

Aus der Haut- und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität  
Mainz

Immunhistochemische Validierung der  
humanisierten Maus als Modellsystem der  
Leishmaniasis in der Translation von Maus auf  
Mensch

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Julian Burg  
aus Deggendorf

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:



1. Gutachter:



2. Gutachter:



Tag der Promotion:

30.06.2020



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6-7</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Epidemiologie.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Parasit .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Lebenszyklus .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Immunologie.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Klinische Erscheinungsbilder.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Diagnostik.....</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Therapie .....</b>	<b>17</b>
<b>1.8 Präventive Maßnahmen .....</b>	<b>19</b>
<b>1.9 Die Maus als Versuchstier.....</b>	<b>21</b>
<b>1.10 Das humanisierte Mausmodell.....</b>	<b>22</b>
<b>1.11 Humanisierte Mäuse in Infektionskrankheiten.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Ziele der Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Geräte .....	28
3.1.2 Gebrauchsgegenstände .....	29
3.1.3 Chemikalien .....	30
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	31
3.1.5 Versuchstiere .....	32
3.1.6 Parasiten .....	32
3.1.7 Antikörper .....	33
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Humanisierung der Mäuse .....	33
3.2.2 Isolierung der Leishmanien .....	34
3.2.3 Infektion der Mäuse mit <i>L.major</i> .....	35
3.2.4 Histologie und Immunhistologie.....	35
3.2.5 Quantitative mikroskopische Auswertung .....	37
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Parasitennachweis .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Zellmorphologie der humanen Immunzellen .....</b>	<b>42</b>
4.2.1 Leukozyten Marker CD45 .....	42
4.2.2 HLA (Humanes Leukozyten Antigen).....	43
4.2.3 CD3 .....	43
4.2.4 CD4 .....	44
4.2.5 CD8 .....	45
4.2.6 CD11c.....	45
4.2.7 CD20.....	46
4.2.8 Neutrophile Granulozyten Markierung mittels ASD Färbung .....	47
<b>4.3 Quantitative Frequenzbestimmung im einzelnen Tier .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 Kumulative Darstellung .....</b>	<b>53</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>55-62</b>
<b>5.1 Verteilung der Parasitenlast .....</b>	<b>55</b>
5.1.1 Lokale und systemische Verteilung.....	55
5.1.2 Vergleich mit anderen Mausmodellen.....	56
5.1.3 Vergleich mit humanen Daten.....	57

5.2 Bewertung der immunhistologischen Ergebnisse .....	58
5.3 Limitationen des Modells .....	60
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	63-64
7. Literaturverzeichnis .....	65-69
8. Danksagung.....	70
9. Lebenslauf .....	71

# **I. Abkürzungsverzeichnis**

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
CD	Cluster of Differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HSC	Haematopoietic stem cells
PBMC	Peripheral-blood mononuclear cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standard Error of the Mean
HPF	High Power Field, Gesichtsfeld

# **II. Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1: Verbreitungsgebiet der Leishmaniasis (WHO 2017)
- Abb. 2: Promastigote Leishmanien (Loeffler 2016)
- Abb. 3: Amastigote Leishmanien (Loeffler 2016)
- Abb. 4: Die Sandmücke (Loeffler 2016)
- Abb. 5: Lebenszyklus der Leishmaniasis (Sacks and Noben-Trauth 2002)
- Abb. 6: Kutane Leishmaniasis (Enk 2003)
- Abb. 7: Mukokutane Leishmaniasis; Patient mit Espundia (Stanford 2017)
- Abb. 8: Viszerale Leishmaniasis (HU-Berlin 2017)
- Abb. 9: Therapie bei kutaner Leishmaniasis(Boecken, Sunderkotter et al. 2011)
- Abb. 10: Zeitstrahl mit den wichtigsten Ereignissen in der Entwicklung des humanisierten Mausmodells (Shultz, Ishikawa et al. 2007)
- Abb. 11: HE-Färbung Ohr 1:2,5 und 1:40
- Abb. 12: Giemsa-Färbung Ohr 1:40
- Abb. 13: Auswertung Giemsa-Färbung

- Abb. 14: Gesichtsfelder
- Abb. 15: CD45<sup>+</sup>-Färbung Ohr 1:10 (A) und 1:40 (B)
- Abb. 16: HLA Färbung Leber 1:10 (A), Milz 1:10 (B)
- Abb. 17: CD3<sup>+</sup>-Färbung Ohr 1:10 (A) und 1:40 (B)
- Abb. 18: CD4<sup>+</sup>-Färbung Leber 1:10 (A) und Rückenhaut 1:10 (B)
- Abb. 19: CD8<sup>+</sup>-Färbung Milz 1:10 (A) und Ohr 1:40 (B)
- Abb. 20: CD11c<sup>+</sup>-Färbung Milz 1:10 (A) und Ohr 1:40 (B)
- Abb. 21: CD20<sup>+</sup>-Färbung Leber 1:10 (A) und Ohr 1:40 (B)
- Abb. 22: ASD-Färbung Milz 1:10 (A) und Ohr 1:40 (B)
- Abb. 23: Auswertung der CD45<sup>+</sup>,CD3<sup>+</sup>,CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Färbung
- Abb. 24: Auswertung der CD45<sup>+</sup> und CD20<sup>+</sup> Färbung
- Abb. 25: Auswertung der CD45<sup>+</sup>,HLA,CD11c<sup>+</sup> und ASD Färbung
- Abb. 26: Mittelwerte mit Standardfehler

# **1. Einleitung**

Die Leishmaniasis ist eine parasitäre Erkrankung, welche von Erregern der Gattung *Leishmania* ausgelöst wird. Der Parasit wird von Sandmücken der Gattung *Phlebotomas* auf Wirbeltiere übertragen, in erster Linie auf kleine Nager, aber auch auf Katzen oder Hunde und - als Fehlwirt - auf den Menschen (Enk 2003).

Die World Health Organization (WHO) geht von 900.000 bis 1,3 Mio. Leishmaniasis Neuinfektionen pro Jahr weltweit aus, dabei sind vor allem arme, mangelernährte und in primitiven Behausungen lebende Menschen betroffen (WHO 2017).

Der Flüchtlingsstrom verleiht Erkrankungen im Zusammenhang mit Leishmanien-Erregern in Deutschland größte Aktualität. 2016 kam laut Bundesamt für Migration und Flüchtlinge (BaMF) knapp die Hälfte der Asylbewerber aus Syrien, Afghanistan, Irak und Pakistan. Alle Länder in denen vor allem die kutane Form der Leishmaniasis endemisch ist (von Stebut, Boecken et al. 2016). Aber auch im Mittelmeerraum und in Deutschland, wo wir die höchste Zuwanderungsrate seit Jahren haben, ist die Sandmücke bereits angekommen und somit gibt es auch in Europa ein Risiko einer Infektion mit Leishmanien. Zusätzlich unternimmt die deutsche Bevölkerung so viele Flugreisen wie nie zu vor und das vor allem in den Mittelmeerraum, aber auch in die Haupt-Endemie-Gebiete. Somit rückt das Krankheitsbild der Leishmaniasis und dabei vor allem die kutane Form als Differentialdiagnose in Deutschland immer weiter in den Vordergrund.

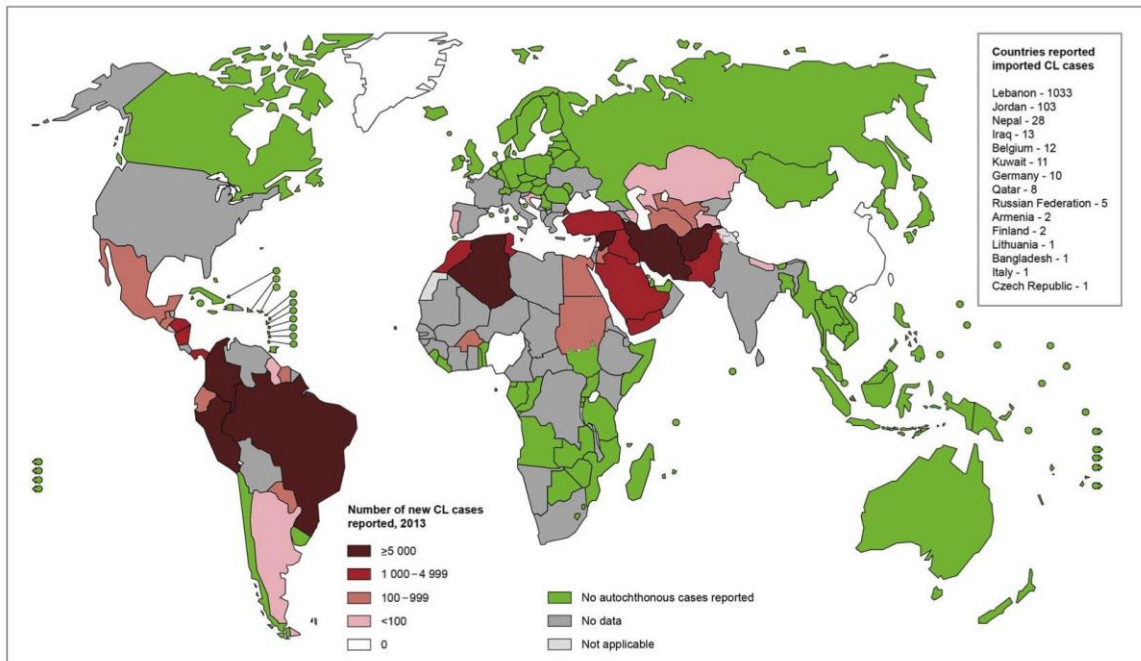
## **1.1 Epidemiologie**

Die stärksten Endemiegebiete der Leishmaniasis liegen im Revier der Sandmücke - also tropischen und subtropischen Ländern. 90% der Leishmaniasis Patienten kommen aus den 'Alte Welt'-Ländern Afghanistan, Algerien, Saudi-Arabien, Iran, Sudan und Syrien und den zwei 'Neue Welt'-Ländern Brasilien und Peru (WHO 2017). Aktuell geht man weltweit von ca. 12 Millionen Infizierten aus und 1 Million Neuinfektionen mit der *Kutanen Leishmaniasis (CL)* oder *Mukokutanen Leishmaniasis (MCL)* und ca. 300.000 Neuinfektionen mit der *Viszeralen Leishmaniasis (VL)* pro Jahr (von Stebut 2014). Die im Jahr 2000 am Institut für Tropenmedizin in Berlin eingerichtete Referenzstelle zur Diagnostik und Therapie von importierter Leishmaniasis berichtet im Zeitraum 2000 bis



2007 über 130 diagnostizierte importierte Leishmaniosen. Mit 91 CL, 5 MCL und 34 VL verteilten sich die Neuinfektionen analog zu den oben angegebenen weltweiten Neuinfektionen (Harms-Zwingenberger 2007).

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2013



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2015. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



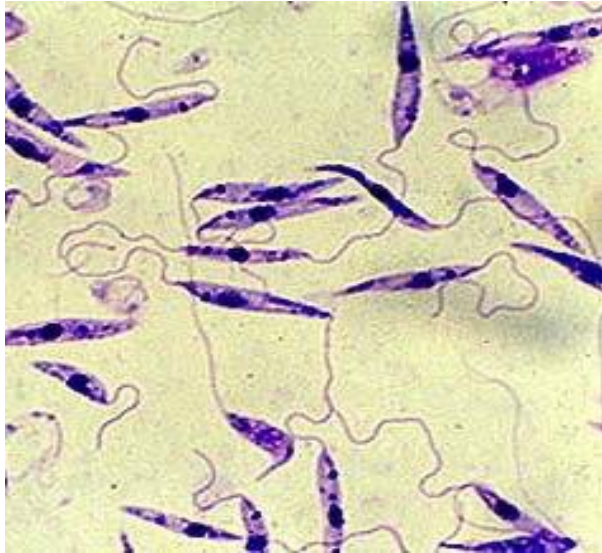
**Abbildung 1 Verbreitungsgebiet der kutanen Leishmaniasis** In den rot bzw. dunkelrot markierten Ländern in Südasien, dem Orient, Nordwestafrika und Süd- sowie Mittelamerika liegen deutliche Schwerpunkte im Endemiegebiet der Leishmaniasis (WHO 2017).

## 1.2 Parasit

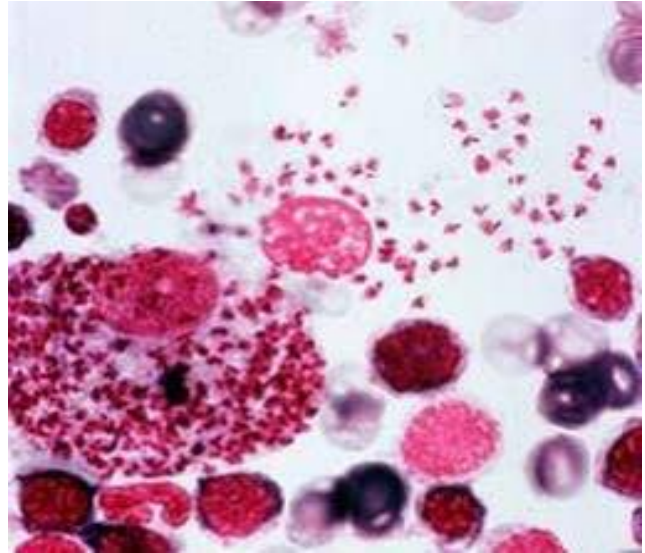
Die Leishmaniasis ist eine protozoische, parasitäre Zoonose, welche von Erregern der Gattung *Leishmania* ausgelöst wird (Enk 2003). Als Vektor fungieren über 40 verschiedene Arten der Sandmücken *Phlebotominae* aus der *Psychodidae*-Familie der Ordnung *Diptera* in der alten Welt und weitere 30 aus dem Genus *Lutzomyia* in der Neuen Welt in mindestens 88 verschiedenen Ländern (Maroli and Khoury 2004).

Generell wird der einzellige Parasit nach seiner promastigoten und seiner amastigoten Form unterschieden. In seiner promastigoten Form erscheint der Parasit in länglicher Form, mit einer Geißel, maximal 12 µm lang und findet sich in den Speicheldrüsen sowie im Vorderdarm der Sandmücke (siehe Abb. 1). Nachdem Promastigoten von der

Sandmücke in die obere Dermis des Wirtes übertragen worden sind, werden sie phagozytiert und wandeln sich dort in die amastigote Form um. Die Amastigoten besitzen keine Geißel mehr und erscheinen rundlich bis oval mit einem Durchmesser von ca. 5  $\mu\text{m}$  (siehe Abb. 2) (Von Stebut 2007).



**Abbildung 2 Promastigote Leishmanien.** Die infektiösen Promastigoten sind etwa 12  $\mu\text{m}$  lang und haben am Kopfende eine Geißel, die unter anderem der Fortbewegung dient (Loeffler 2016).



**Abbildung 2 Amastigote Leishmanien.** Die intrazellulären Amastigoten befinden sich in ihrer runden, unbegeißelten Form im Zytoplasma der Zellen (Loeffler 2016).

### **1.3 Lebenszyklus**

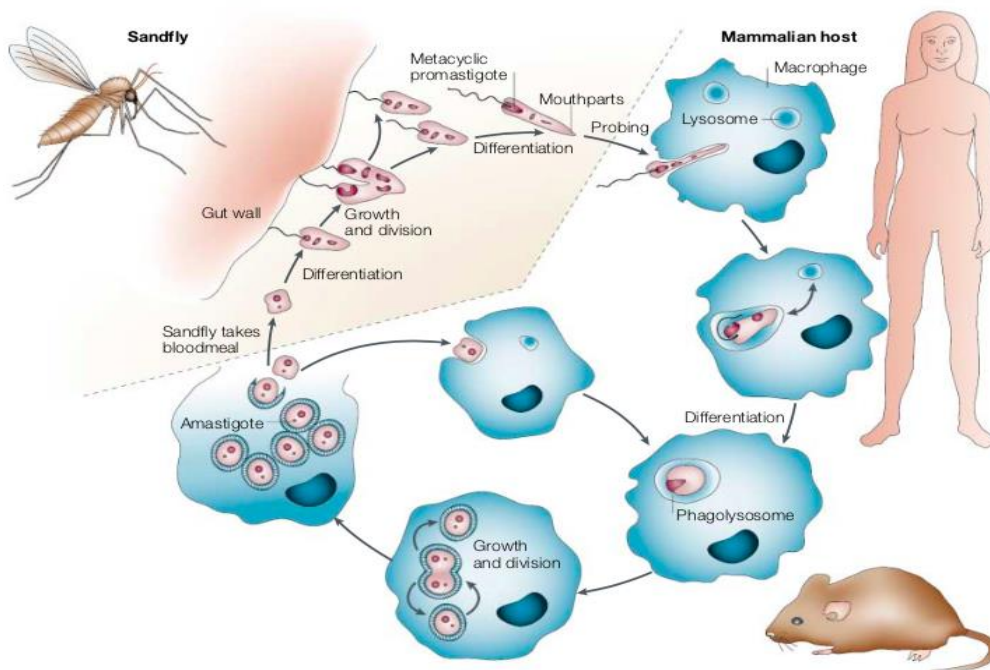
In der Literatur werden die Vektoren in die *Phlebotominae* Gattung aus der Alten Welt und die *Lutzomya longipalpis* Gattung aus der Neuen Welt unterteilt (Souza, Brazil et al. 2017). Als einzige Blutsauger der *Psychodidae*-Familie erscheinen die *Phlebotominae* mit einer Länge von 1,5 - 3,5 mm insgesamt größer, was ihre Abgrenzung zu anderen Sandmücken makroskopisch erleichtert. Behaarung findet sich sowohl am Kopf-Rumpfbereich sowie an den beiden im 40° Winkel abstehenden Flügeln (siehe Abb. 3). Vektor für Leishmanien sind ausschließlich die Weibchen. Diese ersuchen zur eigenen Eierproduktion die Blutmahlzeit, neben ihrer sonstigen Nahrungsquelle von Pflanzensäften und zuckerhaltigen Sekreten (ECDC 2017).

Der Lebenszyklus beginnt mit der Aufnahme von amastigoten Leishmanien durch die Sandmücke während der Blutmahlzeit (siehe Abb. 4). In ihrem Verdauungstrakt reifen die Amastigoten zu ihrer begeißelten Form, den Promastigoten heran. Über die Hämolymphe gelangen sie in die Speicheldrüsen der Sandmücke und werden bei der



**Abbildung 3 Die Sandmücke.** Eine Sandmückenweibchen bei der Blutmahlzeit auf humaner Haut (Loeffler 2016).

nächsten Blutmahlzeit auf den Wirt übertragen. Hier werden die metazyklischen Promastigoten hauptsächlich von Makrophagen und anderen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) phagozytiert. Innerhalb parasitophorer Vakuolen in den Makrophagen wandelt sich der Parasit wieder in seine amastigote Form um und vermehrt sich mittels Zellteilung. Die Vermehrung führt zu einem Anschwellen des Zellvolumens bis hin zur Ruptur und dem damit verbundenen Ausstrom der amastigoten Parasiten in das umliegende Gewebe. Dort werden weitere Zellen nach diesem Schema infiziert. Der Kreislauf ist geschlossen, wenn die Sandmücke die Amastigoten bei der nächsten Blutmahlzeit aufnimmt und diese sich im Verdauungstrakt der Sandmücke wieder in Promastigote umwandeln (Sacks and Noben-Trauth 2002, von Stebut 2007).



**Abbildung 4: Der Lebenszyklus der Leishmaniasis.** Der Kreislauf ist geschlossen, wenn die Sandmücke die Amastigoten bei der nächsten Blutmahlzeit aufnimmt und diese sich wieder in Promastigote umwandeln (Sacks and Noben-Trauth 2002).

## 1.4 Immunologie

Die Immunantwort auf eine Infektion mit *L. major* kann in eine zelluläre und eine humorale unterteilt werden. Dabei sind T-Lymphozyten (T-Zellen) die Träger der spezifischen zellulären Immunantwort und B-Lymphozyten (B-Zellen) die Träger der spezifischen humoralen Immunantwort (Kaufmann 2014).

Die von der Sandmücke übertragenen promastigoten Leishmanien werden hauptsächlich von Gewebsmakrophagen phagozytiert, aber auch durch dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und Fibroblasten (Kaye and Scott 2011).

Nach der Aufnahme von promastigoten Leishmanien wandeln sich die Parasiten in ihre amastigote Form um und vermehren sich intrazellulär im Phago lysosom durch Zweiteilung. Da die Makrophagen bei diesem Vorgang nicht aktiviert werden, können sich die amastigoten Leishmanien ungehindert vermehren bis die Makrophagen platzen und die Amastigoten in das umliegende Gewebe ausströmen. Dort werden sie von anderen Makrophagen aufgenommen, aber auch von Dendritischen Zellen (DC). Die DC migrieren zu den drainierenden Lymphknoten und präsentieren dort die *Leishmania*-Antigene den T-Zellen. Diese werden aktiviert, wandern zum Infektionsort und produzieren Interferon-*gamma* (IFN $\gamma$ ). Dieses trägt eine entscheidende Rolle in der Abwehr gegen Leishmanien, da es mit Leishmanien infizierte Gewebsmakrophagen aktiviert, woraufhin diese oxidative Stickstoffradikale (NO) produzieren, welche die amastigoten Parasiten intrazellulär abtöten. Durch die Ansammlung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und T-Zellen am Infektionsort kommt es zur Ausbildung eines Granuloms (von Stebut 2014).

Wenn DC in den Lymphknoten den Th0-Zellen *Leishmania*-Antigene präsentieren, gibt es einige CD4+ T-Zellen, welche die spezifischen Rezeptoren für LACK besitzen, um diese Antigene erkennen zu können. Daraufhin reifen sie zu Th2-Zellen heran, welche der Bekämpfung von extrazellulären Erregern dienen - also der humoralen Abwehr. Sie produzieren unter anderem den Botenstoff Interleukin-4 (IL-4), welcher die B-Zellen zur Antikörperproduktion anregt (Govender, Hurdayal et al. 2018).

Generell kann gesagt werden, dass eine Th1-dominierte Immunantwort besser geeignet ist intrazelluläre Erreger wie *Leishmania* zu bekämpfen, als eine Th2-dominierte Immunantwort, die eher geeignet ist für extrazelluläre Erreger wie Würmer (Rogers, DeKrey et al. 2002).

In der Literatur wird oft von einem Th1/Th2-Paradigma gesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Th1-vermittelte Immunantwort unter Beteiligung von IL-2 und Interferon-gamma zur Ausheilung einer *L. major*-Infektion führt, wohingegen eine Th2-vermittelte Immunantwort unter Beteiligung von IL-4 und IL-10 zur Persistenz der Infektion führt (Castellano, Filho et al. 2009).

