TNF-R1^{-/-} Mäuse in der Lage, eine Th1-Antwort zu induzieren, die durch eine IFN-γ-Freisetzung charakterisiert ist^{60;61}. FAN^{-/-} Mäuse zeigen dagegen im Vergleich ein uneinheitliches Bild. Wir konnten erhöhte IFN-γ-Konzentrationen in den Überständen restimulierter Lymphknotenzellen infizierter FAN^{-/-} Mäusen nachweisen. Dieser Effekt war in der akuten Phase der Infektion (Woche 9) und in persistierenden Läsionen zu erkennen und könnte auf eine überschießende Th1-Antwort hindeuten. Jedoch gingen damit eine signifikant erhöhte Freisetzung des Th2-Zytokins IL-4 in der akuten Phase und eine signifikant reduzierte IL-12p40 Expression (Th1-Zytokin) zum gleichen und zum frühesten untersuchten Zeitpunkt einher. Ein Hinweis darauf,

dass dieses Zytokinprofil eine Verschiebung hin zu einer Th2-Antwort verursachte, könnte die erhöhte Zahl an CD19⁺ B-Zellen in FAN^{-/-} Lymphknoten sein.

Veränderte zelluläre Zusammensetzung des Lymphknotens

Gleichzeitig zeigten sich signifikant erhöhte Anteile an CD3⁺CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten von FAN^{-/-} Mäusen. CD4⁺ Th stellen eine wichtige IFN- γ Quelle bei *L. major*-Infektionen dar. Allerdings waren zu allen Zeitpunkten signifikant reduzierte Anteile an CD3⁺CD8⁺ Tc-Zellen nachweisbar, ebenfalls wichtige IFN- γ -Produzenten. In absoluten Zellzahlen traf das jedoch nur für Woche 6 zu, wohingegen dauerhaft mehr CD3⁺CD4⁺ Th-Zellen im Lymphknoten vorlagen. Es zeigten sich Hinweise darauf, dass insbesondere die verringerte CD8⁺ T-Zellzahl auf eine verschlechterte, frühe CD3⁺CD8⁺ T-Zellproliferation zurückzuführen war. Als Ursache hierfür kommt die CD40 Assoziation von FAN in Frage. CD40 wird als kostimulatorisches Molekül von DC, M Φ sowie B-Zellen exprimiert und aktiviert nach Stimulation diese Zellen. Sein Ligand CD40L wird auf T-Zellen exprimiert. Es ist bekannt, dass CD40L-exprimierende CD8⁺ T-Zellen CD8 α ⁺ DCs dazu veranlassen, IL-12p70 zu produzieren¹⁵⁵. Diese durch CD40-Stimulation induzierte IL-12-Freisetzung spielt bei *L. major*-Infektionen eine wichtige Rolle¹⁵⁶. Eine ineffektive CD40-Signalweiterleitung nach Bindung mit CD40L, resultierend in einer verringerten Aktivierung von DCs und damit von T-Zellen, könnte die Folge sein. Eine stimulierende Wirkung von FAN auf die Induktion einer humoralen Antwort wurde bereits beschrieben¹⁵¹.

Eine IFN- γ -Freisetzung durch NK-Zellen ist insbesondere in den ersten beiden Wochen einer *L. major*-Infektion für die anti-Leishmanien-Reaktivität und Th1-Polarisierung während der T-Zelldifferenzierung wichtig^{157;158}. Dennoch ist interessant, dass sowohl in Woche 6 als auch in Mäusen mit persistierenden Läsionen ein signifikant geringerer Anteil an CD49b⁺ Zellen in den Lymphknoten zu finden war. Ob diese Zellen auch in den relevanten ersten Wochen nach Infektion reduziert sind, bleibt noch zu prüfen. Zudem zeigte sich, dass CD49b keinen optimalen Marker für NK-Zellen darstellt. In zukünftigen Experimenten müssen geeignetere Marker wie z.B. NK1.1 zur NK-Zellmarkierung eingesetzt werden.

Die Freisetzung von IL-12p40 durch DCs ist ein wichtiger Schritt zur Induktion einer protektiven Th1-Antwort^{26;38}. Die reduzierten Konzentrationen an IL-12p40 in unseren Experimenten gingen nicht wie erwartet mit reduzierten Anteilen an DCs in den Lymphknoten einher. Ganz im Gegenteil waren in FAN^{-/-} Mäusen in der akuten Phase und in Mäusen mit persistierenden Läsionen höhere Prozentsätze an CD11c⁺MHCII⁺ DCs zu finden als in WT Lymphknoten. In den absoluten Zahlen zeigte sich das gleiche Bild. Eine verringerte phagozytische Aktivität von FAN^{-/-} DCs konnten wir anhand von BMDCs *in vitro* als Ursache der reduzierten IL-12p40-Expression ausschließen. Interessanterweise produzierten *in vitro* infizierte DCs keine auffällig geringeren Mengen an IL-12p40, allerdings leicht erhöhte Mengen an IL-4 im Vergleich zu WT BMDCs. In FAN^{-/-} Mäusen mit persistierenden Läsionen war die verringerte IL-12p40-Expression wie auch die erhöhte IL-4-Freisetzung nicht mehr zu beobachten. Dagegen blieb die IFN- γ -Freisetzung höher als in WT Mäusen. Das legte die Vermutung nahe, dass FAN transient in den ersten Wochen der Infektion bei der Induktion oder Aufrechterhaltung einer Th1-Antwort eine Rolle spielt.

Die zelluläre Zusammensetzung der Infektionsstelle ist ebenfalls verändert

Es wurde bereits gezeigt, dass die Rekrutierung von $CD11b^+F4/80^+$ M Φ 4 Stunden nach i.p. Injektion von humanem TNF in $FAN^{-/-}$ Mäusen verringert ist¹⁵¹. Die Experimente der hier vorliegenden Arbeit zeigten zu deutlich späteren Zeitpunkten ähnliche Ergebnisse. Waren in den Lymphknoten von $FAN^{-/-}$ Mäusen während der akuten Phase der Infektion noch signifikant mehr M Φ zu finden, war ihr Anteil am Infektionsort bei $FAN^{-/-}$ Tieren zu allen Beobachtungszeitpunkten reduziert. Betrachtet man die absolute Zellzahl, waren zum frühest beobachteten Zeitpunkt signifikant weniger $F4/80^+$ M Φ zu finden. Trotzdem war die absolute Zahl der Parasiten vergleichbar mit der in WT Mäusen. Daraus ließe sich rein rechnerisch eine erhöhte Zahl an Parasiten je M Φ in $FAN^{-/-}$ Mäusen ableiten. Eine in Knock Out und WT Mäusen vergleichbare Zahl an $F4/80^+$ M Φ in der akuten Phase und in persistierenden Läsionen mit einer gleichzeitig erhöhten Parasitenzahl in den Läsionen der $FAN^{-/-}$ Tiere erlaubt den gleichen Schluss.

N Φ sind die ersten Zellen, die nach einem Sandmückenstich an die Inokulationsstelle einwandern. Es wurde bereits nachgewiesen, dass *L. major*-Parasiten in der Lage sind, nach Phagozytose durch humane N Φ in diesen zu überleben. Das Modell des trojanischen Pferdes beschreibt die stille Infektion von humanen M Φ durch Phagozytose dieser infizierten, apoptotischen N Φ ¹⁵⁹. Ein verändertes Modell geht von einem Entkommen der Parasiten aus den N Φ und anschließender Phagozytose durch M Φ aus¹⁶⁰. Im murinen Modell konnte ebenfalls ein Überleben von N Φ -phagozytierten *L. major* beobachtet werden¹⁶¹. Es wurde bereits gezeigt, dass das Peritoneum von $FAN^{-/-}$ Mäusen in den ersten Stunden nach TNF-induzierter Entzündungssituation weniger $CD11b^+Gr1^+$ N Φ aufweist¹⁵¹. In den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit zeigten die $FAN^{-/-}$ Mäuse einen unauffälligen Anteil an $7/4^+$ N Φ an den Infektionsstellen. Sie wiesen jedoch durch die insgesamt höhere Zellzahl signifikant mehr N Φ in den Läsionen auf. Eine daraus resultierende, vermehrte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und eine dadurch erhöhte Zellrekrutierung ist eine mögliche Ursache für die größeren Läsionen der $FAN^{-/-}$ Mäuse.

Interessanterweise waren mit Ausnahme der persistierenden Läsionen signifikant geringere Anteile an $CD3^+$ T-Zellen an dem Infektionsstellen als in WT Läsionen präsent. Das beruhte auf tendenziell weniger $CD3^+CD4^+$ Th-Zellen und in der akuten Phase auf signifikant weniger $CD3^+CD8^+$ Tc-Zellen. Damit kommen als weitere Ursache für die ineffektivere Immunantwort die anteilig reduzierten, potentiell IFN- γ -produzierenden Zellen in den Läsionen sein. Zudem finde sich in den Läsionen signifikant geringere Anteile $CD49b^+$ Zellen, die zunächst als ebenfalls potentielle IFN- γ -produzierende NK-Zellen identifiziert wurden. Allerdings zeigte sich diese Färbung als zu unspezifisch, was auch an dem für NK-Zellen überraschend hohen Zellanteil zu erkennen ist. Leider wird $CD49b$ auch auf einer ganzen Reihe weiterer Zellpopulationen wie T- und B-Zellen, M Φ , Monozyten, Endo- und Epithelzellen exprimiert. Dadurch ist der Marker offensichtlich ungeeignet.

Ob die physiologische lokale IFN- γ -Freisetzung in $FAN^{-/-}$ Mäusen nach *L. major*-Infektion ebenfalls beeinträchtigt ist und zu späten Zeitpunkten freigesetztes oder überschießendes IFN- γ einen pathologischen Faktor darstellt, muss noch untersucht werden. Eine Reduktion des IFN- γ -Spiegels durch Applikation von anti-IFN- γ -Antikörper, der aufgrund der erhöhten IFN- γ -Konzentrationen von Lymphknotenüberständen angebracht schien, verringerte nicht die Läsionsgröße sondern erhöhte die Parasitenzahl. Der Antikörper in der hier eingesetzten Konzentration verbesserte demnach nicht den Krankheitsverlauf.

Diese in FAN^{-/-} Mäusen veränderten Verhältnisse der läSIONalen Zellpopulationen zueinander repräsentieren, wie bereits gesehen, nicht die Situation in den Lymphknoten. Einen Erklärungsansatz hierfür liefern die Arbeiten von Monfort et al. und Haubert et al.^{75;151}. FAN ist an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und ihm wurde eine Rolle in der Leukozytenrekrutierung zugesprochen. Die Ursache für diese veränderten Zellverhältnisse könnten demnach Migrationsdefekte einzelner Zellpopulation sein.

Phagolysosomen und phagozytotische Aktivität

L. major-Parasiten replizieren in MΦ. Wie bereits angesprochen wurde, war die rechnerische Parasitenzahl je FAN^{-/-} MΦ höher als in C57BL/6 Tieren. Einen Ansatz für eine mögliche Erklärung hierfür liefern Werneburg et al. und Möhlig et al. Es ist bekannt, dass FAN in einer Signalkaskade Caspase-8/Bid vorgeschaltet ist, die in der Permeabilisierung von Lysosomen resultiert¹⁶². Zudem reguliert FAN die Größe von Lysosomen¹⁶³. Fehlt FAN, sind sie deutlich vergrößert. Diese vergrößerten Kompartimente können durch anschließende Fusionierung mit Leishmanien-beherbergenden Phagosomen zu Parasiten-tragenden Phagolysosomen verschmelzen. Derzeit ist noch unbekannt, ob FAN über diesen Weg Einfluss auf die Parasitenzahl nimmt.

Um auszuschließen, dass bereits die phagozytotische Aktivität in FAN^{-/-} MΦ und DCs durch den Knock Out beeinträchtigt wird, infizierten wir deshalb *in vitro* inflammatorische Biogel-MΦ mit Amastigoten. Die Zahl intrazellulärer Parasitenzahlen war jedoch zwischen den Stämmen vergleichbar. Folglich hat FAN keinen Effekt auf die phagozytotische Aktivität. Ein Effekt auf die Phagolysosomen kann jedoch derzeit noch nicht ausgeschlossen werden. Die Aktivierung von MΦ erfolgt mittels IFN-γ und der Bindung von CD40 an CD40L, exprimiert auf CD4⁺ Th1-Zellen. Ein aufgrund des Fehlens von FAN unvollständig weitergeleitetes CD40-Signal und ein daraus resultierender, verminderter Aktivierungsstatus ist eine ebenfalls mögliche Erklärung für die erhöhten Parasitenzahlen. Wie in den Experimenten zu sehen war, nahm die Parasitenzahl in FAN^{-/-} Mäusen nach der akuten Phase dennoch ab, jedoch später als in WT Mäusen. Der Verlust von FAN konnte demnach kompensiert werden.

Zusammenfassung und Ausblick

Die exakte Rolle von FAN in der kutanen Leishmaniasis, ausgelöst durch *L. major*, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Es wurde jedoch in diesem Teilprojekt gezeigt, dass Mäuse, denen das TNF-R1-assoziierte Molekül FAN fehlt, nach *L. major*-Infektionen einen Läsionsverlauf aufweisen, der mit dem von TNF-R1^{-/-} Mäusen vergleichbar ist. Die in der Leishmaniasis relevanten, TNF-induzierten Signale scheinen demnach intrazellulär weitgehend über FAN und damit über die Aktivierung der nSMase weitergeleitet zu werden. Allerdings wiesen FAN^{-/-} Mäuse in den persistierenden Läsionen deutlich mehr Parasiten als fast ausgeheilte WT Mäuse auf, was für TNF-R1^{-/-} Mäuse nicht publiziert ist. Eine Ursache hierfür könnte die zusätzliche CD40-Assoziation von FAN sein. Es ist bisher nicht publiziert, dass CD40-Signale in TNF-R1^{-/-} Mäusen beeinträchtigt sind.

FAN^{-/-} Mäuse erlagen im Beobachtungszeitraum nicht der Infektion, zeigen jedoch eine Neigung zu Viszeralisierung. FAN ist demnach für die lokale Begrenzung der Infektion relevant. Das Zytokinprofil nach antigenspezifischer Restimulation von Milzzellen zeigte ein unklares Bild. Zwar wurde verstärkt das Th1-/Tc1-Zytokin IFN-γ freigesetzt, jedoch auch geringere Mengen an Th1-polarisierendem IL-12p40 und erhöhte Mengen des

Th2-Zytokins IL-4. In persistierenden Läsionen waren im Vergleich zu WT Tieren leicht erhöhte IFN- γ -Konzentrationen festzustellen. Veränderte IL12p40- und IL-4-Konzentrationen waren nicht mehr zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass FAN transient in eine effektive Th1-Antwort eingebunden ist. Eine Verringerung des IFN- γ -Spiegels war nicht in der Lage, die Läsionsgröße und die Parasitenzahl auf WT Niveau zu senken. Insgesamt kommt es zwar zu einer Rekrutierung von Zellen an die Infektionsorte, was sich an den hohen Zellzahlen in den Läsionen zeigte. Allerdings war das Verhältnis der Zellen zueinander im Vergleich zu WT Tieren deutlich verändert. Hier waren insbesondere die M Φ , DC und T-Zellen betroffen. Als Ursache kommt einen Einfluss von FAN in der Aktin-Reorganisation und damit in der Migration dieser Zellpopulationen in Frage. Ob dieser Einfluss von FAN auf das Aktin-Skelett die migratorischen Fähigkeiten tatsächlich beeinflusst, werden Migrationstests von T-Zellen und DCs in einer Gelmatrix zeigen.

Nachdem das Augenmerk in dieser Arbeit auf die Assoziation von FAN mit dem TNF-R1 gelegt wurde, muss zukünftig zunehmend dessen Bindung an CD40 und damit die Interaktion von T-Zellen und DCs bzw. M Φ berücksichtigt werden. Ob FAN einen Effekt auf die Aktivierung von M Φ und DCs hat und ob die geringeren CD3⁺CD8⁺ Zellzahlen im Lymphknoten aus verringerter DC-Aktivität resultieren, soll in den folgenden Experimenten gezeigt werden. Hierzu werden DCs aus infizierten FAN^{-/-} Mäusen durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsstatus und in Kokultur mit FAN^{-/-} und WT T-Zellen auf ihre stimulatorische Kapazität untersucht. Sind hier in FAN^{-/-} Mäusen Veränderungen zu beobachten, müssen auch die durchflusszytometrischen Analysen der Läsionen um Aktivierungsmarker erweitert werden. Ebenso muss geklärt werden, ob sich nicht nur das Zytokinprofil der Lymphknoten, sondern ob und wie auch das lokale Zytokinmilieu in den Läsionen durch das Fehlen von FAN beeinträchtigt ist. Ein verändertes lokales Zytokinmilieu könnte weitere Erklärungsansätze für den beobachteten Phänotyp liefern. Hierzu eignet sich eine intrazelluläre Fluoreszenzfärbung von Zytokinen, die es erlaubt, zu identifizieren, welche Zellpopulationen in der Lage sind, die jeweiligen Zytokine zu exprimieren.

Eine aufgrund veränderter Lysosomen eventuell ebenfalls beeinträchtigte, vergrößerte, parasitentragende Phago lysosomen in M Φ und DCs lassen sich mit Hilfe von red-fluorecent protein⁺ *L. major* und einer zusätzlichen Färbung dieser Kompartimente fluoreszenzmikroskopisch nachweisen. Eine funktionelle Beeinträchtigung der Phago lysosomen in Form reduzierten Abtötens von Parasiten durch M Φ und DCs soll durch Infektion und IFN- γ -Stimulation dieser Zellen untersucht werden.

Schon 3 Wochen nach Infektion waren Auswirkungen des FAN Knock Outs in Form leicht vergrößerter Läsionen erkennbar. In der frühen Phase der Infektion spielen insbesondere die NK-Zellen durch IFN- γ -Freisetzung eine schützende Rolle. Besonders in dieser Phase, jedoch auch zu späteren Zeitpunkten dürfte es interessant sein, durchflusszytometrisch die Präsenz von NK-Zellen und ihre IFN- γ -Freisetzung zu untersuchen. Zusätzlich wurden inzwischen histologische Präparate von Läsionen verschiedener Zeitpunkte nach Infektion erstellt, um insbesondere die Lokalisierung der bereits Durchflusszytometrisch nachgewiesenen Zellpopulationen zu untersuchen. Diese histologische Untersuchung bietet sich für einige Fragestellungen als Alternative zur durchflusszytometrischen Analyse von Hautgeweben an, da daraus isolierte Zellen aufgrund von Haar- und Hautgeweberesten oftmals nur schwierig mit Antikörpern spezifisch gefärbt werden können.

Die Assoziation von FAN mit zwei unterschiedlichen Rezeptoren macht es notwendig, zukünftig sowohl TNF-R1^{-/-} als auch CD40^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund als Kontrollmäuse in die Experimente zu involvieren. Ansonsten können identifizierte Effekte nur schwer dem jeweiligen Rezeptor zugeordnet werden.