## **1.5 Klinische Erscheinungsbilder**

Die Leishmaniasis wird aufgrund der unterschiedlichen Symptome und der verschiedenen Erreger in drei Gruppen unterteilt. Ursächlich sind um die 20 verschiedenen Erreger der Gattung *Leishmania*, die sich in zwei Untergruppen unterteilen lassen (Oryan and Akbari 2016). Zum einen der Subgenus *Leishmania* (*L.*) mit beispielsweise den Vertretern *L. donovani*, *L. tropica* und *L. major*. Der andere Subgenus ist *L. (Viannia)* mit den beispielhaften Vertretern *L. braziliensis* und *L. peruviana* (Melby 2002). Je nach übertragener Subspezies kommt es zu unterschiedlichen Ausprägungen der Leishmaniasis. Die klinischen Erscheinungsbilder reichen von der kutanen Form über die mukokutane bis hin zur viszeralen Form der *Leishmaniasis*.

### **Kutane Leishmaniasis (CL)**

Über 90% aller Infektionen mit Leishmanien äußern sich in Form einer kutanen Leishmaniasis, welche von den Erregern *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum* und *L. aethiopica* in der Alten Welt und *L. brasiliensis* und *L. mexicana* in der Neuen Welt ausgelöst wird (von Stebut 2007). Nach der Infektion eines Vertebraten mit Leishmanien durch die Sandmücke unterlaufen die Parasiten einen Inkubationszeitraum von 1-12 Wochen, ehe sich an der Stelle des Einstichs durch die Sandmücke eine rötliche Papel bildet. Diese wächst mit der Zeit an und differenziert sich zu einer ulzerierenden Plaque oder einem Knötchen auf granulomatöser Basis. Das von der Plaque ausgeschiedene Exsudat vertrocknet an der Oberfläche und bildet eine typische Kruste (siehe Abb. 5). Die Symptome beschränken sich zumeist auf die beschriebene lokale Hautveränderung, allerdings kann es zur Superinfektion der Ulzera kommen, die oft mit



leichten bis mittelschweren Schmerzen einhergehen. Manche Patienten weisen geschwollene Drüsen im Gebiet des Einstichortes auf, welche ebenfalls Schmerzen bereiten können (CDC 2017).

Die meisten Fälle von kutaner Leishmaniasis heilen innerhalb von eineinhalb Jahren mit dem Verbleib einer flachen manchmal leicht konkaven, atrophischen Narbe spontan aus. Eine signifikante Sterblichkeitsrate gibt es bei der *kutanen Leishmaniasis* (CL) nicht (Stockdale and Newton 2013). Die unterschiedlichen Erreger sorgen auch für verschiedene klinische Bilder, die sich in ihrer Anzahl, Entzündlichkeit und Symptomatik unterscheiden. Generell aber äußern sich Infektionen mit Erregern aus der Neuen Welt eher unilokulär, aus der Alten Welt oft auch multilokulär (Enk 2003).

Das Immunsystem reagiert auf eine Leishmaniasis-Infektion mit einer spezifischen T-Zell-Antwort (CD4<sup>+</sup> Th1 und CD8<sup>+</sup> Tc1) und sorgt somit für lebenslange Immunität gegen dieselbe Subspezies (von Stebut 2007).

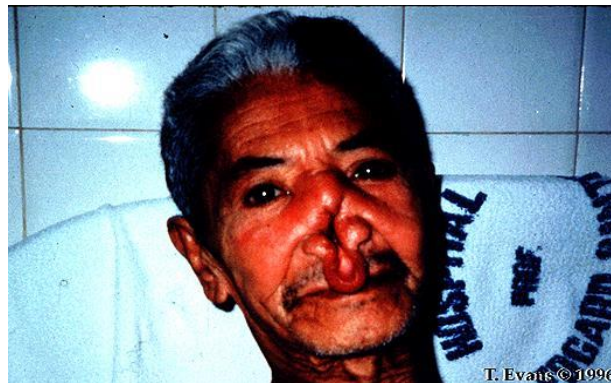


**Abbildung 5 Kutane Leishmaniasis.** Das typische Erscheinungsbild der kutanen Leishmaniasis ist der verkrustete Plaque mit granulomatöser Basis (Enk 2003).

### *Mukokutane Leishmaniasis (MCL)*

Im Vergleich zur kutanen Leishmaniasis liegt bei der mukokutanen Leishmaniasis (MCL) ein zusätzlicher Befall der Schleimhäute vor. Fälle von MCL kommen hauptsächlich in der Neuen Welt vor und werden durch *L. brasiliensis* ausgelöst, wohingegen in der Alten Welt nur seltene Fälle von MCL bei Infektionen mit *L. aethiopica* bekannt sind. Das Krankheitsbild ist zunächst nicht von dem der CL abzugrenzen mit dem Unterschied, dass entweder gleichzeitig oder Monate bis Jahre nach Abheilung der ursprünglichen Läsion eine neue Läsion im Schleimhautbereich entsteht. Findet sich diese neue Läsion im Bereich des Nasopharynx spricht man vom

Krankheitsbild Espundia (siehe Abb. 6). Die Ausbreitung auf die Schleimhäute kommt entweder über Blut - und Lymphwege oder überträgt sich von einer nahegelegenen Ulzeration (Enk 2003, von Stebut 2007).



**Abbildung 6 Mukokutane Leishmaniasis.** Patient mit Espundia. Die weitestgehende Zerstörung der knorpeligen Struktur der Nase ist hier ein typisches Krankheitsbild (Stanford 2017).

### Viszerale Leishmaniasis (VL)

Bei der viszeralen Leishmaniasis (VL), oder auch Kala-Azar, handelt es sich um das mit Abstand schwerste Krankheitsbild mit oft letalem Ausgang (Srivastava, Shankar et al. 2016). 85-90% aller Patienten mit VL sterben und selbst mit medikamentöser Therapie überleben nur 50% der Erkrankten. Als Erreger der VL gelten vor allem *L. donovani* und *L. infantum* im Mittelmeerraum, Mittleren Osten, Zentralasien, China, Zentral- und Südamerika (Stockdale and Newton 2013). Bei der VL sind vor allem innere Organe wie Milz und Leber beteiligt aber auch Lymphknoten und Knochenmark weisen Parasitenbefall auf. Typisch ist ein Aszites mit Hepatosplenomegalie (siehe Abb. 7) (von Stebut 2015).



**Abbildung 7 Viszerale Leishmaniasis.** Die schwerste Form der Leishmaniasis ist charakterisiert durch stark vergrößerte innere Organe, was hier deutlich zu sehen ist an dem stark ausgeprägten Aszites (HU-Berlin 2017).

## 1.6 Diagnostik

Deutschland zählt nicht zu den Endemiegebieten der Leishmaniasis und somit beschränkte sich bisher die jährliche Fallzahl auf Reisedermatosen. Im Zeitraum von 2001 bis 2004 wurden in Deutschland lediglich 42 Fälle von Leishmaniasis registriert (Weitzel, Muhlberger et al. 2005). Von den vielen Asylbewerbern, die zur Zeit nach Deutschland kommen, stammen die Hälfte aus Endemiegebieten der CL, was einen Anstieg an Leishmaniasis Infektionen in Deutschland vermuten lässt (von Stebut, Boecken et al. 2016). Somit sollte bei ulzerösen Hauterkrankungen differentialdiagnostisch an eine CL gedacht werden.

Die Diagnosestellung beginnt mit einer klinischen Untersuchung des Patienten. Die Hautveränderung bei der CL, wie in Punkt 2.3 beschrieben, hat als Prädilektionsstelle Hautareale, die meist unbedeckt sind wie Gesicht, Arme oder Beine. Differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehen sind die *Ekthyma* bzw. *erosiv ulzerierte Pyodermie*, die primäre Hauttuberkulose, *Tuberculosis cutis verrucosa* bzw. postprimäre Inokulationstuberkulose, atypische Mykobakterien, das Schwimmbadgranulom - *Mycobacterium marinum*, *Lepra*, die tiefe *Trichophytie* bzw. *entzündlich-pustulöse Tinea*, *Lues I* und diverse Hauttumoren wie beispielsweise das Plattenepithelkarzinom (Boecken, Sunderkotter et al. 2011).

Besteht die Verdachtsdiagnose CL, so ist der nächste Schritt die Gewinnung einer geeigneten Probe zur molekularbiologischen sowie pathohistologischen Untersuchung in einem medizinischen Labor. Die Probe wird entweder durch eine (Stanz-) Biopsie, mittels Skalpell oder scharfem Löffel (*skin scraping*) oder mit Hilfe einer Blutlanzette (*slit skin smear*) gewonnen. Wenn möglich wird ein Teil der Probe für die Pathohistologie in Formalin eingelegt und mittels gängiger Färbeprotokolle eine HE- sowie Giemsa-Färbung erstellt. Darin können mikroskopisch amastigote Leishmanien in Form von kleinen, blauen Pünktchen meist in den Makrophagen der Zellen befindlich nachgewiesen werden (Enk 2003). Die histologische Untersuchung ermöglicht zwar einen Erregernachweis, allerdings keine Spezifizierung. Deshalb wird der zweite Teil der gewonnenen Probe für eine molekularbiologische Untersuchung verwendet und dafür in sterile, physiologische Kochsalzlösung gegeben. Methoden wie die Erregeraufzucht in Spezialmedien, die Isoenzym-Analyse oder die immunologische Untersuchung mittels monoklonaler Antikörper sind sowohl zeit- als auch kostenaufwendig. Mit der



Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gibt es ein Verfahren, das sowohl schnell, sensitiv, spezifisch als auch kostengünstig ist (Harris, Kropp et al. 1998). Die PCR ist ein molekularbiologisches *in vitro* Verfahren, das durch Vervielfältigung von Parasiten-DNA durch DNA-Polymerase-Enzym einen Erreger-Nachweis mit Genus Spezifizierung möglich macht. Dies ist entscheidend, da sich die adäquate Therapie bei den verschiedenen *Leishmania* Subspezies teilweise stark unterscheidet (Boecken, Sunderkotter et al. 2011)

## **1.7 Therapie**

Maßgebend für die adäquate Therapie einer Leishmaniasis ist die Komplexität der Läsion, der klinische Verlauf und die genaue Subspezies. Einfache, solitäre Läsionen mit Erregern der Alten Welt bedürfen nicht zwingend einer Therapie. Die Läsion heilt meist nach wenigen Monaten von selbst ab, was in lebenslanger Immunität gegen dieselbe Erregersubspezies resultiert, was gerade in Endemie Gebieten von Vorteil ist (WHO 2017). Kritisch zu werten ist dabei die möglicherweise kosmetisch beeinträchtigende Narbenbildung und deshalb sollten Läsionen in kosmetisch oder funktionell wichtigen Hautarealen wie Gesicht, Hände oder Füße immer medikamentös therapiert werden. Ebenfalls sofortiger Therapie bedürfen Multiple Läsionen, Läsionen mit Ausbreitungstendenz auf die Schleimhäute (z.B. *L. braziliensis*), MCL und VL (Enk 2003). Liegt eine zu therapierende Leishmaniasis vor, so gibt es eine große Auswahl an verschiedenen Chemotherapeutika, die entweder lokal, systemisch oder in Kombination angewandt werden. Die mittels PCR ermittelte *Leishmania*-Subspezies ist die Voraussetzung für die Auswahl des richtigen Chemotherapeutikums, da diese ein sehr speziesabhängiges Wirkspektrum haben (Minodier and Parola 2007). In Deutschland sind aufgrund der niedrigen Fallzahlen viele Chemotherapeutika nicht für die Behandlung der Leishmaniasis zugelassen, worüber Patienten vorher aufgeklärt werden müssen. Außer einfache Läsionen verursacht durch Erreger aus der Alten Welt, durch *L. mexicana* oder Läsionen bei Schwangeren beziehungsweise Patienten mit Kontraindikationen, die lokal therapiert werden, ist die systemische Gabe von Chemotherapeutika angezeigt (Boecken, Sunderkotter et al. 2011).

Stellt sich im klinischen Erscheinungsbild eine Beteiligung der Schleimhäute dar, also eine mukokutane Verlaufsform, so bedarf dies immer einer Spezies-spezifischen

systemischen Therapie (DTG 2010). Die Therapiemittel der Wahl sind analog zu komplexen kutanen Läsionen, unterteilt nach den kausativen Subspezies, in Abbildung 9 zu finden.

Die viszerale Verlaufsform der Leishmaniasis, welche untherapiert letal verläuft, bedarf immer medikamentöser Therapie. Dabei ist intravenös verabreichtes liposomales Amphotericin B Mittel der ersten Wahl. Die Amphotericine werden von Makrophagen aufgenommen und sind somit unmittelbar am Ort der Infektion. Als Mittel der zweiten Wahl wird das Alkylphosphocholin Miltefosin angesehen. Beide Therapieoptionen wirken kurativ und nach 6-12 Monaten sollten die Leishmanien-Titer abgefallen sein.

Die anfänglichen Symptome Fieber und Lymphknotenschwellungen sollten innerhalb einer Woche nach erster Medikamentengabe behoben sein (DTG 2016).

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Therapieoptionen Old World Cutaneous Leishmaniasis (OWCL).

Läsion	Wahl	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. infantum</i>
<i>A. einfach</i>	1.	1. pIA + Kryotherapie 2. Paromomycin/MBCl 3. Thermotheapie	1. pIA + Kryotherapie 2. Thermotheapie	1. pIA + Kryotherapie
<i>B. komplex</i>	1.	1. Miltefosin 2. Fluconazol (insb. bei Zymodem MON-26) 3. Ketoconazol	1. Itraconazol 2. Ketoconazol 3. Fluconazol	1. Antimon i.v. + Pentoxifyllin 2. Miltefosin
	2.	1. Antimon i.v. + Allopurinol 2. Antimon i.v. + Pentoxifyllin	1. Antimon i.v. + Allopurinol	1. Liposomales Ampho B

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Therapieoptionen New World Cutaneous Leishmaniasis (NWCL).

Läsion	Wahl	<i>L. mexicana</i>	<i>Subgenus Viannia</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
<i>A. einfach</i>	1.	1. pIA + Kryotherapie 2. Paromomycin/MBCl 3. Thermotheapie 4. Abwarten	1. Antimon i.v. + Pentoxifyllin 2. Miltefosin (abhängig vom Endemiegebiet) 3. Pentamidin	1. Pentamidin 2. Miltefosin	1. Ketoconazol 2. Antimon + Allopurinol 3. Miltefosin (abhängig vom Endemiegebiet)
<i>B. komplex</i>	1.	1. Ketoconazol 2. Antimon i.v.			
	2.	1. Miltefosin	1. liposomales Ampho B 2. Itraconazol		

**Abbildung 8 Therapieoptionen bei Kutaner Leishmaniasis.** Tabellarisch zusammengefasst sind die Therapieoptionen bei CL mit Erregern der 'Alten Welt' (Tabelle 1) und Erregern der 'Neuen Welt' (Tabelle 2)(Boecken, Sunderkotter et al. 2011).

## **1.8 Präventive Maßnahmen**

Die Richtlinien der WHO zur Leishmaniasis-Prävention bestehen aus einer frühen Diagnostik, der Vektor Kontrolle und der Aufklärung von Risikopatienten (WHO 2017). Es gilt von Kleidung unbedeckte Hautareale so gering wie möglich zu halten und nackte Areale mit geeigneten Repellenzien zu schützen, dabei haben sich jene, die den Wirkstoff Diethylmetatoluamid enthalten, als besonders wirksam herausgestellt. Mit Insektiziden sollten Wohn- und Schlafräume behandelt werden, um so die Insekten zu töten (CDC 2017). Es konnte gezeigt werden, dass mit Insektizid behandelte Moskitonetze (0,5 g/m<sup>2</sup> Permethrin) die Wahrscheinlichkeit, von einer Sandmücke gestochen zu werden, um 65% senken. Das Besprühen von Wohn- und Schlafräumen konnte die Wahrscheinlichkeit um 40% senken (Reyburn, Ashford et al. 2000).

Neben der Vektor Kontrolle gibt es schon seit der Mitte des 20. Jahrhunderts Bestrebungen ein geeignetes Vakzin gegen *Leishmania*-Parasiten zu entwickeln. Vakzine mit toten *Leishmania*-Parasiten wurden schon 1940 sowohl in Hunde- als auch Humanstudien getestet, waren mit 54% allerdings nicht sehr effektiv (Palatnik-de-Sousa 2008). Für die canine Leishmaniasis gibt es mit Letifend und Canileish bereits zwei effektive Vakzine, wobei es Stand 2017 für die humane Prophylaxe kein zugelassenes Präparat gibt. In Endemiegebieten findet die sogenannte Leishmanisation Anwendung. Dabei werden die Patienten meist im Kleinkindalter iatrogen an einer verdeckten Körperstelle mit Leishmanien infiziert, um eine natürliche Resistenz zu erzeugen (Davies, Kaye et al. 2003). Bei einigen Patienten entstehen allerdings unkontrollierte Infektionen, weshalb die Methode der Leishmanisation eine eingeschränkte Indikation hat (von Stebut, Berneburg et al. 2014).

Hauptproblem bei der Entwicklung eines geeigneten Vakzins ist, dass die Parasiten in den Zellen sitzen und somit von Antikörpern nicht erreicht werden können. Nach der Infektion einer Zelle werden jedoch Bruchstücke einzelner Proteine des Erregers auf der Zelloberfläche sichtbar, die von T-Zellen erkannt werden können und die Zelle samt Parasiten somit eliminiert werden kann (Ärzteblatt 2014). Schwierig für die Entwicklung eines geeigneten Vakzins mit einem breiten Spektrum ist die Vielzahl der Erreger. 2014 wurde an der Berliner Charité ein DNA-Vakzin an Mäusen getestet. Die Vakzin-Antigene wurden aus verschiedenen *Leishmania*-Subspezies und aus unterschiedlichen Endemiegebieten gewonnen, allerdings handelt es sich um fünf

Proteinabschnitte, die bei allen Erregern gleich sind. Damit wird eine breite Abdeckung des Vakzins erwartet. Es führte zu 94% weniger Parasiten in der Leber von geimpften Tieren gegenüber den Kontroll-Tieren (Das, Freier et al. 2014). Das Vakzin gilt als vielversprechend, allerdings müssen Ergebnisse aus klinischen Studien abgewartet werden.

Leish-111f ist ein Vakzin, das sich in der klinischen Untersuchung mit *L. infantum* infizierten Mäusen effektiv gegen alle drei Formen der Leishmaniasis erwiesen hat. Es handelt sich um ein rekombinantes Polyprotein Vakzin und befindet sich zur Zeit in der klinischen Testphase. Das Vakzin führte zu Th1 Immunantwort mit einem signifikanten Anstieg der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und Tumor-Nekrose-Faktor (Coler, Goto et al. 2007).

LACK ist das Homolog für den bei Säugetieren bekannten Rezeptor für Aktivierte C-Kinase (RACK). In einer *in vivo* Studie wurden BALB/c-Mäuse mit *L. major* infiziert und am Infektionsort konnte eine starke Ansammlung von LACK-spezifischen Th2-Zellen beobachtet werden, was zu einem starken Fortschreiten der Infektion in diesen Mäusen führte (Launois, Maillard et al. 1997). Sowohl ein Antagonismus der LACK-spezifischen CD4-T-Zell Immunantwort, als auch die Zerstörung von LACK-reaktiven T-Zellen durch Expression eines LACK-Transgens im Maus-Thymus führten in BALB/c Mäusen zu einer Th1-Immunantwort und verhinderten somit ein Ausbreiten der Infektion (Julia, Rassoulzadegan et al. 1996, Pingel, Launois et al. 1999). Im Jahr 2003 konnte die Forschungsgruppe rund um Ben L. Kelly zeigen, dass das LACK-Antigen eine Schlüsselrolle in der Immunantwort von BALB/c-Mäusen einnimmt und somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Vakzin-Entwicklung darstellt. Die LACK-Gene von *L. major* bestehen aus einem Allel mit den zwei unterschiedlichen LACK-Genen *lack1* und *lack2*. Mittels Gene-Targeting generierte die Arbeitsgruppe um Ben L. Kelly Parasiten, mit jeweils nur *lack1* oder *lack2*, welche sich als nicht infektiös gegenüber BALB/c-Mäusen darstellten. Parasiten ohne jeglichen LACK-Rezeptor konnten nicht generiert werden, was darauf hindeuten könnte, dass der LACK-Rezeptor für den Parasiten überlebensnotwendig ist (Kelly, Stetson et al. 2003).

Vielversprechend ist auch die 2017 erstellte Studie mit dem Checkpoint-Inhibitor Nivolumab. Leishmanien besitzen einen Liganden für den auf T-Zellen befindlichen Checkpoint Programmed-Death-1 (PD-1), welcher bei Aktivierung die T-Zell-Funktion beeinträchtigt und so zu einer Abschwächung bzw. zu einem Ausbleiben der Immunantwort führt. Durch die Nivolumab-Antikörper konnte der das Immunsystem

bremsende Checkpoint (PD-1) blockiert werden und durch wieder funktionsfähige T-Zellen das Immunsystem aktiviert werden (Filippis, Arens et al. 2017).

## **1.9 Die Maus als Versuchstier**

Die Untersuchung von komplexen biologischen Systemen erfordert in vielen Fällen eine *in vivo* Analyse. Sowohl aus ethischer als auch aus technischer Sicht ist dies am Menschen oftmals nicht durchführbar. Somit begründet sich vor allem in der medizinischen Forschung ein Bedarf an geeigneten Tiermodellen, um mit menschlichen Zellen, Organen und Geweben zu forschen, ohne dabei menschliches Leben zu gefährden (Shultz, Ishikawa et al. 2007). Biologisch gesehen gibt es zwar viele Gemeinsamkeiten zwischen Maus und Mensch, aber auch viele Unterschiede, was dazu führt, dass Ergebnisse aus einer *in vivo* Studie mit Mäusen nicht auf den Menschen übertragbar sind oder der Versuch erst gar nicht möglich ist.

In einer Untersuchung wurden Ratten, Hamster, Meerschweinchen und Mäuse mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) infiziert. Von allen Säugetiergruppen zeigten nur Mäuse eine erhöhte Sterblichkeitsrate im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe, allerdings nicht statistisch signifikant (18,7% zu 5,9%). HIV konnte weder virologisch noch immunologisch nachgewiesen werden (Morrow, Wharton et al. 1987). Mit der Entwicklung von transgenen Versuchstieren wurden Mäuse generiert, die jene Proteine exprimieren, die für die HI-Virus-Replikation wichtig sind, vor allem CD4, CC-Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5) und CXCR-Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4). Allerdings zeigten auch diese aufgrund des Fehlens von HIV-Cofaktoren oder auch der Präsenz von beim Menschen nicht vorhandenen Proteinen, die eine HIV-Infektion verhindern, keine virale Replikation und auch keine Infektion. Das beste Versuchsmodell stellt die genetisch immunkomprimierte Maus, die mit einem humanen Immunsystem rekonstituiert wird dar (Hatzioannou and Evans 2012).