4.3 Etablierung eines PBMC-Transfermodells der humanen, kutanen Leishmaniasis

***L. major*-Infektion immundefizienter Mäuse**

Für eine effektive Immunantwort gegen *L. major* sind CD4⁺ Th- und CD8⁺ Tc-Antworten unerlässlich²⁹. SCID Mäuse, denen mature T- und B-Zellen fehlen, zeigen deshalb einen progressiven Krankheitsverlauf nach *L. major*-Infektion^{150;164;165}. Damit übereinstimmend waren die hier getesteten, immundefizienten Mäusestämme, denen ebenfalls mature T- und B-Zellen fehlen, nach Parasiten-Inokulation suszeptibel. Das Fehlen von NK-Zellen beschleunigte die Entwicklung großer Läsionen. NSG Mäuse wiesen mehr Parasiten auf als NS oder NS-tg(HLA-A0201) Tiere. Die erhöhten Läsionsvolumina sind deshalb zumindest teilweise auf eine größere Zahl an Parasiten zurückzuführen waren. NK-Zellen sind demnach auch auf NOD-Hintergrund für die Abwehr von *L. major* relevant. Eine solche Rolle wurde bereits für den Stamm C57BL/6 gezeigt¹⁵⁸. Hierzu wurden in diesen Mäusen mittels NK1.1-spezifischen Antikörpern 2 Tage vor und zweimal wöchentlich nach der Infektion in die Fußsohlen die NK-Zellen depletiert. Diese Mäuse zeigten in den ersten zwei Wochen nach Infektion signifikant erhöhte Fußsohlenschwellungen. Dieser Effekt trat jedoch in den ansonsten immunkompetenten C57BL/6 Mäusen nur transient auf. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem resistenten Stamm C3H/HeN erzielt¹⁶⁶. Scharton et al. zeigten zudem, dass es im resistenten C3H/HeN in den ersten Tagen nach Infektion im Vergleich zu suszeptiblen BALB/c Mäusen zu einer deutlich erhöhten Freisetzung von IFN- γ durch NK-Zellen kommt. Dieses unter anderem im Lymphknoten freigesetzte IFN- γ förderte eine effektive Th1-Differenzierung. Sie konnten weiterhin in einer Reihe von Mausstämmen eine Korrelation zwischen erhöhter zytotoxischer NK-Zellaktivität an Tag 2 und damit einhergehender, reduzierter Parasitenzahl 2 Wochen nach Infektion nachgewiesen werden. Allerdings resultiert die reduzierte Parasitenzahl nicht direkt aus der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber infizierten M Φ . Vielmehr stimulieren NK-Zellen infizierte M Φ IFN- γ -, TNF- und NO-Synthetase-abhängig dazu, intrazelluläre Leishmanien abzutöten¹⁶⁷. Durch das Fehlen der NK-Zellen in den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten NK-Zell-defizienten Stämmen wird dieser Mechanismus außer Kraft gesetzt, womit sich die leicht erhöhten Parasitenzahlen in NSG Mäusen im Vergleich zu NS Mäusen erklären lassen.

Aktivierung muriner M Φ durch humanes IFN- γ

IFN- γ ist aufgrund seiner Fähigkeit zur Aktivierung infizierter M Φ ein Schlüsselenzym der murinen und humanen Leishmaniasis. Deshalb ist dieser Aktivierungsschritt auch in einem PBMC-Transfermodell von zentraler Bedeutung. Grundlage hierfür ist eine Kreuzreaktivität des von transferierten Effektor-T-Zellen freigesetzten IFN- γ . Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass murine M Φ des C57BL/6 sowie NS-Hintergrundes in der Lage sind, nach Aktivierung durch humanes rekombinantes IFN- γ innerhalb von 48h einen signifikanten Anteil der intrazellulären Parasiten abzutöten. M Φ des NS Hintergrundes waren hierbei sogar effektiver als nach Stimulation mit murinem rekombinanten IFN- γ . Das ist überraschend, denn in der Literatur ist von einer strikten Spezifität von IFN- γ die Rede^{168;169}. Dennoch zeigt sich in unseren Experimenten ein Effekt des humanen IFN- γ . Allerdings erscheint die Rate infizierter Zellen nach 48 h Stimulation noch recht hoch. La Flamme et al. publizieren für peritoneale M Φ und 72 h Stimulation mit 100 U/ml murinen

IFN- γ eine Infektionsrate von nur rund 25%¹⁷⁰. Allerdings handelt es sich hierbei um *ex vivo* Makrophagen nach natürlicher Infektion. Zudem zeigten Green et al. in C3H/HeN M Φ , dass die Zahl infizierter M Φ nach IFN- γ -Stimulation innerhalb der ersten 46 h kaum absinkt, innerhalb der folgenden 24 h jedoch deutlich abnimmt¹⁷¹. Ein späterer Analysezeitpunkt könnte in Folgeexperimenten demnach deutlichere Ergebnisse liefern. Dennoch scheint grundsätzlich eine Aktivierung infizierter M Φ durch humanes IFN- γ sowohl auf C57BL/6 als auch NS Hintergrund möglich und der Einsatz der gewählten Mausstämme ist in diesem Punkt vielversprechend.

Rekonstitution durch PBMC-Transfer

In der Literatur gibt es Beispiele für das Rekonstitutionsverhalten von NS und NSG Mäusen nach PBMC-Transfer. Allerdings findet keine einheitliche PBMC-Zahl Verwendung und oft werden nur Daten einzelner Mäuse publiziert. Für NS Mäuse wurde beschrieben, dass die Rekonstitution nicht immer erfolgreich verläuft. Typische Anteile humaner CD45⁺ Zellen im peripheren Blut bestrahlter Mäuse liegen in Woche 2 bei bis zu 8 % (i.p. Transfer, 10×10^6 PBMC)^{102;172}. NOD-Scid γ ^{-/-} (NSG und NOG) Mäuse weisen nach Transfer der gleichen PBMC-Zahl zum selben Zeitpunkt zwischen 20% und 80% humane CD45⁺ Zellen im Blut auf. Allerdings werden je nach Publikation vor dem Zelltransfer NK-Zellen oder Granulozyten depletiert bzw. die Mäuse radioaktiv bestrahlt. Eine höhere Zahl transferierter PBMC erhöht grundsätzlich im Mittel den Anteil humaner Zellen im Blut^{129;172}. In den Experimenten dieser Arbeit konnten wir ebenfalls bereits früh humane Zellen nachgewiesen. Sofern die Rekonstitution erfolgreich verlief, wiesen NS Mäuse schon in der ersten Woche nach Transfer humane Zellen im Blut auf. Anteile von rund 8 % wurden jedoch i.d.R. erst nach Woche 3 erreicht. Diese Unterschiede in der Rekonstitutionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Literatur sind vermutlich auf die Bestrahlung der Mäuse und Depletion des angeborenen Immunsystems zurückzuführen. Auf eine solche wurde in der hier vorliegenden Arbeit verzichtet. Wie in der Literatur beschrieben, verlief in unseren Experimenten die Expansion der transferierten, humanen Zellen in Mäusen mit einem γ ^{-/-} tendentiell schneller. Es konnten noch nach 9 Wochen in Mäusen aller Stämme humane CD45⁺ Zellen in der Milz nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass in allen eingesetzten Maustämmen ein Auswandern humaner Zellen aus dem Peritoneum in das Blut und damit eine Wanderung der Zellen in der Maus möglich war. Die Milz als lymphoides Organ, in dem eine Kommunikation zwischen (murinen) APC und humanen T-Zellen ermöglicht wird, ist insbesondere in den hier eingesetzten immundefizienten Tieren von Bedeutung. Diese weisen in den sehr kleinen und teilweise nicht vorhandenen drainierenden Lymphknoten wenige Zellen auf. Das Priming humaner, Leishmanien-spezifischer T-Zellen muss also in der Milz stattfinden. Bei den in der Milz nachgewiesenen humanen Zellen handelte es sich fast ausschließlich um CD3⁺CD4⁺ Th- und CD3⁺CD8⁺ Tc-Zellen. T-Zellen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen nach PBMC-Transfer in immundefizienten Mäusen problemlos nachgewiesen^{129;130;173}. Unabhängig von der Route des PBMC-Transfers können diese Zellen stabil in der Peripherie identifiziert werden. Es konnten in unseren Experimenten in Woche 9 nach PBMC-Transfer jedoch so gut wie keine B-Zellen nachgewiesen werden. Das ist insofern überraschend, als andere Arbeitsgruppen nach humanem Zelltransfer in der Lage waren, B-Zellen 4-6 Wochen nach Zelltransfer in verschiedenen Geweben nachzuweisen. Allerdings handelte es sich dabei entweder um einen PBMC-Transfer direkt in die Milz¹⁷⁴ oder i.p./i.v. Transfer von Lymphozytenleukämie-Zellen¹⁷⁵. Jedoch zeigen weitere Arbeiten, dass ein mittelbarer Nachweis von B-Zellen durch IgE-Produktion nach i.p. PBMC-Injektion möglich ist^{176;177}. Es könnte sein, dass die B-Zellen in unseren Experimenten nicht in der Lage waren, das Peritoneum zu verlassen. Um diese Zellen auch im hier vorgestellten Modell in der Milz und

eventuell in den Läsionen verfügbar zu machen, eignet sich möglicherweise ein i.v. Transfer von B-Zellen.

Ein effektiver Übertritt der in PBMC enthaltenen Monozyten aus dem Peritoneum in die Blutbahn und eine Differenzierung dieser Zellen in humane DCs wurde bisher noch nicht publiziert.

Granulombildung

Eine Präsenz humaner Zellen in lymphoiden Organen wie der Milz reicht jedoch allein nicht aus. Die letztlich effektive Immunreaktion gegen den Parasiten findet nicht dort, sondern an der Infektionsstelle, den Läsionen, statt. Bei schützenden Immunantworten aktivieren hier Th1 und Tc1 durch Freisetzung von IFN- γ infizierte M Φ dazu, die intrazellulären, amastigoten *L. major* abzutöten. Die Entwicklung von Läsionen resultiert aus der lokal ablaufenden Entzündungsreaktion und der damit verbundenen Rekrutierung inflammatorischer Zellen. In resistenten Mausstämmen kommt es zu einer effektiven Granulombildung mit der Einwanderung von CD11c⁺ DCs, F4/80⁺ M Φ , Gr-1⁺ N Φ , CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen^{80;178}. Das Granulom des resistenten Stammes C57BL/6 weist dabei signifikant weniger N Φ und DCs auf als das der suszeptiblen BALB/c Mäuse. Die Zahl der M Φ und T-Zellen unterscheidet sich dagegen kaum. Die lokale Begrenzung der Infektion auf das Granulom verhindert das Ausbreiten der Parasiten über den gesamten Organismus. Auch beim Menschen kommt es nach *L. major*-Infektion lokal zu einer Granulombildung an der Inokulationsstelle der Parasiten. In Granulomen infizierter Patienten sind vor allem CD68⁺ M Φ , wenige CD1a⁺ epidermale Langerhanszellen sowie als Zellen des adaptiven Immunsystems CD20⁺ B-Zellen, insbesondere CD4⁺ Th1, CD8⁺ Tc1 und kaum Th2-Zellen vorhanden^{89;179}.

Wie sich zeigte, kam es in allen immundefizienten Stämmen sowohl ohne als auch mit PBMC-Transfer zur einer progressiven Läsionsentwicklung. Das Ausbilden der Granulome in den immundefizienten Mäusen ohne PBMC-Transfer verdeutlicht, dass für diesen Prozess keine funktionellen T-, B- oder NK-Zellen notwendig sind, die Entstehung messbarer Läsionen jedoch verzögert ist. Das zeigt auch die Arbeit von Hoerauf et al. unter Verwendung von Scid Mäusen¹⁵⁰. Alle in der hier vorgelegten Arbeit getesteten Mausstämmen wiesen nach PBMC-Transfer leicht bis signifikant erhöhte Läsionsvolumina auf. Es zeigte sich also ein Effekt der humanen Zellen auf den Krankheitsverlauf. Dieser war mit Ausnahme von NS-tg(HLA-A0201) Mäusen tendenziell oder je nach Stamm auch auffällig stärker ausgeprägt, wenn gut rekonstituierte Mäuse mit mehr als 10% humanen CD45⁺ Zellen in der Milz betrachtet wurden. Wie aus Patientengranulomen bekannt⁸⁹, konnten in den Läsionen humane T-Zellen nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um CD3⁺CD8⁺ Tc-Zellen und CD3⁺(CD8⁻)CD4^{+/low} Th-Zellen. Humane lin⁻CD11c⁺ DCs waren im Gegensatz zu humanen Läsionen nicht präsent. Allerdings konnten unabhängig von PBMC-Transfers in infizierten Mäusen murine CD11c⁺ DCs sowie F4/80⁺ M Φ und Ly-6G⁺ bzw. 7-4⁺ N Φ identifiziert werden. N Φ waren besonders in den NK-Zell-defizienten Stämmen NSG und H2b Rag2^{-/-} γ c^{-/-} erst nach Infektion nachweisbar; ein PBMC-Transfer allein führte zu keiner Akkumulation von N Φ . Die Anwesenheit humaner B-Zellen in den Läsionen, wie es im Menschen zu beobachten ist, wurde im Rahmen dieser Experimente nicht überprüft und muss nachgeholt werden. Nachdem jedoch keine abgegrenzte Population von B-Zellen in der Milz nachgewiesen werden konnte, ist eine Präsenz an der Infektionsstelle unwahrscheinlich. Dennoch waren damit die für eine effektive Immunreaktion notwendigen humanen Zellen an der Infektionsstelle präsent^{29;89;90;180} und konnten potentiell die in den immundefizienten Mäusen durch Mutation bzw. gezielten Knock Out fehlenden murinen Zellen ersetzen. Jedoch vermittelte dieser einfache Transfer peripherer, menschlicher Leukozyten keinen Schutz.

Interessanterweise wurden in Mäusen mit PBMC-Transfer allein in vielen Ohren deutliche Anteile humaner Zellen nachgewiesen. In NS Mäusen betrug der Anteil humaner CD45⁺ Leukozyten teilweise über 20%. Es handelte sich dabei genau wie nach Infektion + PBMC-Transfer um CD3⁺CD4^{low} sowie CD3⁺CD8⁺ T-Zellen, ein möglicher Hinweis auf eine durch die PBMC induzierte GvHD.

Parasitenlasten

Die Heilung der Erkrankung geht mit einem Abheilen der Läsionen und einem Abtöten der Parasiten einher. Eine effektive T-Zellantwort ist auch in Scid Mäusen, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurden, unverzichtbar. Scid-Mäuse sind suszeptibel, doch eine Rekonstitution von Scid Mäusen mit murinen BALB/c T-Zellen ist in der Lage, eine Resistenz der Mäuse gegen *L. major*-Infektionen herzustellen. Ein zusätzlicher Transfer von B-Zellen kehrt den Effekt wieder um¹⁵⁰. PBMC bestehen aus T-, B- und NK-Zellen, Monozyten und wenigen Granulozyten. Die Ursache für den hier beobachteten, weiterhin progressiven Verlauf nach PBMC-Transfer könnte, wie im murinen Beispiel, der Kotransfer von B-Zellen sein. Eine Gabe von B-Zell-freien PBMC oder aufgereinigten T-Zellen könnte diese Frage klären. Da jedoch nach PBMC-Transfer in der Peripherie kaum B-Zellen nachweisbar waren, ist ein B-Zell-Effekt als Ursache unwahrscheinlich.

Wie aus suszeptiblen Mäusen bekannt¹⁷⁸, ging der progressive Läsionsverlauf mit hohen läsionalen Parasitenzahlen einher. Ein PBMC-Transfer in infizierte Mäuse beeinflusste zudem die Zahl der Parasiten. Sowohl NS wie auch NSG und H2b Rag2^{-/-}gc^{-/-} Mäuse zeigten signifikant erhöhte Parasitenlasten nach PBMC-Transfer. Einzig in NS-tg(HLA-A0201) Mäusen waren die Parasitenzahlen nach Transfer von HLA-A0201⁺ PBMC gegenüber Mäusen ohne PBMC-Transfer reduziert. Bisher liegen nur Daten weniger Mäuse dieses Stammes vor. Die geringe Parasitenzahl in den analysierten Mäusen deutet jedoch darauf hin, dass eine Antigenpräsentation muriner Zellen über das humane MHC Klasse I-Molekül HLA-A0201 zu einer effektiveren Immunantwort transferierter HLA-A0201⁺ PBMC im Vergleich zu NS Mäusen führen kann.

Im Gegensatz dazu bewirkte ein repetitiver PBMC-Transfer sowohl in NS als auch in NS-tg(HLA-A0201) Mäusen signifikant erhöhte Parasitenzahlen im Vergleich zu Infektion allein. In NS Mäusen lag die Parasitenlast jedoch nicht über der nach einmaligem PBMC-Transfer. Eine durch den repetitiven Transfer induzierte, starke systemische Entzündungsreaktion könnte die Ursache für das Überkommen des positiven Effektes in NS-tg(HLA-A0201) sein.

Eine solche Entzündungsreaktion, die bereits nach einmaligem Transfer von PBMC auftreten kann, wäre auch für Mäuse ohne humane MHC Klasse I-Präsentation ein Erklärungsansatz für die erhöhten Parasitenzahlen. Eine solche Xenoreaktion geht mit starker Unterdrückung der Hämatopoese sowie TNF Freisetzung einher und führt zu systemischer Entzündung¹²⁹. Unter diesen Bedingungen sind effektive Immunreaktionen gegen Erreger wie *L. major* schwierig und nur schwer nachweisbar.

Ein weiterer Beleg dafür, dass die Bildung eines die Infektion lokal begrenzenden Granuloms nur unvollständig funktionierte, sind die Parasitenzahlen der Milz. Interessanterweise konnten in NS-tg(HLA-A0201) Tieren nach PBMC-Transfer so gut wie keine Parasiten in den Milzen nachgewiesen werden. Allerdings wiesen gleich behandelte NS Mäuse und infizierte NS-tg(HLA-A0201) Mäuse ohne PBMC-Transfer eine Tendenz zur Viszeralisierung auf. Diese war in NK-Zell-defizienten Tieren ohne PBMC-Transfer bereits grundsätzlich erhöht, jedoch noch deutlicher ausgeprägt, wenn zusätzlich PBMC transferiert wurden. Eine Präsentation über HLA-A0201 auf Mauszellen gegenüber HLA-A0201⁺ PBMC, insbesondere gegenüber den in der Milz und in den Ohren nachgewiesenen CD3⁺CD8⁺ T-

Zellen, wirkte sich demnach positiv auf die lokale Begrenzung der Infektion aus. Ein PBMC-Transfer in andere als NS-tg(HLA-A0201) Mäuse erwies sich jedoch als hinderlich.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Präsenz humaner CD3⁺CD4^{low} und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen an der Infektionsstelle nicht ausreicht, um die Leishmanien-Replikation zu kontrollieren und damit eine effektive Granulombildung zu unterstützen.

Antigenspezifische Zytokinantworten

Eine Erklärung für die Ineffektivität der nachgewiesenen humanen T-Zellen ist eine zwischen humanen PBMCs und murinen APC nicht optimal funktionierende Kommunikation, die jedoch für eine Immunantwort und damit für Heilung nötig ist. Diese Kommunikation findet in der Regel in den drainierenden Lymphknoten statt. Tatsächlich zeigte sich auch nach PBMC-Transfer, dass nur die wenigsten der in diesen Experimenten eingesetzten Mäuse Lymphknoten aufweisen, aus denen Leukozyten isoliert werden können. Das war bei allen Stämmen und bei der überwiegenden Zahl an Tieren der Fall. Aus diesem Grund wurden Nachweise antigenspezifischer Immunantworten anhand von Milzzellen überprüft.

Es wurden bereits antigenspezifische Immunreaktionen humaner PBMC, transferiert in immundefiziente Mäuse, erfolgreich induziert^{181;182}. Insbesondere anti-virale Antworten in NSG Mäusen gegen das SARS-Corona- und HI-Virus, einhergehend mit IFN- γ -Freisetzung, aber auch *in vivo*-anti-Tumor-Reaktivität spezifischer CD8⁺ Tc-Zellen in NS Mäusen wurden publiziert¹⁸³⁻¹⁸⁶. Die Immunantworten wurden 3 Tage bis 5 Wochen nach PBMC-Transfer nachgewiesen. Humane Tetanustoxoid-spezifische T-Zellantworten in NS Mäusen wurden ebenfalls beschrieben¹⁰⁶. Daten einer befreundeten Arbeitsgruppe verdeutlichen, dass nach einem Transfer von humanen, MelanA/MART-1-spezifischen HLA-A0201⁺ CD8⁺ T-Zellen in NSG-tg(HLA-A0201) Mäuse eine antigenspezifische Immunantwort, vermittelt über HLA-A0201-Präsentation, induzierbar ist. Die Analyse der Immunantworten erfolgte hier wenige Tage nach der T-Zellinjektion¹⁸⁷.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten bei einigen Mäusen der Stämme NS und NSG nach einmaligem PBMC-Transfer antigenspezifische Antworten gegen *L. major* induziert werden. Interessanterweise waren diese nicht nur nach der Gabe von 50x10⁶ sondern auch nach Transfer von nur 1x10⁶ PBMC nachweisbar. Dabei zeigten sich in allen Fällen erhöhte, jedoch insgesamt geringe Konzentrationen des humanen Th2- und Treg-Zytokins IL-10. Eine antigenspezifische Freisetzung von schützendem IFN- γ war nicht zu beobachten. Diese antigenspezifische Reaktion war nur in wenigen, gut rekonstituierten Mäusen zu sehen ($\geq 45\%$ humane CD45⁺ Zellen in der Milz, Woche 9), ein weiterer Hinweis, dass die Kommunikation zwischen murinem und humanem Immunsystem noch nicht optimal funktionierte. Wie bereits verdeutlicht, scheint eine Antigenpräsentation über HLA-A0201 in PBMC-transferierten NS-tg(HLA-A0201) Mäusen vorteilhaft für die Kontrolle der *L. major*-Parasitenzahl zu sein. Allerdings konnte in den untersuchten Tieren in Woche 9 keine antigenspezifische Zytokinfreisetzung nachgewiesen werden.

Eine solche war auch in NS und NS-tg(HLA-A0201) Tieren mit repetitiven PBMC-Transfer nicht zu beobachten. Eine höhere PBMC-Verfügbarkeit induzierte demnach keine verbesserte Immunantwort gegen *L. major*. Bisher konnten jedoch nur wenige Mäuse in Woche 9 analysiert werden. Es bleibt zu zeigen, dass der Zeitpunkt für die Analyse antigenspezifischer Immunantworten richtig gewählt ist oder ob zu früheren Zeitpunkten möglicherweise nur transient vorliegende, spezifische Immunantworten nachgewiesen werden können. Zudem zeigen die angesprochenen Literaturverweise antigenspezifische Immunantworten, die entweder auf CD8 T-Zell-Zytotoxizität oder auf transferierten, bereits zuvor antigenspezifisch geprimten T-Zellen beruhen. Eine Induktion von Antigen-spezifitäten transferierter PBMC konnte bislang nur von Okada et al. erreicht werden¹⁸³. Die

antigenspezifische IFN- γ -Freisetzung von Milzzellen beschränkte sich jedoch auf wenige pg/ml und eine Relevanz des Wirkmechanismus T-Zell-Zytotoxizität wurde bisher für *L. major*-Infektionen nicht publiziert. Gleiche gilt für ein kürzlich publiziertes PBMC-Transfer-Allergiemodell, in dem allergenspezifische CD4⁺ T-Zellproliferation, Zytokinfreisetzung und IgE-Produktion nachgewiesen werden konnte¹⁷⁷. Die in NSG Mäuse transferierten PBMC stammten jedoch aus allergischen Patienten. Eine ausreichende *de novo* Induktion antigenspezifischer, humaner T-Zellantworten gegen *L. major* scheint ohne eine effektive Antigenpräsentation schwierig. Ein Alternative zu den in unseren Experimenten eingesetzten PBMC aus gesunden Spendern wäre auf Basis der aktuellen Literatur die Verwendung von Zellen akuter oder ausgeheilter Leishmaniasis-Patienten. Wie Inoue et al. jedoch zeigen konnten ist zumindest eine MHC Klasse I-restingierte, MART1-, WT1- oder CMV-Peptid-spezifisches Priming von isoliert transferierten, humanen CD8⁺ T-Zellen in NOG Mäusen möglich, wenn zusätzlich humane, Peptid-beladene DCs transferiert werden¹³¹.

Humane MHC-Präsentation durch syngene DCs

Diese Möglichkeit, die Induktion antigenspezifischer Immunantworten durch zusätzliche Applikation syngener humaner DCs zu verbessern, wurde in dieser Arbeit ebenfalls nachgegangen. Dadurch wird eine Antigenpräsentation über humanes MHC Klasse I und II gegenüber den in PBMC enthaltenen T-Zellen möglich. In NS Mäusen, infiziert mit 1×10^3 promastigoten Leishmanien, die nur eine schwache bis keine Rekonstitution mit humanen Zellen aufwiesen (<10% humane CD45⁺ Zellen in der Milz, Woche 9) zeigte die zusätzliche Injektion von unreifen humanen DCs an die Infektionsstelle keinen Effekt auf die Parasitenzahl der Tiere. Jedoch beeinflussten humane DCs die Parasitenzahl in gut rekonstituierten Mäusen. Hier waren reduzierte Parasitenzahlen gegenüber infizierten Tieren ohne PBMC-Transfer nachweisbar. Analysierte man allerdings die Parasitenzahlen der jeweiligen Experimente einzeln, zeigte sich, dass in allen Gruppen der Experimente, aus denen diese Mäuse stammen, eine geringe Parasitenzahl nachweisbar war. Die geringe Parasitenzahl in Tieren mit zusätzlichem DC-Transfer war demnach auf die Handhabung in den jeweiligen Experimenten zurückzuführen und unterschied sich innerhalb der Experimente nicht auffällig zwischen den Gruppen. Die Daten können demnach nicht als Indiz für Heilung interpretiert werden. In dieses Bild fügte sich die Beobachtung ein, dass unter den Mäusen mit Infektion, PBMC- und DC-Transfer nur ein einzelnes Tier mit antigenspezifischer Zytokinfreisetzung zu finden war. Es handelte sich wiederum um eine gut rekonstituierte Maus (29% humane CD45⁺ Zellen in der Milz, Woche 9) mit einer um den Faktor 3 erhöhten Konzentration des Th2-Zytokins IL-4. Die Zahl der Parasiten an der Infektionsstelle lag in dieser Maus auf dem Niveau der Gruppe mit PBMC-Transfer und Infektion. Die Läsionsvolumina waren nicht auffällig verändert. Es zeigte sich demnach, dass ein zusätzlicher Transfer von syngenen, humanen, unreifen DCs bei gleichzeitiger Injektion von 50×10^6 PBMC den Krankheitsverlauf nach *L. major*-Infektion nicht verbesserte.

Eine Injektion unreifer, humaner DCs an die Infektionsstelle setzt voraus, dass die Zellen vor Ort ihr Antigen phagozytieren. Gorantla et al. waren in der Lage, in PBMC-transferierten NOD-Scid Mäusen mit humanen DCs, welche zuvor mit HIV Typ1-gp120-kodierenden Herpes Simplex-Amplicons transduziert wurden, antigenspezifische IFN- γ -T-Zellantworten zu induzieren¹⁸⁵. Um sicher zu gehen, dass die in der vorliegenden Arbeit transferierten DCs *L. major*-Antigen in sich tragen, wurden in einem weiteren Experiment humane DCs injiziert, die zuvor *in vitro* 1:5 mit Amastigoten infiziert wurden. Obwohl $0,5 \times 10^6$ dieser DCs an die Infektionsstelle gespritzt wurden und damit die injizierte Parasitenzahl deutlich höher lag als in den Tieren, die unreife, humane DCs erhielten, kam es zu keiner erhöhten Parasitenzahl am Infektionsort. Hier wäre zu postulieren, dass die bereits

infizierten DCs effektiv die phygozytierten Parasiten in die Lymphknoten und die Milz transportieren konnten und deshalb nur wenige Parasiten an der Infektionsstelle verblieben. Trotzdem kam es in den lymphatischen Organen zu keiner effektiven Stimulation von humanen T-Zellen durch diese DCs. Es konnte nur in einer Maus eine antigenspezifische Zytokinfreisetzung nachgewiesen werden. Diese war wiederum von einem Th2-Profil geprägt. Auch hier stellt sich die Frage, ob ein früherer Zeitpunkt für die Analyse antigenspezifischer Immunantworten geeigneter ist. Eine effektive Reduktion der Parasitenzahl in Woche 9 war weder durch den Transfer unreifer, noch durch die Gabe infizierter DC zu erreichen.

Eignung des PBMC-Transfermodells zur Untersuchung humaner T-Zellantworten gegen *L. major*

Wie die Daten dieser Arbeit zeigten, reagieren infizierte, murine M Φ (C57BL/6 und NOD Hintergrund) auf die Stimulation mit humanem IFN- γ mit dem Abtöten intrazellulärer Parasiten. Es wurde zudem bereits publiziert, dass humanes TNF genau wie sein muriner Gegenpart in der Lage ist, eine Entzündung auszulösen¹⁵¹. Diese Beispiele zeigen, dass im eingesetzten PBMC-Transfermodell grundsätzlich von einer erfolgreichen Kommunikation von murinem und humanem Immunsystem, nicht nur auf zellulärer Ebene, ausgegangen werden kann. Sicherlich trifft das nicht auf alle Immunmechanismen zu. Das zeigte sich in den Experimenten dieser Arbeit darin, dass nur in wenigen Mäusen eine antigenspezifische Immunreaktion nach PBMC-Transfer induziert werden konnte. War eine Induktion erfolgreich, konnte dennoch kein schützendes, antigenspezifisches IFN- γ , sondern nur eine spezifische Freisetzung der Th2-Zytokine IL-4 und vor allem IL-10 nachgewiesen werden. Auch das Einbringen humaner, syngener DCs in das Modell verbesserte den Verlauf der Erkrankung nicht. Ein Problem in diesem Zusammenhang könnten die für das Überleben humaner Zellen vorteilhaften Defekte des angeborenen Immunsystems bei Mäusen auf NOD-Scid Hintergrund sein. So fehlen diesen Tieren nicht nur T- und B-Zellen. Mäuse auf NOD-Hintergrund zeigen auch eine reduzierte NK-Zellaktivität sowie Defekte in der Differenzierung und Funktionalität von Antigen-präsentierenden Zellen und eine Abwesenheit von zirkulierendem Komplement¹⁰⁸, die während der kutanen Leishmaniasis durchaus relevant sind. Mäusen mit einem $\gamma c^{-/-}$ fehlen eine Reihe von Zytokinrezeptoren. Sie sind deshalb in ihren Immunantworten und im Zellrepertoire eingeschränkt. Das wird unter anderem am Fehlen von funktionellen NK-Zellen deutlich. Zudem ist bekannt, dass ein Großteil der T-Zellen nach Transfer in immundefiziente Mäuse einen anergen Phänotyp aufweisen^{108;109}. Dass mit PBMC-Transfermodellen in immundefizienten Mäusen dennoch antigenspezifische Immunreaktionen induzierbar sind, wurde mehrfach gezeigt¹⁸³⁻¹⁸⁷. Wie bereits erwähnt, wurden die publizierten Untersuchungen hierzu jedoch zu deutlich früheren Zeitpunkten als Woche 9 durchgeführt. Woche 9 wurde in dieser Arbeit aus Gründen der Vergleichbarkeit zum rein murinen Modell als Hautptanalysezeitpunkt gewählt. Diese Wahl des Zeitpunktes muss jedoch überdacht werden.

Infektion humaner Hauttransplantate

Eine vielversprechende Möglichkeit, einige der Defekte des angeborenen Immunsystems immundefizienter Mäuse zu umgehen und zudem ein weiteres humanes Organ experimentell in das PBMC-Transfermodell einzubringen, ist die Transplantation humaner Haut. Es handelt sich dabei um eine derzeit noch recht selten eingesetzte, jedoch gut

beschriebene Methode¹²²⁻¹²⁷. Es wurde bereits ein Vielzahl von immundefizienten Stämmen für Hauttransplantationen verwendet¹²⁶. Insbesondere Mäuse auf NOD-Hintergrund, aber auch Tiere auf BALB/c-Hintergrund finden bei solchen Xenotransplantationen Verwendung. Das ermöglicht es, nicht nur PBMC, sondern auch die Haut mit den darin vorliegenden antigenpräsentierenden Zellen unter experimentellen Bedingungen zu untersuchen. Ein Anwachsen der Haut ist innerhalb weniger Wochen möglich, allerdings tritt eine Verschorfung des Transplantats ein¹²⁶. Racki et al. zeigen Bilder verschorfter Transplantate aus Woche 6. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Transplantation humaner Haut auf NS und NSG Mäuse auch in unserem Hause möglich ist. Das Abheilen der Transplantationswunde und die Abstoßung des Schorfs nahmen dabei bis zu 20 Wochen in Anspruch. Vergleichbare Zeiträume sind aus der Literatur nicht bekannt. Es wurde bereits gezeigt, dass nach der Transplantation der Haut humane CD11c⁺ dermale DCs und CD163⁺ MΦ im Transplantat verbleiben¹²⁷. Damit sind sowohl die *L. major*-Hauptwirtszellen als auch die zur Induktion einer effektiven, adaptiven Immunantwort unverzichtbaren APC in der Dermis präsent. Es wurde von den Autoren zudem nachgewiesen, dass Langerin⁺ bzw. CD1a⁺ Langerhanszellen nach der Transplantation auswandern, die Epidermis zu unserem gewählten Infektionszeitpunkt (15-20 Wochen nach Transplantation) jedoch wieder mit Langerhanszellen repopuliert ist. Sie stehen demnach ebenfalls für Immunreaktionen zur Verfügung.

Dieses Xeno-Hauttransplantationsmodell wurde - erweitert um PBMC-Transfers - bereits erfolgreich zur Aufklärung von Abstoßungsmechanismen allogener Hauttransplantate eingesetzt^{123;124}. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine inzwischen in der klinischen Evaluationsphase befindlichen Methode der Toleranzinduktion gegen allogene Hauttransplantate mit Hilfe eines solchen Hauttransplantationsmodells verbessert werden kann. So wurden Belege dafür geliefert, dass die dafür eingesetzten *ex vivo* polyklonal expandierten Spender-Tregs weniger wirksam eine Toleranz induzieren, als es Alloantigen-spezifische Tregs vermögen¹⁸⁸. Wie eine andere Arbeit zeigt, erlaubt die histologische Analyse von Bakterien-infizierten Hauttransplantation auf Scid-Mäusen eine Unterscheidung von Gewebeschäden, die durch Alloreaktionen bzw. Bakterieninfektionen entstehen – ein Problem, dass nach Gewebetransplantationen bei Patienten vermehrt auftritt¹⁸⁹.

Besonders interessant sind jedoch Publikationen der Gruppe um A. Arvin, die zeigen, dass dieses Modell erfolgreich zur Untersuchung von infektiösen Hauterkrankungen eingesetzt werden kann¹⁹⁰⁻¹⁹². Sie waren in der Lage, Replikationsmechanismen des Varizella-Zoster-Virus (VZV), durch ihn induzierte Immunantworten und Antikörper-Therapien im Xeno-Hauttransplantationsmodell näher zu untersuchen¹⁹³⁻¹⁹⁵. Sie nutzten dazu die Transplantation humaner Haut auf C.B-17-Scid Mäuse.

Durch eine Hochdosisinfektion mit *L. major* konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Modell der CL in den Transplantaten etabliert werden, das histologisch mit einer humanen *L. major*-Infektion vergleichbar war^{89;196;197}. Deutlich war 3 Wochen nach Infektion eine Vielzahl an *L. major*-Parasiten in histologischen Schnitten des Transplantats zu erkennen. Wie von infizierten Patienten bekannt, bildete sich in unseren Transplantaten ein perivaskuläres Infiltrat und damit ein Granulom aus. Nu et al. konnten eine solche Läsionsbildung und die Entstehung perivaskulärer Infiltrate in Hauttransplantaten nach VZV-Infektionen ebenfalls nachweisen¹⁹⁵. Dieses von der Arbeitsgruppe um Arvin eingesetzte VZV-Modell lieferte konnte bereits mehrfach erfolgreich zur Aufklärung intrazellulärer Regelmechanismen bei Infektionen mit diesem Virus eingesetzt werden und verdeutlicht damit das Potential von Xenotransplantationsmodellen^{190-192;194;195}. Zusätzlich zu einem solchen ausschließlichen Hautinfektionsmodell, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, basierend auf dem zuvor beschriebenen PBMC-Transfermodell, zusätzlich zur Infektion humane PBMC zu transferieren. Dadurch sollte erreicht werden, dass nicht nur die lokalen

Mechanismen in der Haut sondern außerdem die Immunmechanismen der CL in der Peripherie untersucht werden können. Transferierten wir zum Zeitpunkt der Infektion PBMCs, wanderten in NSG Mäusen mit dem perivaskulären Infiltrat humane CD45⁺ Zellen in das Transplantat ein. Es handelte dabei sich fast ausschließlich um humane CD3⁺ T-Zellen. Dieser Influx humaner Zellen wurde in NS Mäusen nicht deutlich, weshalb NSG Mäuse für dieses Modell interessanter sein dürften. Berücksichtigt man das langsamere Anwachsen humaner Zellen in NS Mäusen, sind jedoch für die Analyse späterer Zeitpunkte in NS Mäusen mit Transplantaten möglicherweise ebenfalls interessant und eine Untersuchung nach 3 Wochen verfrüht.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Abbildung der humanen Leishmaniasis inklusive der humanen Haut unter experimentellen Bedingungen möglich ist. I.p.-transferierte, humane Zellen können an die Infektionsstelle einwandern und so potentiell mit infizierten humanen Makrophagen und DCs interagieren. Das ermöglicht es, die Mechanismen der humanen Immunantwort im Mausmodell zu untersuchen und detailliert die Abläufe in der Haut zu analysieren.

Induktion einer GvHD durch PBMC-Transfer

Humane T-Lymphozyten können durch die Erkennung muriner MHC-Moleküle aktiviert werden, sich zu Effektorzellen entwickeln und eine GvHD mit starken Entzündungsreaktionen auslösen^{104;198}. Dieser Effekt ist Zellzahl- und Mausstamm-abhängig. In Scid Mäusen mit NK-Zellaktivität sind hohe Zellzahlen oder die Depletion von NK-Zellen notwendig sind, um eine GvHD auszulösen. Die Tiere sterben nach Gewichtsverlust typischerweise innerhalb von 2-3 Monaten^{198;199}. Ein i.p.-Transfer von 2,5x10⁶ PBMC kann hingegen in NOG ausreichen, um eine GvHD zu induzieren¹⁷². I.v.-Transfers sind weniger verträglich als der Transfer über die i.p.-Route. Es kommt häufiger zu einer GvHD. Aus diesem Grunde werden NSG/NOG Mäuse gerne als Modelle für eine xenogene GvHD eingesetzt^{129;172}. Doch auch Rag2^{-/-}γc^{-/-} sind anfällig für PBMC-Transfers und werden zur Untersuchung der Mechanismen der Xeno-GvHD verwendet¹⁰³.

In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich in allen immundefizienten Stämmen eine verringerte Überlebensrate nach dem Transfer 50x10⁶ PBMC, unabhängig von einer zusätzlichen Infektion. Das Versterben war in Tieren mit einem Knock Out für das γc-Gen deutlich erhöht und trat früher ein als in NS und NS-tg(HLA-A0201) Mäusen. Mäuse mit Hauttransplantaten und zusätzlichem PBMC-Transfer zeigten das gleiche Verhalten. Berücksichtigt man, dass es in Mäusen ohne γc durch das Fehlen von NK-Zellen zu einer schnelleren Expansion transferierter, humaner T-Zellen kommt, wird der Zusammenhang zwischen guter Rekonstitution und Versterben deutlich. Damit übereinstimmend wurde beobachtet, dass NS und NS-tg(HLA-A0201) Mäuse schneller verstarben, wenn wiederholt PBMC transferiert wurden. Ein weiterer Indikator für das Auslösen einer GvHD war die hohe Präsenz humaner Zellen in nicht infizierter Haut. Es ist bekannt, dass Haut-ständige APC in Transplantationssituationen Spender-T-Zellen aktivieren und hierdurch eine kutane GvHD auslösen können²⁰⁰.