Mäuse sind seit Jahrzehnten die Versuchstiere der ersten Wahl, wenn es um immunologische *in vivo* - Untersuchungen geht. Im Jahr 2002 wurde das Maus-Genom entschlüsselt und festgestellt, dass die Übereinstimmung der Gene von Maus und Mensch 98% beträgt. Allerdings gibt es zwischen dem humanen und dem murinen Immunsystem einige Unterschiede auf zellulärer Ebene wie beispielsweise dem Verhältnis der unterschiedlichen Leukozyten-Untergruppen, der Natürlichen

Killerzellen, B- und T-Zellen, der Th1-/Th2-Differenzierung, der Antigen-Präsentationsfunktion von Endothelzellen und Chemokin Expression (Mestas and Hughes 2004).

## **1.10 Das humanisierte Mausmodell**

Die biologischen Unterschiede der beiden Spezies Maus und Mensch limitieren viele *in vivo* Untersuchungen und deshalb entwickelte sich ein starkes wissenschaftliches Interesse, ein humanisiertes Mausmodell zu entwickeln. Dafür wurden genetisch modifizierten, immundefizienten Mäusen humane Stammzellen (HSCs) oder mononukleare Blutzellen (PBMCs) übertragen, die nach ihrem Anwachsen die Simulation einer humanen *in vivo* Studie ermöglichen (Shultz, Ishikawa et al. 2007). Die Immundefizienz der Mäuse spielt dabei insofern eine entscheidende Rolle, als dass die auf die Maus übertragenen humanen Zellen bei intaktem Immunsystem der Maus abgestoßen würden und die Humanisierung damit ausbleiben würde.

### **Entwicklungsgeschichte des humanisierten Mausmodells**

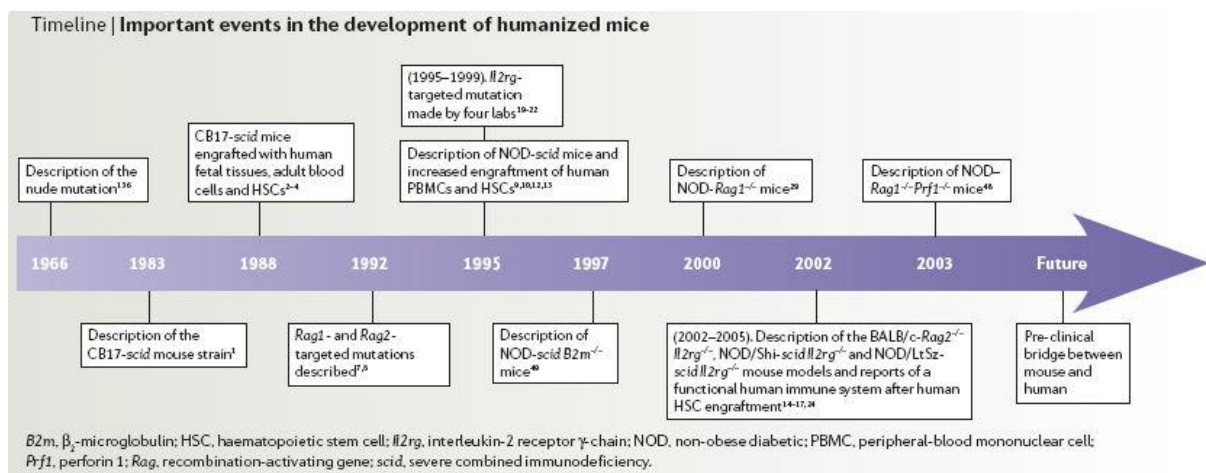
Der Grundstein für das humanisierte Mausmodell wurde 1983 durch die Entdeckung der immundefizienten CB17-*scid* (*severe combined immunodeficiency*) Maus gelegt (Bosma, Custer et al. 1983). Durch die *Prkdc* (*protein kinase DNA activated catalytic polypeptide*)<sup>*scid*</sup> Mutation fehlen den Mäusen reife T- und B-Zellen wodurch eine humorale Immunabwehr nicht möglich ist. Neben einer erhöhten Strahlungssensitivität ist dieses Modell insofern limitiert, als dass es zu einer erhöhten Bildung von Natürlichen Killerzellen (NKs) kam und zur spontanen Ausbildung von T- und B-Zellen, was allgemein als *leakiness* bezeichnet wird (Greiner, Hesselton et al. 1998).

Durch eine gezielte Mutation an den Genen *Rag1* und *Rag2* (*recombination-activating gene*) ist es gelungen sowohl die Radiosensitivität als auch die *leakiness* zu eliminieren, allerdings verhinderte das große Aufkommen von NKs das Anwachsen von HSCs maßgeblich (Mombaerts, Iacomini et al. 1992, Shultz, Ishikawa et al. 2007).

Mit der *NOD* (*non-obese diabetic*)-*scid* Maus wurde 1995 eine Modellmaus entwickelt, die zwar ein geringeres Aufkommen von NKs als die *scid*-Maus hat, diese aber nicht gänzlich eliminiert sind, was zu einem verminderten Anwachsen des humanen lymphoiden Systems führt (Christianson, Greiner et al. 1996). Das verminderte

Anwachsen humaner Zellen und die kurze Lebensdauer der Tiere limitieren auch dieses Modell.

Schlussendlich führte die gezielte Mutation des Interleukin-2 Rezeptor gamma-chain locus (*Il2rg*) im *Il2rg*- oder auch NOG-Mausmodell zu einer stark eingeschränkten T- und B-Zellbildung und zur Elimination von NKs. Das Anwachsen humaner Zellen wurde somit weiter verbessert und funktionstüchtiges humanes Immunsystem wurde in der Maus etabliert. Schwachpunkte hat auch dieses Modell, in dem die Mäuse keine Lymphknoten und keinen Thymus ausbilden (Shultz, Ishikawa et al. 2007).



**Abbildung 9 Zeitstrahl mit den wichtigsten Ereignissen in der Entwicklung des humanisierten Mausmodells.** Interessant ist die relativ große Zeitspanne zwischen der Beschreibung der *nude*-Mutation 1966 (Flanagan 1966) und der Entdeckung der CB17-*scid* Maus 1983. Nach der anfänglichen Lücke von 17 Jahren gibt es seit 1983 im Abstand von wenigen Jahren wesentliche Weiterentwicklungen, sodass die CB17-*scid* Maus als Meilenstein in der Geschichte des humanisierten Mausmodells gilt (Shultz, Ishikawa et al. 2007).

Das Einsatzgebiet für die Arbeit mit humanisierten Mäusen ist sehr vielseitig. Die größten Gebiete sind die Hämatopoese-Forschung, Forschungen zur Entwicklung und Funktion des humanen Immunsystems, aber auch zur humanen Immunantwort auf verschiedene Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Krebsforschung bis hin zur regenerativen Medizin mittels Stammzelltherapie.

Seit der Entdeckung der CB17-*scid* Maus wurde das humanisierte Mausmodell kontinuierlich verbessert um sich einer humanen *in vivo* Studie so weit wie möglich anzunähern.

### Humanisierte Mausmodelle

Die aktuell meist verwendeten immunodefizienten *IL2rg<sup>null</sup>*- Mausstämme sind NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>* (NSG), NODShi.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Sug</sup>* (NOG) und BALB/c-

*Rag2<sup>null</sup> IL2rg<sup>null</sup>*. Um in diesen Mäusen ein intaktes humanes Immunsystem oder Teile davon zu etablieren, werden derzeit hauptsächlich die drei folgenden Methoden angewendet.

Beim ersten Modell, bekannt als Hu-PBL-SCID, werden den Mäusen humane Leukozyten aus dem peripheren Blutkreislauf (Human Peripheral Blood Leukocytes - Hu-PBL) intrahepatisch injiziert. Innerhalb einer Woche sind in der Maus humane CD3<sup>+</sup>-Zellen zu finden und somit eignet sich dieses Modell sehr gut für *in vivo*-Untersuchungen von humanen T-Zellen. Aufgrund der dann auftretenden Graft versus host disease (GVHD) bleibt allerdings nur ein kleines Zeitfenster für die Untersuchungen.

Beim zweiten Modell, dem Hu-SRC-SCID-Modell, werden den Mäusen intravenös humane SCID-repopulierende-Zellen (Human SCID repopulating Cells - Hu-SRC) wie zum Beispiel CD34<sup>+</sup>-Stammzellen aus dem Knochenmark, der Nabelschnur oder der fetalen Leber injiziert. Dabei etabliert sich in der Maus ein nahezu komplettes humanes Immunsystem. Die T-Zellen reifen im Maus-Thymus heran. Allerdings scheinen dem Maus-Thymus einige human-spezifische Faktoren zu fehlen, die für eine vollständige humane T-Zell-Reifung notwendig sind, was dieses Modell hinsichtlich der Vollständigkeit eines humanen Immunsystems limitiert (Walsh, Kenney et al. 2017).

Beim dritten Modell, bekannt als BLT-Modell (Bone marrow-liver-thymus - BLT), werden den Mäusen zum einen Teile humaner fetaler Leber und Thymus unter die Nierenkapsel transplantiert und zum anderen intravenös HSC aus der fetalen Leber injiziert. Wie beim zweiten Modell etabliert sich ein nahezu vollständiges humanes Immunsystem in der Maus, mit dem Unterschied, dass die humanen T-Zellen in einem transplantierten autologen Thymus heranreifen (Lan 2006).

## **1.11 Humanisierte Mäuse in Infektionskrankheiten**

Ein sehr großer Teil des derzeitigen Wissens über das menschliche Immunsystem stammt aus experimentellen Tierversuchen. Durch die Entwicklung von immundefizienten Mausmodellen und den damit möglichen Versuchen mit menschlichen Zellen ist das Wissen über humane Zellen, Gewebe und das humane Immunsystem signifikant erweitert worden. Seit der Entwicklung von immundefizienten humanisierten Mäusen gab es eine Vielzahl an Versuchen, um humane Infektionskrankheiten *in vivo* zu erforschen. Unter anderem wurden Versuche



mit Viren wie dem Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV), dem Epstein-Barr-Virus (EBV), Ebola-Virus, Dengue-Virus, Hepatitis-C und B-Virus, aber auch Bakterien wie zum Beispiel *Salmonella enteric serovar typhimurium*, *Borrelia hermsii* oder *Plasmodium falciparum* (Shultz, Brehm et al. 2012).

In einer Studie aus dem Jahr 2019 wurde die Pathogenese des Ebola Virus mit der des Reston Virus im HLA-A2 transgenen, NOD-scid-Interleukin-2 $\gamma$ -knockout-Mausmodell verglichen. Dabei stellte sich der Ebola Virus als weitaus weniger pathogen heraus, wobei der Reston Virus 20% der infizierten Mäuse tötete. Auch korrelierte die Anzahl an Fällen mit fatalem Ausgang bei den unterschiedlichen Ebolaviren mit humanen Fallzahlen (Escudero-Perez, Ruibal et al. 2019).

In einer anderen Studie konnten in mit dem Dengue-Virus infizierten NOD-scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> Mäusen die typischen Symptome beobachtet werden, die auch bei humanen Fällen festzustellen sind. Nach der aufgetretenen Thrombozytopenie folgte ein fieberartiger Anstieg der Körpertemperatur und Erytheme. Zum Vergleich wurde der selbe Versuchsaufbau für andere Virus-Genotypen angewandt und die Ergebnisse waren für den jeweiligen Virus typisch und der Krankheitsverlauf der Mäuse zeigte eine Virus-spezifische Charakteristik. Das Mausmodell stellt eine hervorragende Möglichkeit dar diesen Virus weiter zu erforschen und dabei Strategien für eine Vakzin-Entwicklung oder antivirale Therapie zu entwickeln (Mota and Rico-Hesse 2009).

Die Arbeitsgruppe um Wege, Florian et. al. hat 2012 an der Universität Regensburg eine Studie durchgeführt, bei der sie humanisierte Mäuse mit *L. major* infiziert haben, um ein Modell zu erforschen, womit möglicherweise weitere Therapiemöglichkeiten, vor allem hinsichtlich der Vakzinentwicklung, erforscht und getestet werden können. Dabei wurden NOD-scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> (NSG) Mäusen zuerst  $3 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> umbilikale, hämatopoetische Stammzellen intrahepatisch transplantiert und ihnen dann entweder  $3 \times 10^1$  (Low dose) oder  $3 \times 10^6$  (High dose) *L. major* Promastigoten (MHOM/IL/81/FE/BNI) in die rechte hintere Pfote injiziert.

Wie erwartet wurden die Parasiten vor allem in den humanen Makrophagen gefunden. Überraschend war, dass sich der Fundort nicht nur auf den Infektionsort beschränkte, sondern auch in viszeralen Organen wie Milz und Leber Parasiten festgestellt werden konnten.

Die humanisierten Mäuse zeigten einen von der Parasiten-Dosis abhängigen, unterschiedlichen Krankheitsverlauf. Je höher die Parasiten-Dosis war, desto schneller

kam es zu einem Gewichtsverlust, desto stärker ausgeprägt war die Schwellung am Infektionsort und desto eher erlagen die Tiere der Infektion.

Es konnte eine Antwort des humanen adaptierten Immunsystems an der Infektionsstelle beobachtet werden. Neben der dichten dermalen Infiltration von humanen CD68<sup>+</sup>Makrophagen dominierten in der Lymphozyten-Population CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, wohingegen nur eine geringe Anzahl von B-Zellen festgestellt werden konnte. Eine weitere Aufteilung der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen in CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, zeigte eine klare Dominanz der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

Die anschließende orale Gabe von Miltefosin führte zu ähnlichen Beobachtungen wie auch bei der humanen Therapie; Gewichtsverlust und ein Anstieg der Ausschüttung von Leber-Enzymen wie GOT und GPT. Miltefosin führte zu einem geringem Rückgang von Parasiten in der Leber und in der Pfote (Wege, Florian et al. 2012).

Im Rahmen einer anderen Studie im Jahr 2019 wurde ein humanisierte Mausmodell für *L. major* untersucht, bei dem mononukleäre humane Zellen aus dem peripheren Blut (hPBMC) in T-, B- und NK-Zell-defiziente Mäuse transferiert wurden. Die immundefizienten Mäuse wurden zum einen gemäß dem low dose-Modell intradermal mit *L. major* infiziert, zum anderen intraperitoneal mit hPBMC transferiert. Es führte zur erfolgreichen Infektionsausbreitung von *L. major* und zur Rekrutierung humaner T-Zellen an den Infektionsort. 50% der Mäuse erlagen einer graft-versus-host-disease (GvHD). Die Frequenz von hCD45<sup>+</sup> variierte zwar von Maus zu Maus, korrelierte aber mit der Frequenz im peripheren Blut. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten in der Haut infizierter Mäuse nachgewiesen werden.

Eine weitere Fragestellung der Studie war, ob die IFN $\gamma$ -vermittelte Parasiten Elimination Spezies-abhängig ist. Mit *L. major* infizierte murine Makrophagen wurden mit humanem (h) oder murinen (m) IFN $\gamma$  stimuliert. Es zeigte sich eine starke Spezies-Abhängigkeit. Nur die Stimulation mit mIFN $\gamma$  zeigte eine Makrophagen-vermittelte Abtötung von Parasiten, wohingegen selbst hohe Dosen von hIFN $\gamma$  ineffektiv waren.

Somit eignet sich das Modell für weitere Studien zur T-Zell-Rekrutierung am Infektionsort und zu humanen anti-*Leishmania* T-Zell-vermittelten Immunantworten (Fischer MR 2019).

## **2. Ziele der Arbeit**

Die Leishmaniasis ist eine parasitäre Erkrankung, die von Erregern der Gattung *Leishmania* ausgelöst wird und bei weltweit schätzungsweise 1,3 Millionen Neuinfektionen pro Jahr (WHO 2017) eine Infektionskrankheit mit großem Handlungsbedarf darstellt, da bis heute noch kein Vakzin vorliegt.

Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung des humanisierten NOD-*scid IL2r $\gamma$ <sup>null</sup>* (NSG) Maus-Modells als geeignetes klinisches Versuchsmodell für das Krankheitsbild der kutanen Leishmaniasis. Insbesondere sollen hier die humanen Entzündungszellen in den murinen Geweben charakterisiert und mit "echten" menschlichen Läsionen verglichen werden.

Dafür wurden NSG Mäuse neonatal mit humanen Stammzellen rekonstituiert. Nach Anwachsen der humanen Zellen wurden die NSG-Mäuse intradermal in beide Ohren mit der physiologisch relevanten Menge von 1.000 *L. major* Promastigoten infiziert. Acht Wochen nach der Infektion wurden die Mäuse abgetötet, die zu untersuchenden Gewebe wie Milz, Leber, Ohr mit Granulom und Rückenhaut entnommen und diese dann immunhistochemisch angefärbt.

Die anschließende quantitative Untersuchung sollte zeigen, in wie weit sich dieses Versuchsmodell für weitere Forschungen im Hinblick auf die humane kutane Leishmaniasis eignet. Zusätzlich soll mit einem möglichen, zukünftigen Einsatz von humanisierten Mäusen die Vakzinentwicklung gegen dieses humane Pathogen weiter vorangetrieben werden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Bad Sachsa
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus, Vertrieb: Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Vertrieb: Thermo Electron Corporation, Langenselbold
FACS LSR2	BD-Pharmingen, Heidelberg
FACS Software	Flowjow Version 7.6.5, LLC, USA
0,5ml, 1ml, 5ml, 10ml Pipetten	Gilson, Bad Camberg
Pipetten-Stepper Handy Step	Brand, Wertheim
Mikroskop Diavert	Leica, Wetzlar
Mikroskop Diaplan	Leica, Wetzlar
Wasserbad Typ GFL-1003 14l	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Vortex	Merck eurolab, Darmstadt
Sterilbank BSB 6A	Gelaire Flow Laboratories, D-Meckenheim
Waage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius AG, D-37070 Göttingen

### 3.1.2 Gebrauchsgegenstände

<b>Gebrauchsgegenstand</b>	<b>Hersteller</b>
Schere steril, feine Schere, gebogen spitz-spitz 105 mm	Medicon, Tuttlingen
Uhrmacher-Pinzette steril	A. Dumont & Fils, Switzerland
Pinzette steril 145 mm	Bochem Laborbedarf, Vertrieb: Fisher Scientific, Schwerte
Skalpell steril	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Zellsieb 70 µm	BD Falcon, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Heinz Herenz Medizinalbedarf GMBH, Hamburg
Zellkultur-Petrischale 100 x 20 mm steril	Falcon, BD, Heidelberg
PP-Test Tubes 50 ml und 15 ml steril	Cellstar, greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten-Spitzen ultratip, versch. Größen	greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten 5, 10 und 25 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Spritzen 5 und 10 ml	BD, Heidelberg
Objektträger 76 x 26 mm	Vertrieb durch DIAGONAL GmbH & Co. KG, Münster
FACS-Rundbodenröhrchen 5 ml	Falcon, BD, Heidelberg
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen 25cm <sup>3</sup> und 75cm <sup>3</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmal-Kanülen 20G x 2 3/4" und 23G x 1 1/4"	Braun, Melsungen
DAKO-Pen	DAKO, Hamburg
Thin Certs – Tc Einsätze 24 well, Porengröße 3 µm translucent	Greiner bio-one, Frickenhausen
Bottle-Top-Filter 0,2 µm Cellulose Acetate Zap Cap – S	Whatman, Schleicher & Schuell MicroScience, Vertrieb: Steinheim

### 3.1.3 Chemikalien

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
BSA: Albumin Fraktion V Protease frei	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
$\alpha$ -D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
Alkopharm 70 (70% Ethanol)	Brüggemann Alcohol, Heilbronn
Trypanblau 0,4% 100 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck Schuchhardt OHG, Hohenbrunn
Helipur H plus N	B. Braun, Melsungen
Aceton	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Xylol	AppliChem, Darmstadt
Mayers Hämalanlösung	Merck, Darmstadt
Aqua dest	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
$\text{NaN}_3$ 99,5%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1 N HCl	Merck, Darmstadt
$\text{H}_2\text{O}_2$	Chem-pharm Lab Dr. Seeger GmbH, Stuttgart
HEPES	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
Glutamin 200 mM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Non-Essential-Amino-Acids (100x)	Biochrom, Berlin
Mercaptoethanol 50 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Forene (Isofluran)	Abott GmbH Co. KG, Wiesbaden

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung/Hersteller</b>
FACS-Puffer 500 ml	1xPBS + 2% FCS + 50µl NaN <sub>3</sub> (einer 10%igen Lösung),
0,5 M EDTA-Lösung	100 ml Aqua dest. + 18,62 g EDTA, pH 6,5 (mit 1 N HCl eingestellt)
Ficoll-Lösung	20 % Ficoll in Aqua dest.
Tris	ICN Biomedicals, Inc., Ohio
ELISA-Waschpuffer	500 ml 1x PBS + 500 µl Tween 20, eigene Herstellung
10 x PBS (pH 6,6)	1 l Aqua dest 1.38 M NaCl 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2H <sub>2</sub> O
1x PBS (pH 7,2-7,3)	1:10 Verdünnung des 10 PBS mit Aqua dest.
Leishmanien Medium	M199 (1x) 350 mL M199 (10x) 14,25 mL FCS 100 mL HEPES (1 M) 20 mL Adenin (10 mM) 5 mL Hemin (0,25%) 1 mL Penicilin/Strepomycin 5 mL Glutamin 5 mL

<u>Lösungen</u>	
FBS/FCS Gold, Katalog-Nr.: A15-649	PAA-Laboratories, Cölbe
DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
ACK-Lysing Buffer	Cambrex (BioWhittaker), Verviers
Antibody Diluent	DAKO, Hamburg
X-VIVO 50 Stammzellmedium	Lonza Ltd., Basel, Schweiz

### **3.1.5 Versuchstiere**

<b>Versuchstiere</b>	<b>Herkunft</b>
NOD- <i>scid</i> <i>IL2<math>\gamma</math></i> <sup>null</sup> (NSG)	Translational Animal Research Center (TARC)

### **3.1.6 Parasiten**

<b>Stamm</b>	<b>Klon</b>
<i>Leishmania major</i>	VI (MHOM/IL/80/Friedlin)



### **3.1.7 Antikörper**

Antikörper (Klon)	Verdünnung	Fixierung	Firma
CD45 (PD7/26)	1:50	Citrat	DAKO
CD3 (LN10)	1:100	EDTA	Menarini
CD4 (4B12)	1:40	EDTA	Leica
CD8 (C8/144B)	1:100	EDTA	DAKO
CD20 (2H7)	1:200	Citrat	Biorad
CD11c (5D11)	1:50	EDTA	Novocastra
CD207 (12D6)	1:100	EDTA	Novocastra
HLA (LN3)	1:50	EDTA	BioGenex

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Humanisierung der Mäuse**

Die immunsupprimierten NOD-*scid* *IL2 $\gamma$* <sup>null</sup> (NSG) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> humanen Stammzellen intrahepatisch rekonstituiert.

Dafür wurden hämatopoetische Stammzellen aus einer humanen Plazenta gewonnen und in dem Stammzellmedium X-VIVO 50 aufgenommen. Die zu injizierenden Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und auf Eis gelagert. Die Rekonstitution der Versuchstiere wurde unter möglichst sterilen Bedingungen vollzogen. Dabei wurden

die Tiere mittels Isofluran in einem wiederverschließbaren Gefäß narkotisiert. Die Tiere wurden auf die Seite gedreht und die Leber lokalisiert. Von dorsal wurde im 45° Winkel einige Millimeter in die Leber eingestochen und 20 µl mit maximal 1.000.000 Zellen injiziert. Es wurde dann einige Sekunden die Position der Spritze gehalten, bis sie langsam wieder entfernt wurde, um das Wiederaustreten der Suspension so gering wie möglich zu halten.

### **3.2.2 Isolierung der Leishmanien**

Zum Zeitpunkt der Gewinnung von metazyklischen Leishmanien war die Leishmanienkultur eine Woche alt. Die Promastigotensuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ergänzt und acht Minuten bei 200g zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Leishmanien enthält, wurde in ein neues 50ml Falcon überführt und erneut acht Minuten bei 200g zentrifugiert. Der daraus entstandene Überstand wurde nun 8 Minuten bei 3.000g zentrifugiert, um die Leishmanien zu pellettieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2ml DMEM resuspendiert.

Zeitgleich wurde in ein 15ml Falcon 2ml der 20%igen Ficoll-Lösung pipettiert und darüber 2ml der 10%igen Ficoll-Lösung gegeben. Als dritte Schicht darüber erfolgte die Gabe von 2ml des Parasitenkonzentrates. Das Falcon wurde 15 Minuten bei 2.000g ohne Bremse zentrifugiert. Die obere Phase und der Beginn der zweiten Phase sind trüb und enthalten die Leishmanien, deshalb wurden diese abgenommen und der Rest verworfen.. Die entnommene Suspension wurde mit 10 ml DMEM vermischt und nochmals acht Minuten bei 3.000g zentrifugiert.

Das erhaltene Pellet wurde dann mit 1ml DMEM resuspendiert. Zum Zählen der Parasiten wurde ein Teil der Suspension im Verhältnis 1:100 mit 4%igem Paraformaldehyd verdünnt. Dieses tötet die Leishmanien ab.

Beim Auszählen der Leishmanien wurden nur lange schlanke Promastigoten berücksichtigt.

Formel zur Bestimmung der Zellzahl:

$$x [\text{gezählte Zellen}] \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10^4 [\text{Kammerfaktor}] = \text{Zellen/aufgenommenes Volumen}$$

### **3.2.3 Infektion der Mäuse mit *L. major***

Es gibt ein Lowdose Modell mit 1.000 metazyklischen Promastigoten/ 10µl und ein Highdose Modell mit  $2 \times 10^5$  metazyklischen Promastigoten/10µl. Vorteilhaft beim Lowdose Modell ist, dass die physiologisch relevante Menge an Parasiten wie bei der Übertragung der Parasiten durch die Sandmücke imitiert wird und somit annähernd reale Bedingungen hergestellt werden (Belkaid, Mendez et al. 2000). Vorteile des Highdose Modells sind eine schnellere Granulombildung verbunden mit einem schnellen Infiltrat von Entzündungszellen und Chemokinen (Cortes, Carneiro et al. 2010).

Für diese Studie wurde das Lowdose Modell verwendet. Die frisch gewonnenen Leishmanien wurden am selben Tag für die Infektion der Versuchstiere verwendet. Dabei wurden die neonatal rekonstituierten Versuchstiere zuerst mit Isofluran-Gas narkotisiert und in eine Kunststoffhalterung gelegt. Zur Injektion wurde die Kanüle mit dem Kanülenschliff nach oben ausgerichtet und vorsichtig zwischen die Dermalschichten geschoben. Injiziert wurden 10µl, sodass eine Beule mit einem Durchmesser von ca. 0,5cm entstand.

### **3.2.4 Histologie und Immunhistologie**

#### **Tötung der Versuchstiere und Entnahme der Gewebeprobe**

Die Versuchstiere wurden 7 Wochen nach Infektion durch Genickbruch getötet. Die entsprechenden Gewebeprobe (Milz, Leber, Rückenhaut und das Ohr mit Granulom) wurden mittels Sektion entnommen und in Paraformaldehyd bis zur histologischen Aufarbeitung konserviert.

#### **Paraffinieren**

Die Gewebeprobe wurden nach gängiger Methode mit Paraffin eingebettet um mit dem Lichtmikroskop verwertbare Schnitte zu bekommen. Die Paraffinblöcke der unterschiedlichen Gewebe wurden in 2-3µm Scheiben geschnitten und mit Glasobjektträgern im Wasserbad aufgenommen.

## Entparaffinieren

Im Anschluss wurden Sie eine Stunde lang bei 60°C getrocknet und danach mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Die Objektträger wurden dabei zwei Mal hintereinander für fünf Minuten in Xylol gebadet und dann jeweils für fünf Minuten in 100%igem, 96%igem und 70%igem Ethanol. Abschließend wurde mit destilliertem Wasser gereinigt.

## Vorbereitung der Schnitte

Die Schnitte wurden vom Paraffin befreit und dehydriert. Da es bei formalinfixierten, paraffinierten Schnitten zu Änderung der Struktur des Antigens bis hin zum Verlust der Immunreaktivität kommen kann, wurde die 'Heat Induced Epitope Retrieval' - Methode (HIER) zur Antigendemaskierung angewandt. Dafür wurden die Schnitte mittels Dampfgerar 40 min. in EDTA bzw. Citrat-Puffer inkubiert. Nach der Hitzebehandlung erfolgte eine langsame Abkühlung auf Raumtemperatur.

## Applikation der Antikörper

Durch Abklopfen wurde überschüssige Feuchtigkeit entfernt und die Objektträger mit 100µl der verdünnten primären Antikörper versehen. Die Kontrollen wurden mittels Antibody Diluent der Firma DAKO verdünnt. (siehe Tabelle 3.1.7). Danach wurden die Objektträger für eine Stunde in einer Kammer durchfeuchtet und anschließend wieder zwei Mal für vier Minuten mit Tris-Puffer gespült. Anschließend wurden die jeweiligen sekundären Antikörper aufgetragen und in der Kammer für eine Stunde durchfeuchtet. Es wurde wieder zwei Mal für vier Minuten mit Tris-Puffer und dann 30 Minuten mit Alkaline Phosphatase Enzyme Detection System AK-5000 der Firma Vector inkubiert. Erneut wurde mit Tris-Puffer gespült und abschließend Alkaline Phosphatase (Chromogen) aufgetragen um eine Untersuchung unter dem Lichtmikroskop möglich zu machen.

## Gegenfärbung und Fixierung der Schnitte

Zur Hämatoxylin-Gegenfärbung wurden die Objektträger in einem Hämatoxylinbad mit Meyers Hämalaunfertiglösung der Firma Merck bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:4 gebadet und anschließend einer einminütigen Inkubation unterzogen. Anschließend erfolgte für fünf Minuten das Bläuen unter laufendem Leitungswasser. Daraufhin wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils zwei Minuten in 76%, 96% und 100% entwässert. Nach zweimaliger fünfminütiger Inkubation in Xylol wurden die Schnitte abschließend mit Mounting Medium (Fa. Sigma Aldrich 03989) eingedeckt.

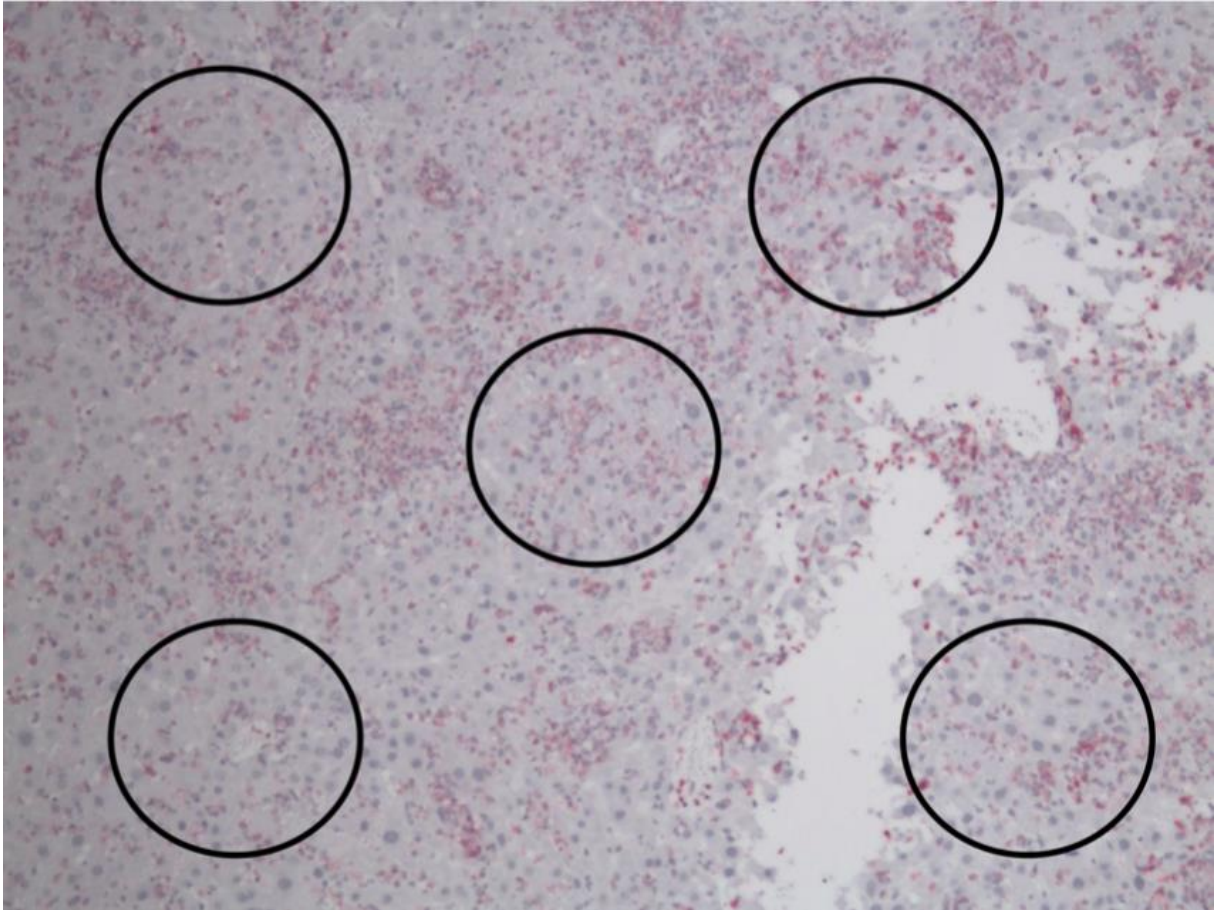
## Hämatoxylin/Eosin und Giemsa Färbung

Die Hämatoxylin/Eosin, Giemsa und ASD-Färbungen wurden nach bekannten Färbeverfahren von [REDACTED] (MTA, Dermatologie Universität Mainz) angefertigt.

Bis zu diesem Punkt wurden die Schritte von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe [REDACTED] [REDACTED] der Universitätsmedizin Mainz - Abteilung Dermatologie durchgeführt. Die anschließende quantitative Auswertung unter dem Mikroskop erfolgte im Rahmen dieser Promotionsarbeit.

### **3.2.5 Quantitative mikroskopische Auswertung**

Die gefärbten Schnitte wurden unter 40-facher Vergrößerung mikroskopiert. In den jeweiligen Geweben und Organen wurden fünf repräsentative Gesichtsfelder - auch High Power Field (HPF) genannt - gleichmäßig verteilt und die sich darin befindlichen positiv angefärbten Zellen gezählt (siehe Abb. 14). In der späteren graphischen Darstellung der quantitativen Auswertung findet sich für jedes Versuchstier T1-T16 jeweils der Mittelwert aus den Werten der fünf Gesichtsfelder. Zusätzlich wurden für jede Färbung die Standardfehler des Mittelwerts über alle Versuchstiere T1-T16 je Organ ermittelt. Zur graphischen Darstellung der Daten wurde das Programm StatView für Windows (Version 5.0) von SAS Institute Inc. genommen.



**Abb. 14 Gesichtsfelder:** Exemplarische Darstellung der fünf über das Präparat verteilten Gesichtsfelder (Kreise). Alle positiv angefärbten Zellen innerhalb eines Gesichtsfeld wurden mit in die quantitative Analyse einbezogen.

## **4. Ergebnisse**

Immunsupprimierte NOD-*scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup>* (NSG) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> humanen Stammzellen intrahepatisch rekonstituiert. Es wurden für die vorliegende Arbeit zwei unterschiedliche Stammzellspender verwendet. Von den 16 Mäusen (T1-T16) wurden T1-T5 mit Spender-1-Stammzellen rekonstituiert und T6-T16 mit Spender-2-Stammzellen.

Gemäß dem Modell wurden den Mäusen anschließend 1.000 metazyklische *Leishmania* Promastigoten intradermal in das Ohr injiziert. Die Infektion mit *L. major* führte bei allen Versuchstieren zur Ausbildung eines entzündlichen Granuloms am Infektionsort. Nach 7 Wochen wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und die Organe Milz, Leber, Rückenhaut und Ohr entnommen. Im Anschluss wurden aus den Organproben Präparate für die histologische beziehungsweise immunhistologische Untersuchung vorbereitet. Bis hierhin wurden die Arbeiten von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. von Stebut der Universitätsmedizin Mainz - Abteilung Dermatologie durchgeführt. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit erfolgte der mikroskopische Nachweis von *L. major* und die quantitative Analyse von Entzündungszellen in den unterschiedlichen Organen sowie deren unterschiedlichen Gewebsschichten.

Die folgenden exemplarischen histologischen Makroaufnahmen stammen von Versuchstier 16 (T16).

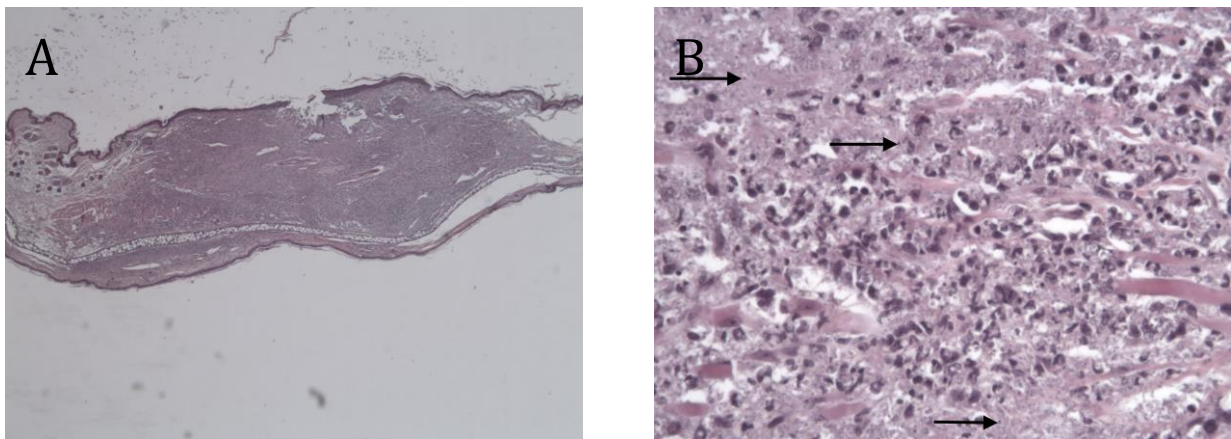
### **4.1 Parasitennachweis**

#### **HE- und Giemsa Färbung**

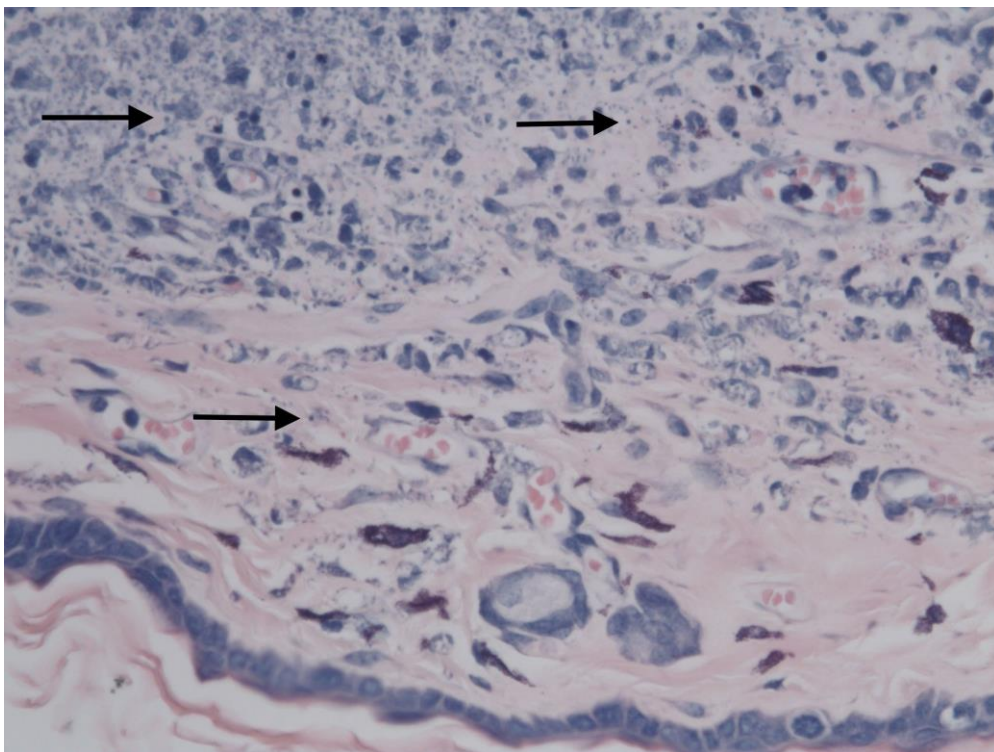
Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) ist eine häufig verwendete Standardfärbemethode in der Histologie, die aus zwei Farbstoffen besteht. Dabei ist Hämatoxylin ein Farbstoff, der alle basophilen bzw. sauren Gewebsbestandteile wie bspw. Zellkerne, Ribosomen und DNA blau färbt. Der zweite Farbstoff Eosin färbt acidophile bzw. basische Zellstrukturen wie Kollagen, Zytoplasma, Mitochondrien etc. rot (siehe Abb. 11 A und B). Die von dem Hamburger Chemiker Gustav Giemsa (1867-1948) entwickelte und nach ihm benannte Färbemethode besteht aus den Farbstoffen Azur A-Eosinat, Azur B-



Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauschlorid. Das Zytoplasma erscheint bläulich, wohingegen Zellkerne, sowie Parasiten- und Protozoenkerne rot erscheinen. Zum Nachweis von *Leishmania*-Amastigoten und somit zur Verifizierung der Leishmaniasis wurden beide Färbungen durchgeführt. Sowohl bei der HE- als auch bei der Giemsa-Färbung konnten bei allen Versuchstieren T1-T16 intrazellulär *Leishmania*-Amastigote nachgewiesen werden. Bei der Giemsa Färbung erfolgte zusätzliche eine semiquantitative Auswertung (siehe Abb. 12).

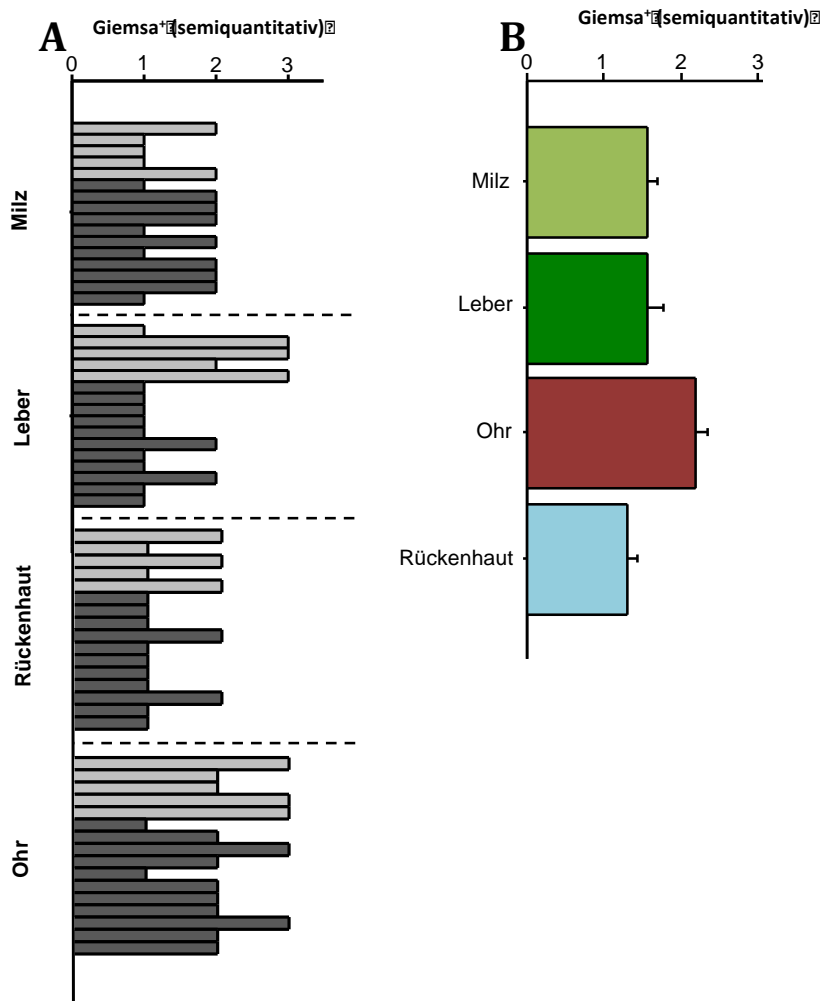


**Abb. 10 HE/Giemsa Färbung:** Exemplarische Darstellung der HE-Färbung des Ohrs von T16 bei 2,5-facher Vergrößerung (A) und 40-facher Vergrößerung (B). *Leishmania*-Amastigote konnten nachgewiesen werden und sind mittels Pfeile gekennzeichnet.