Typisches Anzeichen einer GvHD ist neben einem Gewichtsverlust und einem darauffolgendem Versterben eine erhöhte GPT-Konzentration im Blutserum. Die Messung der Konzentration von GPT erlaubt es, GvHD-induzierte Organschäden ohne das Abtöten des Tieres zu erkennen²⁰¹. In unseren Experimenten zeigten Mäuse aller immundefizienten Stämme erhöhte GPT-Werte und ein verfrühtes Versterben einzelner Tiere. GPT-Normalwerte liegen bei bis zu 40 U/l. NS und NS-tg(HLA0201) Mäuse wiesen jedoch Serumkonzentrationen von bis zu rund 700 U/l auf. Deutlich erhöhte Werte waren in NS Mäusen bereits 3 Wochen nach PBMC-Transfer nachweisbar, wohingegen in NS-tg(HLA-

A2.1) erst in Woche 6 nach Transfer von HLA-A0201⁺ PBMC Werte deutlich über 40 U/l nachgewiesen werden konnten. Wie in der humanen Erkrankung ist die Entwicklung einer xenogenen GvHD stark abhängig von der Expression von MHC Klasse I und Klasse II und geht mit reduzierter Hämatopoese einher¹²⁹. NS Mäuse exprimieren ausschließlich murine MHC Klasse I- und Klasse II-Moleküle. Sowohl transferierte, xenoreaktive CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen finden damit potentiell ihr Antigen in den Mäusen vor. NS-tg(HLA-A0201) Mäuse exprimieren zusätzlich das humane MHC Klasse I-Molekül HLA-A0201, an dem die transferierten CD8⁺ T-Zellen im humanen Thymus selektiert wurden. Das in den Experimenten dieser Arbeit verlangsamte Auftreten von GvHD-Symptomen und Versterben könnte darauf zurückzuführen sein, dass CD8⁺ T-Zellen neben den murinen MHC Klasse I-Molekülen auch das humane HLA-A0201 vorfinden und nur die CD4⁺ T-Zellen ausschließlich murines MHC Klasse II antreffen. Bestätigt wird diese Vermutung durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Helmut Jonuleit. Diese konnte zeigen, dass ein Transfer humaner HLA-A0201⁺ CD8⁺ T-Zellen in NSG-tg(HLA-A0201) Mäuse zu keiner GvHD-Induktion führt¹⁸⁷. Hingegen zeigten in unseren Experimenten NSG und H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} bereits in den ersten Wochen nach PBMC-Transfer eine fulminante GvHD mit GPT-Konzentrationen von teilweise über 2000 U/l. Diese Tiere exprimieren ebenfalls ausschließlich murine MHC-Moleküle. Es traten in diesen Tieren wie in NS Mäusen bereits in Woche 3 hohe GPT-Werte auf. Vereinzelt waren Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben. Es konnte hier eine direkte Korrelation zwischen guter Rekonstitution des peripheren Blutes und erhöhten GPT-Konzentrationen nachgewiesen werden. Insbesondere Mäuse der NK-Zell-defizienten Stämme NSG und H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} mit PBMC-Transfer wiesen geringe Überlebensraten auf. Der Anteil humaner CD45⁺ Milzzellen in Woche 9 eignete sich deshalb nur bedingt als Maß für den Rekonstituierungserfolg des gesamten Experiments, da zu diesem Zeitpunkt gut rekonstituierte Tiere oft bereits verstorben sind. Tatsächlich zeigte sich, dass besonders häufig die schnell und gut rekonstituierten Tiere noch vor Versuchsende verstarben. Je nach Stamm konnten deshalb rund 10% bis 70% der PBMC-transferierten Tiere in Woche 9 nicht mehr analysiert werden.

Es sind verschiedene Methoden bekannt, die in immundefizienten Mäusen nach PBMC-Transfer mehr oder minder in der Lage sind, eine GvHD zu verzögern oder zu verhindern. So konnten King et al. eine GvHD in PBMC-transferierten NSG Mäusen (20x10⁶ PBMC) hinauszögern, in dem die TNF-α-Signalkaskade mittels Etanercept inhibiert wurde¹²⁹. Sie konnten das Überleben der Mäuse signifikant verlängern, jedoch wurde keine Überlebensdauer erreicht, die für die Experimente dieser Arbeit ausreichend wäre. Cao et al. waren in der Lage, eine GvHD in NK-Zell-depletierten, bestrahlten NS Mäusen, denen 10x10⁶ PBMC transferiert wurden, über 30 Tage zu unterbinden. Sie nutzten dazu die Injektion von 10x10⁶ Treg. Die Spender-gegen-Tumor-Reaktivität der PBMC blieb dabei erhalten¹⁹⁹. Auch in H2d Rag2^{-/-}γc^{-/-} verzögert ein Kotransfer von autologen Treg eine GvHD²⁰². Ein 1:4 Anteil von Tregs ist bei Verwendung neonataler NS Mäuse zur Vermeidung einer GvHD ausreichend¹³⁶. Die Autoren belegten zudem, dass anstatt einer erhöhten Anzahl an Tregs die Koapplikation des Treg-aktivierenden HIV-Hüllproteins gp120 den gleichen Effekt auslöst und in diesen Mäusen über 52 Tage die Induktion von GvHD-Symptomen verhindert. Die transferierten PBMC waren dennoch in der Lage, Gewebe wie z.B. die Lunge zu besiedeln. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch im *L. major*-Infektionsmodell gp120 nach PBMC-Transfer in NSG eine schützende Funktion ausübte und die Überlebensrate steigerte. Dabei zeigten sich durch die Behandlung keine signifikanten Effekte auf die Läsionsentwicklung. Die Verwendung von gp120 zu GvHD-Unterdrückung ist ein vielversprechender Ansatz, wenn es trotz dieser Behandlung gelingen sollte, eine anti-Leishmanien-Aktivität zu erreichen.

Wie bereits erwähnt wurde, ist die GvHD-Induktion Zellzahl- und Mausstamm-abhängig. Mäuse des Stammes NSG, die zwar gute Rekonstitutionserfolge, jedoch damit auch

häufiger eine GvHD zeigen, sind in diesem Zusammenhang für weitere Versuche besonders interessant. Sie lassen sich auch mit einer geringen Zellzahl erfolgreich rekonstituieren. Die Daten dieser Arbeit verdeutlichen, dass nach einer Rekonstitution mit 1×10^6 PBMC 90% der Tiere bis Woche 9 überlebten und 100% der überlebenden Tiere mindestens 1% humane CD45⁺ Zellen in der Milz aufwiesen. Die Läsionsentwicklung zeigte sich von der geringeren PBMC-Zahl unbeeinflusst. Außerdem wies eine der vier analysierten NSG Mäuse bereits nach dem Transfer von 1×10^6 PBMC und zusätzlicher Infektion eine antigenspezifische Zytokinfreisetzung auf. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass mit den PBMC Leishmanien-spezifische T-Zellen transferiert werden, ist jedoch eine etwas höhere PBMC-Zahl sinnvoll. In Kombination mit einer gp120-Injektion wären etwa 5×10^6 PBMC bei ausreichender anti-Leishmanien-Aktivität das Protokoll der Wahl. Interessant sind auch die Beobachtungen von Inoue et al. In ihren Experimenten traten GvHD-Symptome seltener auf, wenn isolierte Zellpopulationen, im konkreten Fall CD8⁺ T-Zellen, anstatt vollständige PBMC in NOG Mäuse transferiert wurden¹³¹. Ein Transfer einzelner T-Zell-Populationen wäre für einige Fragestellungen durchaus interessant und könnte die Induktion der GvHD verzögern.

Zusammenfassung

Abschließend lässt sich sagen, dass ein Transfer von 50×10^6 PBMC in immundefiziente Mäuse humane CD45⁺ T-Zellen sowohl in der Milz, den Läsionen als auch der murinen Haut verfügbar machte. Humane DCs und B-Zellen waren nicht nachweisbar. Es kommt sowohl ohne als auch mit PBMC-Transfer zur Bildung von Läsionen, in denen murine MΦ, DCs und NΦ präsent waren.

Der PBMC-Transfer beeinflusste zwar die Leishmaniasis, wirkte jedoch nicht förderlich auf den Krankheitsverlauf. Stattdessen stiegen die Läsionsvolumina nach Transfer teils signifikant an. In den Läsionen waren nach PBMC-Transfer humane CD3⁺CD8⁺ und CD3⁺CD4^{low} T-Zellen präsent. Ob diese geringe CD4-Expression physiologisch ist oder auf der Isolation aus dem Gewebe beruht, muss in folgenden Experimenten geprüft werden. Die Präsenz der T-Zellen führte nicht zur Induktion einer Heilung, sondern es kam zu signifikant erhöhten Parasitenlasten gegenüber Infektion allein.

Eine antigenspezifische, humane Zytokinfreisetzung war nur in einigen Mäusen nachweisbar, zeigte jedoch ein Th2-/Treg-Zytokinprofil mit insgesamt geringer Ausschüttung humaner Zytokine. Eine effektive Induktion von anti-Leishmanien-Antworten humaner T-Zellen fand nicht statt.

Auch eine Antigenpräsentation über zusätzliche, syngene, humane DC, induziert durch Applikation dieser Zellen an die Infektionsstelle, war nicht förderlich. Nur NS-tg(HLA-A0201) Mäuse zeigten nach PBMC-Transfer eine reduzierte Parasitenzahl in den Ohren. Hier ist das Datenaufkommen jedoch noch zu gering, um abschließende Aussagen darüber zu treffen, ob eine zusätzliche Präsentation über humane MHC Klasse I-Moleküle zu einer verbesserten Antigenpräsentation und damit zu antigenspezifischer T-Zellaktivierung führt. In den wenigen bisher untersuchten Mäusen konnte keine antigenspezifische Zytokinfreisetzung nachgewiesen werden. Wie in den meisten diskutierten Publikationen beschrieben, ist besonders der Transfer bereits antigenspezifischer humaner T-Zellen vielversprechend. Hierdurch wird das Problem der xenogenen Reaktivität humaner T-Zellen im Optimalfall vollständig vermieden.

Vorrangig muss in diesem Projekt die Kontrolle der xenogenen GvHD weiterverfolgt werden. Antigen-spezifische Antworten gegen *L. major* wurden in dem stark inflammatorischen Umfeld einer GvHD eventuell kaum induziert oder stark verschleiert. Hier sind neben der genannten Verwendung antigenspezifischer T-Zellen eine Reduktion der

PBMC-Zahl und eine Applikation von Treg-aktivierendem gp120 sinnvoll, sofern die Applikation dieses Glykoproteins eine antigenspezifische Reaktion zulässt. Ein Transfer isolierter Zellpopulationen wie z.B. CD8⁺ T-Zellen kommt für einige Fragestellungen ebenfalls in Betracht. Sollte sich trotz kontrollierter GvHD keine verlässliche antigenspezifische Zytokinfreisetzung erreichen lassen, ist eine Nutzung des Modells in dieser Form nicht zielführend. Kann eine solche jedoch induziert werden, muss anhand dieser neuen Ergebnisse abgewogen werden, welcher der Mausstämmen für das Modell in Frage kommt.

Zum jetzigen Zeitpunkt scheinen die Vorteile des NS Stammes in der geringeren GvHD-Anfälligkeit und bereits erfolgreich induzierten, antigenspezifischen Zytokinfreisetzen zu liegen. Allerdings war der Rekonstitutionserfolg sehr variabel. NS-tg(HLA-A0201) Mäuse waren ebenfalls nur mäßig anfällig für GvHD und die Entwicklung der Ohrläsionen verlief unauffällig. Diese Läsionsentwicklung ist nicht zwangsläufig als negativ, sondern möglicherweise als effektiv zu betrachten, denn es konnte eine reduzierte Parasitenzahl nach PBMC-Transfer nachgewiesen werden. Bislang wurde keine antigenspezifische Zytokinfreisetzung beobachtet. NSG Mäuse waren sehr GvHD-anfällig und wiesen ebenfalls kaum erhöhte Läsionsvolumina auf. Für sie spricht jedoch, dass eine erfolgreiche Rekonstitution mit wenigen PBMC GvHD-frei erreicht werden konnte und unter diesen Bedingungen bereits eine antigenspezifische Zytokinfreisetzung nachgewiesen wurde. H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} zeigten ebenfalls eine hohe GvHD-Anfälligkeit, jedoch konnten in diesen Mäusen die deutlichsten Effekte auf die Läsionsentwicklung, jedoch noch keine antigenspezifische Zytokinfreisetzung beobachtet werden. Letztere wurde allerdings bisher nur an wenigen Mäusen untersucht. Insgesamt besitzen diese Tiere gegenüber allen anderen getesteten Stämmen den Vorteil, dass für NOD Mäuse Defekte in der MΦ-, DC- und Komplement-Funktionalität beschrieben wurde. Das ist für den genetischen Hintergrund C57BL/6 nicht der Fall. Desweiteren sind C57BL/6 Mäuse in der murinen Leishmaniasis als Standardmodell bekannt. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass der Hintergrund der verwendeten H2b Rag2^{-/-}γc^{-/-} durch Rückkreuzung über viele Generationen weitestgehend, aber noch nicht vollständig C57BL/6 ist. Wie die Literaturdiskussion zeigt, wurde in allen diskutierten Publikationen ein meist deutlich früherer Analysezeitpunkt bei Experimenten mit PBMC-Transfers verwendet. Berücksichtigt man bei den bisher gewählten Bedingungen die aus der murinen Leishmaniasis bekannte Verzögerung der DC-Infektion und Induktion der T-Zellantwort, die ab Woche 3 auftretenden erhöhten GPT-Werte nach PBMC-Transfer und das in der Folge zunehmende Versterben der Tiere, zeigt sich ein Zeitfenster von etwa 4 Wochen, indem ohne übermäßigen Mausverlust eine Analyse humaner CL-Mechanismen durchgeführt werden kann. Unter diesen Voraussetzungen kämen alle getesteten Mausstämmen in Frage. Aufgrund des besseren Anwachsens humaner Zellen sollten jedoch präferentiell NSG-Mäuse in Betracht gezogen werden. Hier konnten bereits schwache, antigenspezifische Immunreaktionen nachgewiesen werden. Besonders interessant sind aufgrund der hier vorgestellten Daten die inzwischen verfügbaren NSG-tg(HLA-A0201).

Ein erfolgsversprechendes Modell stellt der Transfer humaner Haut auf immundefiziente Mäuse dar. Durch den Transfer des gesamten Organs mit gewebeständigen MΦ und DC werden die Schwächen in der Kommunikation zwischen murinem und humanen Immunzellen umgangen. Es lassen sich direkt im humanen Organ die Abläufe während einer *L. major*-Infektion analysieren und die Immunreaktion durch Injektion humaner Leukozyten gezielt modulieren. Mit Hilfe dieses Modells wurden bereits erfolgreich Infektionsexperimente mit VZV durchgeführt und publiziert. Jedoch muss nach PBMC-Transfer auch hier von einer möglichen GvHD-Induktion, sowohl xeno- als auch allogene, ausgegangen werden. Wie in dieser Arbeit beobachtet, wurde mit dem Transplantat eine kleinere Anzahl humaner T-Zellen in den Mausorganismus transferiert. Diese wenigen, zum Transplantat syngenen Zellen verursachten keine GvHD-Symptome in den Mäusen und könnten für die Analyse einiger

Fragestellungen ausreichen. Ein zusätzlicher PBMC-Transfer wäre deshalb nicht in allen Fällen nötig.

Insgesamt zeigte sich, dass beim Einsatz eines PBMC-Transfermodell eine gruppenweise Auswertung von Daten nicht zielführend ist. Das gilt in gleichem Maße für hauttransplantierte Mäuse mit PBMC-Transfer. Hierfür sind die Rekonstitutionserfolge und induzierten Immunreaktionen zu variabel. Eine Auswertung kann nur auf Einzelmausebene erfolgen.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Ursache der unterschiedlichen Verläufe von *L. major*-Infektionen in C57BL/6 und BALB/c Mäusen auf den genetischen Hintergrund des adaptiven Immunsystems eingegrenzt werden. In weiteren Ansätzen werden nun gezielt Knochenmarkschimären infiziert, in denen nur Th-, Tc- oder B-Zellen jeweils eines genetischen Hintergrundes vorliegen. Hierdurch sollen die relevanten Zellpopulationen weiter eingegrenzt werden.

Weiterhin wurde FAN als wichtiger Faktor in der kutanen Leishmaniasis identifiziert, der sowohl eine Rolle in der Migration von Zellen als auch in der Kontrolle der Parasitenzahl und der Ausbildung von Th2-Zytokinantworten spielt. Nachdem das Augenmerk in dieser Arbeit auf die Assoziation von FAN mit dem TNF-R1 gelegt wurde, muss zukünftig zunehmend dessen Bindung an CD40 und damit die Interaktion von T-Zellen und DCs bzw. MΦ berücksichtigt werden. Hierzu werden DCs aus infizierten FAN^{-/-} Mäusen durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsstatus und in Kokultur T-Zellen aus FAN^{-/-} und WT Mäusen auf ihre stimulatorische Kapazität untersucht. Eine Aktivitätsanalyse von T-Zellen und MΦ ist ebenfalls angebracht. Als Vergleichsstämme werden sowohl TNF-R1^{-/-} als auch CD40^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund in die Experimente involviert werden.

Zudem konnte unter Verwendung immundefizienter Mäuse ein PBMC-Transfer- und Hauttransplantationsmodell für die kutane Leishmaniasis etabliert werden. Im weiteren Verlauf muss die Reduktion xenogener GvHD im Vordergrund stehen, um gleichzeitig eine verlässliche, antigenspezifische Zytokinreisetzung zu induzieren. Der Einsatz von NSG-tg(HLA-A0201) Mäusen, die mit geringen PBMC-Zahlen rekonstituiert werden können und zusätzlich eine Präsentation von Peptiden über humane MHC Klasse I ermöglichen, ist hier vielversprechend. Eine reduzierte GvHD-Anfälligkeit sollte zudem bei der geplanten Verwendung von NSG Mäusen erreichbar sein, die kein murines MHC Klasse II exprimieren. Eine Variante dieses Stammes mit zusätzlicher Expression von HLA-DQ8 wird gleichzeitig eine Präsentation über humanes MHC Klasse II erlauben.

Um eine allogene humane Haut-GvHD zu vermeiden, werden zukünftig bei Infektionen humaner Haut PBMC des Hautspenders verwendet. Das wird nicht in allen Fällen möglich sein. Aus diesem Grund werden die Transplantationen von HLA-A0201⁺ Haut auf NSG-tg(HLA-A0201) Mäuse durchgeführt, HLA-A0201⁺ PBMC transferiert und dadurch HLA-Diskrepanzen minimiert.

5 Material und Geräte

5.1 Zellen und Gewebe

Parasiten

Leishmania major, Klon VI (MHOM/IL/80/Friedlin)

Mäuse

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Mäuse von der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg Universität Mainz (ZVTE) bezogen. Alle Tiere wurden von den Mitarbeitern der Einrichtung versorgt und Tierexperimente in deren Räumlichkeiten durchgeführt.

- C57BL/6
 - BALB/c
 - BALB/c x C57BL/6 F1
 - BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1
 - C57BL/6 FAN^{-/-}
- Eigenzucht
Eigenzucht
Gründertiere von Prof. Dr. Martin Krönke, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene am Klinikum der Universität Köln, Genetischer C57BL/6 Hintergrund durch ZVTE bestätigt.
- NOD-Scid (kurz NS)
- Offizielle Stammbezeichnung: NOD.CB17-Prkdscid/J (Stamm-Nr. 1303, ursprünglich bezogen von <http://www.jax.org/index.html>). Der genetische Hintergrund ist NOD/Lt
- NOD-Scidtg(HLA-A0201)
- Offizielle Stammbezeichnung: NOD.Cg-Prkdscid Tg(HLA-A2.1)1Enge/DvsJ (Stamm-Nr. 006609, ursprünglich bezogen von <http://www.jax.org/index.html>)
- NOD-Scidyc^{-/-} (kurz NSG)
- Offizielle Stammbezeichnung: NOD.Cg-Prkdscid Il2rg tm1Wjl/SzJ (Stamm-Nr. 5557, ursprünglich bezogen von <http://www.jax.org/index.html>). Der genetische Hintergrund ist NOD
- H2b (C57BL/6-like) Rag2^{-/-}gc^{-/-}
- Stammbezeichnung ZVTE: H2b;B6-Rag2 gc. Der genetische Hintergrund ist nicht standardisiert. Es wurde der H-2b MHC des C57BL/6 Stammes eingekreuzt.

Buffy coats

Buffy coats freiwilliger Spender wurden von der Transfusionszentrale der Unimedizin Mainz bezogen. Die Typisierung HLA-A02-positiver Buffy coats wurde durch die Transfusionszentrale durchgeführt und hier im Labor bestätigt sowie hinsichtlich HLA-A0201 verfeinert.

Humane Haut

Humane Haut freiwilliger Spender wurde über Dr. Ralf-Georg Meyer, III. Medizinische Klinik der Unimedizin Mainz bezogen.