**Abb. 11 Giemsa Färbung:** Exemplarische Darstellung der Giemsa Färbung des Ohr-Präparats von T16 bei 40-facher Vergrößerung. *Leishmania*-Amastigoten sind klar erkennbar und befinden sich intrazellulär (Pfeile).





**Abb. 12 Auswertung Giemsa-Färbung:** Die humanisierten Mäuse wurden mit  $2 \times 10^5$  metazyklischen Promasitgoten in die Ohrhaut infiziert und 7 Wochen nach der Infektion für die histologische Nachuntersuchung getötet. Die Parasitenzahl wurde für die jeweiligen Organe mittels Giemsa-Färbung semiquantitativ unter dem Mikroskop ermittelt. Dabei wurde die *Leishmanien*-Zahl mit 0=keine, 1=wenig, 2=durchschnittlich und 3=viele bewertet. **A** zeigt das Parasitenaufkommen im jeweiligen Organ der einzelnen Tiere T1-T16, dabei sind T1-T5 Spender-1-Tiere (hellgrau) und T6-T16 Spender-2-Tiere (dunkelgrau). **B** zeigt die Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwerts kumulativ über alle Tiere T1-T16 im jeweiligen Organ.

Die Auswertung des *Leishmanien*-Vorkommens erfolgte semiquantitativ nach den Kategorien 0 = keine, 1=wenige, 2=viele und 3=sehr viele.

Bei allen Mäusen T1-T16 konnten *Leishmanien* festgestellt werden und die Infektion somit verifiziert werden. In der Milz fand sich Kategorie 1 und 2, wohingegen in der Leber Kategorie 1 - 3 festgestellt wurde. In den Gewebeproben des Ohres reichte die *Leishmanien*-Zahl von Kategorie 1 - 3. In den Proben der Rückenhaut konnte nur Kategorie 1 festgestellt werden, bis auf fünf Proben mit Kategorie 2 (siehe Abb. 13 A). In Abb. 13 B sind die Mittelwerte aller Proben unterteilt nach Organen dargestellt. Besonders viele *Leishmanien* wurden im Mittel in Gewebeproben des Ohres gefunden.

## 4.2 Zellmorphologie der humanen Immunzellen

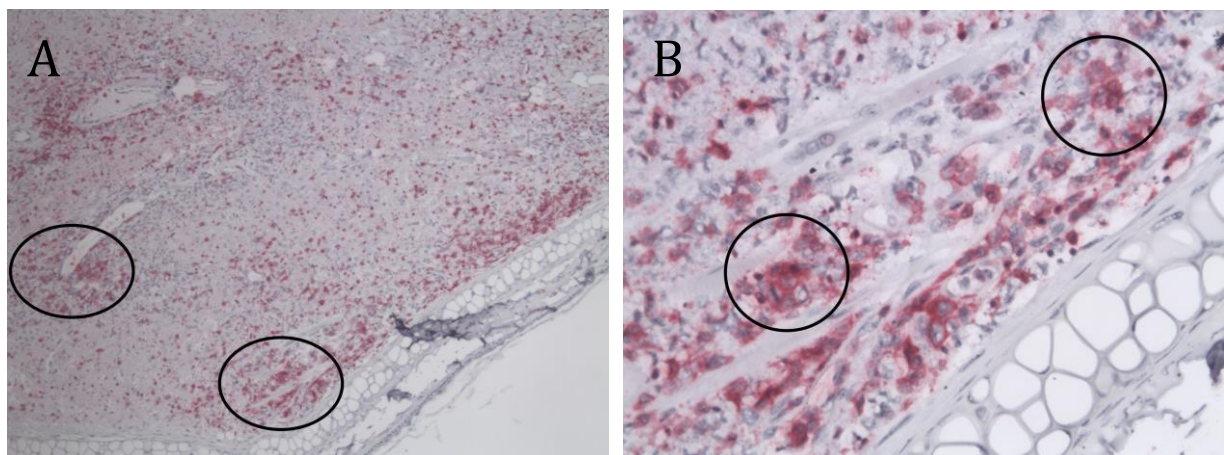
Unter Cluster of Differentiation (CD) sind Oberflächenmerkmale zusammengefasst, die sich hinsichtlich ihres Immunphänotyps nach biochemischen oder funktionellen Eigenschaften ordnen lassen. Diese CD-Oberflächenmerkmale sind oft Zell-spezifisch und somit kann mittels spezifischer Antikörper ein Rückschluss auf eine bestimmte Zellpopulation innerhalb einer Zellansammlung oder die Reinheit geschlossen werden.

Für die Analyse der myeloiden Zellen wurde der Leukozytenmarker CD45 und das Humane Leukozyten Antigen (HLA) verwendet und als T-Zell Marker CD3, CD4 und CD8. Für die Bestimmung der myeloiden Zellen wurden zusätzlich CD11c, CD20 und die ASD-Färbung verwendet.

### 4.2.1 Leukozyten Marker - CD45

CD45 ist eine Tyrosin-Phosphatase und fungiert auf den Membranen von allen humanen hämatopoetischen Zellen, außer reifen Erythrozyten, als Oberflächenrezeptor. Vor allem humane Leukozyten können mit  $\alpha$ -CD45 Antikörpern markiert werden. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse nach CD45 Färbung dargestellt.

CD45-positiv angefärbte Zellen fanden sich mit Ausnahme von einigen Präparaten der Rückenhaut oder der Ohrhaut auf allen Präparaten, im Zentrum des Granuloms im Ohr der Versuchstiere und in der Milz am häufigsten (siehe Abb. 15). Bei 40 - facher Vergrößerung ließen sich einzelne positiv angefärbte Zellen deutlich voneinander abgrenzen (siehe Abb. 15 B).

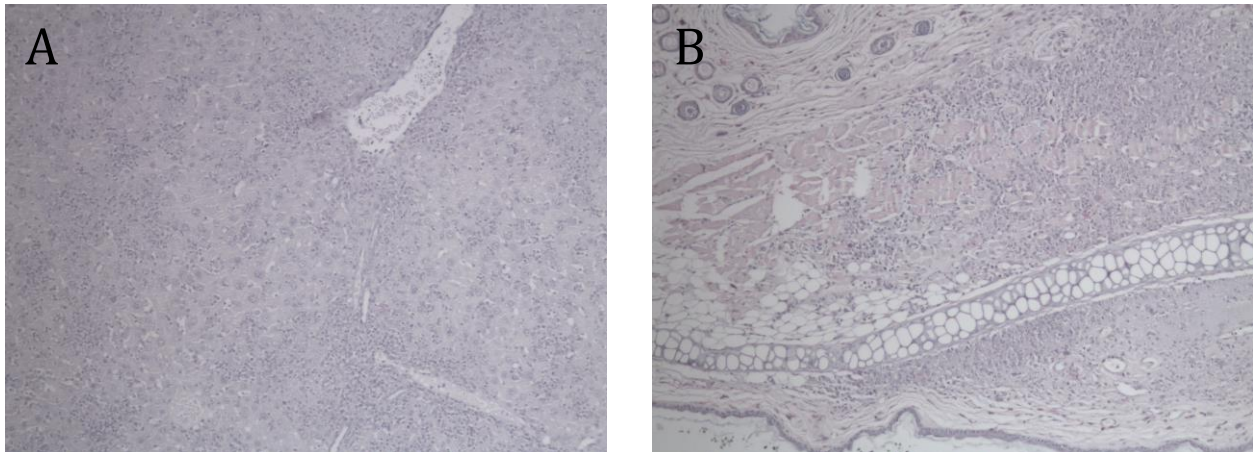


**Abb. 15 CD45 Färbung:** Exemplarische Darstellung der CD45 Färbung des Ohr-Präparats von T16 bei 10 - facher Vergrößerung (A) und bei 40 - facher Vergrößerung (B). CD45 positiv Zellen sind pink angefärbt und oft in Herden angesammelt (Kreise).

### 4.2.2 HLA (Humanes Leukozyten Antigen)

Das Humane Leukozyten Antigen (HLA) findet sich membranständig auf humanen Leukozyten und spielt eine zentrale Rolle im humanen Immunsystem. Vor allem bei Transplantationen, wie in diesem Fall transplantierte humane Stammzellen in Mäuse, dient HLA zur Bestimmung der Histokompatibilität. Über das HLA unterscheidet das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen.

In der folgenden Abbildung ist exemplarisch die HLA-Färbung der Leber und des Ohrs von T16 dargestellt. Bis auf vereinzelte positiv angefärbte Zellen in und um das Granulom im Ohr fanden sich bei Spender-2-Tieren keine HLA-positiven Zellen (siehe Abb. 16).

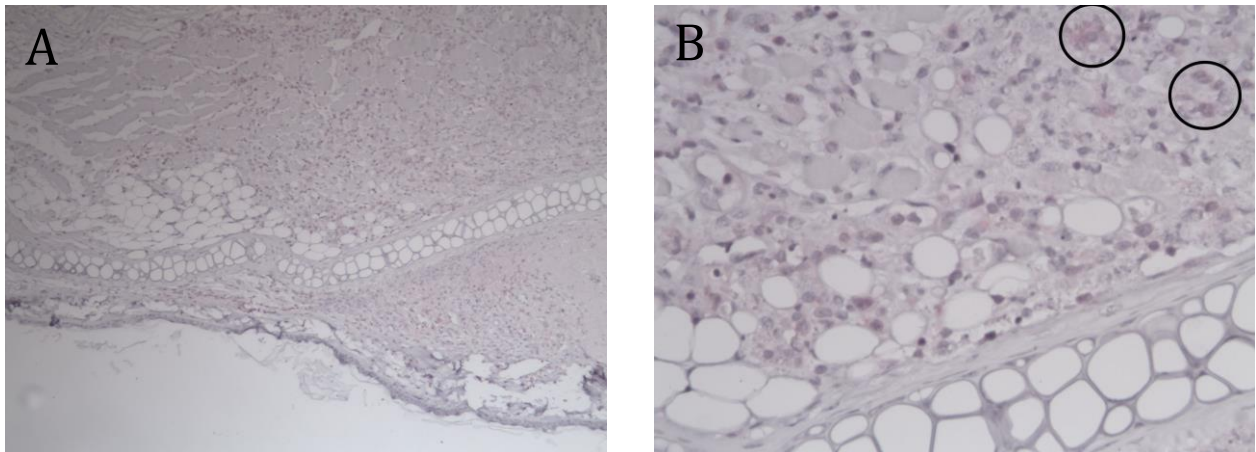


**Abb. 16 HLA-Färbung:** Exemplarische Darstellung der HLA-Färbung von T16. Sowohl in der Leber (A, Vergrößerung 1:10) als auch im Ohr (B, Vergrößerung 1:10) konnten keine positiv gefärbten Zellen festgestellt werden.

### 4.2.3 CD3

Der CD3 Rezeptor ist ein Transmembranprotein und findet sich auf der Membranoberfläche aller T-Lymphozyten. Durch eine immunhistochemische CD3-Antikörper-Färbung können Erkenntnisse über die Gesamtpopulation von T-Lymphozyten gewonnen werden.

In den histologischen Präparaten erscheinen die CD3 positiv gefärbten Zellen blass-rosa und konnten in der mikroskopischen Auswertung klar erkannt werden (Abb. 17).

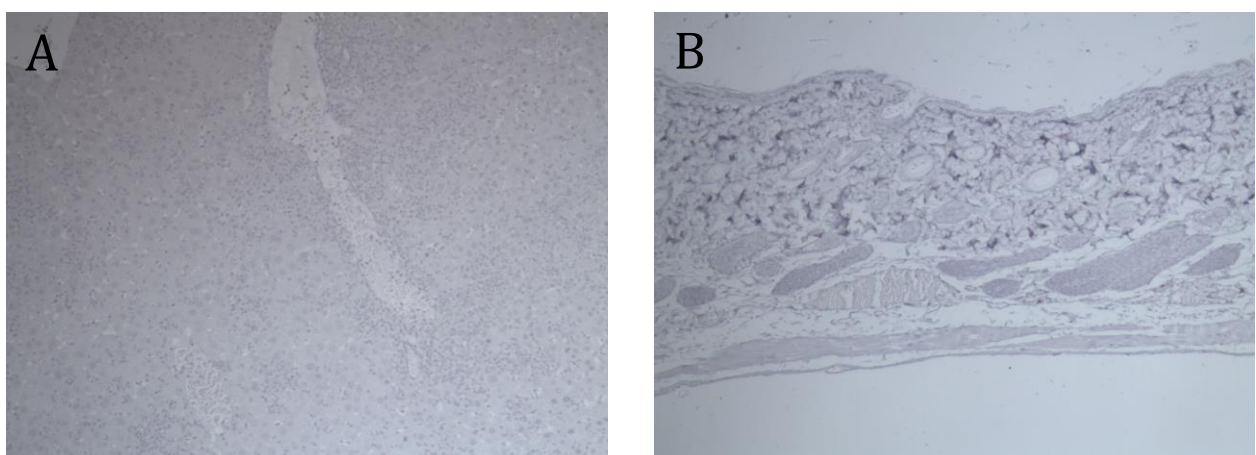


**Abb. 17 CD3-Färbung:** Exemplarische Darstellung der CD3-Antikörper Färbung bei T16. Ausschnitt aus dem Ohr bei 10-facher Vergrößerung (A) und 40-facher Vergrößerung (B). Positiv angefärbte Zellen waren deutlich zu erkennen.

#### 4.2.4 CD4

CD4 ist ein Auxiliärprotein, das für die Bindung der T-Zelle an die Antigen-präsentierende Zelle von großer Bedeutung ist. CD4 positive T-Lymphozyten bzw. T-Helferzellen machen zwischen 30 und 60% aller Lymphozyten aus und sind an der weiteren Aktivierung des Immunsystems beteiligt.

In den histologischen Präparaten konnten bei Spender-2-Tieren kaum CD4 positive Zellen festgestellt werden (Abb. 18).

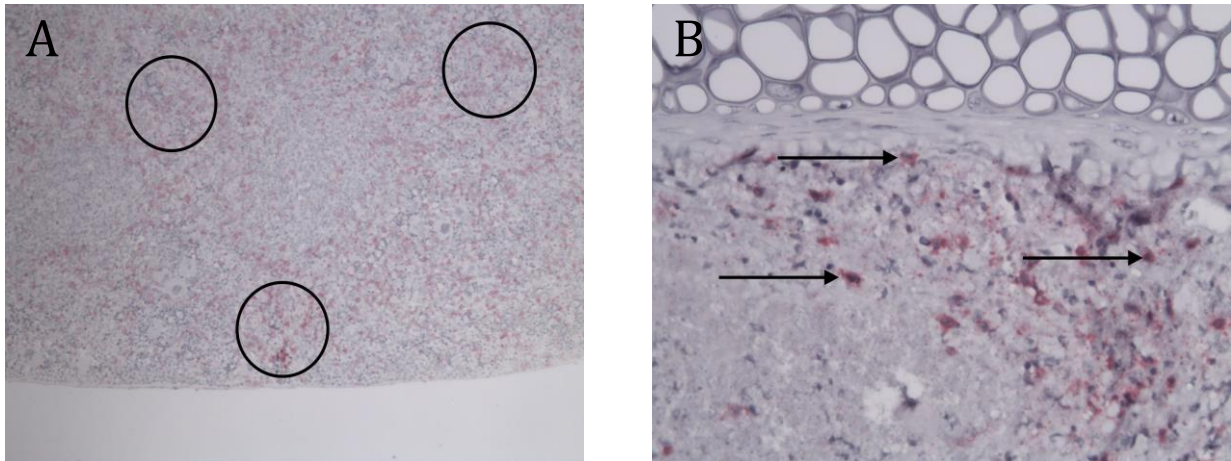


**Abb. 18 CD4 Färbung:** Exemplarische Darstellung der CD4-Antikörper Färbung bei T16. Das Leberpräparat bei 10-facher Vergrößerung (A) und das Rückenhautpräparat bei 10-facher Vergrößerung (B). Beide Präparate sind frei von CD4<sup>+</sup> Zellen.



### 4.2.5 CD8

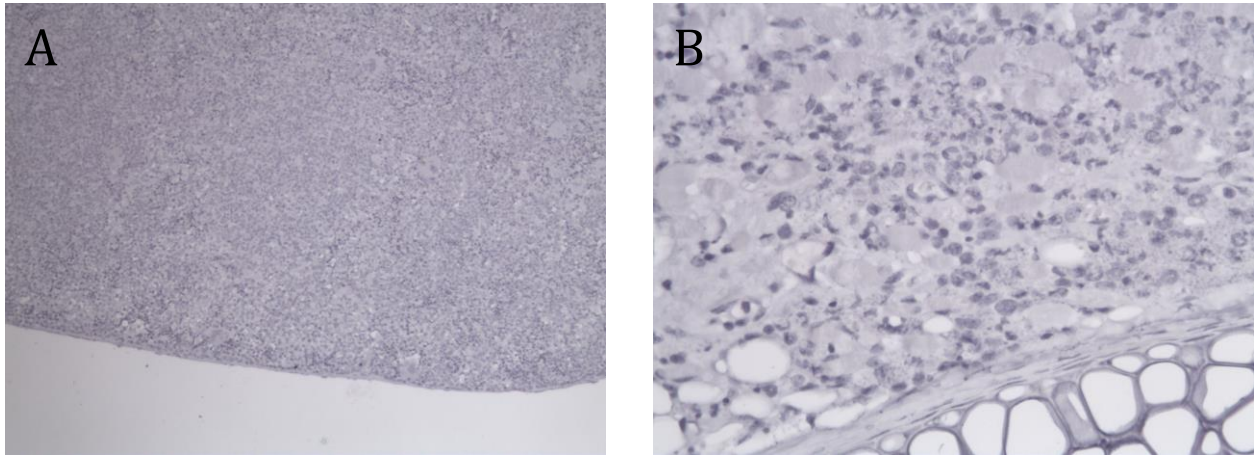
In die Zellmembran eingelagert ist CD8 wie CD4 ein Auxiliärprotein für die T-Zell-Antigen-Bindung. Der CD8-Rezeptor bindet an den Major Histocompatibility Complex I (MHC-I). Sowohl in Spender-1- als auch in Spender-2- Tieren ließ sich vor allem in den Organpräparaten Milz, Leber und Granulom deutlich CD8 nachweisen (siehe Abb. 19).



**Abb. 19 CD8+-Färbung:** Exemplarische Darstellung der CD8-Antikörper Färbung bei T16. Das Milzpräparat bei 10-facher Vergrößerung (A) und das Ohrpräparat bei 40-facher Vergrößerung (B). In beiden Präparaten sind CD8-positiv gefärbte Zellen deutlich zu erkennen (Kreise (A), Pfeile (B)).

### 4.2.6 CD11c

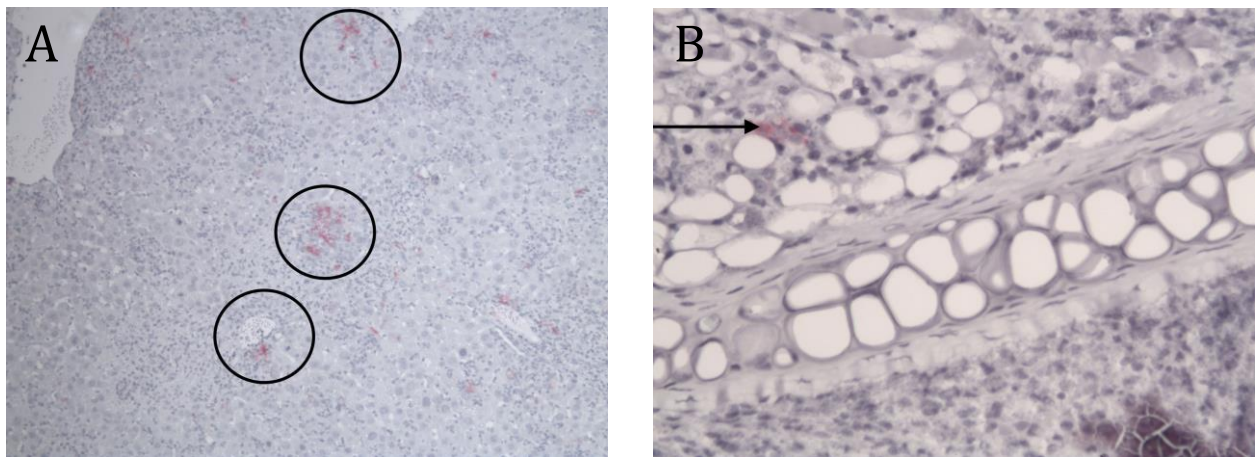
Das Transmembran-Protein CD11c oder synonym Integrin *alpha-X* gehört zu der Gruppe der Integrine. Es findet sich auf den Zelloberflächen von Monozyten, Granulozyten, B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen und wirkt in der Monozyten-Adhäsion sowie Chemotaxis (siehe Abb. 20).



**Abb. 20 CD11c<sup>+</sup>-Färbung:** Exemplarische Darstellung der CD11c-Antikörper Färbung bei T16. Das Milzpräparat bei 10-facher Vergrößerung (A) und ein Ausschnitt aus dem Ohrpräparat bei 40-facher Vergrößerung (B). In keinem der beiden T16-Präparate sind CD11c-positiv gefärbte Zellen zu erkennen.

## CD20

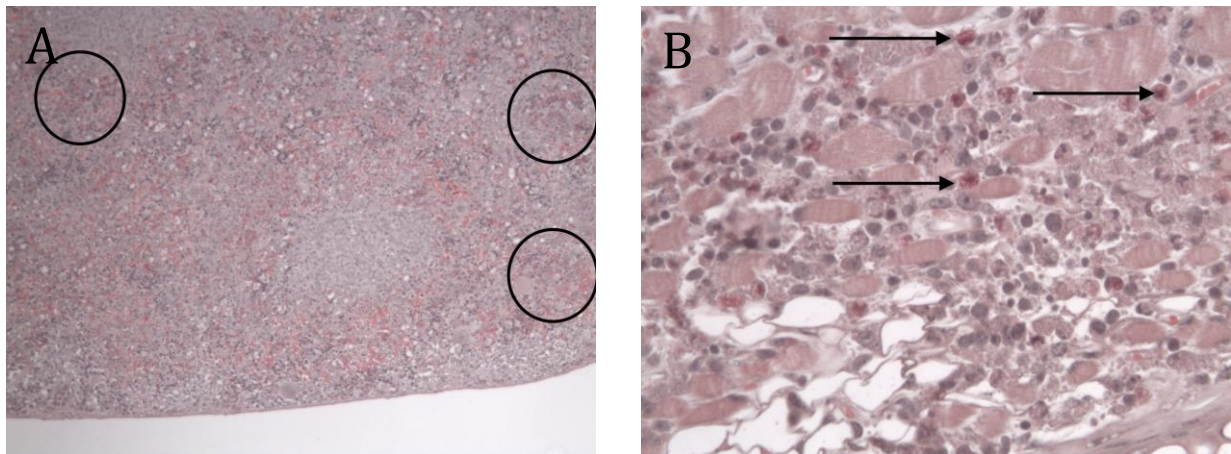
Das glykolysierte Phosphoprotein CD20 wird auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert. Es kommt in fast allen Stadien der B-Zell Entwicklung vor und eignet sich daher als guter Marker für B-Zellen (siehe Abb. 21).



**Abb. 21 CD20<sup>+</sup>-Färbung:** Exemplarische Darstellung der CD20-Antikörper Färbung bei T16. Das Leberpräparat von T16 bei 10-facher Vergrößerung (A) und das Ohr - Präparat bei 40-facher Vergrößerung (B). Die CD20<sup>+</sup> gefärbten Zellen erscheinen hell-violett und sind in beiden Präparaten deutlich erkennbar (A - Kreise; B - Pfeil).

## Neutrophile Granulozyten Markierung mittels ASD Färbung

Mit 50 - 70 % sind neutrophile Granulozyten die häufigste Art der Leukozyten. Durch Chemotaxis gelangen sie an den Infektionsort und phagozytieren dort den Erreger. Die Naphthol - ASD-Chloracetatesterase-Färbung (ASD-Färbung) färbt die Granulozyten leuchtend rot und die Kerne blau (siehe Abb. 22).



**Abb. 22 Färbung der Neutrophilen Zellen:** Exemplarische Darstellung der ASD-Färbung bei T16. Das Milz-Präparat bei 10-facher Vergrößerung (A) und das Ohr - Präparat bei 40-facher Vergrößerung. In beiden Präparaten sind positiv gefärbte Zellen zu erkennen (A - Kreise; B - Pfeile).

## 4.3 Quantitative Frequenzbestimmung im einzelnen Tier

### CD45

Der Nachweis humaner Leukozyten im Mausgewebe mittels CD45-Antikörperfärbung war bis auf einige epidermale Schichten positiv. In der Milz wurden bei T1-T5 zwischen 5 und 74 CD45 positive Zellen gezählt. In der Leber wurden 4-37 Zellen ausgezählt. Sowohl in Epidermis und Dermis der Rückenhaut dominierten Spender-1-Tiere mit bis zu 15 positiv angefärbten Zellen. Spender-2-Tiere wiesen nur in der Dermis vereinzelt positive Zellen auf. In der Epidermis peripher des Granuloms wurden im Durchschnitt der 5 repräsentativen Gesichtsfelder weniger als eine positive Zelle gefunden, wohingegen in der Dermis die Werte von 0,5-4,8 streuten. In der Epidermis und Dermis oberhalb des Granuloms wurden bei Spender-1-Tieren mit bis zu 8 bzw. 21 deutlich mehr positive Zellen festgestellt, als bei Spender-2-Tieren (0-2). Auch im Zentrum des

Granuloms bzw. in dessen Peripherie dominierten Spender-1-Tiere mit 49-100 bzw. 18-44 positiven Zellen im Vergleich zu Spender-2-Tieren 10-48 bzw. 3-23.

### CD3<sup>+</sup>

In den epidermalen Schichten der Rücken- und der peripheren Ohrhaut konnten keine positiv gefärbten Zellen festgestellt werden. Nur in der Epidermis oberhalb des Granuloms fanden sich 0-1,8 CD3-positive Zellen. In den dermalen Schichten der Rückenhaut wurden 0-3,2 bzw. in der peripheren Ohrhaut 0-2,8 positive Zellen gezählt. Im Zentrum des Granuloms wurden 0 - 16,8 positive Zellen gezählt und in den peripheren Arealen des Granuloms 0 - 7,9 (Abb. 23).

### CD4<sup>+</sup>

Sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis der Rückenhaut konnten keine CD4<sup>+</sup> Zellen festgestellt werden. In der Milz fanden sich 0,2 - 9,1 bzw. in der Leber 2,0 - 9,9 positiv gefärbte Zellen, allerdings nur bei Spender-1 Tieren. Die Epidermis der peripheren Ohrhaut war frei von positiv gefärbten Zellen und in der Epidermis fand man mit 0 - 2,0 vereinzelte Zellen. Einige wenige CD4<sup>+</sup> Zellen wurden auch in Epidermis und Dermis oberhalb des Granuloms mit 0-0,9 festgestellt. Im Zentrum des Granuloms (0,0 - 11,3) bei Spender-1-Tieren fanden sich die meisten Zellen und in der Peripherie des Granuloms waren es 0-4,8 (Abb. 23).

### CD8<sup>+</sup>

CD8<sup>+</sup>gefärbte Zellen wurden in den Präparaten Milz (0,6 - 12,0) und Leber (0,4 - 27) festgestellt. Die Epidermis der Rückenhaut wies 0-0,2 und die darunterliegende Dermis 0-0,7 CD8<sup>+</sup> Zellen auf. In der Epidermis der peripheren Ohrhaut wurden 0-0,3 und in der Dermis 0-2,9 positive Zellen festgestellt. Die Epidermis oberhalb des Granuloms wies 0-0,8, die Dermis 0-2,0, das Zentrum des Granuloms 1,8 - 23,4 und die Peripherie des Granuloms 0,8 bis 14,2 positive Zellen auf (Abb. 23).

### CD20<sup>+</sup>

In der Milz wurden 0 - 29,2 CD20<sup>+</sup> Zellen gezählt und in der Leber 0 - 15,6. Die Haut oberhalb des Granuloms wies in der Dermis keine CD20-positiven Zellen auf und in der Epidermis 0 - 0,8. Im Zentrum des Granuloms fanden sich 0 - 5,0 und peripher des



Granuloms 0 - 2,4 positive Zellen. In der Rückenhaut konnten nur in der Epidermis von T1 (0,8) und der Dermis von T2 (1,8) positive Zellen festgestellt werden (Abb. 24).

### HLA

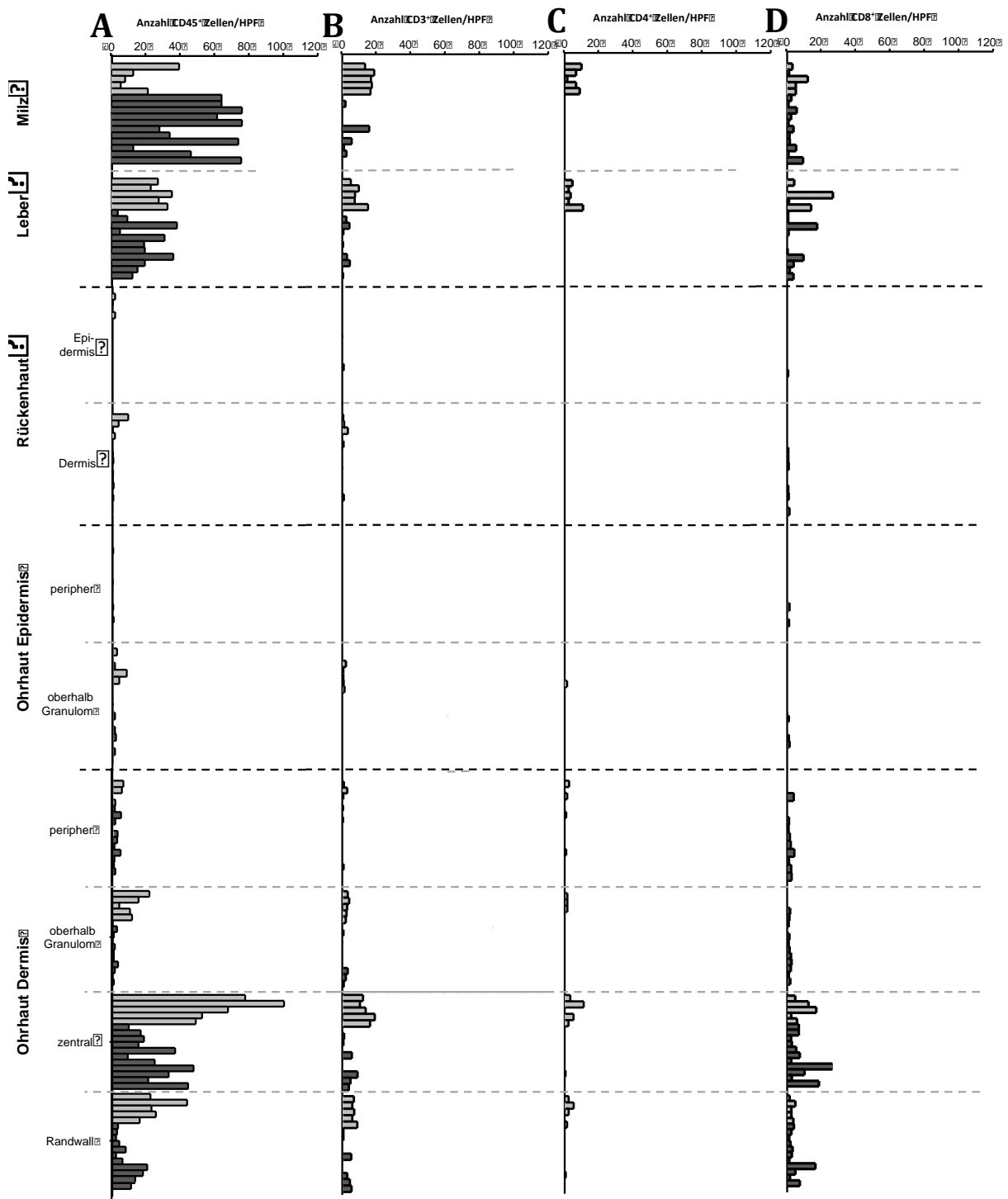
Bei Spender-1-Tieren konnten 2,8-5,4 Zellen in der Milz bzw. 0,6 - 2,0 Zellen in der Leber festgestellt werden. In Haut und Ohrhaut reichten die Werte von 0 bis 2,1 positiv gefärbter Zellen. Die meisten HLA-positiven Zellen fanden sich mit 4,0 - 19,2 im Zentrum des Granuloms von Spender-1-Tieren. Bei allen Spender-2-Tieren (T6-T16) konnten kaum HLA-positiv gefärbte Zellen festgestellt werden (Abb. 25).

### CD11c<sup>+</sup>

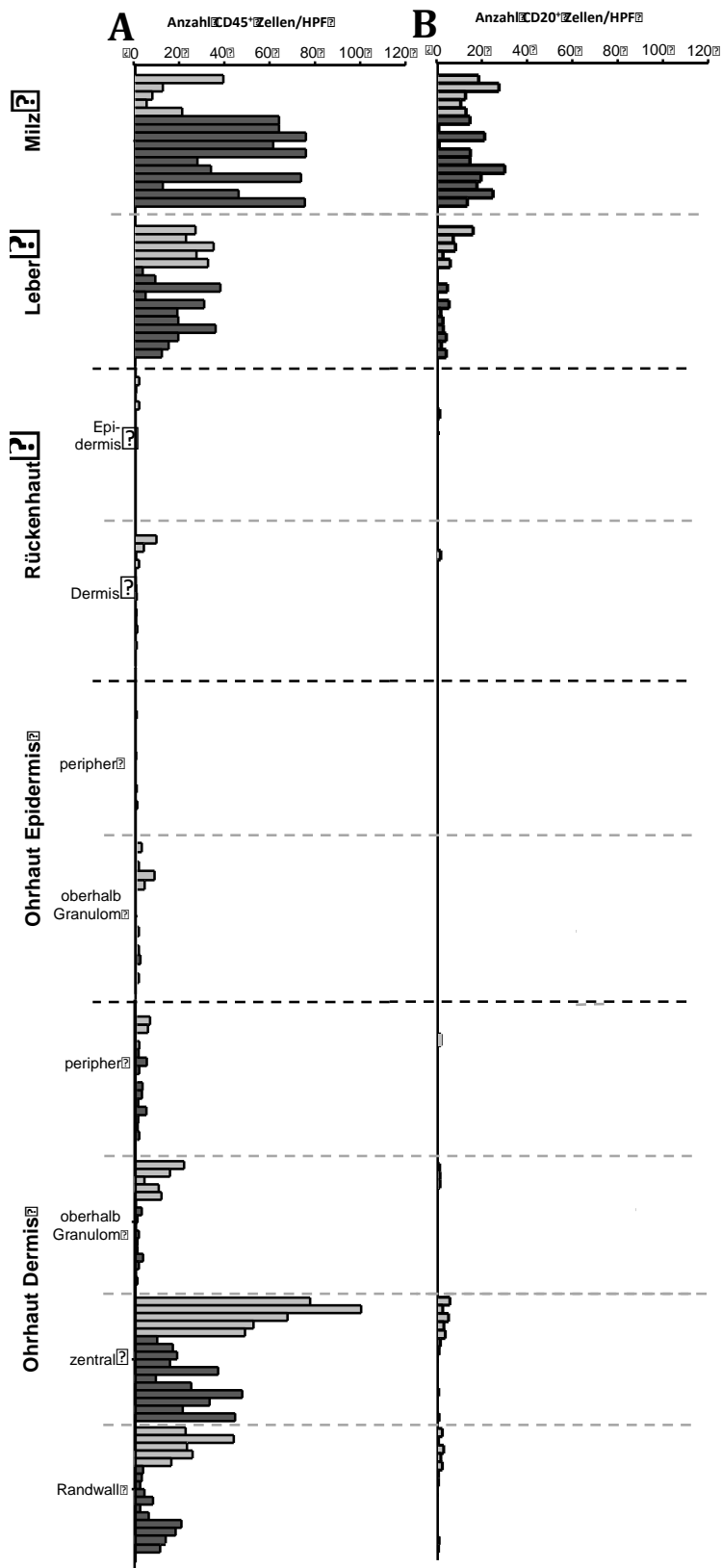
In den Milz-Präparaten wurden 0 - 11,6 positive Zellen festgestellt und in den Leber-Präparaten 0 - 6,8. Bei beiden Organen wiesen alle Spender-1- (T1-T5) CD11c-positive Zellen auf, wohingegen bei Spender-2-Tieren (T6-T16) nur vereinzelt Zellen gefunden wurden. Mit Ausnahme der Dermis von T1 (0,8) wurden weder in Epidermis noch Dermis der Ohrhaut positive Zellen gefunden. In der Epidermis und Dermis oberhalb des Granuloms stellten sich mit 0-1 positiven Zellen ähnlich Ergebnisse dar. Im Zentrum des Granuloms wurden 0 - 9,2 bzw. peripher des Granuloms 0 - 3,1 positive Zellen gezählt. In der Rückenhaut wurden nur in den dermalen Schichten von T1-T3 0 - 0,4 Zellen gezählt (Abb. 25).

### Neutrophile Granulozyten - ASD Färbung

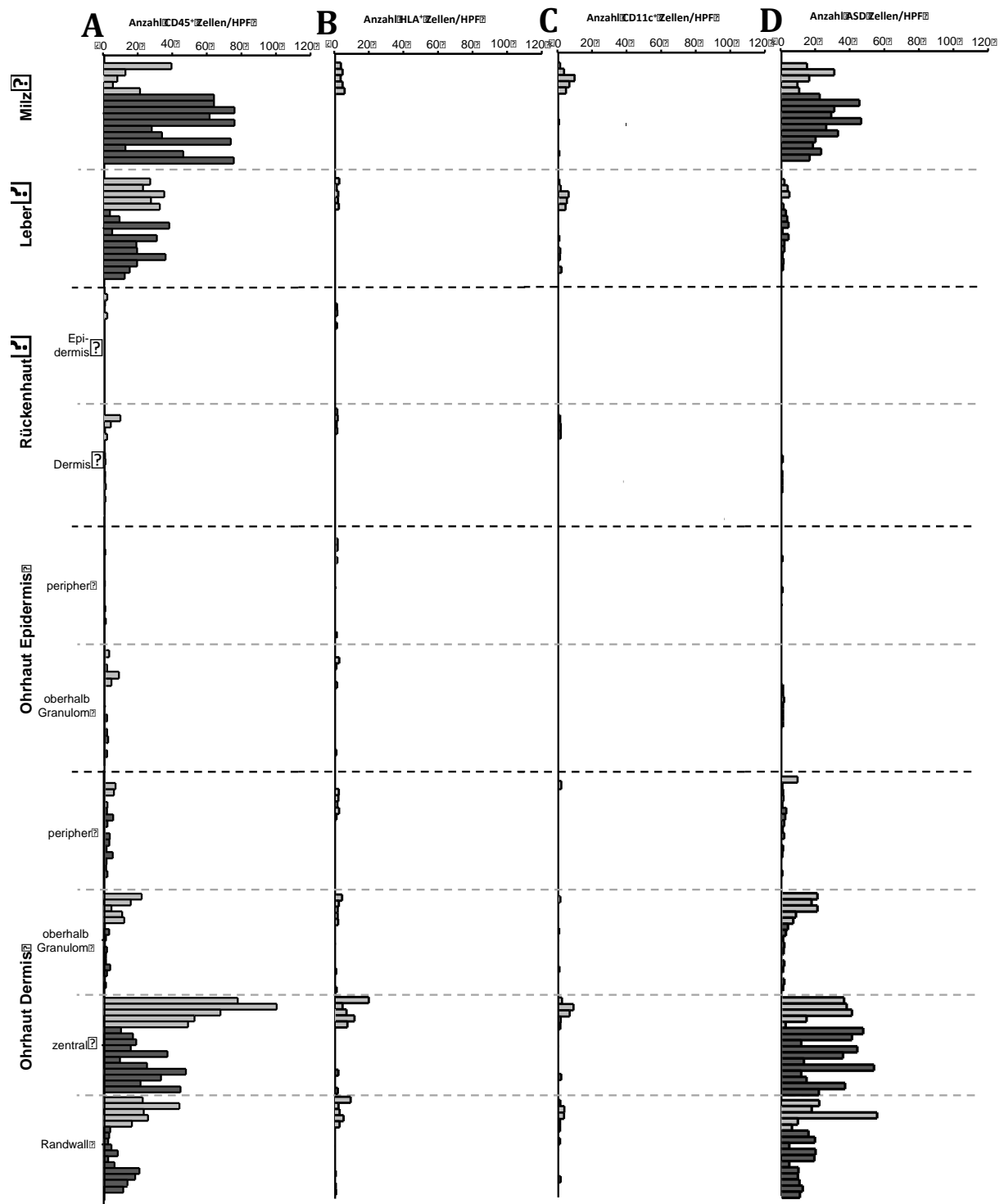
In den Milz-Präparaten wurden 8,8 - 45,4 positive Zellen festgestellt und in den Leber-Präparaten 0 - 4,2. In der Dermis und Epidermis der Ohrhaut wurden 0 - 8,8 positive Zellen gefunden. Epidermis und Dermis oberhalb des Granuloms stellten sich mit 0-20,4 positiven Zellen dar. Im Zentrum des Granuloms wurden 2 - 53,4 bzw. peripher des Granuloms 4,4 - 55,6 positive Zellen gezählt. In der Rückenhaut wurden nur in einigen dermalen Schichten von T1-T3 0 - 0,5 Zellen gezählt (Abb. 25).



**Abbildung 23: Auswertung der CD45+, CD3+, CD4+ und CD8+ Färbung:** Graphische Darstellung der Anzahl der je nach Marker positiv gefärbten Zellen pro High Power Field (HPF) unterteilt nach Organen. Tiere T1-T5 von Stammzell-Spender-1 (hellgrau), Tiere T6-T16 von Stammzell-Spender-2 (dunkelgrau). Eine Konzentration der positiv gefärbten Zellen auf den Infektionsort Ohr und lymphatische Organe Leber und Milz ist zu erkennen.



**Abbildung 24: Auswertung der CD45<sup>+</sup> und CD20<sup>+</sup> Färbung:** Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung von CD20<sup>+</sup> positiv angefärbten Zellen neben CD45<sup>+</sup> positiv angefärbten Zellen pro High Power Field (HPF) unterteilt nach Organen. Tiere T1-T5 von Stammzell-Spender-1 (hellgrau), Tiere T6-T16 von Stammzell-Spender-2 (dunkelgrau). In den epidermalen sowie den dermalen Schichten wurden nur vereinzelt positive Zellen gesichtet.



**Abbildung 25: Auswertung der CD45+, HLA, CD11c+ und ASD Färbung:** Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung von HLA-positiven, CD11c+-positiven und mittels ASD-Färbung angefärbten neutrophilen Granulozyten neben CD45+-positiv angefärbten Zellen pro High Power Field unterteilt nach Organen. Tiere T1-T5 von Stammzell-Spender-1 (hellgrau), Tiere T6-T16 von Stammzell-Spender-2 (dunkelgrau).

## **4.4 Kumulative Darstellung**

Im Mittel sind in der Milz (41,8 +/- 7,2) und im Zentrum des Granuloms im Ohr (38,7 +/- 5,9) am meisten CD45<sup>+</sup>-positive Zellen festgestellt worden, wohingegen die epidermalen und dermalen Hautschichten generell wenig positive Zellen aufwiesen.

Bei der CD20<sup>+</sup>-Färbung fanden sich im Mittel in der Milz 16 +/- 2,1, Leber (3,9 +/- 1,0) und im Zentrum des Granuloms (1,8 +/- 0,3) CD20<sup>+</sup>-positive Zellen.

In der Milz fanden sich mit 16 +/- 2,1 im Mittel die meisten positiven Zellen bei der CD3<sup>+</sup>-Färbung, gefolgt von der Leber mit 4,3 +/- 1 Zellen.. In den epidermalen Schichten der Rücken- und der peripheren Ohrhaut konnten keine positiv gefärbten Zellen festgestellt werden.

Bei der CD4<sup>+</sup>-Färbung wurden im Mittel 1,9 +/- 0,5 positive Zellen in der Milz, in der Leber 1,2 +/- 0,3, im Zentrum des Granuloms 1,2 +/- 0,4 und im peripheren Teil des Granuloms 0,8 +/- 0,2 positive Zellen festgestellt.