5.2 Immunologische Nachweise

Antikörper

Murin

Anti-Maus 7/4 FITC, Klon	Serotec, München
Anti-Maus B220 FITC, Klon RA3-6B2	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD3e eF450, Klon 500A2	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD4 APC, Klon RM4-5	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD8a FITC, Klon 53-6.7	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD11c PE, Klon N418	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD11c biotinyliert, Klon M1/70	Biologend, über Biozol, Eching
Anti-Maus CD16/CD32 (Fc-Rezeptor III/II), Klon 2.4G2	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD19 FITC, Klon 1D3	Immunotools, Friesoythe
Anti-Maus CD45.1 eF450, Klon A20	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD45.2 APC, Klon 104	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD49b PE, Klon DX5	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus F4/80 PE, Klon BM8	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus Gr-1 biotinyliert, Klon RB6-8C5	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IFN- γ , Klon XMG1.2	Eigenproduktion mit Hybridom, aufgereinigt, unkonjugiert
Anti-Maus Ly-6G AF647, Klon 1A8	Biologend, über Biozol, Eching
Anti-Maus MHCII Pacific Blue, Klon M5/114.15.2	Biologend, über Biozol, Eching

Human

Anti-human CD2 PE, Klon LT2	Immunotools, Friesoythe
Anti-human CD3 APC-H7, Klon SK7	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-human CD3 PE, Klon UCHT1	eBioscience, Frankfurt
Anti-human CD3, Klon OKT3	Biologend, über Biozol, Eching
Anti-human CD4 biotinyliert, Klon L3T4	eBioscience, Frankfurt
Anti-human CD4 V450, Klon RPA-T4	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-human CD8 FITC, Klon B9.11	Beckman/Coulter, Krefeld
Anti-human CD8 PE, Klon MEM-31	Immunotools, Friesoythe
Anti-human CD11c V450, Klon B-ly6	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-human CD14 PE, Klon 61D3	eBioscience, Frankfurt
Anti-human CD19 PE, Klon LT19	Immunotools, Friesoythe
Anti-human CD45 APC, Klon HI30	eBioscience, Frankfurt
Anti-human CD45 PerCP-Cy5.5, Klon HI30	eBioscience, Frankfurt
Anti-human CD56 PE, Klon MEM188	eBioscience, Frankfurt
Anti-human CD80 PE, Klon 2D10.14	eBioscience, Frankfurt
Anti-human CD83 PE, Klon HB1SE	eBioscience, Frankfurt
Anti-human CD86 PE, Klon IT2.2	eBioscience, Frankfurt
Anti-human HLA-DR FITC, Klon L243	BD Pharmingen, Heidelberg

Streptavidin-gebundene Fluorochrome SA-PerCP

BD Pharmingen, Heidelberg

Isotypen

Murin

Ratte IgG2a FITC, Klon R35-95

BD Pharmingen, Heidelberg

Ratte IgG2b V450, monoklonal

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG2a APC, Klon eBR2a

eBioscience, Frankfurt

Arm. Hamster IgG1 PE, Klon G235-2356

BD Pharmingen, Heidelberg

Ratte IgG2a PE, Klon RB35-95

BD Pharmingen, Heidelberg

Ratte IgG2a AF647, Klon eBR2a

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG2b Pacific Blue, Klon RTK4530

Biologend, über Biozol, Eching

Ratte IgG2a biotinyliert, Klon R2-40

BD Pharmingen, Heidelberg

Human

Maus IgG1 APC, Klon P3.6.2.1

eBioscience, Frankfurt

Maus IgG1 APC-H7, Klon MOPC-21

BD Pharmingen, Heidelberg

Maus IgG1 Biotinyliert, Klon P3.6.2.8.1

eBioscience, Frankfurt

Maus IgG1 FITC, Klon MOPC-21

BD Pharmingen, Heidelberg

Maus IgG1 PE, Klon MOPC-21

BD Pharmingen, Heidelberg

Maus IgG1 PerCP-Cy5.5, Klon P3.6.2.8.1

eBioscience, Frankfurt

Maus IgG1 V450, Klon MOPC-21

BD Pharmingen, Heidelberg

Zytokinnachweise

Murin

DuoSet ELISA Maus IFN- γ

R&D Systems, Wiesbaden

DuoSet ELISA Maus IL-1 α

R&D Systems, Wiesbaden

BD OptEIA ELISA Maus IL-4

BD Pharmingen, Heidelberg

DuoSet ELISA Maus IL-6

R&D Systems, Wiesbaden

BD OptEIA ELISA Maus IL-10

BD Pharmingen, Heidelberg

DuoSet ELISA Maus IL-12p40

R&D Systems, Wiesbaden

DuoSet ELISA IL-23

R&D Systems, Wiesbaden

DuoSet ELISA IL-27

R&D Systems, Wiesbaden

BD OptEIA ELISA Maus TNF (mono/mono)

BD Pharmingen, Heidelberg

Human

ELISA IFN- γ Sets / Matched Pairs

Immunotools, Friesoythe

ELISA IL-4 Sets / Matched Pairs

Immunotools, Friesoythe

ELISA IL-10 Sets / Matched Pairs

Immunotools, Friesoythe

5.3 Sonstige Materialien

Puffer und Lösungen

PBS

PBS (10x): 1,38 M NaCl
 0,1 M NaH₂PO₄ x 1 H₂O
 in 1 l destilliertem Wasser, pH 6,6

PBS (1x): PBS (10x) wurde mit destilliertem Wasser verdünnt und der pH auf 7,2-7,3 angepasst und autoklaviert

RPMI complete-Medium

5% FCS
 1% Penicilin/Streptomycin
 1% Glutamin
 1% HEPES
 1% nicht essentielle Aminosäuren
 0,1% β-Mercaptoethanol
 500 ml RPMI 1640 zugeben

Leishmania-Medium

M199 (1x) 350 ml
 M199 (10x) 14.25 ml
 FCS 100 ml
 HEPES (1 M) 20ml
 Adenin (10 mM) 5 ml
 Hemin (0.25%) 1 ml
 Penicillin/Streptomycin 5 ml
 Glutamin 5 ml

Adenin 10 mM Adenin
 5% HEPES (1 M)
 in aqua dest.

Hemin 50% Triethanolamin
 0,25% Hemin
 in aqua dest.

Ficoll-Lösung

20% Ficoll in Aqua dest.

PBS/Glucose/EDTA-Puffer

0,2% Glukose
 2 mM EDTA (pH 6.5)
 in sterilem 1x PBS

Collagenase-Medium

1% Penicillin/Streptomycin
 0.1% Collagenase A
 in sterilem DMEM

Schneiders-Medium

2% Urin (human)
 10% FCS
 2% Glutamin
 1% Penicillin/Streptomycin
 0.5% HEPES (1 M)
 in Schneiders Drosophila-Medium

FACS-Puffer

2% FCS
 50 µl NaN₃ (10% sol.)
 in sterile PBS

Hautinkubations-Lösung

400 U/ml Penicillin, 400 µg/ml Streptomycin
 0,1 mg/ml Gentamicin
 0,4 mg/ml Fluconazol
 in EBSS (Earle's Balanced Salt Solution)

Narkose-Lösung

0,8 ml Rompun
 + 2 ml Ketamin
 + 2,8 ml PBS
 pro 10 g Maus etwa 25-30 µl i.p. verabreichen

Reagenzien und Chemikalien**ACK Lysepuffer**

Adenin

Alkopharm 70 (Ethanol 70%)

Aqua dest.

Baumwollgaze, Weichparaffin Cuticell Classic

Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5 g

BioGel P 100 Gel

CFDA SE Cell Tracer Kit (CFSE)

Collagenase, Clostridiopeptidase A

DMEM w/o pyruvate

Diff-Quik Färbung

Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)

EBSS (Earle's Balanced Salt Solution)

EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

FACS Clean Solution

FACS Flow Sheath Fluid

FACS Rinse Solution

Ficoll 400

FCS (fötale Kälberserum)

Fluconazol Infusionslösung (2 mg / ml)

Forene (Isoflurane)

BioWhittaker/Cambrex BioScience,
Verviers, Belgien

Carl Roth, Karlsruhe

Brüggemann Alcohol, Heilbronn

B. Braun, Melsungen

BSNmedical, Hamburg

Bayer Vital, Leverkusen

BioRad Laboratories, München

Invitrogen, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Merck, Darmstadt

Dade Behring, Düringen, Schweiz

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Gibco BRL, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

BD Pharmingen, Heidelberg

BD Pharmingen, Heidelberg

BD Pharmingen, Heidelberg

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PAA, Pasching, Österreich

Hikma, Klein-Winterheim

Abbott, Wiesbaden

Gentamicin-ratiopharm 80 mg/2 ml SF	Ratiopharm, Ulm
Glucose (D-(+)-Glucose, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Gp120	freundlicherweise überlassen von Christian Becker/Helmut Jonuleit, Unimedizin Mainz
HEPES, Pufferan $\geq 99,5\%$	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Liquemin N 25000	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LSM 1077 Lymphozyten-Separationsmedium	PAA, Pasching, Österreich
Helipur H plus N	B. Braun, Melsungen
Hemin(Chlorid) 98%	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES Pufferan, 99.5%	Carl Roth, Karlsruhe
Human-Albumin 20% Behring, salzarm (HSA)	CSL Behring, Marburg
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	PAA, Pasching, Österreich
Salzsäure (HCl, für pH-Werteinstellungen)	Merck, Darmstadt
Immersionsöl (Mikroskopie)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart
Ketamin Hydrochloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ketamin-ratiopharm 100 O.K. (50 mg / ml)	Ratiopharm, Ulm
Liberase T-Flex	Roche Applied Science, Penzberg
M199 Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Nahtmaterial, Ethibond Excel 5 – 0, 75 cm	Ethicon, Norderstedt
β -mercaptoethanol, 99% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger	Diagonal, Münster
Paraformaldehyde	Merck, Darmstadt
PenStrep 10000 U / ml Penicillin + 10000 μ g / ml Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Rekombinantes murines GM-CSF	PeproTech, Offenbach
Rekombinantes murines IL-4	PeproTech, Offenbach
<i>Rekombinantes murines IFN-γ</i>	PeproTech, Offenbach
Rekombinantes humanes GM-GSF (Leukine sargramostim)	Bayer Health Care Pharmaceuticals, Berlin
Rekombinantes humanes IL-4 premium grade	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Rekombinantes humanes IFN- γ	Immunotools, Friesoythe
RPMI 1640 Medium	Biochrome, Berlin
RPMI 1640 Medium	Lonza, Verviers, Belgien
Schneiders Drosophila Medium	BioWhittaker/Cambrex Bioscience
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, (NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonate (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Rompun 2% Injektionslösung (Xylazin)	Bayer Vital, Leverkusen
Staphylococcus Enterotoxine B (SEB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Verbrauchsmaterial

Finntips 300, 5-300 µl	Thermo Lab, VWR Darmstadt
Greiner Tubes, 15 ml	Greiner-One, Frickenhausen
Greiner Tubes, 50 ml	Greiner-One, Frickenhausen
Kanüle, 23Gx1¼, 0.6x30	B. Braun, Melsungen
Kanüle, 26Gx1½, 0.45x12	B. Braun, Melsungen
Kanüle, 23Gx1½, 0.3x13	BD, Heidelberg
Kryoröhrchen, 1.8 ml	Sarstedt, Nürnberg
MaxiSorp Nunc-Immuno Platten, 96 Well	Nunc, Brandt, Wertheim
Medicon, 50 µm, steril	BD, Heidelberg
Parafilm M Laboratory Film	Pechiney Plastic, Chicago, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 0.1 – 10 µl	Carl Roth, Karlsruhe
PD Tips Plastibrand, 0.5 ml	Brand, Wertheim
PD Tips Plastibrand, 2.5 ml	Brand, Wertheim
PD Tips Plastibrand, 5.0 ml	Brand, Wertheim
Pellet-Pestel-Motor-Spitzen PP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rasierklingen	Plano, Wetzlar
Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt, Nürnberg
Skalpel	B. Braun, Melsungen
Spritze, 0,5 ml	B. Braun, Melsungen
Spritze, 1 ml	B. Braun, Melsungen
Spritze, 2 ml	B. Braun, Melsungen
Spritze, 5 ml	B. Braun, Melsungen
Spritze, 10 ml	B. Braun, Melsungen
Spritze, 20 ml	B. Braun, Melsungen
ZapCap-S Bottel-top Filter, 0.2 µm	Schleicher & Schuell, Darmstadt
Zellkulturflasche, 25 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflasche, 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 6 Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 12 Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 24 Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 48 Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 96 Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb, 70 µm	Falcon, Fisher Scientific, Schwerte

5.4 Geräte

Absorptionsmicorplattenleser ELx808	BioTEK Instruments, Bad Friedrichshall
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
Durchflusszytometer LSR II	BD, Heidelberg
Medimachine	BD, Heidelberg
Mikroskop Dialux	Leitz, Wetzlar
Microskop Diaplan	Leitz, Wetzlar
Microskop Diavert	Leitz, Wetzlar

Miroskop DM IL	Leica, Wetzlar
Mikroskop DM LB	Leica, Wetzlar
Mikroskop Eclipse TS-100	Nikon, Düsseldorf
Mikroskopkamera DFC 290	Leica, Wetzlar
Milli-Q Wassersystem	Millipore, Schwalbach
Pellet-Pestel-Motor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pipetten pipetman	Gilson, Villiers de Bel, Frankreich
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schieblehre, digital, 150 mm	Rheinwerkzeuge, Mainz
pH211 Mikroprozessor-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Varioclav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vollschutz-Kleintier-Bestrahlungsanlage (Cäsium-Quelle: ^{137}Cs), Typ OB 58-BA	Buchler, Braunschweig
Vortexgenie Touch Mixer	Scientific Industries, New York, USA
Waage MC1 LC2200P	Sartorius, Göttingen
Waage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad TW2	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Kendro, Langenselbold
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Kendro, Langenselbold
Zentrifuge Mutlifuge 3 L-R	Heraeus, Kendro, Langenselbold
Zytospinzentrifuge Cellspin II	Tharma, Waldsolms

6 Experimentelle Methoden

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellsuspensionen resuspendiert und ein Aliquot mit physiologischer 1:10-verdünnter Trypanblau-Lösung resuspendiert. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde anschließend die Zahl lebender Zellen bestimmt. Durch Auflage eines Deckgläschens auf flankierende Stege wird eine Kammer mit einem definierten Volumen geschaffen, in der die Zellen ausgezählt werden. Nach Auszählung von mindestens zwei Großquadraten (16 Einzelquadrate) errechnet sich die Zellzahl nach folgender Formel:

$$\text{Zellen pro Großquadrat} \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

V = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension in Trypanblau

10^4 = Kammerkonstante

6.1.2 Kultivierung von promastigoten *L. major*

Die infektiöse, metazyklische, promastigote Lebensform von *L. major* findet sich in der Natur im Vorderdarm der Sandfliege. Um die dort herrschenden Lebensbedingungen zu imitieren, wurden die Promastigoten in Leishmanien-spezifischen Medium unter anaeroben Bedingungen bei 27°C kultiviert⁸⁰. Um eine neue Kultur herzustellen, wurden 10-20x10⁶ frisch isolierte amastigote Parasiten in 5 ml *Leishmania*-Medium in einer 25cm² Zellkulturflasche aufgenommen, welche mit Parafilm versiegelt wurden. Replizierende Parasiten der Log-Phase wurden in 10 ml Medium gehalten und wurden jeden zweiten Tag 1:3 oder 1:5 geteilt.

6.1.3 Isolation von metazyklischen, promastigoten *L. major*

Kultivierte Promastigote sind eine heterogene Mischkultur verschiedener Parasitenstadien. Mäuse und Zellen wurden jedoch ausschließlich mit hochinfektiösen metazyklischen Promastigoten infiziert, wie sie bei der Blutmahlzeit der Sandmücke übertragen werden. Für deren Isolation wurden 6-9 Tage alte Kulturen über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt²⁰³. Die Parasiten wurden zuvor zweimal in sterilem DMEM für 8 min bei 200 g gewaschen. Während dieses Schrittes verbleiben die Parasiten im Überstand. Im nächsten Schritt werden die Parasiten sedimentiert (3000g, 8 min). Das entstehende Pellet wurde in 2 ml DMEM aufgenommen. In einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen wurden 2 ml 20%ige Ficolllösung überschichtet von 2 ml einer 10%igen Ficolllösung vorgelegt. Das resuspendierte Pellet wurde über die oberste Phase geschichtet und das Röhrchen für 15 min bei 2000 g und Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Metazyklische Promastigote reichern sich dabei in den oberen beiden Phasen an. Sie wurden entnommen und ein weiteres Mal in DMEM für 8 min bei 3000 g gewaschen, bevor sie gezählt wurden.

6.1.4 Intradermale Infektion in die Ohren

Die Parasitenzahl (1×10^3 , Niedrigdosis) orientiert sich dabei an der Zahl physiologisch durch die Sandmücke übertragener Parasiten⁸⁰. Für einige wenige Fragestellungen wurden 2×10^5 Parasiten verwendet (Hochdosis). Die Infektion erfolgte intradermal in die exponierten Ohren der anästhesierten Mäuse. Dazu wurde die entsprechende Parasitenzahl in 10 μ l DMEM mit einer Spritze in die Ohren injiziert.

6.1.5 Isolation amastigoter *L. major*

Die Herstellung einer neuen *L. major* Kultur und einige *in vitro* Infektionen von murinen M Φ und DCs machen die Isolation intrazellulärer amastigoter Parasiten nötig. Amastigote wurden direkt aus infiziertem Gewebe von BALB/c Mäusen isoliert²⁶, welche 3-4 Wochen zuvor mit 2×10^5 metazyklischen Promastigoten infiziert wurden. Die infizierten Fußsohlen wurden geerntet und in 1x PBS/Glukose/EDTA Puffer überführt. Das Gewebe wurde im ersten Schritt mit einer Schere zerkleinert. Um die intrazellulären Parasiten aus den Zellen zu isolieren, wurden diese mechanisch in einem sterilen Gewebezerkleinerer aufgeschlossen. Der Überstand wurde über ein 70 μ m Zellsieb gegeben und zweimal mit DMEM für 8 min bei 3000 g gewaschen. Das resultierende Pellet beinhaltete die Amastigoten.

6.1.6 Herstellung von löslichem Leishmanien-Antigen (SLA)

SLA wurde für die antigenspezifische Restimulation von Leishmanien-Peptide erkennende T-Zellen eingesetzt⁸⁰. Es ist eine komplexe Mischung aller löslichen Proteine von *L. major*. Um SLA herzustellen, wurden *L. major*-Promastigote aus 6 Tage alten Kulturen zweimal in RPMI complete für 8 min bei 200g gewaschen und bei 3000 g pelletiert. Die Parasitenzahl wurde auf 300×10^6 /ml in RPMI complete-Medium eingestellt und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wie folgt degradiert:

- 1) Einfrieren der Parasiten in flüssigem Stickstoff
- 2) Auftauen im Wasserbad bei 50°C
- 3) Resuspendieren

Dieser Zyklus wurde 10-mal wiederholt. Die Immunogenität des SLA wurde durch Restimulationsexperimente und Messung der dabei freigesetzten Zytokine bestimmt.

6.1.7 Bestimmung von Läsionsentwicklung

Die Läsionsentwicklung wurde wöchentlich überprüft und die Läsionen mit Hilfe einer Schieblehre in drei Dimensionen gemessen⁴¹. Die Läsionsvolumina wurden mit folgender Formel berechnet: $(a/2 \times b/2 \times c/2) \times 3/4\pi$. Die Angabe der Volumina jeder Versuchsgruppe erfolgte als Mittelwert \pm SEM.

6.1.8 Bestimmung von Parasitenlasten

Infizierte Ohren wurden geerntet, im Bereich des Knorpels geteilt und mit der Dermis nach unten für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ in Collagenase A-Medium inkubiert. Anschließend wurden die enzymatisch angedauten Ohren mit einer Schere zerkleinert und für 1 min mit einem Pelletmotor das Gewebe mechanisch aufgeschlossen, wobei die Parasiten aus

den Zellen freigesetzt werden. Die Zellsuspensionen wurden durch ein 70 µm Sieb gefiltert und zweimal in sterilem 1x PBS gewaschen. Die freigesetzten Parasiten wurden durch Zentrifugation bei 3000 g für 8 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Schneiders Medium aufgenommen und 100 µl der Parasitensuspension in das erste Well einer 96 Well-Platte überführt, in der bereits 100 µl Schneiders Medium vorgelegt waren. In einer 1:2 Verdünnung wurden die Parasiten in jedem folgenden Well verdünnt. Es wurden Verdünnungsreihen von bis zu 6 Spalten angesetzt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 27°C für 6-9 Tage kultiviert. Die meisten Amastigoten transformieren unter diesen Bedingungen in die promastigote Lebensform. Das am höchsten verdünnte Well mit mindestens einem lebenden Parasiten gibt unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren die absolute Zahl der Parasiten im infizierten Ohr an⁸⁰.

6.1.9 Isolation von Zellen aus Lymphknoten und Milz

Lymphknoten infizierter Mäuse wurden geerntet und durch Zerdrücken mit einem sterilen Spritzenstempel aufgeschlossen. Das Gewebe wurde in 1x PBS aufgenommen und durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert. Die Zellen wurden in RPMI complete Medium oder FACS Puffer für 8 min bei 200 g gewaschen und anschließend gezählt.