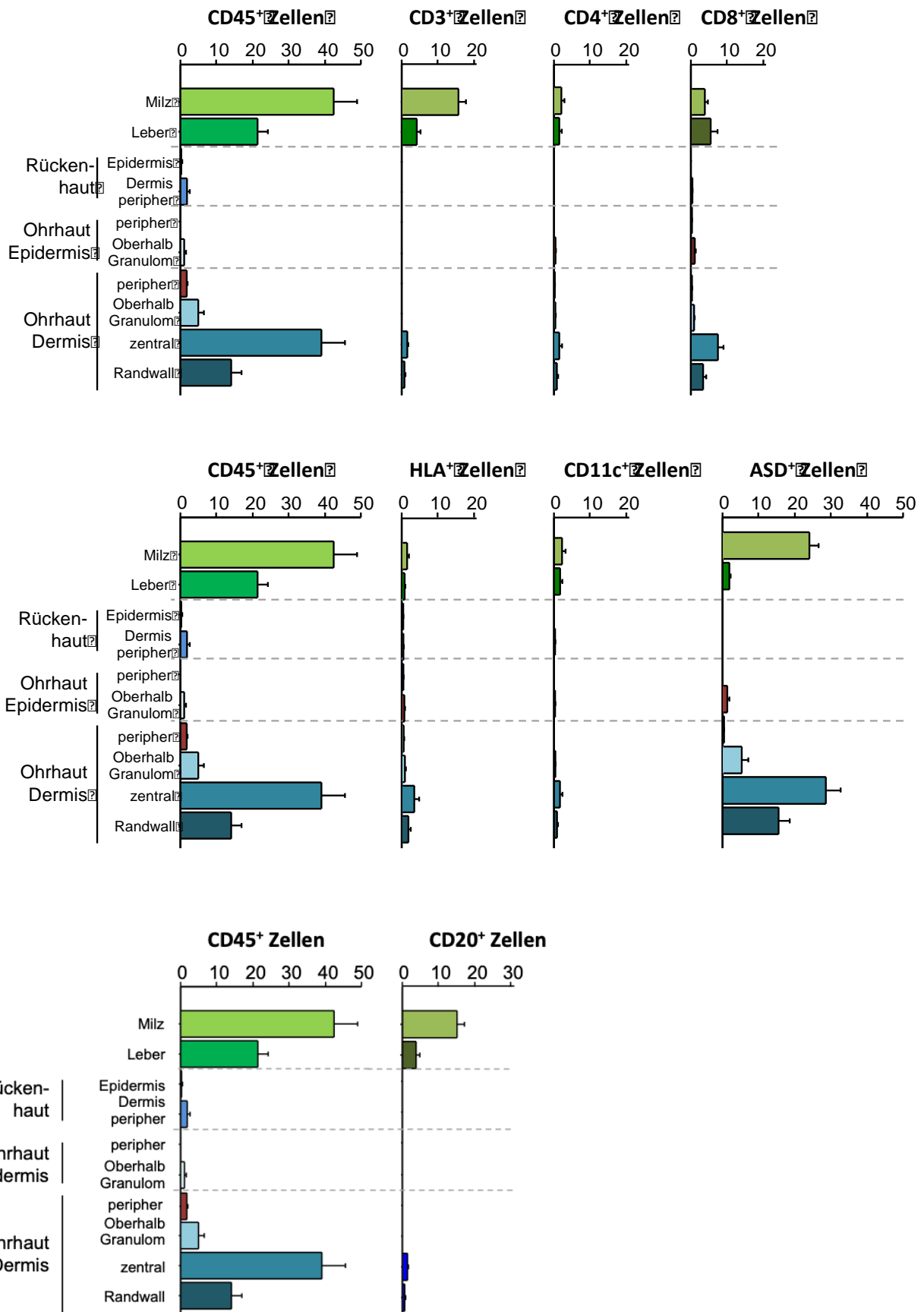
3,8 +/- 0,8 positive Zellen fanden sich im Mittel in der Milz, in der Leber 5,2 +/- 1,9 und im Zentrum des Granuloms 6,4 +/- 1,1 bzw. 3,3 +/- 0,5 in der Peripherie des Granuloms bei der CD8<sup>+</sup>-Färbung.

In der Mittelwert-Grafik dominieren das Zentrum des Granuloms im Ohr mit 3,2 +/- 1,3, peripher des Granuloms mit 1,6 +/- 0,6 und die Milz mit 1,2 +/- 0,4 HLA positiven Zellen.

In allen anderen Organproben wurde im Mittel weniger als eine Zelle gefunden.

1,9 +/- 0,9 CD11c<sup>+</sup>-positive Zellen fanden sich im Mittel in der Milz, in der Leber 1,3 +/- 0,5, im Zentrum des Granuloms 1,2 +/- 0,6 und in der Peripherie des Granuloms 0,6 +/- 0,2.

Bei der ASD-Färbung wurden im Mittel 24,2 +/- 2,9 in der Milz, in der Leber 2,0 +/- 0,2, im Zentrum des Granuloms 27,9 +/- 3,3 und in der Peripherie des Granuloms 16,1 +/- 2,5 positive Zellen festgestellt (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: Mittelwerte mit Standardfehler:** Graphische Darstellung der Mittelwerte mit Standardfehler für alle Färbungen unterteilt nach Organen kumulativ für alle Tiere T1-T16. Ein hohe Anzahl an positiv gefärbten Zellen wurde im und um das Granulum festgestellt, in der Milz und in der Leber. In epidermalen und dermalen Schichten konnten sowohl überhalb des Granuloms als auch peripher nur vereinzelt positiv angefarbte Zellen festgestellt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Verteilung der Parasitenlast

Bei der natürlichen Infektion mit *L. major* durch die Sandmücke dringt der Saugrüssel durch seine relativ einheitliche Länge bis in die Dermis des Wirts vor und injiziert dort eine relativ einheitliche Menge der promastigoten Form von *Leishmanien* (Geiger, Wenzel et al. 2010). Bei diesem Versuchsaufbau wurden die Leishmanien manuell, nicht standardisiert mittels einer Kanüle in das Ohr der Maus übertragen. Wie einheitlich dabei die Eindringtiefe gehalten werden konnte und wie viele *Leishmanien* mit dem gewählten Low-Dose Modell konkret übertragen wurden, bleibt zu diskutieren, allerdings ist auch bei der Infektion auf dem natürlichen Weg durch die Sandmücke keine einheitliche Parasitenmenge gegeben. Das Lowdose Modell wurde in dieser Studie verwendet, da es physiologischen Infektion möglichst nahekommt. 1.000 metazyklische Promastigoten/ 10µl entsprechen in etwa derjenigen Menge, die beim Stich durch die Sandmücke übertragen wird am meisten, jedoch handelt es sich dabei nur um Schätzwerte (Belkaid, Mendez et al. 2000). Die Versuchstiere wurden sieben Wochen nach der Infektion für die histologische Untersuchung getötet.

In der humanen Leishmaniasis ist das Parasitenaufkommen meist in den oberen dermalen Schichten am größten (von Stebut 2015). Es gibt zum Teil Große histologische Unterschiede zwischen Mensch und Maus. Beispielsweise ist die Epidermis bei der heranwachsenden und bei der adulten Maus aus nur zwei Zellschichten aufgebaut und somit deutlich dünner als die humane Epidermis (Kuhn 1957). Auch bestehen deutliche Unterschiede in der dermalen Hautvaskularisation und in der Blutgefäßorganisation von stark und spärlich behaarter Haut (Wagner 2008) Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass in den dermalen Schichten unserer Versuchsmäuse nur wenige Parasiten festzustellen waren, sondern hauptsächlich im und um das Granulom. Zwischen den beiden Spendergruppen gab es dabei keine Unterschiede (siehe Abb. 13).

### 5.1.1 Lokale und systemische Verteilung

In allen Versuchstieren T1-T16 ließen sich *L. major* sowohl in der HE- als auch in der Giemsa-Färbung nachweisen. *Leishmanien* wurden mittels Mikroskopie in allen Organen semiquantitativ festgestellt, jedoch die meisten am Infektionsort Ohr (siehe Abb. 13). Die Ergebnisse der Leishmania-Quantifizierung dieser Studie stimmen hinsichtlich der Hauptanzahl an Parasiten am Infektionsort mit der Literatur überein. So wurden bei der Untersuchung der Arbeitsgruppe um Wege et al. 2012 die zuvor humanisierten NSG-Mäuse an der Pfote mit *L. major* infiziert, was in der höchsten Parasitenmenge an eben diesem Infektionsort resultierte.

Nach dem Infektionsort Ohr dominierten in dieser Untersuchung die Präparate der viszerale Organe Milz und Leber gleichermaßen mit der zweitgrößten Parasitenzahl. Eine kutane Manifestation der Leishmaniasis mit *L. major* gefolgt von einer viszerale Manifestation wurde im humanisierten Mausmodell bereits beobachtet (Wege, Florian et al. 2012). Parasiten wurden neben den Ohr-, Milz- und Leberpräparaten auch in den Rückenhautpräparaten der Versuchstiere festgestellt, also weitab vom Infektionsort. Dies könnte die Folge der Dissemination der Parasiten über Lymph- und Blutbahnen sein oder aber Fehldiagnosen aufgrund der geringen Spezifität der Methode.

### 5.1.2 Vergleich mit anderen Mausmodellen

Die in dieser Studie verwendeten NOD-*scid IL2 $\gamma$* <sup>null</sup> (NSG) Mäuse besitzen keine funktionierenden T- und B-Zellen und werden daher oft für humanimmunologische *in vivo* - Studien verwendet (Sacks and Noben-Trauth 2002). Das murine Immunsystem ist in seiner Funktion stark eingeschränkt, was nach der Humanisierung mit humanen Stammzellen die Etablierung eines humanen Immunsystems inklusive myeloider Zellen, T-Zellen, B-Zellen und Natürlicher Killerzellen ermöglicht (Ishikawa, Yasukawa et al. 2005).

Eine Vergleichsgruppe mit nicht-humanisierten NSG-Mäusen gab es im Rahmen dieser Untersuchung nicht. Die Arbeitsgruppe um Wege et al. nahmen als Vergleichsgruppe BALB/c Mäuse. Diese zeigten die höchste Parasitenzahl am Infektionsort und ebenfalls eine viszerale Beteiligung. Sie mussten nach 29 Tagen in Folge der Progredienz der Leishmaniasis getötet werden. Bereits 1991 konnte gezeigt werden, dass eine Th1



dominierte Immunantwort einhergeht mit der Cytokin-Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-2, und TNF- $\alpha$ , welche wiederum infizierte Makrophagen aktivierten, leishmanizide iNOS und NO zu produzieren und somit zu einer protektiven Immunantwort gegen *Leishmania*-Spezies führt. Eine Th2 dominierte Immunantwort hingegen führt zur Cytokin-Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 und somit zu einer Proliferation der Entzündung (Heinzel, Sadick et al. 1991). BALB/c Mäuse haben eine genetische Prädisposition für die Progredienz der Leishmaniasis über die IL-4 vermittelte T<sub>H</sub>2-Immunantwort (Sacks and Noben-Trauth 2002).

Im Rahmen einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2019 wurden NSG-Mäuse intradermal gemäß dem Lowdose-Modell mit  $10^3$  *L. major* Parasiten infiziert und intraperitoneal mit unterschiedlich hohen Dosen von humanen PBMC rekonstituiert (Fischer MR 2019). NSG-Mäuse besitzen weder B- noch T-Zellen, eine im Vergleich zu anderen Immundefizienten Mäusen hohe Lebenserwartung, keine aktiven natürlichen Killerzellen, eine geringe Aktivität des murinen angeborenen Immunsystems und sind sehr aufnahmefähig für humane Stammzellen (Shultz, Lyons et al. 2005).

Dabei wurden bei allen Versuchstieren erfolgreich humane CD45<sup>+</sup> Zellen am Infektionsort nachgewiesen. Die Anzahl an hCD45<sup>+</sup> war unterschiedlich und korrelierte mit der Anzahl an hPBMC. Interessanterweise korrelierte auch die Läsionsgröße mit der Dosis an hPBMC. Je mehr hPBMC, desto größer das Läsionsvolumen. Auch wiesen Kontroll-Tiere ohne hPBMC wesentlich weniger Parasiten in den Läsionen auf, als mit hPBMC rekonstituierte Mäuse. Da 50% der Tiere einer Graft-Versus-Host-Disease (GvHD) erlagen, bleibt unklar, ob die vorherig beschriebene Korrelation Parasiten-abhängig oder auf die GvHD zurückzuführen ist. Ein weiterer wichtiger Punkt aus der Studie ist die starke Spezies-Abhängigkeit von der IFN- $\gamma$ -vermittelten Parasiten Elimination. Im Mausmodell von Fischer et al. sind ausschließlich murine Makrophagen infiziert, da die Mäuse nicht humanisiert wurden. Diese murinen Makrophagen reagieren ausschließlich auf murines IFN- $\gamma$  und nicht auf humanes IFN- $\gamma$  und töten intrazellulär Parasiten mittels NO ab.

### 5.1.3 Vergleich mit humanen Daten

Es gab bereits klinische Fälle von humaner, kutaner Leishmaniasis nicht nur mit visceraler Beteiligung, sondern mit Dissemination der Läsionen in alle Hautareale, dabei

auch in weit vom Infektionsort befindliche Areale und Schleimhäute. Es wird von einer Ausbreitung über den peripheren Blutkreislauf ausgegangen (Turetz, Machado et al. 2002). Im Rahmen dessen wird auch das Krankheitsbild der diffusen kutanen Leishmaniasis beschrieben. Hierbei wird von einer defizitären zellulären Immunantwort am Infektionsort ausgegangen, sodass die Parasiten über das Gewebe, die Lymphbahn oder die Blutbahn disseminieren können (Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017). Dies könnte übertragen auf diese Untersuchung eine Erklärung für das Parasitenaufkommen in den Rückenhautpräparaten sein. Durch ein Defizit in der Immunabwehr am Infektionsort bei den Versuchstieren könnten sich die Parasiten ausgebreitet haben.

## 5.2 Bewertung der immunhistologischen Ergebnisse

Immunhistologisch betrachtet sind im Granulom bei der humanen kutanen Leishmaniasis häufig zentral gelegene CD68-positive Makrophagen, die den Parasiten beherbergen, umgeben von Lymphozyten, die CD3-, CD4- und CD8-positiv sein können. Desweiteren sind Plasmazellen zu beobachten (von Stebut 2015). In klinischen Fällen der Leishmaniasis beim Menschen wurde beobachtet, dass nach den Makrophagen die CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten die größte Zell-Anzahl in cutanen Läsionen darstellen (Hepburn 2000). Die granulomatöse Entzündungsreaktion auf die Infektion mit *L. major* bis hin zur Ausbildung der kutanen Leishmaniasis (CL) wurde in der Literatur hinreichend beschrieben (Kaye and Beattie 2016). Bei der histologischen Untersuchung stellte sich bei allen mit *L. major* in das Ohr infizierten Versuchstieren T1-T16 als Reaktion eine derartige Granulombildung am Infektionsort dar. Der Parasitennachweis war in allen Versuchstieren erfolgreich. Auf CD68<sup>+</sup> wurde zwar nicht getestet, allerdings ist davon auszugehen, dass im Zentrum des Granuloms Makrophagen waren, da diese bekannterweise hauptsächlich *L. major* aufnehmen. Wichtig ist zu berücksichtigen, dass diese Makrophagen sowohl murinen als auch humanen Ursprungs sein können. Alle Versuchstiere T1-T16 in dieser Studie wiesen im Granulom humane CD45<sup>+</sup>-Zellen auf. Die Lymphozytenpopulation bestand hauptsächlich aus CD3<sup>+</sup>-Zellen, weiter unterteilt in CD8<sup>+</sup>-Zellen, welche den Großteil darstellten und CD4<sup>+</sup>-Zellen, die in weitaus geringerer Zahl als CD8<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden konnten. CD20<sup>+</sup>-B-Zellen konnten in ähnlich hoher Anzahl wie CD3<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden.

In der Studie von Wege et. al. 2012 wurden ebenfalls humanisierte Mäuse mit *L. major* infiziert. Dabei wurden bei allen Versuchstieren humane CD45<sup>+</sup>-Zellen im Granulom festgestellt. Mit Blick auf die Lymphozytenpopulation wurden vor allem CD3<sup>+</sup>-Zellen festgestellt, dabei gab es aber anders als bei vorliegender Studie eine deutliche Dominanz von CD4<sup>+</sup>-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup>-Zellen und CD20<sup>+</sup>-B-Zellen wurden in deutlich geringerem Maße als CD3<sup>+</sup>-Zellen festgestellt.

Im Rahmen der Studie von Fischer et. al. 2019 wurden zuvor humanisierte Mäuse mit *L. major* infiziert. Dabei wurden im Granulom CD45<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen. Hinsichtlich der Lymphozyten wurden hauptsächlich CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten festgestellt. Davon vor allem CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten. Die genaue Verteilung wurde nicht untersucht, auch auf B-Zellen wurde nicht getestet. Hinsichtlich des entzündlichen Infiltrats decken sich diese Ergebnisse mit den Ergebnissen vorliegender Studie.

Geiger et. al. untersuchten in ihrer Studie 2010 Hautbiopsien von 20 humanen Patienten mit kutaner Leishmaniasis. Sie fanden dabei einen ähnlichen Granulomaufbau. vor allem fanden sie CD68<sup>+</sup>-Makrophagen, die die Parasiten beherbergen. CD20<sup>+</sup>-B-Zellen fanden sie nur in geringem Umfang. CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden über das komplette Patientenkollektiv mit 29% beziehungsweise 31% in ähnlicher Höhe ohne signifikante Verteilung festgestellt. Zu berücksichtigen ist, dass die Infektion in unterschiedlichen Ländern auf verschiedenen Kontinenten stattgefunden hat, damit also auch unterschiedliche *Leishmania*-Spezies. Auch das Läsionsalter ist heterogen.

Hinsichtlich der Granulomausbildung und der Infiltration von CD3<sup>+</sup>-Zellen decken sich die Ergebnisse dieser Studie mit den Ergebnissen von Wege et al., Fischer et al., und Geiger et al. Unterschiede gibt es vor allem in der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verteilung und in der Anzahl der B-Zellen.

CD4-T-Helferzellen binden an den MHC-II von APC und sorgen für eine weitere Aktivierung des Immunsystems über die Zytokin-Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$ . CD4<sup>+</sup>-T-Zellen kontrollieren somit die Multiplikation der Parasiten während der frühen Phase der *Leishmania* Infektion (da Silva Santos and Brodskyn 2014). CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wird laut aktuellem Stand der Wissenschaft eine komplexe Rolle in der Immunantwort bei der Leishmaniasis zugeschrieben. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wirken einerseits protektiv, wenn sie IFN- $\gamma$  produzieren, andererseits begünstigen sie die Progredienz der Infektion, wenn sie zytolytisch sind und damit den Parasiten freisetzen. Die CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Funktion scheint von Faktoren wie der *Leishmania*-Spezies, dem Mausstamm und dem Ort abhängig zu sein (Seyed, Taheri et al. 2014, Novais and Scott 2015). In dieser

Untersuchung wurden im Zentrum des Granuloms fünffach so viele CD8<sup>+</sup> verglichen mit CD4<sup>+</sup> festgestellt. Hinsichtlich des CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> -Paradigmas könnte dies und das Aufkommen von B-Zellen auf eine Immunantwort, die in Richtung Progredienz der Infektion führt, schließen lassen.

Die Rolle der B-Zellen in der Leishmaniasis ist in der Literatur noch nicht abschließend geklärt, jedoch ist sie, wie schon in anderen Untersuchungen am Mausmodell festgestellt, mit einer Th2-Immunantwort assoziiert, was mit einer Progression der Entzündung und nicht wie bei der Th1-dominierten Immunantwort mit der Ausheilung der Leishmaniasis einhergeht (Sacks and Noben-Trauth 2002, Alexander and Bryson 2005). Allerdings konnte auch festgestellt werden, dass B-Zellen Leishmania-spezifische Antikörper produzieren, vor allem IgG und IgM, welche die Opsonisierung der Parasiten für dendritische Zellen begünstigen. Damit nehmen B-Zellen eine nützliche Rolle in der Bekämpfung der Leishmaniasis ein (Woelbing, Kostka et al. 2006). Anders als bei Wege et al. konnte in dieser Studie keine klare Dominanz von CD3<sup>+</sup> gegenüber CD20<sup>+</sup>-B-Zellen festgestellt werden.

Welche Rolle die Neutrophilen Granulozyten bei der Infektion mit *L. major* genau spielen, ist in der Literatur noch nicht abschließend geklärt. Fest steht, dass sie die ersten Leukozyten sind, die in großer Anzahl an die Infektionsstellen strömen (Muller, van Zandbergen et al. 2001). Auf der einen Seite werden Leishmanien opsonisiert und an den Komplementrezeptor C3R von Makrophagen gebunden, was dann eine Abtötung möglich macht, auf der anderen Seite überlebt der Großteil der Parasiten innerhalb der Neutrophilen Granulozyten und macht diese zu Wirtszellen (Laufs, Muller et al. 2002). Die hohe Anzahl der von uns im Granulom festgestellten Neutrophilen Granulozyten entspricht diesen Erkenntnissen. *Leishmania* vermindert die Caspase-3-Aktivität, welche die spontane Zellapoptose steuert. Somit überleben die neutrophilen Granulozyten nicht die üblichen 6-10 Stunden, sondern 2-3 Tage (van Zandbergen, Klinger et al. 2004). Desweiteren regt *L. major* die Genexpression und Sekretion der Chemokine Macrophage inflammatory Protein (MIP)-1alpha und MIP-1beta an, welche zur Makrophagen Chemotaxis führen. Innerhalb von Makrophagen überlebt und vermehrt sich *L. major*, sodass dieser Prozess auch als "Trojanisches Pferd"-Strategie bezeichnet wird, da sich der Parasit dadurch sicher und unbemerkt einschleusen kann (Laskay, van Zandbergen et al. 2003).

### 5.3 Limitationen des Modells

Eine der größten Limitationen dieses humanisierten Mausmodells ist die Tatsache, dass sowohl murine Makrophagen als auch humane Makrophagen vorhanden sind. In der Infektionskaskade der Leishmaniasis kommt den Makrophagen eine entscheidende Rolle zu. Die Funktionstüchtigkeit der Makrophagen bei NOD-*scid*-Mäusen ist durch einen Mausstamm spezifischen Defekt stark eingeschränkt, was unser Versuchsmodell hinsichtlich der Ausbreitung der Infektion limitiert (Shultz, Schweitzer et al. 1995). Auch stellt die Koexistenz von murinen und humanen Antigen-Präsentierenden Zellen eine Schwierigkeit dar für die Medikamenten-Testung im humanisierten Mausmodell. Murine Makrophagen reagieren auf LPS und IFN $\gamma$  als iNOS-Stimuli mit einer NO-Ausschüttung, die zur intrazellulären Parasitenelimination führt. Bei humanen Makrophagen scheinen andere Stimuli wie IFN $\alpha/\beta$ , IL-4 und anti-CD23 wirkungsvoller zu sein (Schneemann and Schoedon 2002, Wege, Florian et al. 2012).

Nach der Infektion der NSG-Mäuse mit *L. major* disseminieren diese im Mausorganismus und interagieren sowohl mit humanen als auch mit murinen Leukozyten. Eine über CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$  vermittelte Aktivierung der Makrophagen führt zur intrazellulären Bekämpfung der Parasiten (Sacks and Noben-Trauth 2002). Allerdings werden murine Makrophagen nur von murinem IFN $\gamma$  aktiviert und humane Makrophagen nur von humanem IFN $\gamma$  wie Fischer et al. zeigen konnten.

Eine weitere Limitation bei dieser Untersuchung ist sicherlich die geringe Standardisierung bei der quantitativen mikroskopischen Auswertung. Vielleicht sollte bei zukünftigen Studien auf Computer-gestützte Analyse Verfahren zurückgegriffen werden. Histologische Präparate auf Objektträgern werden dabei in Whole Slide Images (WSI) digitalisiert und von einem Computer über einen Algorithmus quantitativ ausgewertet. Der Nachweis von Leishmanien kann mikroskopisch, Molekularbiologisch mittels PCR oder über eine Leishmanienkultur erfolgen. Die hier angewandte Methode des mikroskopischen Leishmanien-Nachweises mittels HE- und Giemsa-Färbung der histologischen Präparate ist nicht Leishmanien-spezifisch. Ebenfalls nachteilig ist die eher geringe Sensitivität und die fehlende Standardisierung. Zudem erfordert dieses Verfahren Erfahrung in der histologischen Untersuchung, da Leishmanien aufgrund ihrer geringen Größe leicht übersehen werden können oder andere Strukturen, wie

Phagosomen im Inneren von Gewebsmakrophagen, als Leishmanien fehlgedeutet werden können. Diese Variable könnte durch einen erfahrenen Histologen oder durch moderne computergestützte, histologische, Analyseverfahren abgeschwächt werden. Eine Speziesdiagnostik ist mit diesem Verfahren nicht möglich, in Anbetracht dessen, dass alle Versuchstiere mit *L. major* infiziert wurden, aber auch nicht nötig (DTG 2010).

Die Versuchstiere T1-5 und T6-16 wurden mit hCD34<sup>+</sup> Stammzellen von zwei unterschiedlichen Spendern rekonstituiert und dabei wurden zum ersten Mal Stammzellen von zwei unterschiedlichen humanen Spendern verwendet. hCD45<sup>+</sup> wurden Spender-unabhängig in individueller Höhe in allen Versuchstieren T1-T16 festgestellt, was auf eine erfolgreiche Humanisierung hindeutet. Eine hohe Anzahl von Humanes Leukozyten Antigen (HLA) positiven Zellen lässt darauf schließen, dass die Übertragung der Stammzellen erfolgreich war und sich in der Maus humane Zellen entwickelt und differenziert haben (Khaddour and Mewawalla 2018). Erwartungsgemäß kam es zu einer Variabilität zwischen den beiden Spendergruppen, sodass obwohl bei allen Tieren hCD45<sup>+</sup> gefunden wurden, nur bei Spender-1-Tieren HLA-positive Zellen vor allem im Zentrum und peripher des Granuloms, in der Milz und in der Leber gefunden wurden (siehe Abb. 17). Bei Spender-2-Tieren konnten keine HLA-positiven Zellen identifiziert werden, woraus eine schlechte Histokompatibilität gefolgert werden könnte. Ebenfalls nicht zu vernachlässigen sind methodische beziehungsweise technische Fehler in der Immunhistologischen Färbung im Labor. Die humanen Stammzellen von Spender-2 liessen sich weniger gut in den NSG-Mäusen T6-T16 etablieren als die Stammzellen von Spender-1 bei T1-T5. Dies könnte in Zusammenhang mit einer Graft versus Host Disease (GvHD) bei Spender-2-Tieren stehen. Eine Strategie, dem entgegenzuwirken, wäre die Anzahl an Versuchstieren stark zu erhöhen und dann nur die Mäuse in die Studie miteinzubeziehen, die einen sehr ähnlichen Humanisierungsgrad aufweisen.

Auch könnte die Anzahl an unterschiedlichen Spendern weiter erhöht werden, was möglicherweise zu einer größeren Unabhängigkeit von spenderbezogenen genetischen Komponenten führen würde.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Leishmaniasis ist eine parasitäre Erkrankung, die von Erregern der Gattung *Leishmania* ausgelöst wird. Durch den Stich der weiblichen Sandmücke wird sie auf den Wirt übertragen, als Fehlwirt oft auch auf den Menschen. Mit weltweit über 12 Millionen Erkrankten besteht großer Handlungsbedarf, um das Krankheitsbild der Leishmaniasis besser zu verstehen, auch auf zellulärer sowie immunologischer Ebene (Wege, Florian et al. 2012).

Ziel dieser Studie war die immunhistologische Untersuchung von mit *L. major* infizierten NOD-*scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup>* (NSG) Mäusen, die zuvor mit hämatopoetischen, humanen CD34<sup>+</sup> Stammzellen humanisiert wurden. Zum ersten Mal wurden dabei zwei verschiedene Stammzellspender verwendet. Es sollte geklärt werden, ob dieses translationale Versuchsmodell für das Krankheitsbild der kutanen Leishmaniasis geeignet ist.

hCD45<sup>+</sup> konnten in allen Versuchstieren nachgewiesen werden, wobei große Unterschiede hinsichtlich der Quantität zwischen den zwei Spendergruppen auftraten. Es stellte sich ein unterschiedlicher Grad der Humanisierung zwischen den beiden Spendergruppen dar. Alle Versuchstiere bildeten wie erwartet das für die Infektion mit *L. major* typische Granulom aus mit zentral liegenden Makrophagen inklusive intrazellulärer Parasiten und einem Leishmaniasis-typischen Infiltrat in Form von CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-Zellen und B-Zellen. Im Gegensatz zu Geiger et. al. beobachteten wir in dieser Studie mehr CD8<sup>+</sup>-Zellen als CD4<sup>+</sup>-Zellen, was für eine Th2-dominierte Immunantwort spricht, welche mit der Progredienz der Infektion einhergeht. Auch stellten wir in dieser Studie eine hohe Anzahl an B-Zellen fest, die zwar einerseits mit einer Th2-dominierten Immunantwort assoziiert werden, aber auch förderlich für die Parasitenbekämpfung sein können, wie Woelbing et al. zeigen konnten.

In wie weit Forschungsergebnisse generell aus dem murinen Modell auf den Menschen übertragbar sind, bleibt fraglich, da es zum Teil immense Unterschiede zwischen den Immunantworten im murinen Modell auf humane Entzündungserkrankungen gibt (Seok, Warren et al. 2013). Dies könnte gerade hinsichtlich der Medikamentenforschung limitierend sein. Trotz ihrer Humanisierung besitzen Mäuse immer noch murine myeloide Zellen wie Makrophagen und Granulozyten, welche die Immunantwort beeinflussen können (Wege, Florian et al. 2012). Interessant für zukünftige Projekte

wäre ein Modell zu entwickeln, das soweit humanisiert ist, dass keine Maus-eigenen Zellen mehr vorhanden sind, welche die humane Immunantwort stören beziehungsweise beeinflussen könnten.



## 7. Literaturverzeichnis

- Alexander, J. and K. Bryson (2005). "T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm." Immunol Lett **99**(1): 17-23.
- Ärzteblatt, D. (2014). "Impfstoff gegen Leishmaniose erfolgreich." Deutsches Ärzteblatt Mai 2014.
- Belkaid, Y., S. Mendez, R. Lira, N. Kadambi, G. Milon and D. Sacks (2000). "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 **165**(2): 969-977.
- Boecken, G., C. Sunderkotter, C. Bogdan, T. Weitzel, M. Fischer, A. Muller, M. Lobermann, G. Anders, E. von Stebut, M. Schunk, G. Burchard, M. Grobusch, R. Bialek, G. Harms-Zwingerberger, B. Fleischer, M. Pietras, M. Faulde, K. Erkens, D. Germany Society of, M. German Society of Tropical and C. German Society of (2011). "[Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany]." J Dtsch Dermatol Ges **9 Suppl 8**: 1-51.
- Bosma, G. C., R. P. Custer and M. J. Bosma (1983). "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse." Nature **301**(5900): 527-530.
- Castellano, L. R., D. C. Filho, L. Argiro, H. Desein, A. Prata, A. Desein and V. Rodrigues (2009). "Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production." Hum Immunol **70**(6): 383-390.
- CDC. (2017). from <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.
- Christianson, S. W., D. L. Greiner, I. B. Schweitzer, B. Gott, G. L. Beamer, P. A. Schweitzer, R. M. Hesselton and L. D. Shultz (1996). "Role of natural killer cells on engraftment of human lymphoid cells and on metastasis of human T-lymphoblastoid leukemia cells in C57BL/6J-scid mice and in C57BL/6J-scid bg mice." Cell Immunol **171**(2): 186-199.
- Coler, R. N., Y. Goto, L. Bogatzki, V. Raman and S. G. Reed (2007). "Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells." Infect Immun **75**(9): 4648-4654.
- Cortes, D. F., M. B. Carneiro, L. M. Santos, T. C. Souza, T. U. Maioli, A. L. Duz, M. L. Ramos-Jorge, L. C. Afonso, C. Carneiro and L. Q. Vieira (2010). "Low and high-dose intradermal infection with Leishmania major and Leishmania amazonensis in C57BL/6 mice." Mem Inst Oswaldo Cruz **105**(6): 736-745.
- da Silva Santos, C. and C. I. Brodskyn (2014). "The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis." Front Public Health **2**: 165.
- Das, S., A. Freier, T. Boussoffara, S. Das, D. Oswald, F. O. Losch, M. Selka, N. Sacerdoti-Sierra, G. Schonian, K. H. Wiesmuller, K. Seifert, M. Schroff, C. Juhls, C. L. Jaffe, S. Roy, P. Das, H. Louzir, S. L. Croft, F. Modabber and P. Walden (2014). "Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis." Sci Transl Med **6**(234): 234ra256.
- Davies, C. R., P. Kaye, S. L. Croft and S. Sundar (2003). "Leishmaniasis: new approaches to disease control." BMJ **326**(7385): 377-382.
- DTG, D. G. f. r. T. u. I. G. (2016). "S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie der viszeralen Leishmaniasis (Kala-Azar)." AWMF Online.
- DTG, D. G. f. T. u. I. G. (2010). "Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland."

ECDC. (2017). "Phlebotomine sand flies." from <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/sanflies/Pages/sandflies.aspx>.

Enk, C. D. (2003). "Kutane Leishmaniose." *Der Hautarzt*.

Escudero-Perez, B., P. Ruibal, M. Rottstegge, A. Ludtke, J. R. Port, K. Hartmann, S. Gomez-Medina, J. Muller-Guhl, E. V. Nelson, S. Krasemann, E. Rodriguez and C. Munoz-Fontela (2019). "Comparative pathogenesis of Ebola virus and Reston virus infection in humanized mice." *JCI Insight*.

Filippis, C., K. Arens, G. A. Noubissi Nzeteu, G. Reichmann, Z. Waibler, P. Crauwels and G. van Zandbergen (2017). "Nivolumab Enhances In Vitro Effector Functions of PD-1(+) T-Lymphocytes and Leishmania-Infected Human Myeloid Cells in a Host Cell-Dependent Manner." *Front Immunol* **8**: 1880.

Fischer MR, S. A., Twelkmeyer T, et al. (2019). "Humanized mice in cutaneous leishmaniasis—Suitability analysis of human PBMC transfer into immunodeficient mice." *Experimental Dermatology* **28**(9): 1087-1090.

Flanagan, S. P. (1966). "'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse." *Genet Res* **8**(3): 295-309.

Geiger, B., J. Wenzel, M. Hantschke, I. Haase, S. Stander and E. von Stebut (2010). "Resolving lesions in human cutaneous leishmaniasis predominantly harbour chemokine receptor CXCR3-positive T helper 1/T cytotoxic type 1 cells." *Br J Dermatol* **162**(4): 870-874.

Govender, M., R. Hurdal, B. M. Salazar, K. Gqada, S. Pillay, L. Gcanga, K. Passelli, N. E. Nieuwenhuizen, F. Tacchini-Cottier, R. Guler and F. Brombacher (2018). "Deletion of IL-4 Receptor alpha-responsive keratinocytes in BALB/c mice does not alter susceptibility to cutaneous leishmaniasis." *Infect Immun*.

Greiner, D. L., R. A. Hesselton and L. D. Shultz (1998). "SCID mouse models of human stem cell engraftment." *Stem Cells* **16**(3): 166-177.

Harms-Zwingerberger, G. (2007). "Nach Deutschland importierte Leishmaniosen." *Deutsches Ärzteblatt* **104**(45): A-3108 / B-2732 / C-2639.

Harris, E., G. Kropp, A. Belli, B. Rodriguez and N. Agabian (1998). "Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes." *J Clin Microbiol* **36**(7): 1989-1995.

Hatzioannou, T. and D. T. Evans (2012). "Animal models for HIV/AIDS research." *Nat Rev Microbiol* **10**(12): 852-867.

Heinzel, F. P., M. D. Sadick, S. S. Mutha and R. M. Locksley (1991). "Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7011-7015.

Hepburn, N. C. (2000). "Cutaneous leishmaniasis." *Clin Exp Dermatol* **25**(5): 363-370.

HU-Berlin. (2017). from <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/schroeder-juliane-2010-09-29/HTML/chapter1.html>.

Ishikawa, F., M. Yasukawa, B. Lyons, S. Yoshida, T. Miyamoto, G. Yoshimoto, T. Watanabe, K. Akashi, L. D. Shultz and M. Harada (2005). "Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice." *Blood* **106**(5): 1565-1573.

Julia, V., M. Rassoulzadegan and N. Glaichenhaus (1996). "Resistance to Leishmania major induced by tolerance to a single antigen." *Science* **274**(5286): 421-423.

Kaufmann, S. H. E. (2014). *Basiswissen Immunologie*, Springer Verlag Berlin.

Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." *Nat Rev Microbiol* **9**(8): 604-615.

Kaye, P. M. and L. Beattie (2016). "Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis." Semin Immunopathol **38**(2): 249-260.

Kelly, B. L., D. B. Stetson and R. M. Locksley (2003). "Leishmania major LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization." J Exp Med **198**(11): 1689-1698.

Khaddour, K. and P. Mewawalla (2018). Hematopoietic Stem Cell Transplantation. StatPearls. Treasure Island (FL).

Kuhn, P. D. O. (1957). Selektive Wirkung verschiedener Stoffgruppen auf tierische Gewebe, Westdeutscher Verlag Köln und Opladen.

Lan, P. e. a. (2006). "Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation." Blood Journal.

Laskay, T., G. van Zandbergen and W. Solbach (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?" Trends Microbiol **11**(5): 210-214.

Laufs, H., K. Muller, J. Fleischer, N. Reiling, N. Jahnke, J. C. Jensenius, W. Solbach and T. Laskay (2002). "Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors." Infect Immun **70**(2): 826-835.

Launois, P., I. Maillard, S. Pingel, K. G. Swihart, I. Xenarios, H. Acha-Orbea, H. Diggelmann, R. M. Locksley, H. R. MacDonald and J. A. Louis (1997). "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 **6**(5): 541-549.

Loeffler, B. (2016). from [http://www.mibi.uniklinikum-jena.de/mibi\\_media/Bilder/Bilder\\_PDF/13\\_Plasmodien\\_Trypanosomen\\_Leishmanien-p-530.pdf](http://www.mibi.uniklinikum-jena.de/mibi_media/Bilder/Bilder_PDF/13_Plasmodien_Trypanosomen_Leishmanien-p-530.pdf).

Maroli, M. and C. Khoury (2004). "[Prevention and control of leishmaniasis vectors: current approaches]." Parassitologia **46**(1-2): 211-215.

Melby, P. C. (2002). "Recent developments in leishmaniasis."

Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-2738.

Minodier, P. and P. Parola (2007). "Cutaneous leishmaniasis treatment." Travel Med Infect Dis **5**(3): 150-158.

Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa and V. E. Papaioannou (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell **68**(5): 869-877.

Morrow, W. J., M. Wharton, D. Lau and J. A. Levy (1987). "Small animals are not susceptible to human immunodeficiency virus infection." J Gen Virol **68 ( Pt 8)**: 2253-2257.

Mota, J. and R. Rico-Hesse (2009). "Humanized mice show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype." J Virol **83**(17): 8638-8645.

Muller, K., G. van Zandbergen, B. Hansen, H. Laufs, N. Jahnke, W. Solbach and T. Laskay (2001). "Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice." Med Microbiol Immunol **190**(1-2): 73-76.

Novais, F. O. and P. Scott (2015). "CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly." Semin Immunopathol **37**(3): 251-259.

Oryan, A. and M. Akbari (2016). "Worldwide risk factors in leishmaniasis." Asian Pac J Trop Med **9**(10): 925-932.

Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008). "Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years." Vaccine **26**(14): 1709-1724.

Pingel, S., P. Launois, D. J. Fowell, C. W. Turck, S. Southwood, A. Sette, N. Glaichenhaus, J. A. Louis and R. M. Locksley (1999). "Altered ligands reveal limited plasticity in the T cell response to a pathogenic epitope." *J Exp Med* **189**(7): 1111-1120.

Reyburn, H., R. Ashford, M. Mohsen, S. Hewitt and M. Rowland (2000). "A randomized controlled trial of insecticide-treated bednets and chaddars or top sheets, and residual spraying of interior rooms for the prevention of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**(4): 361-366.

Rogers, K. A., G. K. DeKrey, M. L. Mbow, R. D. Gillespie, C. I. Brodskyn and R. G. Titus (2002). "Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*." *FEMS Microbiol Lett* **209**(1): 1-7.

Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." *Nat Rev Immunol* **2**(11): 845-858.

Schneemann, M. and G. Schoedon (2002). "Species differences in macrophage NO production are important." *Nat Immunol* **3**(2): 102.

Seok, J., H. S. Warren, A. G. Cuenca, M. N. Mindrinos, H. V. Baker, W. Xu, D. R. Richards, G. P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C. C. Finnerty, C. M. Lopez, S. Honari, E. E. Moore, J. P. Minei, J. Cuschieri, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, M. G. Jeschke, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S. E. Calvano, P. H. Mason, J. P. Cobb, L. G. Rahme, S. F. Lowry, R. V. Maier, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, R. W. Davis, W. Xiao, R. G. Tompkins, *Inflammation and L. S. C. R. P. Host Response to Injury* (2013). "Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(9): 3507-3512.

Seyed, N., T. Taheri, C. Vauchy, M. Dosset, Y. Godet, A. Eslamifar, I. Sharifi, O. Adotevi, C. Borg, P. S. Rohrllich and S. Rafati (2014). "Immunogenicity evaluation of a rationally designed polytope construct encoding HLA-A\*0201 restricted epitopes derived from *Leishmania major* related proteins in HLA-A2/DR1 transgenic mice: steps toward polytope vaccine." *PLoS One* **9**(10): e108848.

Shultz, L. D., M. A. Brehm, J. V. Garcia-Martinez and D. L. Greiner (2012). "Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges." *Nat Rev Immunol* **12**(11): 786-798.

Shultz, L. D., F. Ishikawa and D. L. Greiner (2007). "Humanized mice in translational biomedical research." *Nat Rev Immunol* **7**(2): 118-130.

Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, S. W. Christianson, B. Gott, I. B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T. V. Rajan, D. L. Greiner and et al. (1995). "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice." *J Immunol* **154**(1): 180-191.

Souza, N. A., R. P. Brazil and A. S. Araki (2017). "The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **112**(3): 161-174.

Srivastava, S., P. Shankar, J. Mishra and S. Singh (2016). "Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis." *Parasit Vectors* **9**(1): 277.

Stanford, U. o. (2017). from <https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/Mucocutaneous.htm>.

Stockdale, L. and R. Newton (2013). "A review of preventative methods against human leishmaniasis infection." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(6): e2278.

Torres-Guerrero, E., M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud and R. Arenas (2017). "Leishmaniasis: a review." *F1000Res* **6**: 750.

Turetz, M. L., P. R. Machado, A. I. Ko, F. Alves, A. Bittencourt, R. P. Almeida, N. Mobashery, W. D. Johnson, Jr. and E. M. Carvalho (2002). "Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil." J Infect Dis **186**(12): 1829-1834.

van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller and S. Dannenberg (2004). "Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages." The Journal of Immunology.

von Stebut, E. (2007). Immunologie der Leishmaniasis: Stand und Perspektiven, Thieme Verlag.

Von Stebut, E. (2007). "Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity." Eur J Dermatol **17**(2): 115-122.

von Stebut, E. (2014). "Leishmaniasis." Journal of the German Society of Dermatology.

von Stebut, E. (2015). "Leishmaniasis." Deutsche Dermatologische Gesellschaft.

von Stebut, E. (2015). Reisedermatosen.

von Stebut, E., M. Berneburg, M. Maurer and K. Steinbrink (2014). Facharztprüfung Dermatologie und Venerologie: 1000 kommentierte Prüfungsfragen, Thieme Verlag.

von Stebut, E., G. Boecken, C. Sunderkotter and C. Bogdan (2016). "Kutane Leishmaniasis." Deutsches Ärzteblatt **15**: 717-720.

Wagner, C. (2008). Dreidimensionale digitale Rekonstruktion des humanen Stratum corneum der Haut in Kombination mit Simulation substantieller Diffusion durch das Stratum corneum.

Walsh, N. C., L. L. Kenney, S. Jangalwe, K. E. Aryee, D. L. Greiner, M. A. Brehm and L. D. Shultz (2017). "Humanized Mouse Models of Clinical Disease." Annu Rev Pathol **12**: 187-215.

Wege, A. K., C. Florian, W. Ernst, N. Zimara, U. Schleicher, F. Hanses, M. Schmid and U. Ritter (2012). "Leishmania major infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response." PLoS Negl Trop Dis **6**(7): e1741.

Weitzel, T., N. Muhlberger, T. Jelinek, M. Schunk, S. Ehrhardt, C. Bogdan, K. Arasteh, T. Schneider, W. V. Kern, G. Fatkenheuer, G. Boecken, T. Zoller, M. Probst, M. Peters, T. Weinke, S. Gfrorer, H. Klinker, M. L. Holthoff-Stich and N. Surveillance Importierter Infektionen in Deutschland Surveillance (2005). "Imported leishmaniasis in Germany 2001-2004: data of the SIMPID surveillance network." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **24**(7): 471-476.

WHO. (2017). "Leishmaniasis." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en>.

Woelbing, F., S. L. Kostka, K. Moelle, Y. Belkaid, C. Sunderkoetter, S. Verbeek, A. Waisman, A. P. Nigg, J. Knop, M. C. Udey and E. von Stebut (2006). "Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity." J Exp Med **203**(1): 177-188.

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt

████████████████████ für die Stellung des Promotionsthemas

██████████ für das Herstellen der histologischen Präparate

████████████████████ für die Betreuung der Dissertationsschrift

und

████████████████████ für die Durchführung der Tierversuche.