Um Zellen aus der Milz zu isolieren, wurde das Organ mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels durch ein 70 µm Zellsieb in eine 55 mm Petrischale mit 5 ml sterilem 1x PBS gedrückt. Die Zellsuspension wurde mit 1x PBS für 8 min bei 200 g gewaschen und in 1x PBS oder RPMI complete-Medium aufgenommen.

6.1.10 Zytokinprofile restimulierter Lymphknoten- und Milzzellen

Um die Zytokinprofile infizierter Mäuse zu bestimmen, wurden 1×10^6 drainierende Lymphknoten- oder Milzzellen in 200 µl RPMI complete-Medium in eine 96 Well-Flachbodenplatte überführt. Die antigenspezifische Restimulation erfolgte durch Zugabe von 10 µl SLA (25 µg/ml). Als Positivkontrolle dienten Ansätze mit 20 µl Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB, 1 mg/ml) oder 10 µl anti-human-CD3-Antikörper (0,5 µg/ml Endkonzentration). Negativkontrollen wurden nicht behandelt. Alle Zellen wurden für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Zytokinfreisetzung mittels ELISA bestimmt.

6.1.11 Isolation intradermaler Leukozyten aus dem Ohr

Für anschließende durchflusszytometrische Analyse wurden die intradermalen Leukozyten aus infizierten Mausohren mittels Verdau und mechanischem Gewebeaufschluss isoliert¹⁹. Infizierte Ohren wurden geerntet, die beiden Hälften getrennt und die Ohrhälften mit der Dermis nach unten in Liberase-Medium überführt. Die Ohren wurden für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ verdaut. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von RPMI complete-Medium gestoppt. Beide Hälften eines Ohrs wurden im Folgenden für 7 min mit einer Medicon-Klinge mechanisch zerkleinert. Um die Zellen aus dem Medicon zu gewinnen, wurde dieses mit 10 ml 1xPBS und 10 ml RPMI complete-Medium gespült und die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb gegeben. Zusätzlich wurde das Medium aus dem Verdauschritt ebenfalls über das Sieb gegeben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 200g für 8 min pelletiert und anschließend die Zellzahl bestimmt.

6.1.12 Isolation von Knochenmark

Um eine Knochenmark-Einzelzellsuspension zu gewinnen, wurde naiven Mäusen Femur und Tibia entnommen, die Knochen von Gewebe befreit, in Ethanol desinfiziert und die Epiphysen entfernt. Mit einer Lösung aus 50% 1x PBS und 50% RPMI complete-Medium wurde unter Verwendung einer Spritze das Mark aus den Knochen gespült. Durch gründliches Mischen der Medium/Knochenmark-Suspension mit einer sterilen Pipette wurden die Zellen vereinzelt. Die Suspension wurde bei 200g für 8 min zentrifugiert und die Zellen in RPMI complete-Medium aufgenommen.

6.1.13 Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark (BMDC)

Die Generierung von murinen Knochenmarks-DC (BMDCs) aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks benötigt die Zugabe der murinen rekombinanten Zytokine IL-4 und GM-CSF²⁰⁴. Eine Knochenmark-Einzelzellsuspension wurde in 1x PBS gewaschen und bei 200 g für 8 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert, um Erythrozyten zu entfernen. Nach 1 min wurden die Zellen wiederum mit 1x PBS gewaschen. Bis zu 40×10^6 Zellen wurden in 20 ml RPMI complete-Medium mit 10 ng/ml IL-4 und GM-CSF in einer Zellkulturflasche kultiviert. Nach zwei Tagen sind die DC-Vorläuferzellen adärent und das Medium musste ersetzt werden. 15 ml frisches RPMI complete-Medium mit Zytokinen wurde zugegeben. An Tag 4 der Kultur befinden sich die Zellen in Suspension und 5 ml RPMI complete-Medium mit Zytokinen wurde zugegeben. An Tag 6 wurden die unreifen DCs geerntet und für weitere Experimente eingesetzt.

6.1.14 Lethale Bestrahlung von Mäusen mit einer Cäsium-Quelle

Für eine Rekonstitution von Mäusen mit einem veränderten Immunsystem muss das bestehende hämatopoetische System der Mäuse zunächst soweit geschädigt werden, dass eine Proliferation dieser Zellen nicht mehr möglich ist. Deshalb wurden durch radioaktive Bestrahlung der Mäuse DNA-Brüche in den hämatopoetischen Zellen induziert (lethale Bestrahlung). Hierfür wurde eine γ -Bestrahlung mit Hilfe der Cäsium-Bestrahlungsanlage des Instituts für Virologie der Universitätsmedizin verwendet. C57BL/6 wurden mit einer Dosis von 9 Gy, BALB/c Mäuse mit 7 Gy bestrahlt^{128;140}. BALB/c x C57BL/6 F1 und BALB/c Rag1^{-/-} x C57BL/6 Rag1^{-/-} F1 wurden aufgrund ihres stabilen Hybridhintergrundes aus eigener Initiative ebenfalls mit 9 Gy bestrahlt.

6.1.15 Rekonstitution durch retroorbitale Injektion von Knochenmark

Das Einbringen von murinem Knochenmark in die Blutbahn lethal bestrahlter Mäuse führt verlässlich zur Rekonstitution eines hämatopoetischen Systems. Um das zu erreichen, wurden die Empfängermäuse betäubt und retroorbital 5×10^6 Knochenmarkszellen in 100 μ l 1x PBS transferiert. Das Anwachsen des transferierten Knochenmarks und die anschließende Rekonstitution der Maus dauerten 6-10 Wochen und wurden mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Blutanalyse kontrolliert.

6.1.16 Gewinnung von inflammatorischen Makrophagen aus Biogel

Inflammatorische M Φ können durch Injektion nicht phagozytierbaren Biogel an die Injektionsstelle gelockt werden²⁰⁵. 4-5 Tage nach der subkutanen Injektion von 1 ml sterilem Biogel/10 g Körpergewicht in den Nacken von Mäusen wurde das Biogel geerntet und in 1x PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde über ein 70 μ m Zellsieb geben um inflammatorischen Zellen vom Biogel zu trennen und anschließend bei 200g für 8 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml M Φ Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Danach erfolgte die Kultivierung von bis zu 15×10^6 Zellen in 10 ml M Φ -Medium in 10 cm Petrischalen für 3-4 h bei 37°C und 5% CO₂. Unter diesen Bedingungen adhären M Φ an die Kunststoffoberfläche. Die Platte wurden anschließend gründlich mit 1x PBS gespült und mit 5 ml 1x PBS/Glukose für 30 min auf Eis gestellt um die adhären Zellen abzulösen. Die Platte wurde mit dem Medium gespült und die Zellsuspension gesammelt. Nach dem Pelletieren der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt.

6.1.17 Infektion von dendritischen Zellen und Makrophagen mit Amastigoten

Um die Zytokinfreisetzung von DCs und M Φ zu bestimmen, wurden sechs Tage alte unreife DCs oder inflammatorische M Φ aus Biogel auf $0,2 \times 10^6$ /ml in RPMI complete- oder M Φ -Medium eingestellt und 1 ml Zellsuspension zusammen mit 1×10^6 frisch isolierten Amastigoten in einer 24 Well-Platte kultiviert. Vor der Kultur wurden die Parasiten mit 5 Volumenprozent BALB/c Normalserum für 10 min bei 37°C im Wasserbad opsonisiert. Als Positivkontrolle dienten DCs, die mit 100 ng/ml LPS und 1000 U/ml murinen IFN- γ stimuliert wurden. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Alle Zellen wurden für 18 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf ihre Zytokinkonzentrationen untersucht. Zur Bestimmung von Infektionsraten der Ansätze mit Amastigoten wurden Zytospins dieser Zellen hergestellt.

Sollte die Aktivierbarkeit von M Φ getestet werden, wurden die Zellen wie beschrieben, jedoch in einer 48 Well-Platte für 18 h mit Amastigoten infiziert und anschließend durch Abnehmen des Mediums und Spülen mit 1x PBS nicht phagozytierte Amastigote entfernt. Um die Aktivierbarkeit von murinen M Φ durch humanes IFN- γ zu überprüfen, wurden diese mit 1000 U/ml murinen IFN- γ oder 1000 U/ml humanen IFN- γ und 100ng/ml LPS versetzt. Alle Zellen wurden für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zu Bestimmung der Infektionsraten wurden von den M Φ Zytospins hergestellt.

6.1.18 Zytospins

Um infizierte Zellen quantifizieren zu können, wurden isolierte Zellen mittels einer Zytozentrifuge auf Objektträger aufgeschleudert. $7,5 \times 10^4$ – $1,5 \times 10^5$ Zellen wurden für 5 min bei 500 U/min zentrifugiert. Um zwischen verschiedenen Zelltypen zu differenzieren und infizierte Zelle zu identifizieren, wurden die Zellen mit Diff-Quick nach Herstellerangaben gefärbt.

6.1.19 Nachweis der Proliferation von T-Zellen mittels CFSE

Der Farbstoff Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) bindet kovalent an intrazelluläre Amine. Durch die Färbung mit CFSE entstehende Protein-Farbstoff-Konjugate verbleiben in der Zelle und können mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. T-Zellen proliferieren nach Aktivierung und verteilen das CFSE auf die resultierenden Tochterzellen. Eine abnehmende CFSE-Fluoreszenz-Intensität im FL-1 Kanal kann somit als Maß für die Proliferation von T-Zellen dienen.

5×10^6 /ml Lymphknoten- oder Milzzellen wurden in warmen 1x PBS gewaschen und in 1 μ M CFSE in 1x PBS resuspendiert. Die Zellen wurden für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend mit 10 ml warmem RPMI complete-Medium aufgefüllt und bei 200 g für 8 min zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend für Restimulationsexperimente eingesetzt. Nach 4-6 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Zellproliferation im Durchflusszytometer gemessen.

6.1.20 Gewinnung von humanen PBMC und autologem Plasma aus Buffy coat

Allgemeines

Für diese Arbeit wurden nur PBMC aus Buffy coats von gesunden Spendern verwendet. Die PBMC wurden mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen^{206;207}. Die PBMC-Aufreinigung erfolgte am Tag nach der Blutentnahme. Die Buffy coats wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Um die verschiedenen Zellpopulationen voneinander zu trennen, wird die Zellsuspension über einem Ficoll-Separationsgradienten zentrifugiert.

Anreicherung

Steriles Ficoll wurde mit Blut überschichtet und bei Raumtemperatur für 30 Min bei 450 g zentrifugiert. Jeweils 10 ml der obersten Plasmaschicht, wurden abgenommen und je Spender gepoolt. Die Interphase wurde abgesaugt, in kaltes 1xPBS überführt und solange gewaschen, bis der Überstand klar ist. Die Zentrifugationsschritte erfolgten für 6 min bei 350 g und 4°C.

Das separat gesammelte autologe Plasma wurde im Wasserbad für 30 Min bei 56°C inaktiviert, anschließend zweimal für 2x 5 Min bei 4000g abzentrifugiert und der Überstand für Zellkulturen eingesetzt. Dazu wurde das Plasma bis zu 6 Tage bei 4°C gelagert oder zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

6.1.21 Generierung von humanen DCs aus Monozyten

Aus Monozyten des peripheren Bluts freiwilliger Spender wurden unreife humane DCs generiert^{206;207}. Die Monozyten wurden über Plastik-Adhärenz aus PBMC isoliert, nicht-monozytäre Zellen ab gespült in 2 ml IMDM-Medium + 1% autologem Plasma über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. An Tag 1 der Kultur wurde das Medium samt nicht adhärenter Zellen (nicht-monozytäre Zellen) komplett abgezogen und durch 3 ml IMDM-Medium + 5% autologem Plasma und 150 U/ml humanem IL-4 und 400 U/ml humanem GM-CSF ersetzt. An Tag 4 der Kultur wurde 1 ml des Mediums an der Oberfläche abgesaugt und durch IMDM-Medium + 5% autologes Plasma + 150 U/mL humanem IL-4 + 800 U/mL humanem GM-CSF ersetzt. Um immature DCs zu erhalten, wurden die Platten für 10 min auf

Eis gestellt und anschließend die Zellen mit dem Medium gespült und abgenommen. DCs von einem Spender wurden vereinigt und die Zellzahl bestimmt.

Wurden die Zellen als unreife DCs für intradermale Injektionen von Mäusen verwendet, wurden am Tag der *L. major*-Infektion $0,5 \times 10^6$ DCs an die Infektionsstelle injiziert. Um anstelle einer Infektion infizierte, humane DCs zu verwenden, wurden diese wie beschrieben am Tag 6 geerntet und 1×10^6 DCs in 3 ml IMDM Medium + 5% autologes Plasma und 150 U/ml humanem IL-4 und 400 U/ml humanem GM-CSF unter Zugabe von 5×10^6 metazyklischen, promastigoten *L. major* für 18 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und anschließend geerntet⁹². Um nicht phagozytierte Parasiten zu entfernen wurden, die Zellen zweimal in 1x PBS gewaschen und in 1x PBS aufgenommen. Anstelle einer Infektion wurden intradermal $0,5 \times 10^6$ dieser DCs in die Ohren der Mäuse injiziert. Wurden humane DCs für Injektionsversuche verwendet, erhielten die Mäuse zum gleichen Zeitpunkt i.p. 50×10^6 PBMC desselben Spenders. Die PBMC stammen jeweils aus denselben Buffy coats, aus denen DCs generiert wurden, und wurden für den Zeitraum der DC Kultur in flüssigem Stickstoff eingefroren.

6.1.22 Intraperitoneale Injektion

Um die Maus zu fixieren, wurde diese am Schwanz hochgenommen. Die Haut im Nacken wurde mit Daumen und Zeigefinger gefasst, die Maus in die Hand gelegt und der Schwanz mit dem kleinen Finger festgehalten. Die immobilisierten Mäuse wurden leicht kopfüber gehalten und die i.p.-Injektion im 45°-Winkel mit einer Spritze gesetzt. Dabei wurde ein Injektionsvolumen von maximal 200 µl appliziert.

Sollten PBMC injiziert werden, wurden 50×10^6 Zellen/100 oder 200 µl in 1x PBS aufgenommen und 50×10^6 Zellen je Maus injiziert. Sofern weniger Zellen transferiert wurden, wurde die Zellzahl/100-200 µl entsprechend reduziert, ein Injektionsvolumen von 100 µl jedoch nicht unterschritten.

6.1.23 Kryokonservierung und Auftauen von PBMC

Um PBMC für eine spätere Verwendung einzufrieren, wurde die Zellzahl auf maximal 150×10^6 Zellen/ml in humanem Serumalbumin (HSA) oder IMDM Medium eingestellt. 2 ml Kryoröhrchen wurden mit 1 ml HSA oder autologem Plasma mit 20% DMSO befüllt, 1 ml Zellsuspension hinzupipettiert und sofort resuspendiert. Die Röhrchen wurden geschlossen und umgehend in einen auf 4°C vorgekühlten Qualilab Freezing Container gestellt. Dieser wurde über Nacht bei -80°C eingefroren und am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die eingefrorenen Zellen wieder aufzutauen, erfolgte ein Antauen der Röhrchen für 30 s bei 37°C im Wasserbad. Die angetauten Zellen wurden in 5 ml eiskaltes HSA oder autologes Plasma überführt und mit IMDM Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 350 g und 4°C für 8 min. Die Zellen wurden ein weiteres Mal in 30 ml IMDM gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für die weitere Verwendung in IMDM aufgenommen. Wurden die Zellen für den Transfer in Mäuse genutzt, wurden sie zuvor zweimal mit 1xPBS gewaschen.

6.1.24 Blutentnahmen aus der Schwanzvene

Blutproben für weitere Analysen wurden den Mäusen aus der Schwanzvene entnommen. Dazu wurden die Mäuse fixiert, der Schwanz mit Ethanol desinfiziert und die Schwanzvene mit einer Klinge angeritzt. Das Blut wurde in 1,5 ml Reaktionsröhrchen aufgefangen und die Blutung durch Druck auf die Schwanzvene und Wunde gestoppt.

6.1.25 Serumpreparation aus Mäuseblut und GPT (ALT) Bestimmung

Erhöhte GPT (ALT) Werte sind sowohl im Menschen wie auch in der Maus eine etablierte Methode, Organschäden nachzuweisen. In allo- und xenogenen Experimenten sind erhöhte GPT-Werte die häufige Folge einer auftretenden Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD). Um eine solche nachzuweisen, wurde den Mäusen im Abstand von 3 Wochen 120 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen, gesammelt und für 20 min bei Raumtemperatur die Gerinnung des Blutes abgewartet. Anschließend wurden die Proben bei 4°C für 20 min und 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend verworfen und eine GPT-Konzentrationsbestimmung im Blutserum durch die zentrale Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Normalwerte im Mausserum liegen bei bis zu 40 U/l GPT.

6.1.26 Leukozytengewinnung aus Mausblut

Die zelluläre Zusammensetzung des Blutes von Mäusen ist ein wichtiges Mittel zum Nachweis einer erfolgreichen Rekonstitution nach Knochenmark- oder PBMC-Transfer. Hierzu wurde ein Tropfen Blut in 50 µl 1:3 Liquemin/1x PBS aufgenommen. Durch Zugabe von 500µl ACK-Lysepuffer und Inkubation für 1 min wurden die Erythrozyten lysiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal in 1x FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

6.1.27 Vorbereiten von humanen Hauttransplantaten

Die Transplantation gesunder, überschüssiger, humaner Haut aus Operationen der ästhetischen Chirurgie auf immundefiziente Mäuse und deren anschließende Infektion mit *L. major* eignet sich gut zur Untersuchung der lokalen Immunreaktion bei kutaner Leishmaniasis. Hierfür wurde frisch entnommene Spenderhaut für den Transport in NaCl aufbewahrt, anschließend von Unterhautfettgewebe sowie Bindegewebe befreit und in ca. 20 mm lange, 15 mm breite und 2-3mm dicke Transplantate zerteilt. Die Transplantate wurden abschließend für mindestens 18 Stunden in Hautinkubations-Lösung inkubiert¹²⁷.

6.1.28 Hauttransplantation

Die Operation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Mit NaCl/Ketamin/Rompun betäubte Mäuse wurden interskapulär rasiert, desinfiziert und ein Stück Nackenhaut entfernt, das der Größe eines Transplantates entsprach. Das Transplantat wurde anschließend auf die Wunde gelegt und mit 5-7 Stichen mit der Maushaut vernäht. Zum Schutz des Transplantats wurde die Wunde mit Weichparaffin-imprägnierter Baumwollgaze bedeckt und mit seitlich der Wunde liegender Haut eine Hauttasche über das

Transplantat genäht. Das Anwachsen des Transplantats dauerte ca. 6 Wochen, schorffrei waren die Wunden nach 15-20 Wochen.

6.1.29 Biopsie

Um die zelluläre Zusammensetzung des Transplantates vor und nach Infektion vergleichen zu können, wurde eine Woche vor Infektion und drei Wochen nach Infektion mit *L. major* eine Biopsie des Transplantats vorgenommen. Hierfür wurden die Tiere mit NaCl/Ketamin/Rompun betäubt, mit einer Schere ein Stück der humanen Haut entnommen und die Wunde mit 3-4 Stichen vernäht. Die entnommene Biopsie wurde in Histofix fixiert, in Paraffin eingebettet und histologisch untersucht.

6.1.30 Intradermale Transplantat-Infektion mit promastigoten *L. major*

Eine Infektion der transplantierten humanen Haut bietet die Möglichkeit, experimentell die lokal ablaufende, humane Immunreaktion in der kutanen Leishmaniasis nachzuvollziehen. Hierfür wurden intradermal 2×10^5 metazyklische, promastigote *L. major* mit einer Spritze in das Transplantat injiziert.

6.1.31 Histologie

Die histologischen Färbungen wurden freundlicherweise von der Core Facility Histologie des Forschungszentrums Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

6.2 Immunologische Methoden

6.2.1 Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Allgemeines

Das Prinzip des hier angewendeten Sandwich-ELISA beruht auf der Erkennung von Antigenen durch spezifische Antikörper, die an einer Trägersubstanz immobilisiert sind (Coating). An diese bindet anschließend das Antigen (Capture), das mit Hilfe eines HRP- (Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelten Antikörpers unter Zugabe eines chromogenen Substrats nachgewiesen werden kann. Die Konzentration des Antigens entspricht somit der optischen Dichte der Färbung und kann mit Hilfe des Microplate-Readers bei 450 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Zytokinnachweise mittels ELISA erfolgten nach Herstellerangaben.

Murine ELISA-Sets

Als Proben dienten die Überstände von DCs und MΦ nach 18 h Infektion mit amastigoten *L. major* oder von Lymphknoten infizierter Mäuse nach 48 h antigenspezifischer Restimulation mit SLA sowie entsprechende Kontrollen. Quantifiziert wurden die murinen Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-23, IL-27, TNF und IFN- γ .

Humane ELISA-Sets

Als Proben dienten die Überstände von Milzzellen 48 h nach antigenspezifischer Restimulation. Quantifiziert wurden die humanen Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- γ .

6.2.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, die es erlaubt, in Suspensionen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom zu vereinzeln, zu zählen und einzeln zu charakterisieren. Ein Laserstrahl einer spezifischen Wellenlänge ist auf diesen Flüssigkeitsstrom gerichtet. Jede Zelle wird registriert und streut dabei das Licht auf eine spezifische Weise. Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Zellen gebunden sind, können durch das Licht angeregt werden und emittieren Licht einer längeren Wellenlänge. Diese Kombination aus gestreutem Licht und Fluoreszenz erlaubt die Analyse der Zellsuspension.

In FACS-Puffer gewaschene Zellen wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Fc Block für 20 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und anschließend 10 μl eines Mixes Fluoreszenzfarbstoffgekoppelter, spezifischer Antikörper in FACS-Puffer für 20 Min bei 4°C inkubiert. Falls nicht nur direkt an ein Fluorochrom gekoppelte, sondern auch biotinylierte Antikörper eingesetzt wurden, wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und in einem weiteren Markierungsschritt mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluorochrom markiert. Nach abschließendem Waschen der Zellen wurden sie in 100-200 μl FACS-Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines BD LSRII Durchflusszytometers analysiert.

6.3 Statistische Analysen und Software

Die statistischen Analysen wurden unter Anwendung des ungepaarten studentischen t-Tests und der Software StatView® 5.0 für Windows oder GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Statistische Unterschiede sind markiert als $*=p\leq 0.05$, $**=p\leq 0.005$ und $***=p\leq 0.002$. Die Auswertungen von durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit FlowJo 7.2.2 oder 7.6.3. Fotos von Gewebeschnitten wurde mit der Software Leica IM 50 Image Manager V5 Release 247 am Mikroskop Leica DM LB über die Kamera Leica DFC 290 aufgenommen. Für die weitere Datenverarbeitung wurde Microsoft Office 2003 und 2007 verwendet.

7 Anhang

Anhang I: Konzentration an GPT in Blutseren nach einmaligem PBMC-Transfer. Aufgeführt sind die GPT-Blutserum-Konzentrationen in Mäusen, denen in Woche 0 50×10^6 PBMC i.p. transferiert wurden (1x PBMC). Die Infektion erfolgte mit 1×10^3 promastigoten *L. major*. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte je Gruppe \pm SEM sowie die die Maximalwerte der Behandlungsgruppe in individuellen Mäusen. Die Werte in Klammern repräsentieren die Anzahl der Tiere, deren Werte in die Mittelwertbestimmung eingingen (n=1-7 unabhängige Experimente)

Stamm	Woche	Durchschnittswerte			Maximalwerte		
		Infektion	PBMC (1x)	Infektion + PBMC	Infektion	PBMC (1x)	Infektion + PBMC
H2b Rag2 ^{-/-} gc ^{-/-}	3	26,2 $\pm 0,74$ (10)	46,74 $\pm 15,67$ (11)	29,45 $\pm 1,58$ (13)	29,50	202,00	43,90
	6	22,74 $\pm 0,70$ (10)	75,82 $\pm 23,78$ (11)	94,45 $\pm 61,03$ (11)	26,40	289,00	700,00
	9	26,33 $\pm 0,92$ (15)	141,17 $\pm 46,03$ (7)	39,33 $\pm 8,63$ (11)	31,40	335,00	114,00
NSG	3	23,4 $\pm 0,69$ (16)	342,4 $\pm 139,31$ (16)	167,8 $\pm 54,75$ (16)	27,50	2275,00	744,00
	6	23,7 $\pm 1,18$ (11)	249,2 $\pm 98,83$ (8)	67,6 $\pm 43,09$ (6)	30,50	756,00	283,00
	9	29,1 $\pm 3,22$ (5)	60,5 $\pm 29,12$ (4)	51,97 $\pm 6,76$ (3)	38,50	145,00	59,70
NS	3	23,55 $\pm 1,66$ (18)	36,68 $\pm 14,60$ (9)	23,48 $\pm 2,54$ (9)	44,50	152,00	35,80
	6	22,00 $\pm 1,96$ (21)	41,54 $\pm 11,49$ (13)	45,81 $\pm 11,58$ (15)	47,90	135,00	178,00
	9	29,87 $\pm 3,05$ (26)	37,98 $\pm 7,34$ (16)	27,44 $\pm 1,47$ (16)	96,50	125,00	36,30
NS-tg(HLA-A0201)	3	23,37 $\pm 2,26$ (15)	24,43 $\pm 1,74$ (4)	22,38 $\pm 1,45$ (4)	45,80	28,70	25,10
	6	20,41 $\pm 4,44$ (13)	190,28 ± 1 71,58 (4)	127,18 $\pm 82,20$ (4)	17,90	22,90	364,00
	9	25,78 $\pm 2,2$ (12)	71,90 ± 0 (1)	30,90 $\pm 9,90$ (2)	40,30	705,00	40,80

Anhang II: Konzentration an GPT in Blutseren nach repetitivem PBMC-Transfer.

Aufgeführt sind die GPT-Blutserum-Konzentrationen in Mäusen, denen in Woche 0 50×10^6 PBMC i.p. transferiert wurden und die zusätzlich in Woche 3 10×10^6 und in Woche 6 5×10^6 PBMC erhielten. Die Infektion erfolgte mit 1×10^3 promastigoten *L. major*. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte je Gruppe \pm SEM sowie die Maximalwerte der Behandlungsgruppe in individuellen Mäusen. Die Werte in Klammern repräsentieren die Anzahl der Tiere, deren Werte in die Mittelwertbestimmung eingingen (n=2 unabhängige Experimente).

Stamm	Woche	Durchschnittswerte		Maximalwerte	
		PBMC (3x)	Infektion + PBMC (3x)	PBMC (3x)	Infektion + PBMC (3x)
NS	3	24,14 $\pm 1,48$ (10)	27,43 $\pm 3,05$ (9)	30,90	27,30
	6	85,92 $\pm 40,49$ (8)	157,06 $\pm 81,58$ (8)	329,00	664,00
	9	67,02 $\pm 51,52$ (6)	37,63 $\pm 2,00$ (3)	160,00	40,90
NS-tg(HLA-A0201)	3	26,16 $\pm 1,69$ (10)	20,07 $\pm 1,27$ (10)	35,40	28,10
	6	47,44 $\pm 24,63$ (9)	357,20 $\pm 170,33$ (8)	244,00	1100,00
	9	91,75 $\pm 39,66$ (8)	29,00 $\pm 8,80$ (5)	351,00	60,00

8 Literaturverzeichnis

1. **Anonymous**, Leishmaniasis. World Health Organization (WHO). *Internetauftritt*. 2011. (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>; 15.10.2011, 21:36 Uhr)
2. **T.J.Naucke**. Leishmaniose - Einzug in Deutschland. *Tierärztliche Umschau* 62, 495-500. 2007. (Magazinartikel)
3. **Handman E**. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin.Microbiol.Rev.* 2001;14: 229-243.
4. **David CV, Craft N**. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol.Ther.* 2009;22: 491-502.
5. **Khandelwal K, Bumb RA, Mehta RD et al**. A patient presenting with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) as a first indicator of HIV infection in India. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2011;85: 64-65.
6. **Herrera E, Sanchez P, Bosch RJ**. Disseminated cutaneous leishmaniasis in an HIV-infected patient. *Int.J.STD AIDS* 1995;6: 125-126.
7. **Niamba P, Goumbri-Lompo O, Traore A, Barro-Traore F, Soudre RT**. Diffuse cutaneous leishmaniasis in an HIV-positive patient in western Africa. *Australas.J.Dermatol.* 2007;48: 32-34.
8. **Sacks D, Noben-Trauth N**. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* 2002;2: 845-858.
9. **Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG**. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366: 1561-1577.
10. **Olliaro PL**. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 2010;23: 595-602.
11. **Kaye P, Scott P**. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat.Rev.Microbiol.* 2011;9: 604-615.
12. **Warburg A, Schlein Y**. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1986;35: 926-930.
13. **Mosser DM, Edelson PJ**. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J.Immunol.* 1985;135: 2785-2789.
14. **Reiner SL, Locksley RM**. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu.Rev.Immunol.* 1995;13: 151-177.
15. **Scott P, Farrell JP**. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Chem.Immunol.* 1998;70: 60-80.
16. **Lohoff M, Gessner A, Bogdan C, Rollinghoff M**. The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1998;115: 191-202.
17. **Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM**. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J.Exp.Med.* 1989;169: 59-72.
18. **Belkaid Y, von Stebut E, Mendez S et al**. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J.Immunol.* 2002;168: 3992-4000.
19. **Kautz-Neu K, Noordegraaf M, Dinges S et al**. Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. *J.Exp.Med* 2011;208: 885-891.
20. **Sacks D, Anderson C**. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol.Rev.* 2004;201: 225-238.
21. **Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y**. A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J.Immunol.* 2005;174: 5444-5455.
22. **Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL**. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002;420: 502-507.
23. **Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK**. IL-17 and Th17 cells. *Annu.Rev.Immunol.* 2009;27: 485-517.
24. **Nylen S, Gautam S**. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J.Glob.Infect.Dis.* 2010;2: 135-146.
25. **Lopez KS, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E**. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J.Immunol.* 2009;182: 3039-3046.

26. **von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC.** Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: Implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J.Exp.Med.* 1998;188: 1547-1552.
27. **Locksley RM, Heinzel FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD.** Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect.Immun.* 1988;56: 336-342.
28. **Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Rollinghoff M, Moll H.** Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J.Infect.Dis.* 1993;167: 418-425.
29. **von Stebut E, Udey MC.** Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect.* 2004;6: 1102-1109.
30. **Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C.** Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J.Exp.Med.* 1994;180: 783-793.
31. **Li J, Hunter CA, Farrell JP.** Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *J.Immunol.* 1999;162: 974-979.
32. **Launois P, Maillard I, Pingel S et al.** IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4⁺ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 1997;6: 541-549.
33. **Reiner SL, Wang ZE, Hatam F, Scott P, Locksley RM.** TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. *Science* 1993;259: 1457-1460.
34. **Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H et al.** IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat.Immunol.* 2001;2: 1054-1060.
35. **Barbi J, Brombacher F, Satoskar AR.** T cells from *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice have a defect in efficiently up-regulating CXCR3 upon activation. *J.Immunol.* 2008;181: 4613-4620.
36. **von Stebut E, Belkaid Y, Nguyen BV, Cushing M, Sacks DL, Udey MC.** *Leishmania major*-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous Leishmaniasis. *Eur.J.Immunol.* 2000;30: 3498-3506.
37. **Filippi C, Hugues S, Cazareth J, Julia V, Glaichenhaus N, Ugolini S.** CD4⁺ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. *J.Exp.Med.* 2003;198: 201-209.
38. **Mattner F, Di Padova K, Alber G.** Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infect.Immun.* 1997;65: 4378-4383.
39. **Nigg AP, Zahn S, Ruckerl D et al.** Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *J.Immunol.* 2007;178: 7251-7258.
40. **Kautz-Neu K, Kostka S Lopez, Dinges S, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E.** IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in *Leishmania*-resistant mice. *Exp.Dermatol.* 2011;20: 77-78.
41. **von Stebut E, Ehrchen JM, Belkaid Y et al.** Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J.Exp.Med.* 2003;198: 191-199.
42. **Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C.** Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J.Leukoc.Biol.* 1992;52: 135-142.
43. **Charmoy M, Megnekou R, Allenbach C et al.** *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J.Leukoc.Biol.* 2007;82: 288-299.
44. **Sunderkötter C, Kunz M, Steinbrink K et al.** Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J.Immunol.* 1993;151: 4891-4901.
45. **Steinbrink K, Schonlau F, Rescher U et al.** Ineffective elimination of *Leishmania major* by inflammatory (MRP14-positive) subtype of monocytic cells. *Immunobiology* 2000;202: 442-459.
46. **Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D et al.** Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 2010;6: e1000871.
47. **Korner H, McMorran B, Schluter D, Fromm P.** The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int.J.Parasitol.* 2010;40: 879-888.
48. **Old LJ.** Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985;230: 630-632.
49. **Espevik T, Nissen-Meyer J.** A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J.Immunol.Methods* 1986;95: 99-105.

50. **Bazzoni F, Beutler B.** The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N.Engl.J.Med.* 1996;334: 1717-1725.
51. **Korner H, Sedgwick JD.** Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. *Immunol.Cell Biol.* 1996;74: 465-472.
52. **Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B et al.** The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92: 7804-7808.
53. **Titus RG, Sherry B, Cerami A.** Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J.Exp.Med.* 1989;170: 2097-2104.
54. **Liew FY, Li Y, Yang DM, Severn A, Cox FE.** TNF-alpha reverses the disease-exacerbating effect of subcutaneous immunization against murine cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 1991;74: 304-309.
55. **Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M.** Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 1990;69: 570-573.
56. **de Kossodo S, Grau GE, Louis JA, Muller I.** Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and TNF-beta and their receptors in experimental cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.* 1994;62: 1414-1420.
57. **Garcia I, Miyazaki Y, Araki K et al.** Transgenic mice expressing high levels of soluble TNF-R1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and are highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* infections. *Eur.J.Immunol.* 1995;25: 2401-2407.
58. **Wilhelm P, Ritter U, Labbow S et al.** Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J.Immunol.* 2001;166: 4012-4019.
59. **De Leonardis F, Govoni M, Lo MA, Trotta F.** Visceral leishmaniasis and anti-TNF-alpha therapy: case report and review of the literature. *Clin.Exp.Rheumatol.* 2009;27: 503-506.
60. **Nashleanas M, Kanaly S, Scott P.** Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. *J.Immunol.* 1998;160: 5506-5513.
61. **Vieira LQ, Goldschmidt M, Nashleanas M, Pfeffer K, Mak T, Scott P.** Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J.Immunol.* 1996;157: 827-835.
62. **Clarke CJ, Hannun YA.** Neutral sphingomyelinases and nSMase2: bridging the gaps. *Biochim.Biophys.Acta* 2006;1758: 1893-1901.
63. **Pavoine C, Pecker F.** Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc.Res.* 2009;82: 175-183.
64. **Philipp S, Puchert M, Adam-Klages S et al.** The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2010;107: 1112-1117.
65. **Kolesnick RN, Kronke M.** Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu.Rev.Physiol* 1998;60: 643-665.
66. **Clarke CJ, Truong TG, Hannun YA.** Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *J.Biol.Chem.* 2007;282: 1384-1396.
67. **De Palma C, Meacci E, Perrotta C, Bruni P, Clementi E.** Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2006;26: 99-105.
68. **Aubin I, Adams CP, Opsahl S et al.** A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat.Genet.* 2005;37: 803-805.
69. **Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K et al.** FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 1996;86: 937-947.
70. **Dinesh, Goswami A, Suresh PS, Thirunavukkarasu C, Weiergraber OH, Kumar MS.** Molecular modeling of human neutral sphingomyelinase provides insight into its molecular interactions. *Bioinformation.* 2011;7: 21-28.
71. **Tcherkasowa AE, Adam-Klages S, Kruse ML et al.** Interaction with factor associated with neutral sphingomyelinase activation, a WD motif-containing protein, identifies receptor for activated C-kinase 1 as a novel component of the signaling pathways of the p55 TNF receptor. *J.Immunol.* 2002;169: 5161-5170.

72. **Krut O, Wiegmann K, Kashkar H, Yazdanpanah B, Kronke M.** Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J.Biol.Chem.* 2006;281: 13784-13793.
73. **Segui B, Andrieu-Abadie N, Adam-Klages S et al.** CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. *J.Biol.Chem.* 1999;274: 37251-37258.
74. **Segui B, Cuvillier O, Adam-Klages S et al.** Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J.Clin.Invest* 2001;108: 143-151.
75. **Haubert D, Gharib N, Rivero F et al.** PtdIns(4,5)P-restricted plasma membrane localization of FAN is involved in TNF-induced actin reorganization. *EMBO J.* 2007;26: 3308-3321.
76. **Kreder D, Krut O, Adam-Klages S et al.** Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J.* 1999;18: 2472-2479.
77. **Malagarie-Cazenave S, Segui B, Leveque S et al.** Role of FAN in tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced interleukin-6 secretion and lethality in D-galactosamine-sensitized mice. *J.Biol.Chem.* 2004;279: 18648-18655.
78. **Sanchez C, Rueda D, Segui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzman M.** The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol.Pharmacol.* 2001;59: 955-959.
79. **Montfort A, Martin PGP, Levade T, Benoist H, Segui B.** FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation), a moonlighting protein in TNF-R1 signaling. *J.LeukocyteBiol.* 2010;88: 897-903.
80. **Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D.** A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J.Immunol.* 2000;165: 969-977.
81. **Castellano LR, Filho DC, Argiro L et al.** Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum.Immunol.* 2009;70: 383-390.
82. **Melby PC.** Experimental leishmaniasis in humans: review. *Rev.Infect.Dis.* 1991;13: 1009-1017.
83. **Convit J, Ulrich M, Fernandez CT et al.** The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1993;87: 444-448.
84. **Kolde G, Luger T, Sorg C, Sunderkötter C.** Successful treatment of cutaneous leishmaniasis using systemic interferon-gamma. *Dermatology* 1996;192: 56-60.
85. **Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA et al.** Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.* 2001;69: 3232-3239.
86. **Gaafar A, Kharazmi A, Ismail A et al.** Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clin.Exp.Immunol.* 1995;100: 239-245.
87. **Trujillo CM, Robledo SM, Franco JL, Velez ID, Erb KJ, Patino PJ.** Endemically exposed asymptomatic individuals show no increase in the specific *Leishmania (Viannia) panamensis*-Th1 immune response in comparison to patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2002;24: 455-462.
88. **Kharazmi A, Kemp K, Ismail A et al.** T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol.Lett.* 1999;65: 105-108.
89. **Geiger B, Wenzel J, Hantschke M, Haase I, Ständer S, von Stebut E.** Resolving lesions in human cutaneous leishmaniasis predominantly harbour chemokine receptor CXCR3-positive T helper 1/T cytotoxic type 1 cells. *BritishJ Dermatol.* 2010;162: 870-874.
90. **Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG.** Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol.Lett.* 2002;209: 1-7.
91. **Nateghi RM, Keshavarz H, Edalat R et al.** CD8⁺ T cells as a source of IFN-gamma production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl.Trop.Dis.* 2010;4: e845.
92. **Zahn S, Kirschsiefen P, Jonuleit H, Steinbrink K, von Stebut E.** Human primary dendritic cell subsets differ in their IL-12 release in response to *Leishmania major* infection. *Exp.Dermatol.* 2010;19: 924-926.
93. **von Stebut E, Sunderkötter C.** Cutaneous leishmaniasis. *Hautarzt* 2007;58: 445-458.
94. **Okwor I, Uzonna J.** Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. *Human Vaccines* 2009;5: 291-301.

95. **Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F.** Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. *Indian Journal of Medical Research* 2006;123: 423-438.
96. **Kedzierski L.** Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J.Glob.Infect.Dis.* 2010;2: 177-185.
97. **Kronenberg K, Brosch S, von Stebut E.** Vaccinations against cutaneous *Leishmania* infection. *G.Ital.Dermatol.Venereol.* 2008;143: 125-137.
98. **Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ.** A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301: 527-530.
99. **Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB.** Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 1988;335: 256-259.
100. **McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL.** The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 1988;241: 1632-1639.
101. **Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick JE.** Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 1992;255: 1137-1141.
102. **Greiner DL, Shultz LD.** Use of NOD/LtSz-scid/scid mice in biomedical research. In: **Leiter EH, Atkinson MA, eds.** NOD mice and related strains: research applications in diabetes, AIDS, cancer and other diseases. 1998.
103. **van Rijn RS, Simonetti ER, Hagenbeek A et al.** A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2^{-/-} gamma^{-/-} double-mutant mice. *Blood* 2003;102: 2522-2531.
104. **Nervi B, Rettig MP, Ritchey JK et al.** Factors affecting human T cell engraftment, trafficking, and associated xenogeneic graft-vs-host disease in NOD/SCID beta2mnull mice. *Exp.Hematol.* 2007;35: 1823-1838.
105. **Shpitz B, Chambers CA, Singhal AB et al.** High level functional engraftment of severe combined immunodeficient mice with human peripheral blood lymphocytes following pretreatment with radiation and anti-asialo GM1. *J.Immunol.Methods* 1994;169: 1-15.
106. **Cao T, Leroux-Roels G.** Antigen-specific T cell responses in human peripheral blood leucocyte (hu-PBL)-mouse chimera conditioned with radiation and an antibody directed against the mouse IL-2 receptor beta-chain. *Clin.Exp.Immunol.* 2000;122: 117-123.
107. **Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE.** RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68: 869-877.
108. **Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL.** Humanized mice in translational biomedical research. *Nature Reviews Immunology* 2007;7: 118-130.
109. **Brehm MA, Shultz LD, Greiner DL.** Humanized mouse models to study human diseases. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* 2010;17: 120-125.
110. **Abele-Ohl S, Leis M, Mahmoudian S, Weyand M, Stamminger T, Ensminger SM.** Rag2^{-/-} gamma-chain^{-/-} mice as hosts for human vessel transplantation and allogeneic human leukocyte reconstitution. *Transpl.Immunol.* 2010;23: 59-64.
111. **Hippen KL, Harker-Murray P, Porter SB et al.** Umbilical cord blood regulatory T-cell expansion and functional effects of tumor necrosis factor receptor family members OX40 and 4-1BB expressed on artificial antigen-presenting cells. *Blood* 2008;112: 2847-2857.
112. **King M, Pearson T, Shultz LD et al.** A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin.Immunol.* 2008;126: 303-314.
113. **Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K et al.** NOD/SCID/gamma(null)(c) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100: 3175-3182.
114. **Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM et al.** Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma(null) mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J.Immunol.* 2005;174: 6477-6489.
115. **Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B et al.** Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 2005;106: 1565-1573.
116. **Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L et al.** Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004;304: 104-107.

117. **Brainard DM, Seung E, Frahm N et al.** Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice. *J.Virol.* 2009;83: 7305-7321.
118. **Kumar P, Ban HS, Kim SS et al.** T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell* 2008;134: 577-586.
119. **Jaiswal S, Pearson T, Friberg H et al.** Dengue virus infection and virus-specific HLA-A2 restricted immune responses in humanized NOD-scid IL2rgammanull mice. *Plos One* 2009;4: e7251.
120. **Strowig T, Gurer C, Ploss A et al.** Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J.Exp.Med.* 2009;206: 1423-1434.
121. **Jimenez-Diaz MB, Mulet T, Viera S et al.** Improved murine model of malaria using *Plasmodium falciparum* competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2Rgammanull mice engrafted with human erythrocytes. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2009;53: 4533-4536.
122. **Erdag G, Morgan JR.** Survival of fetal skin grafts is prolonged on the human peripheral blood lymphocyte reconstituted-severe combined immunodeficient mouse/skin allograft model. *Transplantation* 2002;73: 519-528.
123. **Rayner D, Nelson R, Murray AG.** Noncytolytic human lymphocytes injure dermal microvessels in the huPBL-SCID skin graft model. *Hum.Immunol.* 2001;62: 598-606.
124. **Murray AG, Schechner JS, Epperson DE et al.** Dermal microvascular injury in the human peripheral blood lymphocyte reconstituted-severe combined immunodeficient (HuPBL-SCID) mouse/skin allograft model is T cell mediated and inhibited by a combination of cyclosporine and rapamycin. *Am.J.Pathol.* 1998;153: 627-638.
125. **Turgeon NA, Banuelos SJ, Shultz LD et al.** Alloimmune injury and rejection of human skin grafts on human peripheral blood lymphocyte-reconstituted non-obese diabetic severe combined immunodeficient beta2-microglobulin-null mice. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2003;228: 1096-1104.
126. **Racki WJ, Covassin L, Brehm M et al.** NOD-scid IL2r gamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection. *Transplantation* 2010;89: 527-536.
127. **Hemmerling J, Wegner-Kops J, von Stebut E et al.** Human epidermal langerhans cells replenish Skin xenografts and are depleted by alloreactive T cells *in vivo*. *Journal of Immunology* 2011;187: 1142-1149.
128. **Korngold R, Sprent J.** Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J.Exp.Med.* 1978;148: 1687-1698.
129. **King MA, Covassin L, Brehm MA et al.** Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin.Exp.Immunol.* 2009;157: 104-118.
130. **Durig J, Ebeling P, Grabellus F et al.** A novel nonobese diabetic/severe combined immunodeficient xenograft model for chronic lymphocytic leukemia reflects important clinical characteristics of the disease. *Cancer Res.* 2007;67: 8653-8661.
131. **Inoue M, Senju S, Hirata S, Irie A, Baba H, Nishimura Y.** An *in vivo* model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice. *Immunol.Lett.* 2009;126: 67-72.
132. **Hupples W, Hoffmann-Fezer G.** Peripheral blood leukocyte grafts that induce human to mouse graft-vs.-host disease reject allogeneic human skin grafts. *Am.J.Pathol.* 1995;147: 1708-1714.
133. **Steinman RM.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* 1991;9: 271-296.
134. **Hart DN.** Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997;90: 3245-3287.
135. **Banchereau J, Steinman RM.** Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 1998;392: 245-252.
136. **Becker C, Taube C, Bopp T et al.** Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Blood** 2009;114: 1263-1269.
137. **Dominguez M, Moreno I, Aizpurua C, Torano A.** Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect.* 2003;5: 507-513.

138. **Maurer M, Dondji B, von Stebut E.** What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Med.Microbiol.Immunol.* 2009;198: 137-146.
139. **Handman E, Ceredig R, Mitchell GF.** Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.* 1979;57: 9-29.
140. **Howard JG, Hale C, Liew FY.** Genetically determined susceptibility to *Leishmania tropica* infection is expressed by haematopoietic donor cells in mouse radiation chimaeras. *Nature* 1980;288: 161-162.
141. **Sardinha JF, Tarle RG, Fava VM et al.** Genetic risk factors for human susceptibility to infections of relevance in dermatology. *An.Bras.Dermatol.* 2011;86: 708-715.
142. **Kongshavn PA, Sadarangani C, Skamene E.** Genetically determined differences in antibacterial activity of macrophages are expressed in the environment in which the macrophage precursors mature. *Cell Immunol.* 1980;53: 341-349.
143. **Haller O, Arnheiter H, Lindenmann J.** Natural, genetically determined resistance toward influenza virus in hemopoietic mouse chimeras. Role of mononuclear phagocytes. *J.Exp.Med.* 1979;150: 117-126.
144. **Raziuddin A, Longo DL, Mason L, Ortaldo JR, Murphy WJ.** Ly-49 G2⁺ NK cells are responsible for mediating the rejection of H-2b bone marrow allografts in mice. *Int.Immunol.* 1996;8: 1833-1839.
145. **Cudkowicz G, Stimpfling JH.** Deficient growth of C57BL marrow cells transplanted in F1 hybrid mice. Association with the histocompatibility-2 locus. *Immunology* 1964;7: 291-306.
146. **Yu YY, Kumar V, Bennett M.** Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annu.Rev.Immunol.* 1992;10: 189-213.
147. **Slavin S, Seidel HJ.** Hemopoietic activity in bone marrow chimeras prepared with total lymphoid irradiation (TLI). *Exp.Hematol.* 1982;10: 206-216.
148. **Bennett M, Yu YY, Stoneman E et al.** Hybrid resistance: 'negative' and 'positive' signaling of murine natural killer cells. *Semin.Immunol.* 1995;7: 121-127.
149. **DeTolla LJ, Scott PA, Farrell JP.** Single gene control of resistance to cutaneous leishmaniasis in mice. *Immunogenetics* 1981;14: 29-39.
150. **Hoerauf A, Rollinghoff M, Solbach W.** Co-transfer of B cells converts resistance into susceptibility in T cell-reconstituted, *Leishmania major*-resistant C.B-17 scid mice by a non-cognate mechanism. *Int.Immunol.* 1996;8: 1569-1575.
151. **Montfort A, de Badts B, Douin-Echinard V et al.** FAN stimulates TNF(alpha)-induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response. *J.Immunol.* 2009;183: 5369-5378.
152. **Kanally ST, Nashleanas M, Hondowicz B, Scott P.** TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens. *J.Immunol.* 1999;163: 3883-3889.
153. **Allenbach C, Launois P, Mueller C, Tacchini-Cottier F.** An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. *Eur.J.Immunol.* 2008;38: 720-731.
154. **Andrieu-Abadie N, Levade T.** Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim.Biophys.Acta* 2002;1585: 126-134.
155. **Wong KL, Lew FC, MacAry PA, Kemeny DM.** CD40L-expressing CD8 T cells prime CD8alpha⁺ DC for IL-12p70 production. *Eur.J.Immunol.* 2008;38: 2251-2262.
156. **Srivastava N, Sudan R, Saha B.** CD40-modulated dual-specificity phosphatases MAPK phosphatase (MKP)-1 and MKP-3 reciprocally regulate *Leishmania major* infection. *J.Immunol.* 2011;186: 5863-5872.
157. **Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S et al.** Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat.Immunol.* 2004;5: 1260-1265.
158. **Laskay T, Rollinghoff M, Solbach W.** Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur.J.Immunol.* 1993;23: 2237-2241.
159. **van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A et al.** Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J.Immunol.* 2004;173: 6521-6525.
160. **Jochim RC, Teixeira C.** *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol.* 2009;25: 145-147.
161. **Peters NC, Egen JG, Secundino N et al.** *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008;321: 970-974.

162. **Werneburg N, Guicciardi ME, Yin XM, Gores GJ.** TNF-alpha-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2004;287: G436-G443.
163. **Mohlig H, Mathieu S, Thon L et al.** The WD repeat protein FAN regulates lysosome size independent from abnormal downregulation/membrane recruitment of protein kinase C. *Exp.Cell Res.* 2007;313: 2703-2718.
164. **Guy RA, Belosevic M.** Response of scid mice to establishment of *Leishmania major* infection. *Clin.Exp.Immunol.* 1995;100: 440-445.
165. **Satoskar A, Brombacher F, Dai WJ et al.** SCID mice reconstituted with IL-4-deficient lymphocytes, but not immunocompetent lymphocytes, are resistant to cutaneous leishmaniasis. *J.Immunol.* 1997;159: 5005-5013.
166. **Scharton TM, Scott P.** Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J.Exp.Med.* 1993;178: 567-577.
167. **Prajeeth CK, Haerberlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C.** *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infect.Immun.* 2011;79: 2699-2708.
168. **Young HA, Komschlies KL, Ciccarone V et al.** Expression of human IFN-gamma genomic DNA in transgenic mice. *J.Immunol.* 1989;143: 2389-2394.
169. **Schreiber RD.** Measurement of mouse and human interferon gamma. *Curr.Protoc.Immunol.* 2001:Chapter 6: Unit.
170. **La Flamme AC, Scott P, Pearce EJ.** Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite Immunol.* 2002;24: 339-345.
171. **Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA.** *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.* 1990;145: 4290-4297.
172. **Ito R, Katano I, Kawai K et al.** Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation* 2009;87: 1654-1658.
173. **Wagar EJ, Cromwell MA, Shultz LD et al.** Regulation of human cell engraftment and development of EBV-related lymphoproliferative disorders in Hu-PBL-scid mice. *J.Immunol.* 2000;165: 518-527.
174. **Kikuchi K, Lian ZX, He XS et al.** Appearance of human plasma cells following differentiation of human B cells in NOD/SCID mouse spleen. *Clin.Dev.Immunol.* 2003;10: 197-202.
175. **Hus I, Kawiak J, Hoser G et al.** SCID mice model *in vivo* evaluation of autologous and allogeneic dendritic cells activity on B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Folia Histochem.Cytobiol.* 2009;47: 563-570.
176. **Brightbill HD, Jeet S, Lin Z et al.** Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *J.Clin.Invest* 2010;120: 2218-2229.
177. **Weigmann B, Schughart N, Wiebe C et al.** Allergen-induced IgE-dependent gut inflammation in a human PBMC-engrafted murine model of allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2012.
178. **Kostka S Lopez, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E.** IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. *J.Immunol.* 2009;182: 3039-3046.
179. **Faria DR, Souza PE, Duraes FV et al.** Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009;31: 432-439.
180. **Bourreau E, Gardon J, Pradinaud R et al.** Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses. *Infect.Immun.* 2003;71: 2244-2246.
181. **Whitfield-Larry F, Young EF, Talmage G et al.** HLA-A2-matched peripheral blood mononuclear cells from type 1 diabetic patients, but not nondiabetic donors, transfer insulinitis to NOD-scid/gammac(null)/HLA-A2 transgenic mice concurrent with the expansion of islet-specific CD8⁺ T cells. *Diabetes* 2011;60: 1726-1733.
182. **Koehne G, Doubrovin M, Doubrovina E et al.** Serial *in vivo* imaging of the targeted migration of human HSV-TK-transduced antigen-specific lymphocytes. *Nat.Biotechnol.* 2003;21: 405-413.
183. **Okada M, Takemoto Y, Okuno Y et al.** The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine* 2005;23: 2269-2272.

184. **Okada M, Takemoto Y, Okuno Y et al.** Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2006:581: 561-566.
185. **Gorantla S, Santos K, Meyer V et al.** Human dendritic cells transduced with herpes simplex virus amplicons encoding human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 elicit adaptive immune responses from human cells engrafted into NOD/SCID mice and confer partial protection against HIV-1 challenge. *J.Virol.* 2005:79: 2124-2132.
186. **Mami-Chouaib F, Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I, Chouaib S.** Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen. *Immunol.Rev.* 2002:188: 114-121.
187. **Björn Palitzsch.** Untersuchung von humanen CD8⁺ T Zellen in immundefizienten Mäusen mit transgener HLA-Expression. 2011. Department of Dermatology, University Medical Center, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. (Thesis/ Dissertation)
188. **Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G.** Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci.Transl.Med.* 2011:3: 83ra42.
189. **Moscicka-Wesolowska M, Olszewski WL, Zolich D, Stelmach E.** Bacterial infection of human skin allograft mimics the rejection process. *Transplant.Proc.* 2002:34: 701-702.
190. **Sen N, Che X, Rajamani J et al.** Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and survivin induction by varicella-zoster virus promote replication and skin pathogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2012:109: 600-605.
191. **Nour AM, Reichelt M, Ku CC, Ho MY, Heineman TC, Arvin AM.** Varicella-zoster virus infection triggers formation of an interleukin-1beta (IL-1beta)-processing inflammasome complex. *J.Biol.Chem.* 2011:286: 17921-17933.
192. **Vleck SE, Oliver SL, Reichelt M et al.** Anti-glycoprotein H antibody impairs the pathogenicity of varicella-zoster virus in skin xenografts in the SCID mouse model. *J.Virol.* 2010:84: 141-152.
193. **Che X, Reichelt M, Sommer MH, Rajamani J, Zerboni L, Arvin AM.** Functions of the ORF9-to-ORF12 gene cluster in varicella-zoster virus replication and in the pathogenesis of skin infection. *J.Virol.* 2008:82: 5825-5834.
194. **Niizuma T, Zerboni L, Sommer MH, Ito H, Hinchliffe S, Arvin AM.** Construction of varicella-zoster virus recombinants from parent Oka cosmids and demonstration that ORF65 protein is dispensable for infection of human skin and T cells in the SCID-hu mouse model. *J.Virol.* 2003:77: 6062-6065.
195. **Ku CC, Zerboni L, Ito H, Graham BS, Wallace M, Arvin AM.** Varicella-zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *J.Exp.Med.* 2004:200: 917-925.
196. **Botelho AC, Tafuri WL, Genaro O, Mayrink W.** Histopathology of human American cutaneous leishmaniasis before and after treatment. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 1998:31: 11-18.
197. **Pace D, Williams TN, Grochowska A et al.** Manifestations of paediatric *Leishmania infantum* infections in Malta. *Travel.Med.Infect.Dis.* 2011:9: 37-46.
198. **Koo GC, Hasan A, O'Reilly RJ.** Use of humanized severe combined immunodeficient mice for human vaccine development. *Expert Review of Vaccines* 2009:8: 113-120.
199. **Cao T, Soto A, Zhou W et al.** *Ex vivo* expanded human CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells prevent lethal xenogenic graft versus host disease (GVHD). *Cell Immunol.* 2009:258: 65-71.
200. **Shlomchik WD.** Graft-versus-host disease. *Nat.Rev.Immunol.* 2007:7: 340-352.
201. **Penaloza-MacMaster P, Masopust D, Ahmed R.** T-cell reconstitution without T-cell immunopathology in two models of T-cell-mediated tissue destruction. *Immunology* 2009:128: 164-171.
202. **Mutis T, van Rijn RS, Simonetti ER et al.** Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2^{-/-}gammac^{-/-} immunodeficient mice. *Clin.Cancer Res.* 2006:12: 5520-5525.
203. **Kautz-Neu K, Kostka S Lopez, Dinges S, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E.** A role for leukocyte-derived IL-1RA in DC homeostasis revealed by increased susceptibility of IL-1RA-deficient mice to cutaneous leishmaniasis. *J.Invest.Dermatol.* 2011:131: 1650-1659.

204. **Inaba K, Inaba M, Romani N et al.** Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* 1992;176: 1693-1702.
205. **Mahoney JA Haworth R GS.** Monocytes and macrophages. In: **Dallman MJ LJ** (ed) Haematopoietic and lymphoid cell culture. *Cambridge: Cambridge University Press*, 2000.
206. **Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N.** Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J.Immunol.Methods* 1996;196: 121-135.
207. **Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH.** Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 2000;192: 1213-1222.

9 Abkürzungsverzeichnis

-/-	Homozygoter Knock Out
1x	Einfach
10x	Zehnfach
100x	Hundertfach
400x	Vierhundertfach
Abb.	Abbildung
AF647	Alexa Flour
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
APC-H7	Allophycocyanin-High7
β 2m	Beta-2-Mikroglobulin
BMDCs	DCs generiert aus Vorläuferzellen des Knochenmarks
Bzw	Beziehungsweise
CD	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFDA-SE)
CL	Kutane Leishmaniasis
Cy	Zyanin
DC	Dendritische Zelle
Dcinf	Infizierte dendritische Zelle
DCL	Diffuse, kutane Leishmaniasis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eF450	EFluor 450
ELISA	Enzym-Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	Et alii (und andere)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FAN	Faktor assoziiert mit der Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isotiozyanat
FSC	Vorwärtslichtstreuung (forward light scatter)
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
gp120	Glykoprotein des HI-Viruses, 120 kDa
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GvHD	Spender gegen Empfänger Reaktion (graft versus host disease)
Gy	Gray
γ c	IL-2-Rezeptor-gamma-Kette (IL2 γ)

h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-Ethansulfonsäure
Hh1	Hematopoetic histocompatibility
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HSA	Humanes Serum-Albumin
i.d.	Intradermal
i.d.R.	In der Regel
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukine
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
L	Liter
LM	<i>L. major</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Lymphozyten-Separations-Medium
M	Molar
mg	Milligramm
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
M Φ	Makrophagen
μ g	Microgramm
μ l	Microliter
μ m	Micrometer
μ M	Micromolar
NOD	Nicht fettleibig diabetisch (non-obese diabetic)
NS	NOD-Scid
NS-tg(HLA-A0201)	NOD-Scid-tg(HLA-A0201)
NSG	NOD-Scid γ ^{-/-}
nSMase	Neutrale Sphingomyelinase
N Φ	Neutrophile Granulozyten
p	P-Wert des Studentischen T-Tests
p.a.	Per analysis
p.i.	Nach Infektion (post infection)
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen des Blutes (peripheral mononuclear blood cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PHA	Phytohämagglutinin
RACK	Rezeptor der aktivierten C Kinase
Rag	Rekombinationsaktivierendes Gen (recombination activating gen)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
s.c.	Subkutan
SA	Streptavidin
Scid	Schwere, kombinierte Immun-Defizienz (severe combined immune deficiency)
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SLA	Lösliches Leishmanien-Antigen (soluble <i>Leishmania</i> antigen)
spp.	Spezies
SSC	Seitwärtslichtstreuung (sideward scatter)
Tc	Zytotoxische T-Zelle
tg	Transgen
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
Treg	Regulatorische t-Zelle
V450	BD Horizon V450
VL	Viszerale Leishmaniasis
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel