

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

Untersuchung zu Mannose-bindendem Lektin und den  
Komplementfaktoren C3 und C5 im murinen Modell einer  
*Leishmania major*-Infektion

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

vorgelegt von

Lisa Waas  
aus Neustadt an der Weinstraße

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Für meine wunderbare kleine Familie  
und meine liebe große Familie.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	IV
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	IX
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	XI
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Ziel der Arbeit .....	3
<b>2 Literaturdiskussion</b> .....	4
2.1 Leishmaniasis .....	4
2.1.1 Diagnostik .....	7
2.1.2 Therapie .....	8
2.1.3 Leishmaniasis-HIV-Koinfektion .....	9
2.1.4 Der Parasit .....	10
2.2 Bestandteile des angeborenen Immunsystems .....	11
2.2.1 Antigenpräsentierende Zellen (APCs) .....	11
2.2.2 Interleukine IL6, IL-10 und IL-12p40 .....	13
2.2.3 Komplementsystem .....	14
2.2.4 Die Aktivierung des Lektin-Weges .....	15
2.2.5 Der Lektinweg .....	18
2.2.6 Mannose-bindendes Lektin (MBL) .....	19
2.2.7 MBL-assoziierte Serin-Proteasen .....	22
2.2.8 Komplementfaktor C3 und -rezeptor CR3 .....	23
2.3 Abwehrmechanismen von und gegen <i>L. major</i> .....	24
2.3.1 <i>L. major</i> -Infektion: Rolle der Antigen-präsentierenden Zellen .....	25
2.3.2 Proteine des Komplementsystems beeinflussen die <i>L. major</i> Infektion ....	28
2.3.3 Mincle-Fc-Komplex der Dendritischen Zellen (DC) .....	29

---

<b>3 Material und Methoden</b> .....	32
3.1 Material .....	32
3.1.1 Parasiten.....	32
3.1.2 Mäuse .....	32
3.1.3 Antikörper .....	32
3.1.4 Differenzierungsfaktoren und Zytokine .....	33
3.1.5 Verwendete Kits .....	34
3.1.6 Puffer und Verbrauchslösungen .....	34
3.1.7 Reagenzien und Chemikalien .....	36
3.1.8 Verbrauchsmaterialien .....	38
3.1.9 Geräte .....	39
3.2 Experimentelle Methoden .....	41
3.2.1 Tierversuche & -haltung .....	41
3.2.2 Neubauer Zählkammer .....	41
3.2.3 Blutentnahme und Herstellung von (hitzeinaktiviertem) Mausserum .....	41
3.2.4 Gewinnung von Gewebemakrophagen und Generierung von <i>bone marrow derived dendritic cells</i> (BMDC) .....	42
3.2.5 <i>L. major</i> : Kultivierung, Isolierung, Opsonisierung von Promastigoten .....	45
und Amastigoten-Generierung.....	45
3.2.6 <i>In vitro</i> Infektion von APC, Abnahme der Medienüberstände, .....	48
Anfertigung und Auszählung der Zytospins .....	48
3.2.7 Entnahme von Ohr, Lymphknoten und Milz der Maus .....	50
3.2.8 Ohrmessung .....	51
3.2.9 Parasitenlasten von Ohr und Milz: Verdünnungsreihe und Auswertung... 51	51
3.2.10 Restimulierung der murinen drainierenden Lymphknoten.....	54
3.2.11 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	55

---

3.2.12 Durchflusszytometrie.....	55
3.2.13 Färbeschemata der FACS-Analysen.....	57
3.2.14 Statistische Auswertung.....	58
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
4.1 <i>In vivo</i> -Infektionsversuche.....	59
4.1.1 Ohrläsionskurven: C57BL/6 vs. MBL-AC <sup>-/-</sup> .....	59
4.1.2 Parasitenlasten: C57BL/6 vs. MBL-AC <sup>-/-</sup> .....	61
4.1.3 ELISA der dLK-Restimulation: C57BL/6 vs. MBL-AC <sup>-/-</sup> .....	63
4.1.4 Ohrläsionskurven: C57BL/6 vs. C3 <sup>-/-</sup> .....	64
4.1.5 Parasitenlasten: C57BL/6 vs. C3 <sup>-/-</sup> .....	65
4.1.6 ELISA der dLK-Restimulation: C57BL/6 vs. C3 <sup>-/-</sup> .....	67
4.2 <i>In vitro</i> -Untersuchungen.....	69
4.2.1 Qualitätskontrolle von MΦ und BMDC mittels FACS.....	69
4.2.2 Einfluss von MBL-AC, C3 oder C5 auf die Promastigoten-Aufnahme..... und Zytokinproduktion in MΦ und BMDC.....	71
4.2.3 Phagozytose- und Zytokinverhalten von MΦ und BMDC bei Infektion..... mit Gewebeamastigoten aus MBL-AC- oder C3-defizienten Tieren.....	80
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>88</b>
5.1 MBL-AC-Knockout in der kutanen Leishmaniasis.....	88
5.2 C3-Knockout in kutaner Leishmaniasis.....	94
5.3 <i>In vitro</i> -Versuche zu C5-Knockout in kutaner Leishmaniasis.....	100
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>103</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>XIII</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>XXII</b>
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>XXVI</b>
<b>10 Lebenslauf.....</b>	<b>XXVII</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

-	ohne, minus, entgegen dem Uhrzeigersinn
/	pro, je
+/+	Wildtyp
-/-	Knockout
%	Prozent
+	mit, plus
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AC	MBL-Gene A und C der Maus
ACK	Ammonium-Chlorid-Potassium
AD	Assay Diluent
AIDS	engl. <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle, Allophycocyanin
Arm. Ham. IgG	Armenisches Hamster Immunglobulin G
Asn	Asparagin
BMDC	engl. <i>bone marrow derived dendritic cells</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
C	Komplementfaktor
c	Konzentration
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
Cfg	Zentrifugation
cfu	koloniebildende Einheit (engl. <i>colony forming unit</i> )
CL	kutane Leishmaniasis (engl. <i>cutaneous leishmaniasis</i> )
CML	Komplement-vermittelte Zellyse (engl. <i>complement-mediated lysis</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid

CR	Komplementrezeptor (engl. complement receptor)
CRD	engl. <i>carbohydrate recognition domain</i>
d	Tag, Durchmesser, destilliert
DAF	engl. complement <i>decay-accelerating factor</i>
DAMP	engl. <i>death-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i> )
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dLK	drainierende Lymphknoten
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
et al.	<i>et alii, et aliae, et alia</i> , und andere
Fab	Antigenbindendes Fragment (engl. <i>fragment antigen binding</i> )
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
Fc	kristallisierbares AK-Fragment (engl. <i>fragment crystallizable</i> )
FCS	Fötale Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
FCSi	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
FDC	Follikuläre dendritische Zellen
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreuung (engl. <i>forward scatter</i> )
G	Gauge
g	Gramm/ Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
Glu	Glukose
h	Stunde/n, human
H <sub>2</sub> O	Wassermolekül, hier: Wasser
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure



---

HRP	Meerrettich- Peroxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
HIV	Human Immunodeficiency Virus
i.d.	intradermal
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin(e)
inf.	infizierte/er/es
i.v.	intravenös
L.	<i>Leishmania</i>
LdISP2	<i>L. donovani</i> inhibitorische Serinpeptidase 2 (engl. <i>L. donovani inhibitor of serine peptidase 2</i> ).
L.L.	<i>Leishmania</i> , Subgenus <i>Leishmania</i>
LPG	Lipophosphoglykan
LPS	Lipopolysaccharid
L.V.	<i>Leishmania</i> , Subgenus <i>Viannia</i>
M	Molar
m	murin
MAC	Membran-angreifender Komplex (engl. <i>complement membrane attack complex</i> )
MACS	Magnetische Zellseparation (engl. <i>magnetic activated cell sorting</i> )
MARCH	Membran-assoziiertes Ringfingerprotein
MASP	MBL-assoziierte Serin-Protease(n)
MCP	Membran-Cofaktor der Proteolyse
MHC I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex I/II (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MBL	Mannose-bindendes Lektin (engl. <i>mannose-binding lectin</i> )
mg	Milligramm
min	Minute(n)
MCL	mukokutane Leishmaniasis (engl. <i>mucocutaneous leishmaniasis</i> )
ml	Milliliter

---

mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (engl. <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MΦ	Makrophage(n)
n	Versuchsanzahl
n.d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
NMS	Normales Mausserum
NMSi	hitzeinaktiviertes normales Mausserum
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
Ø	ohne/ keine
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PMN	Polymorphkernige Granulozyten (Neutrophile)
Prom.	Promastigote(n)
PS	Petrischale
rhMBL	rekombinantes humanes MBL
rm	Rekombinant, murin
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SLA	Lösliches Leishmanien-Antigen (engl. <i>soluble Leishmania antigen</i> )
sMAP	engl. <i>small MBL-associated serine protease</i> (siehe MASP)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i> )
T	Temperatur/ Tier
TARC	engl. <i>Translational Animal Research Center</i>
Tbc	Tuberkulose
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	engl. <i>toll like receptor</i>
U	Einheit (engl. <i>unit</i> )
u.a.	unter anderem
ÜS	Überstand
V	Versuchsnummer
v.a.	vor allem
VL	viszerale Leishmaniasis
v.l.n.r.	von links nach rechts
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>world health organization</i> )
wk	Woche (engl. <i>week</i> )
w/v	Gewicht/Volumen (engl. <i>weight/volume</i> )
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Sandmücke. ....	4
Abb. 2: Lebenszyklus von <i>Leishmania</i> spp. ....	5
Abb. 3: Läsionen bei kutaner Infektion mit <i>Leishmania major</i> .. ....	6
Abb. 4: <i>L. major</i> : Promastigote und Amastigote. ....	10
Abb. 5: Komplementkaskade. ....	15
Abb. 6: Aktivierung des Lektin-Weges. ....	16
Abb. 7: Darstellung von Kohlenhydratseitenketten von Glykoproteinen. ....	18
Abb. 8: MBL2-Polymorphismus. ....	19
Abb. 9: MBL-Trimer. ....	22
Abb. 10: Abbauprodukte von C3b. ....	23
Abb. 11: Phagozytose und Prozessierung von <i>L. major</i> . ....	25
Abb. 12: Mincle-abhängige DC-Downregulierung nach <i>L. major</i> -Infektion. ....	30
Abb. 13: Ficoll-Dichtegradient. ....	46
Abb. 14: Ansetzen einer Verdünnungsreihe für Parasitenlasten ....	51
Abb. 15: Ohrläsionskurven: C57BL/6 vs. MBL-AC <sup>-/-</sup> . ....	60
Abb. 16: Parasitenlasten: C57BL/6 vs. MBL-AC <sup>-/-</sup> Mäuse. ....	62
Abb. 17: ELISA der dLK-Restimulation: C57BL/6 vs. MBL-AC <sup>-/-</sup> ....	64
Abb. 18: Ohrläsionskurven: C57BL/6 vs. C3 <sup>-/-</sup> Mäuse. ....	65
Abb. 19: Parasitenlast: C57BL/6 vs. C3 <sup>-/-</sup> Mäuse. ....	66
Abb. 20: ELISA der dLK-Restimulation: C57BL/6 vs. C3 <sup>-/-</sup> Mäuse. ....	68
Abb. 21: Qualitäts-FACS: Biogel-MΦ. ....	69
Abb. 22: Qualitäts-FACS: BMDC. ....	70
Abb. 23: MΦ <i>in vitro</i> Infektion mit <i>L. major</i> -Promastigoten +/- Opsonisierung. ....	72
Abb. 24: ELISA: MΦ <i>in vitro</i> -Infektion mit Promastigoten. ....	75
Abb. 25: BMDC <i>in vitro</i> -Infektion: <i>L. major</i> -Promastigote +/- Opsonisierung. ....	77
Abb. 26: ELISA: BMDC <i>in vitro</i> -Infektion mit Promastigote. ....	79
Abb. 27: MΦ <i>in vitro</i> -Infektion mit <i>L. major</i> -Amastigoten. ....	81
Abb. 28: ELISA: MΦ <i>in vitro</i> -Infektion mit Amastigoten. ....	83
Abb. 29: BMDC <i>in vitro</i> -Infektion mit <i>L. major</i> -Amastigoten. ....	85

---

Abb. 30: ELISA: BMDC <i>in vitro</i> -Infektion mit Amastigote. ....	87
Abb. 31: Promastigoten <i>in vitro</i> Versuche: Vergleich der IL-10 und IL-12p40 Level zwischen M $\Phi$ und BMDC. ....	XXII
Abb. 32: Amastigoten <i>in vitro</i> Infektionen: Vergleich von IL-10 und IL-12p40 Level zwischen M $\Phi$ und BMDC. ....	XXIII
Abb. 33: Vergleich von IL-10 und IL-12p40 zwischen <i>in vitro</i> ..... Promastigoten- und Amastigoteninfektionen.....	XXIV
Abb. 34: Vergleich von Infektionsraten, adhärennten und intrazellulären..... <i>L. major</i> zwischen den <i>in vitro</i> -Promastigoten- und Amastigoten-..... Versuchen bei M $\Phi$ und BMDC.....	XXV

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Therapien einer kutanen Leishmaniasis. ....9  
Tabelle 2: Auswertungshilfe für Parasitenlasten aus murinen Milzen und Ohren. ....54

## 1 Einleitung

Mit voranschreitender Globalisierung, Klimaveränderung und Weiterentwicklung der Medizin rückt die Bekämpfung der überwiegend in Afrika, Südasien, Mittel- und Südamerika sowie dem Mittelmeerraum endemisch auftretenden Leishmaniasis immer mehr in den Fokus der Forschung. Das Ausprägungsspektrum beinhaltet zwar auch harmlose und selbstlimitierende Formen, jedoch genauso tödlich verlaufende Manifestationen. Sind die Haut oder Schleimhäute betroffen, kommt es meist zu einer narbigen Abheilung mit zum Teil auch destruierenden, entstellenden Ergebnissen. Die viszerale Verlaufsform endet oft tödlich. Durch die Vielseitigkeit der Erkrankung ist auch ein vielseitiger Ansatz gefragt, um ihr zu begegnen (von Stebut, 2015).

Da bisher jedoch kein Impfstoff existiert, ist eine primäre Prophylaxe nicht möglich. In Usbekistan werden beispielsweise virulente *Leishmania*-Stämme an nicht sichtbaren Hautstellen injiziert, um eine gezielte Infektion zu setzen. Die kutane Leishmaniasis verheilt dort unter Narbenbildung und hinterlässt eine partielle Immunität gegen diesen speziellen Erreger (von Stebut et al., 2016, Khamesipour et al., 2005). Die bisherigen Forschungsergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass für die immunologische Bekämpfung der Leishmaniasis im ersten Schritt das angeborene Immunsystem die tragende Rolle spielt, bevor im zweiten Schritt das erworbene Immunsystem zum Einsatz kommt.

Das Mannose-bindende Lektin (MBL) ist Teil jenes angeborenen Immunsystems. Über dieses Komplement-aktivierende Protein werden u.a. die Parasiten *L. mexicana*, *L. chagasi*, *L. braziliensis* und auch *L. major* erkannt (Mishra et al., 2015). Die jedoch widersprüchliche Datenlage zur Rolle des MBL in der Leishmaniasis war Hintergrund unserer Versuche mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen, die einen absoluten MBL-Mangel aufweisen. Denn sowohl ein Defizit als auch ein Genpolymorphismus, der zu erhöhten MBL-Serumlevels führt, können einen Einfluss auf den Infektionsverlauf haben. Ein Schutz vor Tuberkulose (Mykobakterien) und *Leishmania* konnte einerseits bei erhöhten MBL-Levels (van Kempen et al., 2017), aber auch bei vorliegendem MBL-Mangel beobachtet werden. Es wird angenommen, dass der Mangel des proinflammatorischen Moleküls dem Wirt hilft, die Wahrscheinlichkeit des Parasitenbefalls über das Komplementprotein C3 und den C3-Rezeptor (CR3) zu reduzieren

(Jack et al., 2001) und über ein abgeschwächtes Entzündungsgeschehen den Kollateralschaden zu minimieren (Ezekowitz, 2005). Sowohl humanes MBL (hMBL) als auch murines MBL-A (mMBL-A) und mMBL-C vermitteln eine Aktivierung des Komplementsystems. Die Analyse der Kohlenhydratspezifität zeigt, dass hMBL eher mMBL-C als mMBL-A ähnelt. Das mMBL-C schafft im Vergleich jedoch nur 1/5 der Aktivierungsaktivität. Es ist wahrscheinlich, dass der Unterschied in der Monosaccharidspezifität zu einem unterschiedlichen Bindungsverhalten an Mikroorganismen führt, je nach Komposition der Glykokonjugate an deren Oberfläche (Hansen et al., 2000).

Auf den folgenden Seiten soll auf die kutane Form der Leishmaniasis (CL) eingegangen werden. Wir untersuchten im Mausmodell den Einfluss des MBL, aber auch der Komplementfaktoren C3 bzw. C5 *in vivo* und *in vitro* im Falle einer *Leishmania major*-Infektion. Hierfür wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, Knockout-Mäuse für MBL-AC, C3 bzw. C5 sowie die promastigote und amastigote Lebensform von *L. major* genutzt.



## 1.1 Ziel der Arbeit

Erste Ergebnisse von *in vivo*-Versuchen mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund im Infektionsmodell mit dem Parasiten *L. major* lieferten eindeutige Ergebnisse: Solche Tiere mit einem Knockout für MBL-AC zeigten initial einen signifikant schlechteren Krankheitsverlauf als C57BL/6 Wildtyp-Mäuse. Diese Beobachtung richtete unser Interesse auf das angeborene Immunsystem und insbesondere auf den Einfluss der nachgeschalteten wichtigen Bestandteile.

Die Intention dieser Arbeit ging dahin, anhand unterschiedlicher Knockouts (Mäuse mit Knockouts für MBL (MBL-AC<sup>-/-</sup>), C3 (C3<sup>-/-</sup>) auf C57BL/6-Hintergrund und C5 (C5<sup>-/-</sup>) auf NOD scid<sup>-/-</sup> γc-Hintergrund) im Mausmodell zu untersuchen, wie sich der Krankheitsverlauf der kutanen Leishmaniasis klinisch (*in vivo*), auf Zellebene und Ebene der Zytokinproduktion (*in vitro*) im Vergleich zu gesunden Tieren unterscheidet. Als zelluläre Grundlage dienten uns Biogel-Makrophagen (MΦ) und aus Knochenmark generierte Dendritische Zellen (DC) der Mäuse (engl. *bone marrow derived dendritic cells*, BMDC). Die Infektion erfolgte im Tiermodell mit einer physiologischen Infektionsdosis (10<sup>3</sup> *L. major*, promastigote Lebensform), wie sie auch beim Stich einer Sandmücke übertragen wird. Wir injizierten die Parasiten entweder in die Ohrfalten der lebenden Mäuse (*in vivo*) oder infizierten MΦ und BMDC innerhalb von Zellkulturschalen (*in vitro*).

Die nachfolgenden Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit erhoben. Sie sollten weitere Erkenntnisse des Einflusses der oben angeführten Komplementfaktoren MBL, C3 und C5 im Bezug auf die kutane Leishmaniasis bringen, das Verständnis der Immunabwehr in diesem speziellen Krankheitsbild erweitern und als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Als Ziel gilt es, die bisher unzureichenden Behandlungs- und Präventionsoptionen im Falle der *Leishmania major*-Infektion möglichst rasch zu verbessern.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Leishmaniasis

Leishmaniasis ist eine Erkrankung, die durch verschiedene Spezies des protozoischen Parasiten *Leishmania* hervorgerufen wird und auf unterschiedliche Weise in Erscheinung treten kann. Dies hängt vom Immunstatus des Betroffenen und von der Subspezies des Parasiten ab (von Stebut and Sunderkotter, 2007). Die mit 90% häufigste Form ist die kutane Leishmaniasis (CL). Sie heilt bei immunkompetenten Patienten in aller Regel nach Wochen bis Monaten lokal destruierend und unter Narbenbildung ab. Im Gegensatz dazu steht die ohne Behandlung meist tödlich verlaufende viszerale Leishmaniasis (VL). Sie befällt die inneren Organe und sorgt letztlich für eine typisch dunkle Pigmentierung der Haut, weswegen sie auch unter dem Namen Kala-Azar (*Hindi: schwarze Haut*) bekannt ist.

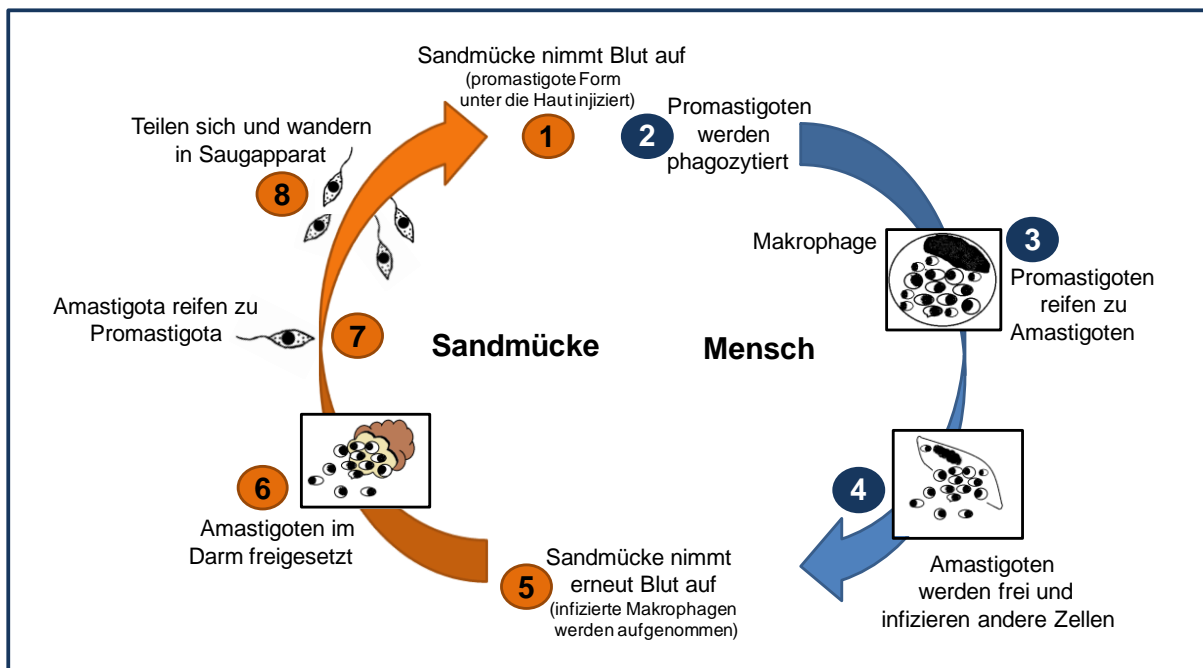
Dazwischen sind noch diffuse und rezidivierende Formen einzuordnen, wie z.B. die Post-Kala-Azar dermale Leishmaniasis, bei der es Jahre nach überstandener viszeraler Leishmaniasis zu typischen Hautveränderungen kommen kann und die mukokutane Form (MCL), die bei ca. 5% der Patienten in der Neuen Welt auftritt und eine starke Gewebeerstörung, vom Nasenseptum ausgehend bis zur Trachea, verursacht (von Stebut, 2015).

Die Leishmaniasis wurde aufgrund der nahezu uneingeschränkten globalen Reisewege zu der dritthäufigsten Reisedermatose (Mansueto et al., 2014). Ebenso ist sie die dritthäufigste von Vektoren übertragene Infektionskrankheit. Sie kommt weltweit in etwa 90 Ländern vor und ist eng verknüpft mit dem Vorkommen der Sandmücke als Vektor (Alvar et al., 2012).



**Abb. 1: Sandmücke (von Stebut, 2015).**

Sandmücken (*Phlebotomus* in der Alten Welt, *Lutzomyia Psychodopygus* in der Neuen Welt) gehören zur Spezies der Schmetterlingsmücken und werden nur etwa 2 mm groß. Typisch für sie ist, dass sie nur kurze Strecken überwinden können, Wind meiden, selten in großen Höhen anzutreffen und nachtaktiv sind. Die weibliche Mücke überträgt während ihrer Blutmahlzeit die promastigote Lebensform von *L. major* auf den Wirt (Boecken et al., 2011).



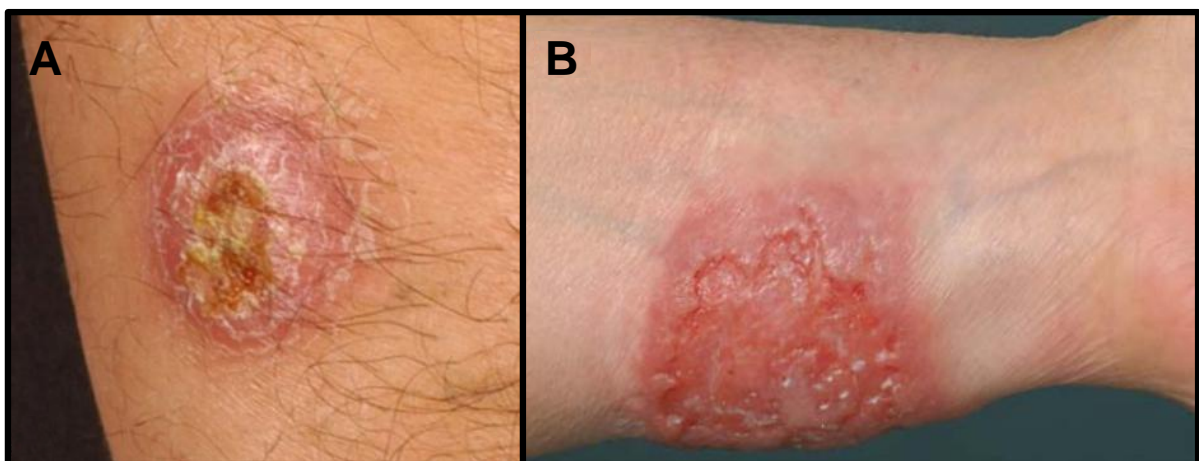
**Abb. 2: Lebenszyklus von *Leishmania* spp. (in Anlehnung an: Centers for Disease Control and Prevention).**

Bei ihrem Stich überträgt die Sandmücke die promastigote Form des Parasiten auf den Wirt. Die nun in der Haut vorliegenden 10-15 µm langen Promastigoten werden von Gewebsmakrophagen (MΦ) phagozytiert. Innerhalb weniger Stunden wandeln sie sich zu 2-3 µm großen obligat intrazellulären Amastigoten um (von Stebut, 2012). Übersteigt die Zahl der Amastigoten die Kapazität der Antigen präsentierenden Zelle (APC), platzt diese auf und die Parasiten werden frei gesetzt. Sie infizieren umliegende MΦ, die nun hämatogen verteilt werden. Nimmt eine Sandmücke nun erneut Blut von diesem Individuum, nimmt sie hiermit auch infizierte MΦ auf. Im Darm des Insekts werden die Amastigoten freigesetzt und es entwickeln sich daraus wieder Promastigoten. Diese stellen die infektiöse Form des Parasiten dar und wandern in den Stechapparat der Mücke, um von hier bei der nächsten Blutmahlzeit wieder unter die Haut des Wirtes (Mensch oder Tier) zu gelangen. Die Infektion findet bei (1) statt, eine Diagnose der Erkrankung ist zu Zeitpunkt (3) und (4) möglich (von Stebut, 2015).

Die Regionen, in denen die Leishmaniasis endemisch ist, lassen sich unterteilen in die Alte und die Neue Welt. In der sogenannten Alten Welt (Südasiens, Afrika, Mittelmeer) sind vor allem die Subspezies *L. donovani* und *L. infantum* für die viszerale Form der Leishmaniasis verantwortlich. Die kutane Form wird vor allem durch *L. major*, *L. tropica* und *L. infantum* hervorgerufen. In der Neuen Welt (Mittel- und Südamerika) ist der häufigste, den viszeralen Verlauf verursachende Parasit, *L.L. chagasi* und für die kutane Verlaufsform sind es *L.V. braziliensis*, *L.V. guyanensis* und *L.L. amazonensis* (Boecken et al., 2011).

Pro Jahr sterben etwa 20.000 Menschen an Leishmaniasis. Etwa 300.000 erkranken an viszeraler und circa eine Million an kutaner Leishmaniasis. Man schätzt, dass weltweit etwa 310 Millionen Menschen der täglichen Gefahr ausgesetzt sind, sich mit dem Parasiten zu infizieren (Mansueto et al., 2014).

Die kutane Leishmaniasis (CL) ist die mit 90% häufigste Verlaufsform der Erkrankung und wird auch Orientbeule oder Aleppobeule genannt. Typischerweise bildet sich erst Wochen bis Monate nach dem Stich ein kleiner Knoten an der Inokulationstelle. Dieser entsteht durch die Einwanderung von Entzündungszellen (Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, T-Zellen). Im weiteren Verlauf nimmt die Läsion an Größe zu. Es bildet sich meist ein erhabener Randwall um ein ulzerierendes Zentrum herum (von Stebut, 2015, Boecken et al., 2011).



**Abb. 3: Läsionen bei kutaner Infektion mit *Leishmania major*. (A: (von Stebut et al., 2017), B: (von Stebut et al., 2016)).**

Bild A zeigt den Unterarm eines Patienten aus Marokko. Bild B zeigt das typische sogenannte „vulcano sign“: der erhabene Randwall um eine flächige, feuchte Ulzeration.

Bei immunkompetenten Patienten heilt dieser Defekt auch unbehandelt in etwa 6-18 Monaten unter Narbenbildung aus. Sogenannte Satellitenläsionen, bei denen sich der Parasit entlang der Lymphbahnen in das umliegende Gewebe bewegt, sind ebenfalls möglich (von Stebut, 2015).

Differentialdiagnostisch sind unter anderem das Ekthym oder die erosiv ulzerierte Pyodermie, das spinozelluläre Karzinom, das Pyoderma gangraenosum, ein Primäreffekt bei Lues, eine Primärtuberkulose, ein durch Mykobakterien verursachtes Granulom oder das kutane B-Zell-Lymphom in Betracht zu ziehen. Lepra kommt differentialdiagnostisch eher bei rezidivierenden, diffusen CL-Verläufen in Betracht (von Stebut, 2012, Boecken et al., 2011, von Stebut and Sunderkotter, 2007).

### 2.1.1 Diagnostik

Eine Diagnostik sollte bei jedem Patienten durchgeführt werden, der sich erstens in den letzten Wochen bis Monaten in einem Endemiegebiet aufgehalten hat und zweitens nicht heilende Haut- und/oder Schleimhautveränderungen aufweist, welche länger als 3–4 Wochen bestehen. Die Diagnose kann auf unterschiedliche Weise gelingen. Mit Hilfe einer Biopsie lässt sich der Parasit einerseits als amastigote Form intrazellulär nachweisen (hierfür eignen sich sowohl die immunhistochemische Färbung nach Giemsa als auch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung). Andererseits sind daraus eine Erregerbestimmung mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Speziesdifferenzierung und ebenso eine kulturelle Anzucht möglich (von Stebut, 2015, Boecken et al., 2011).

Die Serologie eignet sich nicht für die Diagnostik, da es keine Korrelation des anti-*Leishmania*-IgG mit dem Krankheitsverlauf gibt und der Titer nur auf eine durchgemachte Infektion hinweist. Gerade in Endemiegebieten ist angesichts der weiten Verbreitung der Erkrankung somit eine frische Infektion nicht nachweisbar (von Stebut and Sunderkotter, 2007).

### 2.1.2 Therapie

Die Therapieform richtet sich vorrangig nach der zugrunde liegenden Verlaufsform, der *Leishmania*-Subspezies, dem Immunstatus, dem Alter, den Grunderkrankungen des Patienten, sowie nach kosmetischen Aspekten (von Stebut et al., 2016). Da die Sandmücke vor allem unbedeckte Hautstellen erreicht, tritt die CL häufig in Gesicht, an Hals, Armen und Beinen auf (von Stebut, 2015). Die WHO empfiehlt bei einfachen Läsionen, wie sie häufig im Nahen und Mittleren Osten nach einer Infektion auftreten, die Selbstheilung abzuwarten. In Deutschland ist dies aufgrund der guten Diagnose- und Therapiemöglichkeiten jedoch nicht das zu präferierende Prozedere. Durch eine optimale Wundpflege parallel zur antiparasitären Therapie kann das Ulkus bei einfachen Läsionen innerhalb weniger Wochen oft um mindestens 2/3 verkleinert und somit das kosmetische Ergebnis deutlich verbessert werden (von Stebut et al., 2016).

Das Krankheitsbild der viszeralen Leishmaniasis (VL) fordert als Mittel der ersten Wahl liposomales Amphotericin B, welches i.v. verabreicht und von Makrophagen (MΦ) aufgenommen wird. Somit gelangt es direkt an den erwünschten Wirkort. Typische Nebenwirkungen können eine substitutionspflichtige Hypokaliämie, Kopf-, Muskel-, Glieder- und Rückenschmerzen unter der Infusion sowie Überempfindlichkeitsreaktionen und Thrombophlebitiden sein. Im Vergleich mit Amphotericin B weist das liposomale Amphotericin B eine geringere Toxizität auf.

Mittel zweiter Wahl ist Miltefosin, ein Alkylphosphocholin, welches oral eingenommen wird. Es wurde ursprünglich zur topischen Tumortherapie entwickelt. Nebenwirkungen sind hier häufig gastrointestinale Störungen wie Erbrechen und Durchfall sowie Anstiege der Leberenzyme und des Serumkreatinins. Schwere bestehende Schädigungen von Leber und Niere sind deshalb Kontraindikationen (Burchard, 2016).

Die in der Therapie der VL bekannten Antimonverbindungen sind zwar kostengünstiger und in den tropischen Ländern noch häufig genutzt, aufgrund von erheblichen Nebenwirkungen und vermehrtem Auftreten von Resistenzen sind diese jedoch nur als Reservemittel zu betrachten (Burchard, 2016).

TABELLE		
Therapieoptionen bei kutaner Leishmaniasis (12, 47)		
Erreger und Verlauf	Therapie einfacher Läsionen	Therapie komplexer Läsionen
<b>L. major</b> Geringes Risiko mukokutaner Metastasierung; Selbstheilungsrate innerhalb 6 Monaten 60 %	Lokaltherapie mit periläsionalem Antimon, ggf. kombiniert mit Kryotherapie (26,27); topische Paromomycin-Kombinationen (29, 37); Thermotherapie (24); ggf. abwarten und lokale Wundbehandlung z. B. mit 0,045 % pharmazeutischem Natriumchlorid (14–16)	<b>1. Wahl:</b> Fluconazol p. o. (28–30); Ketokonazol p. o. (31–33); Miltefosin p. o. (20–22) <b>2. Wahl:</b> liposomales Amphotericin i. v. <b>3. Wahl</b> (wegen unerwünschter Wirkungen): Antimon i. v. plus Allopurinol (34, 35) oder Pentoxifyllin (36)
<b>L. tropica</b> Verlauf evtl. mit Satelliten oder chronisch-rezidivierend; Abheilung innerhalb 6–15 Monaten, ausgeprägte Narbenbildung	Lokaltherapie mit periläsionalem Antimon, ggf. kombiniert mit Kryotherapie (26,27); Thermotherapie (25); lokale Wundbehandlung z. B. mit pharmazeutischem Natriumchlorid (14–16)	<b>1. Wahl:</b> Azole p. o. (Itraconazol (38–41), Ketokonazol (32, 33, 42), Fluconazol (29, 30)) <b>2. Wahl:</b> liposomales Amphotericin i. v. (46, 47) <b>3. Wahl:</b> (wegen unerwünschter Wirkung): Antimon i. v. plus Allopurinol (34, 35, 43)
<b>L. infantum</b> Immer Immunsuppression ausschließen, da darunter häufiger manifeste Disseminierung	Abwarten und lokale Wundbehandlung*; Lokaltherapie mit periläsionalem Antimon, kombiniert mit Kryotherapie (23, 26, 27)	<b>1. Wahl:</b> liposomales Amphotericin i. v. (46, 47) <b>2. Wahl:</b> Miltefosin p. o., (wegen unerwünschter Wirkung): Antimon i. v. plus Pentoxifyllin (44)
<b>L. aethiopia</b> Wenig Erfahrung, kaum Therapiestudien	Lokaltherapie mit periläsionalem Antimon, kombiniert mit Kryotherapie (23, 45)	liposomales Amphotericin i. v.; Antimon i. v. (45); Pentamidin; Miltefosin

\* wenn Immunsuppression bzw. Viszeralisierung ausgeschlossen wurde

**Tabelle 1: Therapien einer kutanen Leishmaniasis (von Stebut et al., 2016).**

Zamani et al. untersuchten kürzlich in ihrer Studie den Einfluss der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) auf die Fähigkeit von MΦ intrazelluläre *L. major* Parasiten abzutöten. Sie fanden heraus, dass durch eine Steigerung der G6PDH-Aktivität mittels Stimulation über LPS und Melatonin MΦ ihre NO Produktion hochfahren und die Bildung bzw. das Überleben intrazellulärer Amastigoten unterdrücken können. Vielleicht ist hiermit ein neuer Ansatz für Therapiemöglichkeiten gefunden (Zamani et al., 2019).

### 2.1.3 Leishmaniasis-HIV-Koinfektion

Bis heute wurde aus 35 Ländern von Viszeraler Leishmaniasis- (VL) und HIV-Koinfektionen (engl. *human immunodeficiency virus*) berichtet (WHO, 2019). Die Koinfektion von HIV und VL bzw. kutaner (CL) Leishmaniasis stellen ernstzunehmende Belastungen dar, da sie nur schwierig zu behandeln sind: An HIV erkrankte Menschen sind besonders anfällig für VL, wohingegen auch die VL die HIV-Replikation und den Progress in Richtung AIDS beschleunigt. Die Interaktion von VL und HIV-Infektionen stellt in Gebieten mit hohen Raten an Koinfektionen eine große Herausforderung dar (WHO, 2019).

Laut WHO geht die Zahl an neuen Koinfektionen in Europa seit Ende der 1990er

Jahre stetig zurück. Dieser Erfolg ist hauptsächlich auf die Entwicklung und den Zugang zur hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) im Kampf gegen HIV zurückzuführen. In anderen Teilen der Erde jedoch, wo der Zugang zu diesen Therapieoptionen begrenzt ist, ist die Prävalenz nach wie vor hoch. Die CL gilt mittlerweile als opportunistische Infektion bei HIV (von Stebut, 2017a, Vogel M., 2010, WHO, 2019).

### 2.1.4 Der Parasit

Durch den Stich der infizierten Sandmücke werden die Parasiten in der begeißelten, hochinfektiösen promastigoten Form (10-15  $\mu\text{m}$ ) übertragen und nach der Inokulation vornehmlich von M $\Phi$  aufgenommen. In diesen wandeln sie sich in die geißellose, obligat intrazelluläre amastigote Form (2-3  $\mu\text{m}$ ) um und vermehren sich durch Zweiteilung (von Stebut, 2012, Reiner and Locksley, 1995).

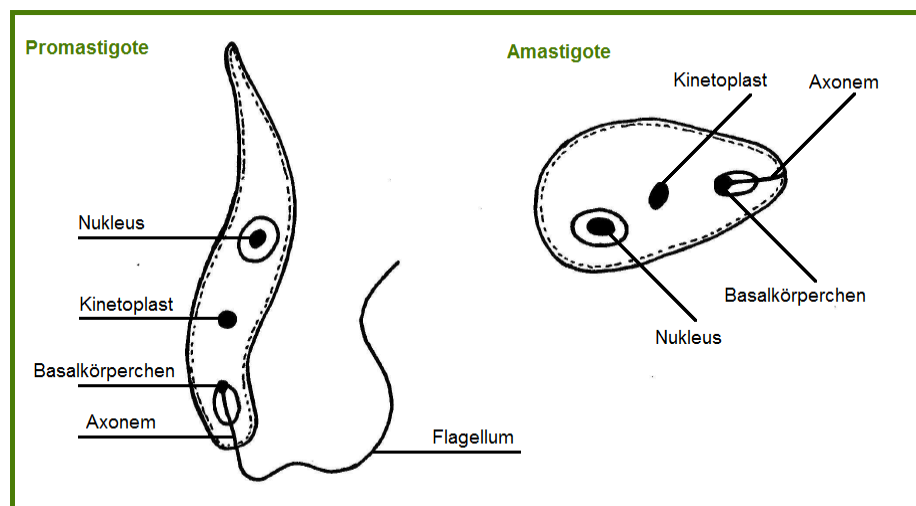


Abb. 4: *L. major*: Promastigote und Amastigote (in Anlehnung an (Hassim, 2015)).

Entsprechend ihrer Lebensform (Promastigote oder Amastigote) benötigen die Parasiten unterschiedliche Temperaturen zum Überleben: Promastigote bevorzugen 25-27°C und Amastigote 37°C (von Stebut and Sunderkotter, 2007). Üblicherweise stellen Nagetiere und Hunde als natürliches Reservoir den Zielwirt dar, der Mensch ist lediglich ein Fehlwirt. Eine Ausnahme bildet hier der Parasit *L. tropica*, welcher nur den Menschen als Wirt nutzt (von Stebut, 2012).



## 2.2 Bestandteile des angeborenen Immunsystems

Natürliche Barrieren (u.a. Haut, Schleimhäute in Atemwegen und Verdauungstrakt) schützen unseren Organismus vor dem Eindringen von Mikroorganismen. Versagen diese Mechanismen, kommen innerhalb von Minuten antimikrobielle Proteine, das Komplementsystem und angeborene Immunzellen zum Einsatz. Hierzu zählen u.a. Makrophagen (MΦ), Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen (DC), die über die Antigenpräsentation T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anregen. Erst nach mehreren Stunden bis Tagen ist das adaptive Immunsystem in der Lage über T-Zellen und antigenspezifische B-Zellen die Antikörperproduktion zu starten und so im besten Falle eine lebenslange Immunität gegen die Mikroorganismen aufzubauen (Murphy, 2018).

### 2.2.1 Antigenpräsentierende Zellen (APCs)

Zu den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) gehören B-Lymphozyten, dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen (MΦ). Sie alle kommen in Blut und Gewebe vor, erfüllen ihre immunologischen Aufgaben jedoch hauptsächlich im lymphatischen Gewebe durch Aktivierung von T-Zellen. APCs tragen auf ihrer Oberfläche Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse II (engl. *major histocompatibility complex*, MHC II), auf welchen sie Antigene präsentieren. Diese MHC-II-Antigen-Komplexe werden von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Ausnahme sind einige Untergruppen der DCs, die im Sinne einer Kreuzpräsentation auch Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren und dadurch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) aktivieren können (Guermonprez et al., 2002, Murphy, 2018).

DCs und MΦ entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Beide tragen Komplement- und Fc-Rezeptoren (letztere erkennen die konstanten Regionen von Antikörpern (AK) in AK:Antigen-Komplexen) auf der Oberfläche und nehmen Antigene mittels Phagozytose und Makropinocytose auf. Bei Antigenkontakt schütten sie die Zyto- und Chemokine IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12 und CXCL8 (= IL-8) aus. Peptide im Peptid:MHC-II-Komplex auf der Oberfläche von DCs aktivieren primär naive CD-4<sup>+</sup>-T-Zellen. Der Peptid:MHC-II-Komplex auf MΦ zielt darauf ab, die Effektor- bzw. Helfer-Funktionen dieser bereits aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren. Im

Gegenzug aktivieren die T-Zellen mittels Zytokinen M $\Phi$  zum Abtöten der intravesikalen Mikroorganismen (von Stebut and Tenzer, 2017, Steimle et al., 1994, Underhill et al., 1999).

Erkennen bereits aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein Peptid im Peptid:MHC-II-Komplex auf einem B-Lymphozyten, produzieren sie Zytokine, die Einfluss darauf nehmen, welches Immunglobulin (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) der B-Lymphozyt generieren wird (Steimle et al., 1994).

Man unterscheidet zwei Arten der DCs: konventionelle DCs, die über die Prozessierung und Antigenpräsentation mittels MHC-II-Moleküle naive T-Zellen aktivieren. Sie tragen alle bekannten Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf ihrer Oberfläche, mit Ausnahme des TLR-9.

Dieser kommt auf der zweiten Art DCs vor, den plasmacytoiden dendritischen Zellen. Diese können vor allem über TLR-7 und TLR-8 virale Infektionen erkennen. TLR-Signale ändern das Verhalten dendritischer Zellen von Antigenaufnahme hin zu T-Zellaktivierung und veranlassen die Wanderung zu sekundär lymphatischem Gewebe (Reis e Sousa, 2004, Krug et al., 2003).

Unreife geweberesidente DCs wandeln sich nach Antigenkontakt zu reifen DCs um. In ihrem nicht aktivierten Zustand bilden sie viele lange Fortsätze (Dendriten) aus. Durch ihre Rezeptoren (z.B. Dectin-1, DEC 205, DC-SIGN und Langerin) sind sie phagozytotisch und makropinozytotisch sehr aktiv. Auf dem Weg zu sekundär lymphatischem Gewebe bilden die aktivierten Zellen eine vielfach gefaltete Oberfläche aus, weshalb sie früher als Schleierzelle bezeichnet wurden. Außer über ihre Morphologie und die Adhäsionsmoleküle CD11c und CD54 sind aktivierte DCs über die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD40 (CD, engl. *cluster of differentiation*) identifizierbar. In Lymphknoten angekommen, bilden DCs große Mengen an MHC-Molekülen und präsentieren ihre Antigen:MHC-Klasse-II-Komplexe auf der Oberfläche den CD4<sup>+</sup> T-Zellen (They and Amigorena, 2001, Murphy, 2018, Wieder, 2003, Engel et al., 2015).

Naive T-Zellen zirkulieren über Lymphe und Blut ununterbrochen durch den Körper. Treffen sie in lymphatischem Gewebe auf ihr, von DCs präsentiertes spezifisches Antigen, stoppen sie ihre Wanderung, proliferieren und differenzieren zu T-Effektorzellen. Als solche wandern sie über efferente Lymphgefäße ins Blut und

zum Infektionsort zurück (Murphy, 2018). Auch bei M $\Phi$  wird erst mit der Aktivierung, also der Aufnahme von Pathogenen, die Expression der Oberflächenmoleküle MHC II, CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) verstärkt (von Stebut and Tenzer, 2017).

### 2.2.2 Interleukine IL6, IL-10 und IL-12p40

#### IL-6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit starken pro-inflammatorischen Eigenschaften. Es aktiviert z.B. Hepatozyten, ist an der Regulierung der Hämatopoese beteiligt und begünstigt das Plasmazellwachstum. Es begünstigt die Differenzierung von Monozyten zu M $\Phi$  und wird selbst wiederum von M $\Phi$ , DCs und T-Zellen gebildet. Zusammen mit dem transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (engl. *transforming growth factor*  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) induziert es die Differenzierung von IL-17 produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Th17). Gleichzeitig inhibiert es die Generierung regulatorischer T-Zellen. Diese gelten als wichtige Zellen in der Leishmaniasis und bestimmen das Ausmaß der Parasitenbeseitigung im Organismus (Kling et al., 2011, Kishimoto, 2005, Belkaid et al., 2002a, Bettelli et al., 2006).

#### IL-10

IL-10 hat anti-inflammatorische Effekte auf unterschiedliche Zelltypen: es hemmt einerseits die Phagozytose, die Ausbildung von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie von co-stimulierenden Molekülen und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch M $\Phi$  und DCs. Andererseits schränkt es die Fähigkeit von M $\Phi$  ein intrazelluläre Organismen abzutöten (Schwarz et al., 2013).

#### IL-12p40

Das bioaktive IL-12 ist ein Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten p35 und p40. Diese lagern sich zu IL-12p70 zusammen. Während p35 in vielzähligen Zelltypen exprimiert wird, ist die Expression von p40 eher begrenzt und legt letztlich fest, ob die Zelle in der Lage ist bioaktives IL-12 zu bilden. IL-12p40 wird oft stellvertretend als Maß für die IL-12 Bildung genutzt, so auch in unseren Versuchen. Wichtig zu wissen ist, dass sich p40 Monomere zu Homodimeren zusammenlagern können

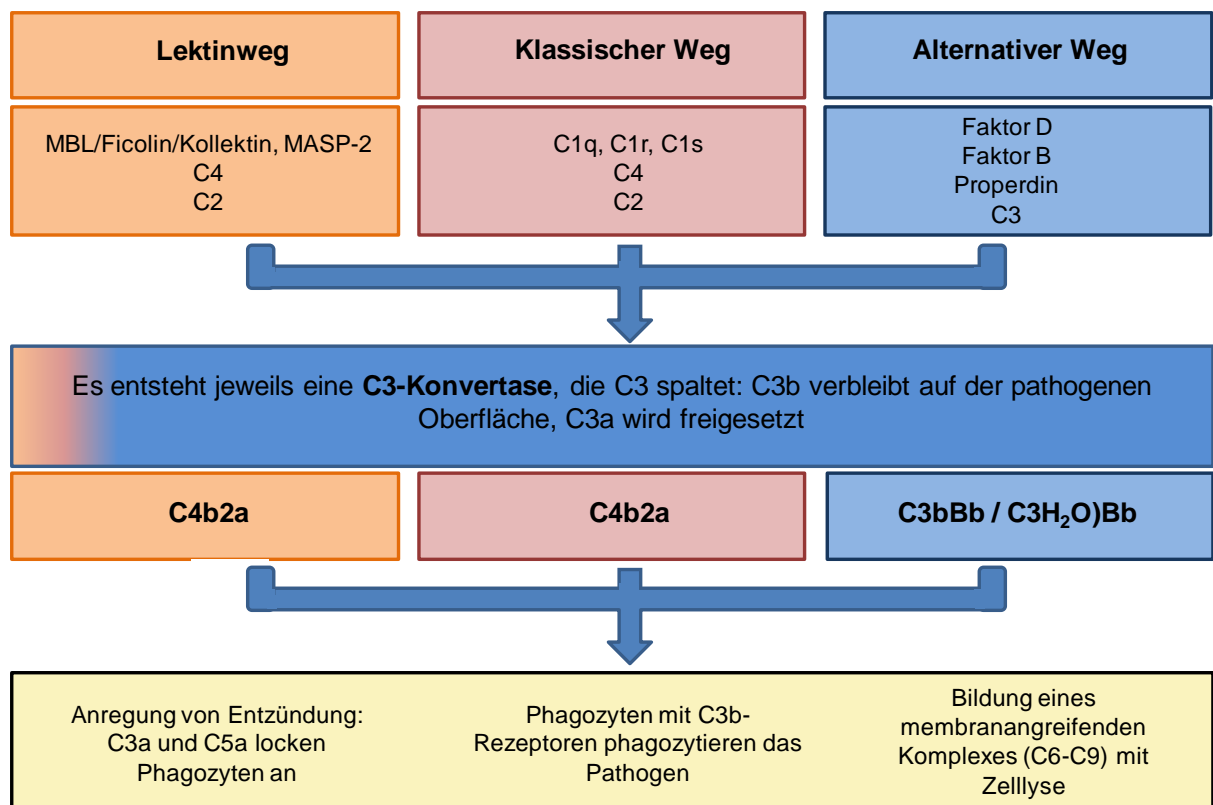
(IL-12p80) und sowohl in der Maus als auch beim Menschen *in vivo* und *in vitro* als IL12 Rezeptor-Antagonist agieren können (Kalinski et al., 2001). Für die Entwicklung einer gegen *L. major* protektiven T<sub>H</sub>1-Immunantwort durch Priming naiver T-Zellen wird IL-12 benötigt (O'Garra, 1998).

### 2.2.3 Komplementsystem

Der Belgier Jules Bordet (1870-1961) entdeckte bereits Ende des 19. Jahrhunderts hitzeinstabile Komponenten im Blutserum, die in der Lage waren Vibrionen zu lysieren (Schmalstieg and Goldman, 2009). Wie man heute weiß, sind die über 30 löslichen Proteine Teil des angeborenen Immunsystems, werden v.a. in der Leber produziert und bilden das Komplementsystem. Sie ergänzen (komplementieren) die antibakterielle Wirkung von Antikörpern und sind inaktive Vorstufen von Proteasen. Einmal angestoßen, aktivieren sie einander in einer fortlaufenden Reaktion (Ezekowitz, 2005, Gros et al., 2008).

Es sind drei Komplementsystemwege bekannt: der klassische Weg, der alternative Weg und der Lektinweg (siehe Abb. 5). Letzterer steht im Fokus dieser Arbeit. Alle drei Pfade münden in einer gemeinsamen Endstrecke und führen über die Aktivierung der C3-Konvertase zu Entzündung, Phagozytose und Bildung des Membranangreifenden Komplexes (MAC) (Yongqing et al., 2012, Gros et al., 2008).

C3 liegt im Blutplasma in einer Konzentration von etwa 1,2 mg/ml vor (Murphy, 2018). Es ist das häufigste Komplementprotein. Bei Spaltung durch eine C3-Konvertase können bis zu 1000 C3b-Moleküle entstehen, die sich auf der Oberfläche eines Pathogens anheften (Sethi et al., 2016).



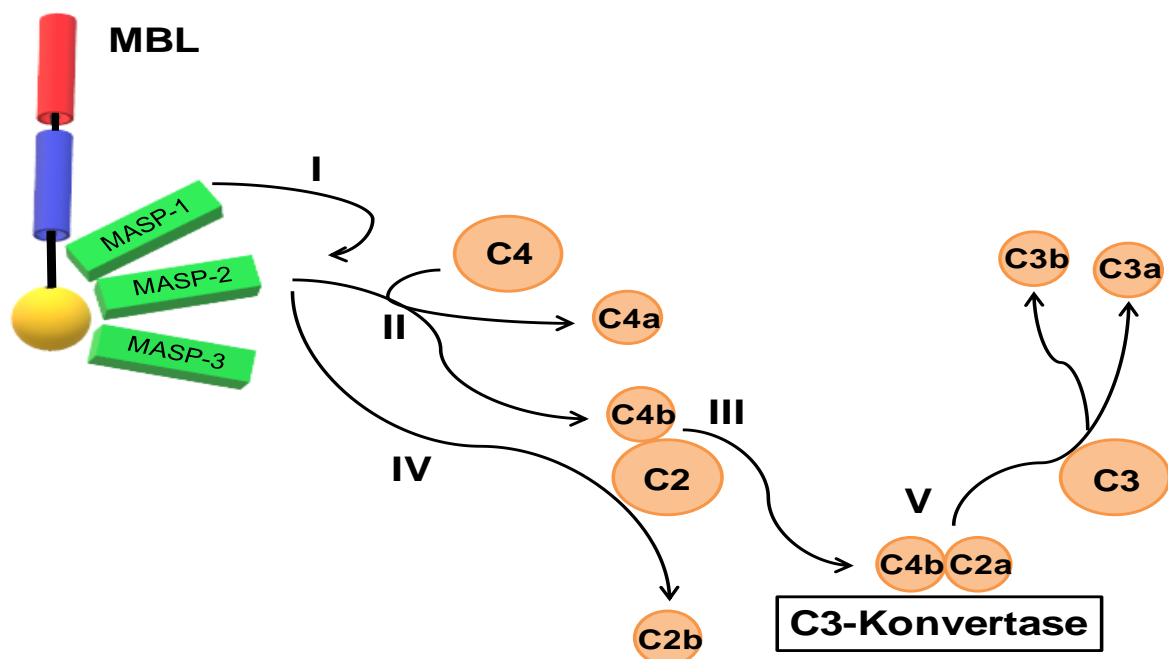
**Abb. 5: Komplementkaskade (in Anlehnung an: (Murphy, 2018)).**

Zeile eins und zwei zeigen die drei Hauptwege des Komplementsystems (Lektinweg, Klassischer Weg und Alternativer Weg) und die dazugehörigen wichtigsten Proteine. In Zeile drei und vier sind die dazugehörigen jeweiligen C3-Konvertasen beschrieben. Zeile fünf fasst die Hauptwirkungen auf die u.a. pathogenen Mikroorganismen zusammen.

#### 2.2.4 Die Aktivierung des Lektin-Weges

Durch die Bindung von Mannose-bindendem Lektin (MBL) an das Pathogen wird eine Kaskade ausgelöst, deren Produkte die Spaltproteine C3a, C3b sowie C4a und C4b sind.

Um zu verhindern, dass die aktivierten Faktoren C4b und C3b vom Ort der Entzündung wegdiffundieren und sich an gesunde Körperzellen anheften, ist ein Sicherheitsschritt eingebaut: C4 und C3 sind homolog und enthalten jeweils eine instabile Thioesterbindung. Wird die kovalente Bindung über diese von C4b und C3b an die pathogene Oberfläche nicht schnell genug ausgebildet, wird die Thioesterbindung der Proteine durch Hydrolyse gespalten. Somit sind sie irreversibel inaktiviert (Garred et al., 2016).



**Abb. 6: Aktivierung des Lektin-Weges (in Anlehnung an: (Murphy, 2018)).**

Bindet MBL an die Pathogenoberfläche, kommt es bei der MBL-assoziierten Serin-Protease-1 (MASP-1, siehe auch Abschnitt 2.2.5) zu einer Konformationsänderung und folglich zu einer Spaltung und Aktivierung von MASP-2 (I). MASP-2 spaltet C4 in C4a und C4b (II). C4b geht nun eine Bindung mit der pathogenen Oberfläche und mit C2 ein (III). Dadurch macht C4b das C2-Molekül für MASP-2 zugänglich, es wird in C2a und C2b gespalten (IV). C4b und C2a bilden zusammen die C3-Konvertase und spalten C3 in C3a und C3b (V) (Murphy, 2018, Gal et al., 2005, Takahashi et al., 2007, Garred, 2016).

Nach Spaltung von C3 folgt nun die Bildung der C5-Konvertasen durch Bindung von C3b an die jeweiligen C3-Konvertasen. Hierdurch entstehen im klassischen Weg und im Lektinweg die C5-Konvertasen C4b2a3b. Bei der Bildung der C5-Konvertase des alternativen Weges entsteht somit C3b<sub>2</sub>Bb. Das Protein C5 wird über eine Akzeptorstelle auf C3b in der C5-Konvertase an die selbige gebunden. Es ist somit zugänglich für die Serinproteasen C2a bzw. Bb und wird in die aktiven Fragmente C5a und C5b gespalten (Garred, 2016).

C3a und C5a sind sogenannte Anaphylatoxine. Sie können durch eine Mastzelldegranulation mit Ausschüttung von Histamin und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), zusammen mit IgE, eine systemische allergische Reaktion bis hin zum allergischen Schock auslösen. Eine Komponente davon ist das Capillary Leak, eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit für Flüssigkeit, aber auch für Immunglobuline und

Komplementfaktoren. Das hierbei entstehende Aufschwämmen des umliegenden Gewebes beschleunigt die Bewegung von APCs, die Mikroorganismen enthalten, zu lokalen Lymphknoten. Hier liegt also eine Schnittstelle zur adaptiven Immunantwort (Barnum, 2015, Hawlisch et al., 2005).

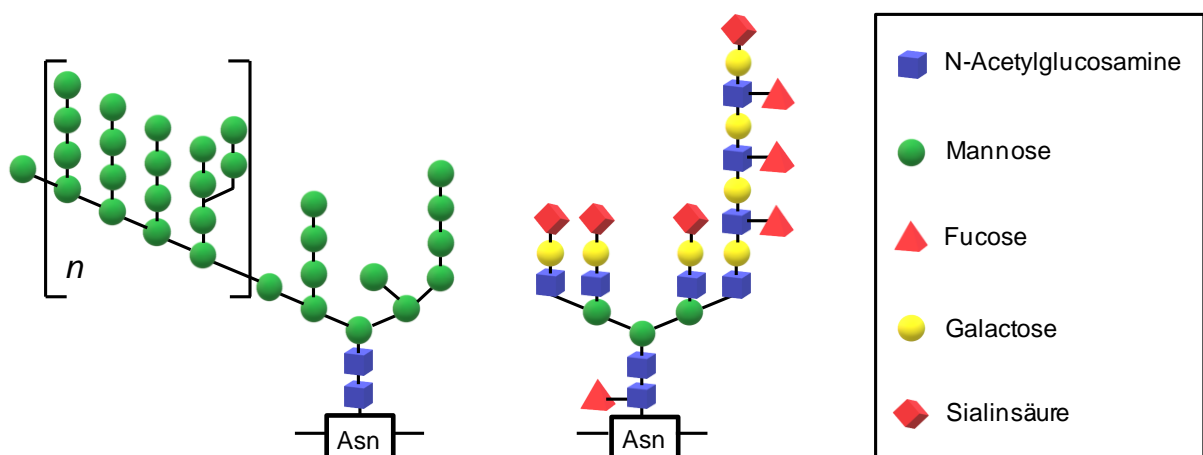
C5a erhöht außerdem die Expression von Komplementrezeptoren (CR1 und CR3) auf neutrophilen Zellen und Monozyten und verstärkt deren Fähigkeit, Mikroorganismen aufzunehmen .

Für den Membran-angreifenden Komplex (MAC) bindet zuerst das C5b-Molekül an ein C6-Molekül. An diesen C5b6-Komplex heftet sich ein C7-Molekül. Diese Zusammenlagerung führt zu einer Konformationsänderung aller drei Faktoren, wodurch auf C7 ein hydrophober Bereich zugänglich wird. Gleiches geschieht mit den C8- und C9-Proteinen, wenn sie an den bestehenden Komplex binden. Mit diesen hydrophoben Anteilen schieben sich die Faktoren in die Lipiddoppelschicht der Mikroorganismen. C8 bewirkt schließlich eine Polymerisierung von etwa 10-16 C9-Molekülen, die sich zu einer porenbildenden Struktur zusammenlagern. Der innere Kanal hiervon ist hydrophil und lässt Wasser sowie gelöste Moleküle durch die Lipiddoppelschicht strömen. Dadurch gehen die zelluläre Homöostase, ebenso der Protonengradient an der Membran verloren und Lysozym kann eindringen (Ram et al., 2010).

Bisher geht man davon aus, dass der MAC eher eine untergeordnete Rolle in der Infektionsabwehr spielt und vor allem bei Gram-negativen Erregern wie *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* zum Tragen kommt (Bayly-Jones et al., 2017, Bloch et al., 1997). Schwere rezidivierende Meningokokken- und Gonokokken-Infektionen sind bisher die wenigen bekannten Erkrankungen, die mit einem Mangel der Endstrecke des Komplementsystems (C5-C9) in Verbindung gebracht werden können (Ram et al., 2010, Susan Farmand, 2017). Man geht davon aus, dass Personen mit einem Mangel an Komplementproteinen der Endstrecke ein fast 600fach erhöhtes Risiko haben an Meningokokken zu erkranken als "gesunde" Personen (Drogari-Apiranthitou et al., 2002).

### 2.2.5 Der Lektinweg

Im Falle des Lektinweges (siehe Abb. 6) sorgen beim Menschen die löslichen kohlenhydratbindenden Proteine MBL, Kollektin-10 und -11 und drei Ficoline (L-Ficolin (Ficolin-2), M-Ficolin (Ficolin-1), H-Ficolin (Ficolin-3)) über ihre Bindung an der Oberfläche des Pathogens für die Komplementaktivierung. Pathogene Oberflächen von z.B. Parasiten, Pilzen, Viren oder Bakterien weisen viele endständige Mannosereste (siehe Abb. 7, von MBL erkannt) oder Oligosaccharide (von den Ficolinen erkannt) auf. Diese werden **pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)** genannt (Garred, 2016, Murphy, 2018). Aber auch apoptotische oder geschädigte Zellen und Zellreste im menschlichen Organismus exprimieren auf ihrer Oberfläche Neoepitope, die von MBL erkannt werden (Takahashi, 2011). Diese werden auch als **damage-associated molecular patterns (DAMPs)** bezeichnet. Im Gegensatz hierzu finden sich bei gesunden menschlichen Zellen endständige Sialinsäurereste, die nicht erkannt werden und somit vor einer Autoimmunreaktion schützen (Garred, 2016).



**Abb. 7: Darstellung von Kohlenhydratseitenketten von Glykoproteinen (in Anlehnung an: (Murphy, 2018)).**

Beispielhaft dargestellt sind die an einen Asparaginrest (Asn) angehängten unterschiedlichen Zuckerreste bei Hefen (links) und Wirbeltieren (rechts). (Murphy, 2018)

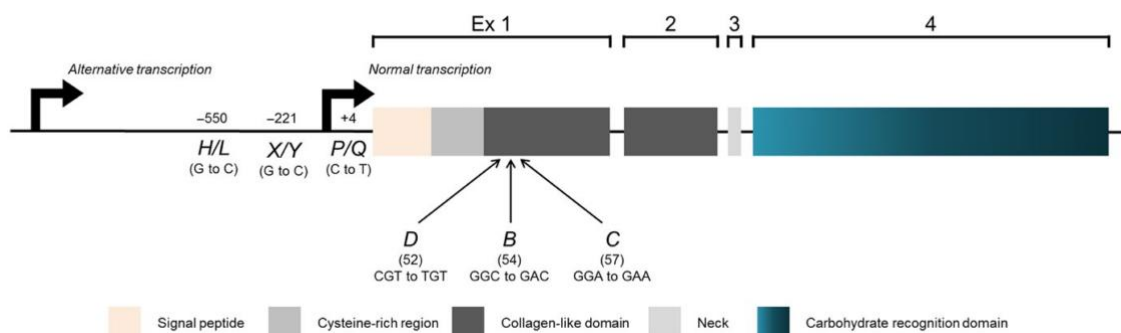
Stimmt die räumliche Anordnung von Mannose- und Fucoseresten auf der pathogenen Oberfläche, heftet sich das reife Oligomer MBL an diese. MBL-Moleküle binden im Plasma an drei verschiedene, inaktive Vorstufen von MBL-assoziierten



Serinproteasen (MASP-1, MASP-2, MASP-3) (Ram et al., 2010, Matsushita et al., 2001, Mishra et al., 2015).

### 2.2.6 Mannose-bindendes Lektin (MBL)

Bereits 1946 wurde erstmals beobachtet, dass ein Faktor im Blut im Stande war Influenza-Viren zu inaktivieren. Es sollten aber noch mehr als 40 Jahre vergehen, ehe es Kawasaki et al. gelang, dieses als MBL zu erkennen und zu extrahieren. Während Nagetiere zwei funktionelle MBL-Gene besitzen (murines MBL-A (mMBL-A) und mMBL-C), finden sich bei höheren Primaten lediglich ein funktionelles Gen, das MBL2-Gen (entspricht mMBL-C), und ein, dem MBL-A entsprechenden, aber funktionsloses Pseudogen MBL1P1. Das hauptsächlich in den Hepatozyten exprimierte MBL2-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q11.2-21). Das Pseudogen MBL1P1 liegt in direkter Nachbarschaft hierzu. Man geht davon aus, dass beide Gene aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden sind. Vier Exons und drei Introns bilden das MBL2-Gen, wovon Exon 4 für die **carbohydrate-binding domain** (CRD) kodiert (Garred, 2016).



**Abb. 8: MBL2-Polymorphismus (Garred, 2016).**

Sechs DNA-Polymorphismen im MBL2-Gen sind mit einer Variabilität der Expression und/oder Funktionalität von MBL assoziiert. Das Ersetzen von nur drei Basen (lokalisiert in Kodon 52 (Allel D), 54 (Allel B) und 57 (Allel C), Wildtyp=A, hier nicht dargestellt) in Exon 1 führt zu drei Aminosäure-Austauschen mit vermindertem Serumspiegel und reduzierter Funktionalität von MBL. In der Promoter 1-Region wurden ebenfalls drei Polymorphismen entdeckt, die je nach Kombination mit anderen Polymorphismen aus der Promoter 1- oder Exon 1-Region unterschiedliche Serumspiegel bewirken.

Das menschliche MBL2-Gen führt über die vier Allelvarianten A (Wildtyp), B, C und D in Exon 1 zur Bildung unterschiedlicher Aminosäurefolgen. Ein Polymorphismus in Kodon 54 führt zur Ausprägung des Allels B, wodurch ein instabiles Protein gebildet und die Kollagenhelix des MBL unterbrochen wird. *In vitro* hergestelltes B/B homozygotes MBL ist nicht in der Lage an MASP-1 (MBL-assoziierte Serin-Protease 1) zu binden und dadurch das Komplementsystem zu aktivieren. Das Allel B findet man bei 13% der Kaukasier und 69% der Afrikaner, Allel A ist zu 80%, bzw. zu 0,3% vertreten. Afrikaner besitzen mit 23% häufiger das Allel C (Ezekowitz, 1998). Auch die Allele C und D gehen mit verminderten MBL-Konzentrationen einher (Hegele et al., 1999).

Generell findet man bei Menschen mit "normalem" Genotyp (A/A) eine 6-8-fache höhere MBL-Konzentration im Serum als bei solchen, die heterozygot für eine Allel-Variation sind (A/B, A/C oder A/D). Dahingegen weisen Menschen mit "defekten" Genotypen (B/B, C/C, D/D, B/C, B/D, C/D) nahezu nicht feststellbar niedrige Serumkonzentrationen auf (Asgharzadeh et al., 2007). Ezekowitz schreibt, dass A/B-Heterozygote sogar eine 20-fache Reduktion ihrer MBL-Konzentration im Vergleich zu A/A-Allelträgern aufweisen (Ezekowitz, 1998).

Hinzu kommen drei Polymorphismen in der Promoterregion des MBL2-Gens an den Positionen -550(H/L), -221(X/Y) und +4(P/Q). Sie modifizieren die Transkriptionsaktivität von MBL. So ergeben sich sieben allgemeine MBL2-Haplotypen über die bisher berichtet werden: HYPA, LYPA und LYQA sind mit hohem Expressionslevel von MBL assoziiert, während LYQC, LXPA, HYPD und LYPB mit einem niedrigen Expressionslevel einhergehen (Mishra et al., 2015, Asgharzadeh et al., 2007, Santos et al., 2001).

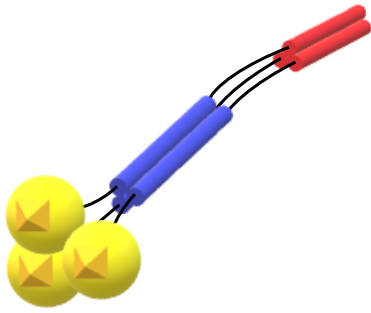
Die meisten Schwankungen des MBL-Serumspiegels können mittels dieser genetischen Aufschlüsselung erklärt werden. Dennoch gibt es einen nicht unerheblichen Anteil, der vermuten lässt, dass epigenetische und hormonelle Faktoren hinzukommen. In vielen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen von MBL-Allel-Varianten und damit einhergehender schwankender Serumspiegel mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert ist. Da sich die initialen Beobachtungen eines Krankheitsverlaufs jedoch nicht replizieren lassen, sind Studien hierzu schwierig. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass MBL2-Schwankungen den Krank-

heitsverlauf von u.a. zystischer Fibrose als Kofaktor beeinflusst (Garred, 2016, Ezekowitz, 2005).

Anlass für Untersuchungsreihen zu MBL war die Beobachtung, dass Kinder, bei denen niedrige Serumspiegel von funktionellem MBL vorlagen, eine Dysfunktion der Phagozytose mit einem erhöhten Risiko für immer wiederkehrende Infektionen aufwiesen (Garred, 2016). Bei ihnen konnte gezeigt werden, dass genetisch ein single-nukleotid-Polymorphismus in der Promoter 1-Region oder in Exon 1 des MBL-Gens vorliegt. Abhängig von der ethnischen Herkunft schwankt die Prävalenz von MBL-Defekten in der Bevölkerung zwischen 5 und 30% (Ezekowitz, 2005, Takahashi, 2011).

In nahezu allen Bevölkerungsgruppen auf dem Globus wurden die MBL2-Polymorphismen nachgewiesen. Die Hypothese, dass die unterschiedlichen Allele und deren Kombinationen eventuelle Vorteile mit sich bringen, konnte in mehreren Studien aber nicht belegt werden. Man geht davon aus, dass sich die unterschiedlichen Allele in den Bevölkerungsgruppen zufällig durchsetzten, ohne einen Überlebensvorteil zu bieten (Garred, 2016).

Nagetiere, so auch unsere Versuchstiere, besitzen im Gegensatz zum Menschen zwei funktionierende MBL-Gene (mMBL-A und mMBL-C) (Seyfarth et al., 2006), die zu 50% homolog sind. Sie ergänzen sich in ihrer Bindungsspezifität, zirkulieren im Serum und aktivieren wie beim Menschen über MASP das Komplementsystem. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem Knockout für beide MBL-Gene (MBL-AC<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bei einer *in vivo*-Infektion mit *Staphylococcus aureus* ein deutlich schlechteres Outcome haben. MBL unterstützt als Opsonin die Phagozytose von Mikroorganismen. Es zeigte sich, dass sich bei MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen sowohl im Blut als auch in den Eingeweiden 24 Stunden nach der Infektion mit *Staphylococcus aureus* signifikant mehr Bakterien als in den Wildtyp-Mäusen befanden. MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse, die eine Stunde vor der i.v.-Infektion mit 75 µg rekombinantem humanem MBL (rhMBL) beimpft wurden, zeigten eine ähnliche Überlebensrate wie die Wildtyp-Mäuse. Das rhMBL musste aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 14-20 Stunden über drei Tage täglich injiziert werden. (Ezekowitz, 2005, Shi et al., 2004).



**Abb. 9: MBL-Trimer (in Anlehnung an: (Murphy, 2018)).** Das MBL-Monomer besteht aus einer Kollagenhelix (rot), einer  $\alpha$ -helikalen Region (blau) und einer carboxyterminalen C-Typ-Lektin-Domäne zur Calcium-abhängigen Kohlenhydraterkennung (gelb). Drei dieser Monomere lagern sich zu einem Trimer (Abb.) zusammen und wiederum zwei bis sechs dieser Trimere bilden zusammen ein reifes MBL-Molekül (Murphy, 2018).

Beim Menschen finden sich Trimere und Tetramere der MBL-Trimere am häufigsten. Die MBL-Trimere lagern sich über Disulfidbrücken zwischen den cysteinreichen Kollagenhelices zu jenen zusammen (Garred, 2016). Das fertige Tetramer besitzt eine hohe Bindungsstärke (Avidität) für sich wiederholende Kohlenhydratstrukturen auf pathogenen Oberflächen. Einzelne MBL-Monomere oder auch MBL-Trimer-Untereinheiten besitzen im Vergleich nur eine geringe Bindungskraft (Matsushita et al., 2001).

MBL liegt meist nur in geringer Konzentration im Blutplasma vor. Erst bei einer Infektion wird die Produktion im Rahmen der akuten Phase gesteigert (Mishra et al., 2015).

### 2.2.7 MBL-assoziierte Serin-Proteasen

**MBL-assoziierte Serinproteasen** (MASP-1, MASP-2, MASP-3) sind wichtige protein-spaltende Enzyme des Komplementsystems. Da nur **Pattern Recognition Molecules** (PRM), die mit MASPs assoziieren, zum Lektinweg zählen, kann man sagen, dass die MASPs den Lektinweg somit definieren. MASPs interagieren zwar mit allen zugehörigen PRMs, sind aber nach ihrer Assoziation zu MBL benannt. Erst in den 1990er Jahren wurden MASP-1 und -2 entdeckt. Es folgten noch drei weitere Mitglieder der MASP-Familie: MASP-3, sMAP (small MBL-associated serine protease) und MAP-1 (Matsushita et al., 2001, Murphy, 2018). Das Gen MASP1 kodiert für MASP-1, MASP-3 und MAP-1, wohingegen das Gen MASP2 für MASP-2 und sMAP kodiert (Garred, 2016).

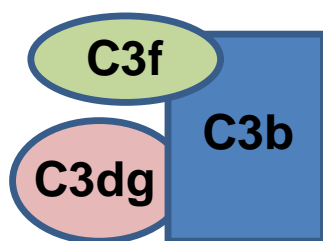
Die Proteasen sMAP, MASP-1 und -2 stammen überwiegend aus Leberzellen (Degn

et al., 2011). MASP-3 wird ebenso hauptsächlich in Hepatozyten gebildet, es kommt aber auch in Milz, Skelettmuskeln, Pankreas, den Ovarien, der Prostata und im Thymus vor (Seyfarth et al., 2006). MAP-1 findet sich in großen Mengen in Herz- und Skelettmuskeln. In Hepatozyten und Nervengewebe liegt es eher in geringeren Mengen vor (Skjoedt et al., 2010).

MASP-1 aktiviert MASP-2 und startet somit den Lektinweg. Es aktiviert aber ebenso MASP-3. Letztere kann nun den Faktor D des alternativen Weges spalten und diesen somit aktivieren. Faktor D spaltet den an C3b gebundenen Faktor B zu Ba und Bb. C3bBb bildet die C3-Konvertase des Alternativen Weges (siehe Abb. 5). Diese Querverbindung des Komplementsystems ermöglicht eine noch schnellere Bildung vieler C3b-Moleküle, die sich auf der Oberfläche des Pathogens anlagern. MASPs spielen ebenso bei Koagulation, Bradykinin-Freisetzung, Endothel- und Thrombozytenaktivierung eine Rolle (Garred, 2016, Hess et al., 2012, Hansen et al., 2015).

### 2.2.8 Komplementfaktor C3 und -rezeptor CR3

Durch die oben beschriebenen Wege entstehen die Opsonine C4b und vor allem C3b, welches sich an Oberflächen von Pathogenen bindet. Gemeinsam mit dem Kofaktor MCP (Membran-Cofaktor der Proteolyse) spaltet die C3-Konvertase das C3f-Fragment von C3b, wodurch inaktives iC3b entsteht (siehe Abb. 10). Dieses Komplementspaltprotein ist ein spezifischer Ligand von CR3 (ebenso für CR2 und CR4, nicht aber für CR1) (Murphy, 2018, Mosser and Edelson, 1985).



**Abb. 10: Abbauprodukte von C3b (in Anlehnung an (Murphy, 2018)).**

Nach Anlagerung von C3b an die Oberfläche des Parasiten, können Faktor I und der Membran-Cofaktor für Proteolyse (MCP) das C3f-Fragment von C3b abspalten, wodurch das inaktive iC3b entsteht. CR3 stimuliert die Phagozytoseaktivität von MΦ, Monozyten, Neutrophilen und FDC.

CR3 wird auch Leukozyten-Integrin  $\alpha_M\beta_2$  oder Mac-1 genannt und besteht aus einem Heterodimer, gebildet aus CD11b und CD18 (CD11b:CD18). CR3 ist ein vielseitiger Leukozyten-assoziiertes Rezeptor mit einer Vielzahl an endogenen und Pathogen-assoziierten Liganden. Er erfüllt hierdurch vielfache Funktionen in Immunabwehr,

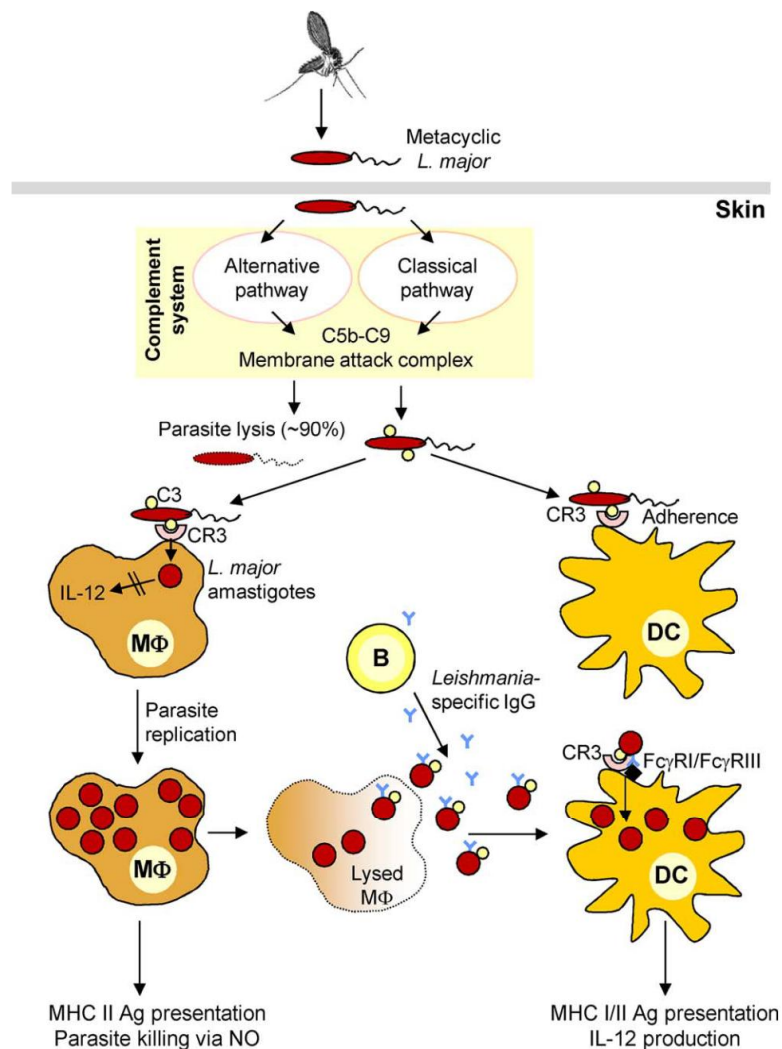
Zelladhäsion und -migration. An CR3 binden extrazelluläre Matrixproteine, ICAM-1 und Lipopolysaccharide von Bakterienoberflächen. Die am besten verstandene Funktion von CR3 ist seine Rolle als Rezeptor für das oben erwähnte iC3b (Carter et al., 2009, Podolnikova et al., 2015).

### 2.3 Abwehrmechanismen von und gegen *L. major*

Etwa 90% der *L. major* werden nach einem Stich direkt durch das Komplementsystem eliminiert (Dominguez et al., 2003). Nur sehr wenige lebensfähige Parasiten kommen (*in vivo*) tatsächlich mit in der Haut angesiedelten Antigen-präsentierenden Zellen (APC, engl. *antigen presenting cells*) in Kontakt. Der bis heute wichtigste bekannte Mechanismus zur Kontrolle einer Infektion mit *L. major* beruht auf der Etablierung einer schützenden T<sub>H</sub>1 Immunantwort, welche durch APC initiiert wird.

Mit Amastigote infizierte DCs, nicht aber infizierte MΦ, sezernieren vermehrt IL-12. Sie sind in der Lage über eine Kreuzpräsentation der Parasitenantigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen (statt auf MHC-Klasse-II) CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen zur Differenzierung zu CD8<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen zu stimulieren, sodass diese IFN-γ freisetzen (Belkaid et al., 2002b, Ashok and Acha-Orbea, 2014). IFN-γ aktiviert infizierte MΦ zur Abtötung von intrazellulären Parasiten durch Stickstoffmonoxid (NO). Das Fehlen von MHC-Klasse-I-Molekülen oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt zu nicht abheilenden Läsionen in Mäusen.

Die Antigenpräsentation über den MHC-Klasse-I-Weg in DCs und das darauf folgende Priming von antigenspezifischen zytotoxischen Zellen sind, genauso wie das Priming von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen im weiteren Verlauf, essentiell für die schützende Immunität gegen Leishmaniasis. APCs und im Speziellen die DCs haben durch die Bildung ihrer Zytokine erheblichen Einfluss darauf, wie eine *L. major* Infektion verläuft (von Stebut et al., 1998, Reiner and Locksley, 1995, O'Garra, 1998, Kautz-Neu et al., 2012, von Stebut and Tenzer, 2017).



**Abb. 11: Phagozytose und Prozessierung von *L. major* (von Stebut and Tenzer, 2017).**

*L. major* nutzt die C3-Opsonisierung, um über CR3 von MΦ phagozytiert zu werden. Hierdurch wird die Ausschüttung von IL-12 durch MΦ unerdrückt. Innerhalb der MΦ vermehrt sich der Parasit. Sie sind hauptsächlich für die spätere Abtötung der Parasiten durch NO und für die Restimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen über MHC-Klasse-II Moleküle verantwortlich. Via FcγRI und FcγRIII nehmen DCs Amastigoten auf, präsentieren deren Antigene sowohl auf MHC-Klasse-I als auch auf Klasse-II Molekülen und fördern das T-Zell-Priming.

### 2.3.1 *L. major*-Infektion: Rolle der Antigen-präsentierenden Zellen

#### Makrophagen

Makrophagen (MΦ) sind hauptsächlich für die primäre Phagozytose, die spätere Abtötung der Parasiten durch NO und die Restimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verant-

wortlich (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Die Parasiten überleben innerhalb der MΦ in phagolysosomalen Strukturen, die als Parasitophorus Vacuole (PV) bezeichnet werden (Walker et al., 2014). Innerhalb dieser PV ändern die Parasiten ihre promastigote Lebensform (10-12 µm) zeitnah zur amastigoten (2-4µm) um und verlieren hierbei ihr Flagellum (Courret et al., 2002). Nachdem die MΦ an einen mit iC3b (bindet an CR3) und gp63 opsonierten Parasiten gebunden hat, lässt sich der Parasit mittels Caveolae (sind omega-förmige Einbuchtungen der Membran) phagozytieren (Moradin and Descoteaux, 2012). Die Metalloproteinase gp63 ist ein typisches Oberflächenprotein von Leishmanien. Das Mannose enthaltende Glykoprotein bindet an einen Fibronectin(mannose)rezeptor (Brittingham et al., 1999). Leishmania fügt dabei in die Phagosomenmembran reichlich von seinem Oberflächenprotein Lipophosphoglykan (LPG) ein. LPG ist einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren der Leishmania (Moradin and Descoteaux, 2012) und scheint die Säurebildung innerhalb der mit *L. major* infizierten PV hinauszuzögern. Dies geschieht einerseits über die Hemmung funktionaler NADH-Oxidase-Komplexe, andererseits blockiert es die Rekrutierung der vakuolen Protonen-ATPase an der PV-Membran. Dadurch wird eine Senkung des pH-Wertes innerhalb der PV verhindert. Dies hat zur Folge, dass sich Promastigote ungehindert in Amastigote wandeln können (Walker et al., 2014) und lysosomale Proteasen nicht aktiviert werden. Diese sind wichtig für die Antigenprozessierung und somit für die Ausbildung einer Immunantwort (Moradin and Descoteaux, 2012). Etwa sechs Stunden nach Infektion mit *L. major* erreicht die Aufnahmeaktivität der MΦ ein Plateau. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion hier auf etwa 60-80% der MΦ übergreift (von Stebut and Tenzer, 2017). Da MΦ zu den wichtigsten Immunzellen im Kampf gegen eine *L. major* Infektion zählen, wurden sie in diese Arbeit mit aufgenommen.

### **Dendritische Zellen**

Über FcγRI und FcγRIII nehmen auch Dendritische Zellen (DCs) Amastigoten auf, präsentieren deren Antigene sowohl auf MHC-Klasse-I- als auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen und fördern das T-Zell-Priming (Ashok and Acha-Orbea, 2014, Kautz-Neu et al., 2011, Zahn et al., 2010, Woelbing et al., 2006). Von den DCs, die erst später aktiv zum Infektionsort gelangen, waren nach 18 Stunden etwa 30% infiziert. Mit *L.*



*major* infizierte DCs nutzen weder Proteasome noch Immunproteasome für die an CD8<sup>+</sup> T-Zellen gerichtete Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen (Brosch et al., 2012). Daher sucht man nach alternativen zytosolischen Proteasen, die hierfür in Frage kommen. Hierbei rücken die Tripeptidylpeptidase II und Nardilysin immer mehr in den Fokus (von Stebut and Tenzer, 2017).

Die Tripeptidylpeptidase II ist die größte bekannte eukaryote Peptidase, deren Hauptaufgabe darin besteht, Zellen von intrazellulären Proteinen durch Abbau zu reinigen. Sie wird auch als Multifunktionspeptidase beschrieben, da sie, zusätzlich zu ihrer „Housekeeping“-Funktion, eine wichtige Rolle in Antigenprozessierung, Apoptose und Zellteilung spielt. Des Weiteren ist sie in Krankheiten wie Muskeldystrophie, Adipositas und Karzinomen involviert (Rockel et al., 2012).

Nardilysin (N-arginine dibasic convertase, Nrdc) ist eine Metalloprotease, die das sogenannte „Ectodomain-shedding“ unterstützt. Hierbei werden die extrazellulären Domänen vieler Membranproteine wie Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und auch TNF- $\alpha$ , proteolytisch gespalten und so in eine lösliche Form überführt. Auf diese Weise wird die Kommunikationsmöglichkeit der Zelloberfläche mit ihrer Umgebung modifiziert und gleichzeitig aktive, lösliche Regulatorproteine geschaffen. Intrazellulär fungiert Nardilysin im Nukleus als Transkriptions-Koregulator (Morita et al., 2017, Sy, 2002).

Während der frühen Phase einer *L. major*-Infektion wandern auch phagozytierende neutrophile Zellen am Ort der Inokulation ein. Sie werden mittels der Tyrosinkinase Mer von DCs (besitzen den Tyrosinkinase-Mer-Rezeptor auf ihrer Oberfläche) aufgenommen. Ihre Depletion gilt als wichtiger Baustein beim Aufbau einer Immunität gegenüber einer Infektion. Im Fall der CL führt die Anwesenheit neutrophiler Zellen jedoch zu einer primären Unterdrückung der Immunantwort, wovon die Parasiten profitieren. Wie *in vitro* Versuchen gezeigt haben, geschieht dies durch vollständige Hemmung der Kreuzpräsentation mittels MHC-Klasse-I-Molekül auf DCs, sobald DCs mit *L. major* infizierte neutrophile Granulozyten (Tyrosinkinase Mer-abhängig) aufnehmen (Ribeiro-Gomes et al., 2015).

Mittels Durchflusszytometrie konnte auf der Oberfläche beider, mit Komplement opsonisierten Lebensformen das Immunglobulin IgM nachgewiesen werden. Daher scheint es keine Rolle bei der bevorzugten Aufnahme der Amastigoten in DCs zu

spielen. Die Immunglobuline IgG1 und IgG2a/b konnten hingegen nur auf Amastigoten detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Immunglobuline die Aufnahme der Amastigoten in DCs wesentlich positiv beeinflussen. Ebenso wurde festgestellt, dass die Rezeptoren FcγRI und FcγRIII hierbei eine essentielle Funktion übernehmen (Kautz-Neu et al., 2012).

### 2.3.2 Proteine des Komplementsystems beeinflussen die *L. major* Infektion

Über den Rezeptor CR1 (Komplementrezeptor 1) nehmen MΦ mittels MBL Pathogene auf. Dieser Vorgang ist im Falle der Leishmaniasis vom Parasiten selbst sogar beabsichtigt, um sich primär ungestört innerhalb der MΦ vermehren zu können (Mishra et al., 2015). Erst nach Platzen der MΦ wird *L. major* zugänglich für DCs und im weiteren Verlauf für das erworbene Immunsystem, welches eine T<sub>H</sub>1-Immunität initiiert (Fischer et al., 2013). Ein Mangel an MBL oder CR1 würde im Umkehrschluss zu einer schlechteren Phagozytose von *L. major* durch MΦ führen. Hierdurch würde am Ende der Kaskade die schützende T<sub>H</sub>1-Antwort über IFN-γ nicht ausgebildet.

CR3 ist ein Heterodimer aus CD 11b und CD18 und auf eben jenen Zellen vorhanden, die normalerweise für die Kontrolle einer *Leishmania*-Infektion wichtig sind: Monozyten, MΦ und Neutrophile.

CR3 ist, wie Fc-Rezeptoren, Mannose-Rezeptoren, TLR 2, TLR3 und TLR4, dafür bekannt, *L. major*-Parasiten in eine Wirtszelle aufzunehmen. Es wird davon ausgegangen, dass die Interaktion des Parasiten mit CR3 dessen „stille“ Aufnahme in die Zelle und somit das Überleben von *L. major* ermöglicht. Mit *L. major* infizierte dermale MΦ zeigen eine verminderte MHC-Klasse-II-Expression, ein gestörtes IFNγ-Signaling, einen Mangel an oxidativem/respiratorischem Burst und eine Inhibition der IL-12-Produktion. Interessanterweise lässt sich das *Leishmania*-Oberflächenmolekül LPG ohne weiteres durch Komplementproteine opsonisieren und bindet direkt an CR3. (Carter et al., 2009, von Stebut and Tenzer, 2017, Locksley et al., 1988, Podolnikova et al., 2015).

CD18<sup>-/-</sup> Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund sind nur begrenzt geeignet, um die Rolle des CR3 in der *L. major* Infektion zu untersuchen. Die Aufnahme Serum-

opsonierter *L. major* inhibierte zwar, wie erwartet, die IL-12-Produktion in Wildtyp-Mäusen und nicht in CD18<sup>-/-</sup> Mäusen, paradoxerweise beherbergten die CD18<sup>-/-</sup> Mäuse aber mehr Parasiten als Wildtyp-Mäuse und zeigten eine vermehrte Parasitenausbreitung im Organismus. In diesem speziellen Fall ist die Unfähigkeit der Parasitenbeseitigung wohl der Tatsache geschuldet, dass CD18 noch Bestandteil anderer wichtiger Moleküle innerhalb des T-Zellkompartiments ist (LFA-1, CR4). Daher kann mit einem Knockout für CD18 allein die Rolle des CR3 nicht untersucht werden (Carter et al., 2009).

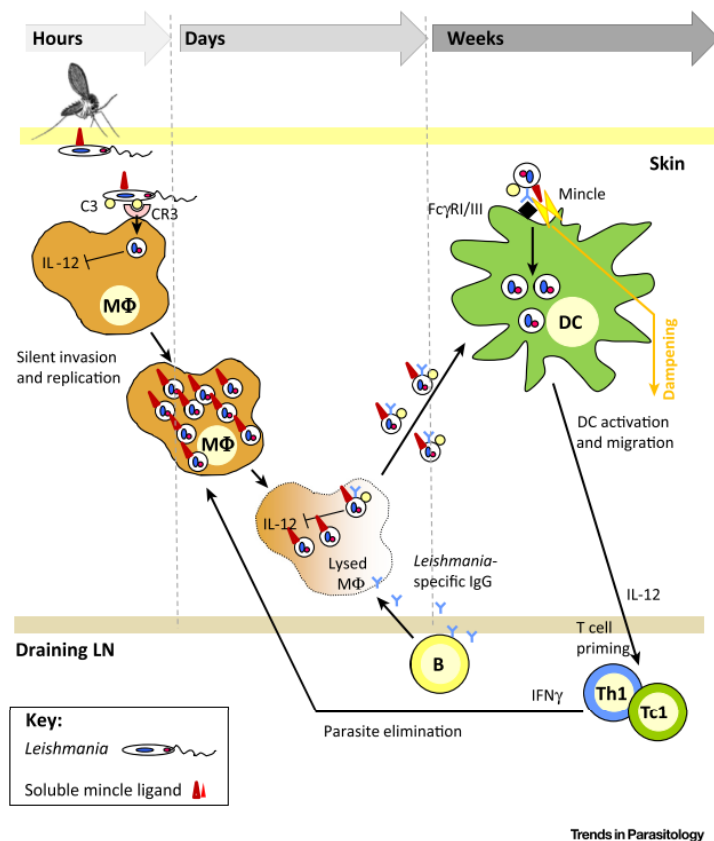
Da eine Ligandenbindung an CR3 auch im Falle einer anderen Infektion als mit *L. major* die Expression von IL-12 inhibiert, liegt die Vermutung nahe, dass *L. major* diesen Weg des Einschleusens in den Wirt gezielt nutzt. Er scheint aber in gesunden Mäusen nur im Zusammenspiel mit anderen immunologischen Vorgängen eine tragende Rolle zu spielen, um die Infektion abzuwehren, wie Carter et al. in mehreren Versuchen herausgefunden haben. Sie konnten u.a. zeigen, dass 9 Wochen nach der intradermalen Infektion ( $10^3$  *L. major*/Ohr) die Ohrläsionen von C57BL/6-Wildtyp und CD11b<sup>-/-</sup> Mäusen gleichermaßen abgeheilt waren (Carter et al., 2009).

### 2.3.3 Mincle-Fc-Komplex der Dendritischen Zellen (DC)

*L. major*-Parasiten setzen einen löslichen Mincle-Liganden frei. Mincle ist ein *pattern recognition receptor* (PRR) und kommt hauptsächlich auf MΦ, DCs und neutrophilen Granulozyten vor. Genauer gesagt ist es ein MΦ induzierendes C-Typ-Lektin, das die Fähigkeit besitzt, beschädigte und mit Pathogenen assoziierte molekulare Strukturen zu erkennen. Es interagiert mit dem FcRγ, über welchen, mit Hilfe von IgG, auch die Aufnahme von *L. major* in DCs stattfindet. Iborra et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Mincle durch diesen parasitären Liganden die DC-Aktivierung (und somit die IL-12-Produktion) hemmt und dadurch die Rekrutierung IFN-γ produzierender T-Zellen hinauszögert. Diese gelten als verantwortlich für die Eradikation des Parasiten. Im physiologischen *low dose* Infektionsmodell konnte gezeigt werden, dass Mincle<sup>-/-</sup> Mäuse die Parasitenreplikation besser kontrollieren als Wildtyp-Mäuse. Sie weisen, bedingt durch die wirksamere Ausbildung der T<sub>H</sub>1/Tc1-abhängigen und schützenden Immunität kleinere Läsionen auf (Iborra et al., 2016).

Mincle interagiert also mit Fc $\gamma$ R<sub>3</sub>, welcher auch für die Aufnahme von *L. major* in DCs nötig ist. Es ist daher nicht verwunderlich, dass der negative Einfluss von Mincle in der *L. major*-Abwehr sich auf DCs begrenzt (von Stebut, 2017b).

Durch Umgehen der M $\Phi$ -Aktivierung mittels „stiller“ Aufnahme in die M $\Phi$  über CR3 und Dämpfung der DC-Aktivierung durch Binden des parasitären Liganden an Mincle, schützt sich *L. major* in den ersten Stunden im Wirtsorganismus vor der einsetzenden Infektionsabwehr durch das Immunsystem.



**Abb. 12: Mincle-abhängige DC-Downregulierung nach *L. major*-Infektion (von Stebut, 2017b).**

Nach der Aufnahme von Promastigoten (die einen Mincle-Liganden ausbilden) in M $\Phi$ , wandeln sich die Promastigoten in Amastigoten um. Die M $\Phi$  lysiert und setzt die Amastigoten frei. Diese werden mit IgG opsonisiert und binden mit dem ihnen erhalten gebliebenen Mincle-Liganden an den Mincle-Fc-Komplex, der auf DC vorkommt. Dadurch wird in DC die Bildung von IL-12 und die nachfolgende T<sub>H</sub>1-Immunantwort gehemmt (von Stebut, 2017b).

Iborra et al. nehmen an, dass der Mincle-Ligand nicht nur von Promastigoten, sondern auch von Amastigoten ausgebildet wird. Sie konnten zeigen, dass der Mincle-Fc-Komplex auch an die in den PV in MΦ enthaltenen Amastigoten bindet. Mincle ist, wie MBL auch, ein C-Typ-Lektin. Während ein Fehlen von MBL jedoch den Krankheitsverlauf der kutanen Leishmaniasis initial dramatisch aggraviert, führt die Abwesenheit von Mincle zu einer Verbesserung der Immunlage (Iborra et al., 2016).

Da *Leishmania* gegen Mincle einen Liganden ausbilden kann, scheint der Parasit sich strategisch an diesem Lektin vorbei zu schleusen, bzw. es für sich zu nutzen. Für MBL ist ein solcher Mechanismus bisher nicht bekannt. Es scheint also dem Komplementsystem, oder zumindest dem Initiator MBL, eine tragende Rolle in der Abwehr zuzukommen, die bisher noch nicht in Gänze verstanden ist. Währenddessen bietet der Mincle-Ligand eventuell eine Grundlage für spätere Behandlungsansätze, z.B. durch Antikörpertherapien. Zuvor muss aber geklärt werden, auf welchen Zellen genau sich Mincle befindet und welche Rolle es dort spielt (von Stebut, 2017b).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Parasiten

*L. major*, Klon V1 (MHOM/IL/80/Friedlin)

Institut Pasteur, Paris,  
Frankreich

#### 3.1.2 Mäuse

C57BL/6

Janvier Labs, Saint-Berthevin,  
Cedex, Frankreich

C57BL/6 MBL-AC<sup>-/-</sup>

AG von Stebut- Borschitz,  
Hautklinik der Universitätsme-  
dizin Mainz

NOD-scid  $\gamma c^{-/-}$  (hier C5<sup>-/-</sup> genannt)

Freundliche Gabe des TARC,  
Translational Animal Research  
Center der Universitätsmedizin  
Mainz

C57BL/6 129S4-C3<sup>tm1Crr</sup>/J (hier C3<sup>-/-</sup> genannt)

Freundliche Gabe der AG Ruf,  
Centrum für Thrombose und  
Hämostase (CTH), Universi-  
tätsmedizin Mainz

#### 3.1.3 Antikörper

Anti-Maus CD86 FITC, Klon B7-2 (GL1)

BD Pharmingen, Heidelberg

Anti-Maus CD54 FITC, Klon 3E2

BD Pharmingen, Heidelberg

Anti-Maus CD40 FITC, Klon HM40-3

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD11b FITC, Klon M1/70

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD11c FITC, Klon N418	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus Ly6b=F7/4 FITC, Klon 7/4	Bio-Rad, München
Ratte IgG2b FITC, Klon A95-1	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2a FITC, Klon eBR2a	eBioscience, Frankfurt
Arm. Hamster IgG1 FITC, Klon eBio299Arm	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus MHC II APC, Klon M5/114.15.2	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus Ly6G APC, Klon 1A8	BioLegend, Koblenz
Ratte IgG2b APC, Klon eB149/10H5	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2a APC, Klon eBR2a	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD11c PE, Klon N418	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus Ly6C PE, Klon HK1.4	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus F4/80 PE, Klon BM8	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2a PE, Klon r2a-21B2	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2c PE, Klon RTK4174	BioLegend, Koblenz
Arm. Hamster IgG PE, Klon eBio299Arm	eBioscience, Frankfurt
Fc-Block (Anti-Maus CD16/32), Klon 2.4G2	BD Pharmingen, Heidelberg

### **3.1.4 Differenzierungsfaktoren und Zytokine**

Rekombinantes murines IL-4 (rm IL-4; 10 ng/μl)	PeptoTech, Offenbach
Rekombinantes murines GM-CSF (rm GM-CSF; 10 ng/μl)	PeptoTech, Offenbach

**3.1.5 Verwendete Kits**

Mouse IFN- $\gamma$ ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience GmbH, Frankfurt
Mouse IL-4 ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience GmbH, Frankfurt
Mouse IL-10 ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience GmbH, Frankfurt
DuoSet ELISA Mouse IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse IL-12/IL-23p40	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse IL-17A	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse IL-23	R&D Systems, Wiesbaden

**3.1.6 Puffer und Verbrauchslösungen**

Sämtliche Puffer und Medien wurden beim Ansetzen steril filtriert (Porengröße 0,2 $\mu$ m) und zur Aufbewahrung bei 4°C gelagert (sofern nicht anders erwähnt).

PBS (10x):	1,38 M NaCl 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O, pH 6,6 in dH <sub>2</sub> O
PBS (1x, Gebrauchslösung)	10x PBS und dH <sub>2</sub> O im Verhältnis 1:10, pH 7,3, autoklavieren
FACS-Puffer	2% (v/v) FCS 0,01% (v/v) NaN <sub>3</sub> , 10%ig In sterilem PBS
Paraformaldehyd (PFA), 4%ig	4% (w/v) Paraformaldehyd, pH 7,2 In sterilem PBS, Lagerung bei -20°C
Ficoll-Lösung, 20%ig	20% (w/v) Ficoll in dH <sub>2</sub> O



Ficoll-Lösung, 10%ig	20%iges Ficoll und DMEM im Verhältnis 1:1
ELISA-Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween 20 (Polyoxythylen(20)-sorbitan monolaurat) in PBS
Assay-Puffer IL-4 ELISA	20% (v/v) 5x AD in dH <sub>2</sub> O
Assay Puffer IL-10 ELISA	20% (v/v) 5x AD in dH <sub>2</sub> O
Assay-Puffer IFN $\gamma$ ELISA	20% (v/v) 5x AD in dH <sub>2</sub> O
Assay Puffer IL-6 ELISA	1% (w/v) BSA in sterilem PBS
Assay-Puffer IL-12p40 ELISA	1% (w/v) BSA in sterilem PBS
Assay-Puffer IL-17A ELISA	1% (w/v) BSA in sterilem PBS
ELISA-Stopplösung	1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Adenin	10 mM Adenin 5% (v/v) 1 M HEPES in dH <sub>2</sub> O
HEPES	1 M HEPES, pH 7,4, in sterilem PBS
PBS/Glukose/EDTA-Puffer	0,2% (w/v) Glukose 2 mM EDTA, pH 6,5 in sterilem PBS
Kollagenase-Medium	100 U/ml / 100 $\mu$ g/ ml Penicillin/ Streptomycin 0,1% (w/v) Kollagenase A in DMEM Pro Well: 1,5 ml DMEM + 15 $\mu$ l Pen/Strep + 1,5 mg Kollagenase A Pulver
Schneiders Medium	10% (v/v) FCS 2% (v/v) Urin (human) 2% (v/v) 200 mM L-Glutamin 100 U/ml / 100 $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin

<i>Leishmania</i> -Medium	0,5% (v/v) 1 M HEPES in Schneiders <i>Drosophila</i> Medium 70% (v/v) Medium-199 (1x) 20% (v/v) FCS 4% (v/v) 1M HEPES 2,8% (v/v) Medium-199 (10x) 1% (v/v) 10mM Adenin 100 U/ml / 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin 0,2% (v/v) Hemin, 0,25%ig
RPMI <i>complete</i> -Medium	5% (v/v) FCS 100 U/ml / 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin 1% (v/v) 1 M HEPES 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren 0,1% (v/v) 50 mM β-Mercaptoethanol in RPMI-1640
Makrophagen-Medium	10% (v/v) FCS 100 U/ml / 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM
Biogel	4,17% (w/v) Biogel P-100 Gel Biorad 150-4170 in sterilem PBS

### 3.1.7 Reagenzien und Chemikalien

Adenin	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest. (dH <sub>2</sub> O), steril	B. Braun, Melsungen
BSA Bovines Serumalbumin	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

---

EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol 70%ig (v/v), vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
FACS Clean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Rinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Flow Sheath Fluid	BD Pharmingen, Heidelberg
Ficoll® 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, AT
Forene (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden
L-Glutamin, 200 mM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Helipur H plus N	B. Braun, Melsungen
HEPES, Pufferan, ≥99,5%	Carl Roth, Karlsruhe
Ionomycin, Kalzium-Salz	Life Technologies Corp., Grand Island, USA
M199 Medium (10x)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
M199 Medium (1x)	Gibco INvitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol, 99% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
P-100 Gel Bio-Rad 150-4170	Bio-Rad, München
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin, 10000 U/ml bzw. 10000 µg/ml	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phosphorsäure, 85%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rekombinantes Maus IL-17A	R&D Systems, Wiesbaden
Rekombinantes Maus IL-12p40	R&D Systems, Wiesbaden
Rekombinantes Maus IL-4	eBioscience, Frankfurt
Rekombinantes Maus IL-10	eBioscience, Frankfurt
Rekombinantes Maus IFN $\gamma$	eBioscience, Frankfurt
RPMI-1640, ohne L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schneiders Drosophile Medium, modifiziert	BioWhittaker/Cambrex BioScience Verviers, Belgien
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

---

---

Straptavidin-Meerrettichperoxidase	eBioscience, Frankfurt
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	R&D Systems, Wiesbaden
Substrat-Lösung A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), BD Opteia™	BD Biosciences, San Diego, USA
Substrat-Lösung B (Tetramethylbenzidin, TMB), BD Opteia™	BD Biosciences, San Diego, USA
TMB Substrat-Lösung	eBioscience, Frankfurt
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween-20	AppliChem, Darmstadt

### 3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Bottle-Top Filter, 0,2 µm	Biochrom, Berlin
Deckgläschen	VWR, Darmstadt
Edelstahlklemme Zytospin	VWR International GmbH, Darmstadt
FACS-Röhrchen, Rundboden, 5ml, PS	BD Pharmingen, Heidelberg
Falkon, konischer Boden, PP, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Falkon, konischer Boden, PP, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filterkarten Zytospin	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
GentleMACS™ M Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Handschuhe, Sempermed S, M	Apotheke, Universitätsmedizin
Kanüle, Microlance 3, 23G x 1¼, 0,6 x 30	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht
MaxiSorp Nunc-Immuno Platten, 96 Well	Nunc, Brandt, Wertheim
Mikrotiterplatten, 96 Well, Rundboden	BD Pharmingen, Heidelberg
Mikrotiterplatten, 96 Well, Rundboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger, geschliffen, Mattrand	Diagonal, Münster
Parafilm M Laboratory Film	Pechiney Plastic, Chicago, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pellet-Pestelmotor-Spitzen, PP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pipettenspitzen, 0,1-10 µl	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, 10-200 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 200-1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen

---

---

Rundbodenplatte, 96 Well, PS, unsteril	BD, Heidelberg
Serologische Pipetten, 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipetten, 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipetten, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Skalpell, steril	B. Braun, Melsungen
Splitterpinzette Uhrmacher	Burchardt & Zimmermann Medizin-Technik, Mainz
Spritze Discardit II, 5 ml	BD, Pharmingen, Heidelberg
Spritze Discardit II, 10 ml	BD, Pharmingen, Heidelberg
Spritze Injekt, 2 ml	B. Braun, Melsungen
Spritze Injekt-F Tuberkulin, 0,01-0,1 ml	B. Braun, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm Porengröße	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflaschen ohne Filter, 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen mit Filterdeckel, 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 6 Well, Flachboden, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 24 Well, Flachboden, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 96 Well, Flachboden, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb, 70 µm Porengröße	BD, Pharmingen, Heidelberg
Zytologietrichter	VWR International GmbH, Darmstadt

### 3.1.9 Geräte

Absorptionsmikroplattenleser	ELx808TM BIO-TEK Instruments, Bad Friedrichshall
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell®	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
Durchflusszytometer Accuri™ C6	BD, Pharmingen, Heidelberg
GentleMACS™ Octo Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kolbenhubpipetten	Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich
Kühlbrutschrank	Memmert, Schwabach
Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar

---

Mikroskop Leica DM IL	Leitz, Wetzlar
Neubauer Zählkammer, 0,1 mm Tiefe	LO-Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Pellet-Pestelmotor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
pH211 Mikroprozessor-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten Pipetman	Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schieblehre, digital, 150 mm	Rheinwerkzeuge, Mainz
Ständer für Reagiergefäße	VWR/Merck, Darmstadt
Sterilbank Gelaire® BSB 6A	Flow Laboratories, Meckenheim
Stromgeber Power PAC 1000	Bio-Rad Laboratories, München
Ultrazentrifuge Optima™ L-80 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge T-1065	Kontron Instruments, Thermo Fisher, Schwerte
Varioklav, Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortex-Schüttler REAX Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Typ GFL-1003	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
Zentrifuge Multifuge 3L-R	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
Zytospin-Zentrifuge Cellspin II	Tharmac GmbH, Waldsolms

## 3.2 Experimentelle Methoden

### 3.2.1 Tierversuche & -haltung

Die Mäuse, die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit in Versuche eingeführt wurden, wurden entsprechend dem aktuellen Tierschutzgesetz unter Aufsicht des Translational Animal Research Center (TARC) der Universitätsmedizin Mainz und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durch Mitarbeiter dieser Einrichtung artgerecht gehalten. Die Infektion mit *L. major*, Organentnahmen und das Töten der Tiere ereigneten sich in den Räumlichkeiten dieser Einrichtung.

### 3.2.2 Neubauer Zählkammer

Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer lässt sich die Zellzahl einer Zellsuspension ermitteln. Die pelletierten Zellen werden in 1-5 ml Medium resuspendiert und 1:10 oder 1:100 in Trypanblau verdünnt. *L. major*-Promastigoten werden hingegen in einer 1:100 Verdünnung in PFA (4%) fixiert. Durch das Einbringen von 10 µl der Verdünnung unter das Deckglas entsteht die geforderte Flüssigkeitshöhe von 0,1 mm. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mithilfe folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl}/16 \text{ Felder}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} 10^4$$

Das Auszählen erfolgte unter einem Lichtmikroskop. Hierbei galten helle, runde Zellen als lebend, dunkle Zellen als tot. Gezählt wurden nur die lebenden Zellen.

### 3.2.3 Blutentnahme und Herstellung von (hitzeinaktiviertem) Mausserum

#### Blutentnahme

Da im Rahmen des *in vivo* Versuchs „Ohrmessung“ überprüft werden musste, dass die vorliegenden C3<sup>-/-</sup> Mäuse tatsächlich homozygot für den Knockout sind, wurde von den Zuchttieren Blut gewonnen und mittels PCR untersucht. Für die Blutentnahme wurde je Maus 50 µl EDTA in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Die Betäu-

bung erfolgte mit Isofluran und die Punktion der *Vena facialis* mittels einer Lanzette 3-4 mm dorsokaudal des Halswirbels am Unterkieferrand. Hierdurch konnten jeweils etwa 100 µl Blut gewonnen werden. Der Blutstropfen wurde direkt in vorgelegtem EDTA aufgefangen.

### **Herstellung von Mausserum**

Zur Herstellung von Mausserum wurde die Maus mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. Die Desinfektion erfolgte großzügig mittels 70%igem Ethanol. Für die Freilegung des Herzens wurde der Zugang über den ventralen Brustkorb gewählt. Nach Durchtrennung der Aorta direkt unterhalb des Herzens, konnte das sich in der Thoraxhöhle sammelnde Blut in einem Falcon ohne Zusätze gepoolt werden.

Um ca. 200 µl Serum zu erhalten, benötigt man etwa 500 µl Blut. Dieses wurde 30-60 min bei Raumtemperatur gelagert und anschließend 30 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der hiernach sichtbare Überstand wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Nach diesem Verfahren wurden im Rahmen dieser Arbeit die Seren von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen, MBL-AC<sup>-/-</sup>, C5<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Mäusen hergestellt.

### **Herstellung von hitzeinaktiviertem C57BL/6 Mausserum**

Um Mausserum bzw. die darin enthaltenen Proteine zu inaktivieren, wurde das gewünschte Volumen nach Herstellung (s. o.) zusätzlich für 30 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt. Die Aufbewahrung erfolgte anschließend ebenfalls bei -20°C.

### **3.2.4 Gewinnung von Gewebemakrophagen und Generierung von *bone marrow derived dendritic cells* (BMDC)**

#### **Biogel-Gewebemakrophagen**

Um Gewebemakrophagen zu gewinnen, wurden der betäubten Maus an Tag 0 (d0) mit einer Spritze und Kanüle etwa 2 ml Biogel in den Nacken direkt unter die Haut injiziert. Dies erfolgte steril und nach Desinfektion der Injektionsstelle.



Die im Biogel enthaltenen Polyacrylamid Beads induzieren im Gewebe eine Entzündungsreaktion, die durch Neutrophile und Makrophagen dominiert wird. Etwa 24h *post injectionem* (p.i.) finden sich überwiegend Neutrophile, Nach weiteren 3-5 Tagen werden diese durch Gewebemakrophagen ersetzt (John et al., 2013). Für die Versuche dieser Arbeit erfolgte die Biogel-Ernte an Tag 4 (d4) p.i. Hierfür wurde die Maus mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und desinfiziert, die Haut über dem Gelbuckel eingeschnitten und das Gel mit Hilfe einer 5 ml serologischen Pipette abgezogen. Das gesammelte Biogel wurde in PBS und anschließend durch einen Filteraufsatz (Porengröße 70 µm) in ein Falcon überführt. Es folgte das Zentrifugieren der Suspension für 8 min bei 200g und 4°C, wonach der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde je nach Größe in 1-2 ml MΦ-Medium resuspendiert und 1:10 verdünnt in Trypanblau gezählt.

Um eine möglichst große Ausbeute zu erzielen, wurden die MΦ nun in unbeschichteten Petrischalen (PS) ausgesät. Als Richtwert galten hier 15-20 x 10<sup>6</sup> Zellen pro PS. Die Zellen wurde in 10 ml MΦ-Medium aufgenommen und ausgesät. Es erfolgte eine Inkubation der PS für 4h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zwischendurch wurde die Adhärenz der Zellen am PS-Boden lichtmikroskopisch kontrolliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit sollten die MΦ am Schalenboden haften. Der Medienüberstand (ÜS) wurde verworfen, die Petrischale zweimal vorsichtig mit 10 ml PBS gespült und das PBS ebenfalls entsorgt. Um die MΦ aus der Schale zu lösen, wurden 5 ml von auf 4°C gekühltem PBS/Glukose-Puffer in die Petrischale pipettiert und diese für 30 min auf Eis gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde der Schalenboden gründlich mit 5 ml serologischen Pipetten gespült und die Suspension in ein 50 ml Falcon überführt. Das anschließende Zentrifugieren erfolgte für 8 min bei 200 g und 4°C. Der Medienüberstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml MΦ-Medium resuspendiert und 1:10 in Trypanblau verdünnt gezählt. Für nachfolgende Versuche wurde eine Zellkonzentration von 0,4 x 10<sup>6</sup> MΦ/ml mittels MΦ-Medium eingestellt.

### **Bone marrow derived dendritic cells (BMDC)**

Nach Euthanasie mit CO<sub>2</sub>, gründlicher Desinfektion der Hinterläufe, des Unterbauchs und des hinteren Rückens wurde die Maus auf den Rücken gedreht und ein Bein unter leichtem Zug am Fuß gestreckt. Nun wurde die Haut mit Fell am Fußgelenk

(oberhalb der „Ferse“) gegriffen und kräftig nach proximal bis zum Becken vom Muskel abgezogen. Nun wurde das Venen-Ader-Geflecht des Oberschenkels aufgesucht und das Bein proximal davon mit einem Skalpell aus dem Hüftgelenk getrennt. Der Fuß wurde auf Höhe des Sprunggelenks entfernt. Nun konnte durch Hyperextension im Kniegelenk der Band- und Kapselapparat zerstört und somit das Femur und die Tibia unabhängig voneinander aus dem Muskelfleisch gelöst werden. Hierfür wurde der jeweilige Knochen der Länge nach mit etwas Druck nach oben bzw. nach unten aus dem Bein herausgeschoben. Das Wadenbein zerbricht bei diesem Vorgang. Die Knochen wurden kurz in 70%-igem Ethanol geschwenkt und anschließend in eine Petrischale mit Medium überführt. Hierfür werden 5 ml RPMI-Complete und 5 ml 1x PBS 1:1 gemischt. Im Medium liegend wurden die Enden der Knochen im Bereich der Epiphysen mit dem Skalpell abgetrennt. Von einem Ende her wurde anschließend mit einer Spritze das sich in der Petrischale befindliche Medium in den Knochen eingespritzt und so das Knochenmark aus dem Inneren heraus gespült.

Das freigesetzte Knochenmark wurde anschließend im Medium resuspendiert und über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon gegeben. Die Petrischale wurde zweimal mit PBS gespült und der Puffer ebenfalls in das Falcon überführt.

Um einer Verklumpung der Knochenmarkzellen beim Zentrifugieren vorzubeugen, wurden pro Falcon die Knochen von maximal drei Tieren verwendet.

Das Zentrifugieren erfolgte für 8 min bei 200 g und 4°C. Das Pellet wurde in 1 ml ACK-Lösung resuspendiert und für 3 min inkubiert. Dadurch werden die enthaltenen Erythrozyten lysiert. Anschließend wurde das Falcon mit PBS aufgefüllt und unter denselben Bedingungen erneut zentrifugiert.

Es folgten die Resuspension des Zellpellets in 2-5 ml RPMI-Complete, die Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung und Zählung unter dem Lichtmikroskop sowie die Aussaat der Knochenmarkzellen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen.

Pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit Filterdeckel wurden etwa 40 x 10<sup>6</sup> Zellen in 20 ml RPMI-Complete ausgesät und dem Medium folgende Zytokine zugesetzt:

20 µl IL-4	(Arbeitslösung 10µg/ml)
20 µl GM-CSF	(Arbeitslösung 10µg/ml)

Die Zellkulturflasche wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

An Tag 2 (d2) sind die Zellen am Flaschenboden adhärent. Die Flasche wurde leicht geschwenkt, um nicht adhärente Zellen zu lösen und mit dem Medium abzugießen. Ersetzt wurde es mit 15 ml frisch mit Zytokinen versetztem Medium.

An Tag 4 (d4) sind die Zellen nicht mehr adhärent. Das Medium wurde mit 5 ml frischem Medium und Zytokinen ergänzt.

Am 6. Tag (d6) der Inkubation wurden die Zellkulturflaschenvorsichtig geschwenkt, um eventuell noch adhärente *bone marrow derived dendritic cells* (BMDC) vom Boden zu lösen. Der vollständig abgenommene Überstand wurde für 8 min bei 200 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet anschließend je nach Größe in 1-3 ml RPMI-Complete resuspendiert und die Lebendzellzahl (siehe Neubauer Zählkammer) ermittelt. Gezählt wurden nur die großen, runden Zellen, zum Teil wiesen sie schon Dendriten auf. Für die nachfolgenden *in vitro* Infektionsversuche wurde mit RPMI-Complete eine Konzentration von  $0,4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### **3.2.5 *L. major*: Kultivierung, Isolierung, Opsonisierung von Promastigoten und Amastigoten-Generierung**

#### **Kultivierung von *L. major* Promastigoten**

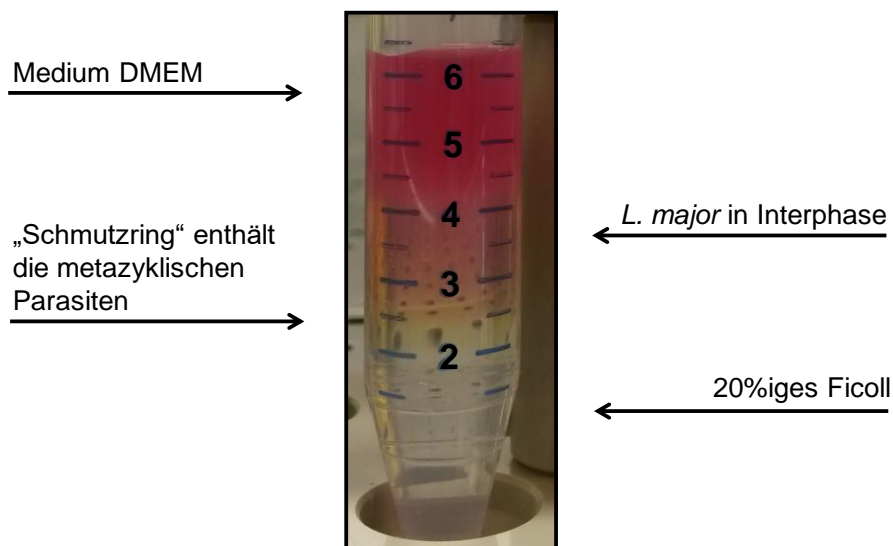
Die für diese Arbeit genutzten Promastigoten wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 27°C kultiviert. Hierfür wurden diese dreimal wöchentlich 1:10 gesplittet und mit frischem Leishmanien-Medium versorgt. Auf diese Weise lässt sich die Linie der promastigoten Form von *L. major* über mehrere Tage bis wenige Wochen unter anaeroben Bedingungen in der prozyklischen, nicht-infektiösen Log-Phase bei 27°C kultivieren (Ramer-Tait et al., 2012).

#### **Isolieren von *L. major* Promastigoten**

Für die Durchführung der *in vitro* und *in vivo* Infektionen müssen zuerst metazyklische promastigote Leishmanien isoliert werden, die die hochinfektiöse Lebensform darstellen. Die Kultur sollte hierfür 6-9 Tage alt sein. Für die Isolation wurden die Leishmanien-Kulturen 1:1 mit DMEM in einem Falcon ergänzt und anschließend für 8

min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Parasiten und wurde erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand erneut abgenommen, diesmal jedoch für 8 min bei 3000 g zentrifugiert. Das nun die Parasiten enthaltende Pellet wurde in 2 ml DMEM resuspendiert. Um die lebenden Parasiten von totem Zellmaterial zu trennen, bedurfte es nun der Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten. Hierfür wurden 2 ml 20%iges Ficoll in einem 15 ml Falcon vorgelegt, 2 ml 10%iges Ficoll langsam darauf geschichtet und anschließend die 2 ml Zellsuspension vorsichtig darüber pipettiert.

Nach dem Zentrifugieren (15 min bei 3000 g, ohne Bremse) sieht man zwischen der unteren und der mittleren Phase einen weißen „Schmutzring“. Die Suspension oberhalb dessen enthält die sich in der Interphase befindenden infektiösen Leishmanien. Sie wurde abgenommen, in ein neues Falcon überführt und dieses mit etwa 10 ml DMEM aufgefüllt. Es folgte ein erneuter Zentrifugierungsschritt für 8 min bei 3000 g. Danach lagen die metazyklischen Parasiten im Pellet vor. Um die Anzahl der *L. major* zu bestimmen, wurde das Pellet in 1 ml DMEM resuspendiert und die Parasiten 1:100 in 4%igem PFA mittels Neubauer Zählkammer gezählt.



**Abb. 13: Ficoll-Dichtegradient.**

Für die intradermale Infektion in die Ohren von Mäusen wurden je nach Bedarf folgende Parasitenkonzentrationen mit DMEM eingestellt:

Hochdosis:  $20 \times 10^6$  Parasiten/ml ( $2 \times 10^5/10 \mu\text{l}$ )

Physiologische Niedrigdosis:  $0,1 \times 10^6$  Parasiten/ml ( $10^3/10 \mu\text{l}$ )

### **Opsonisierung der *L. major* Parasiten**

Nach Isolation der Parasiten wurde die Zellsuspension der Anzahl der gewünschten Ansätze entsprechend mit einem adäquaten Volumen an DMEM aufgefüllt. Pro Ansatz wurde jeweils 1 ml der Parasitensuspension in ein 15 ml Falcon überführt. Für diese Arbeit wurden folgende Ansätze der Promastigotensuspensionen gewählt:

- 1) reine Promastigotensuspension
- 2) + 50  $\mu\text{l}$  C57BL/6 NMS (5% v/v)
- 3) + 50  $\mu\text{l}$  C57BL/6 NMSi (5% v/v)
- 4) + 50  $\mu\text{l}$  MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS (5% v/v)
- 5) + 50  $\mu\text{l}$  C5<sup>-/-</sup> NMS (5% v/v)
- 6) + 50  $\mu\text{l}$  C3<sup>-/-</sup> NMS (5% v/v)

Nach dem Zusetzen der entsprechenden Seren in die Promastigotensuspensionen wurden die Ansätze für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Hierbei ist auf eine strikte Einhaltung der Zeitvorgabe zu achten, da das Serum toxisch auf die Parasiten wirkt und diese bei längerer Inkubation abtötet. Nach der Wärmeinkubation wurden pro 15 ml Falcon 10 ml DMEM zugefügt und für 8 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes erfolgte die Resuspension in 1 ml DMEM und die Zählung in der Verdünnung 1:100 in 4%igem PFA. Die Opsonisierung hält nicht länger als 1-2 h an, deshalb war eine zügige Weiterverarbeitung der Parasiten notwendig.

Für die Infektion der M $\Phi$  bzw. der BMDC wurde eine Konzentration von  $50 \times 10^6$  Parasiten/ml über einen eventuell zweiten Zentrifugierungsschritt (8 min bei 3000 g), und die Resuspension in weniger ml DMEM, eingestellt.

### Generierung von Amastigoten

Für die *in vitro*-Versuche mit endogen gereiften *L. major* Amastigoten mussten diese zunächst generiert werden. Hierfür wurden C57BL/6, MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Mäuse intradermal in beide Ohren mit einer Hochdosis ( $2 \times 10^5$  Parasiten) an metazyklischen *L. major* Promastigoten infiziert und die Ohren nach 3-4 Wochen geerntet. In dieser Zeit wandelten sich die inokulierten metazyklischen Promastigoten intrazellulär in die obligat intrazelluläre amastigote Lebensform um.

### 3.2.6 *In vitro* Infektion von APC, Abnahme der Medienüberstände, Anfertigung und Auszählung der Zytospins

#### *In vitro* Infektion von Makrophagen (MΦ) und BMDC

Es liegen bereits vor:

- 1) APCs in einer Konzentration von  $0,4 \times 10^6$ /ml
- 2) opsonisierte Parasiten in einer Konzentration von  $50 \times 10^6$ /ml

Pro Well wurden 480 µl Medium vorgelegt, 500 µl im Well für die Negativkontrolle. Dieses enthielt lediglich Medium und APCs. Es folgten die Hinzugaben von 500 µl der APC-Suspension ( $C = 0,4 \times 10^6$ /ml,  $0,2 \times 10^6$  APCs pro Well) und entsprechend 20 µl der opsonierten Parasiten ( $1 \times 10^6$  Parasiten pro Well, Verhältnis Parasiten:APCs = 5:1). Als Positivkontrolle dienten nicht-opsonierte APC-Ansätze mit 10 µl LPS (10 µg/ml) und 10 µl IFN- $\gamma$  ( $10^5$  U/ml). Das Endvolumen pro Well war 1 ml. Die Platte wurde nun für 18 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Abnahme der Medienüberstände für spätere ELISA und die Anfertigung von Zytospins.

#### Abnahme der Medienüberstände

Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen in der 24- bzw. 96-Well-Platte durch ein 6-minütiges Zentrifugieren bei 200 g pelletiert, anschließend die Überstände abgenommen und zur Lagerung bei -20°C sowie zur weiteren Analyse in eine neue Platte überführt.

### Anfertigung von Zytospins

Mit Hilfe des Zytospins werden Zellen durch einen Zytospintrichter und ein Filterpapier konzentriert auf ein kleines Areal an definierter Stelle eines Objektträgers geschleudert. Durch das Filterpapier wird die flüssige Phase während des Zentrifugierens in einer Cellspin-Zentrifuge entzogen. Das Zentrifugieren erfolgte bei Raumtemperatur (RT) und 500 g für 5 min. Die Zellen lassen sich daraufhin unter dem Lichtmikroskop beurteilen.

Die 24 Well Platte mit den infizierten APCs wurde hierfür auf Eis gestellt, um die adhärennten Zellen besser vom Boden lösen zu können. Vom Gesamtvolumen innerhalb des Wells (1 ml) wurden nach dem Zentrifugieren die gewünschten Volumina für spätere ELISA abgenommen und das Restvolumen vorsichtig soweit verringert bis ein Endvolumen von 200 µl/well übrig war. Dieses Volumen wurde nun gründlich resuspendiert, um die APCs vom Boden zu lösen. Anschließend wurde mit etwa 100 µl dieser Suspension ein Zytospin angefertigt.

### Färbung und Auszählung der Zytospins

Nach dem Zentrifugieren wurde der Objektträger an der Luft getrocknet und im Anschluss mit dem Diff-Quick-Kit gefärbt. Dieses aus drei Reagenzien (Fixierlösung, Färbelösung I und Färbelösung II) bestehende Kit ermöglicht eine Unterscheidung von Zellkern, Zytoplasma und intrazellulären Parasiten. Die Objektträger wurden hierfür jeweils eine Minute nacheinander in den drei Lösungen inkubiert. Es folgten eine Spülung in destilliertem H<sub>2</sub>O und Lufttrocknung. Die Färbelösung I besteht aus dem sauren Farbstoff Eosin Y. Sie färbt basische (azidophile) Proteine mit freien Aminogruppen rot an. Die Färbelösung II besteht aus dem basischen Farbstoff Hämatoxylin. Dieses bindet an saure (basophile) Proteine wie die DNS und färbt somit den Zellkern blau-violett. Um die Infektionsrate der Zellen zu bestimmen, wurden die gefärbten Objektträger unter 1000-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgewertet. Pro Präparat wurden 200 intakte Zellen gezählt und hierbei unterschieden, ob die Zellen mit *L. major* infiziert sind oder nicht. Die Anzahl der intrazellulären Parasiten bei infizierten Zellen sowie die Anzahl der adhärennten Parasiten bei jeder gezählten Zelle wurden ebenfalls bestimmt.

**3.2.7 Entnahme von Ohr, Lymphknoten und Milz der Maus**

Für die Organentnahme wurden die Mäuse zuvor mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und mit 70%-igem Ethanol desinfiziert.

**Entnahme der Ohren**

Die Ohren wurden mit der anatomischen Pinzette vom Kopf weg unter leichtem Zug gehalten und mit der Schere dicht am Kopf abgetrennt. Hierbei wurde möglichst wenig Fell mit präpariert und anschließend das Verbindungshäutchen an der Basis der Ohren mit der Schere durchtrennt. Nach kurzem Schwenken in 70%igem Ethanol wurden die Ohren in PBS 1x bis zur Weiterverarbeitung am selben Tag, bzw. in Formaldehyd bis zur histologischen Weiterverarbeitung, gelagert.

**Entnahme der drainierenden Lymphknoten (dLK) am Hals**

Für die Entnahme der dLK am Hals wurde das Fell am Bauch der Maus inzidiert und reißend zirkulär eröffnet. Die nachfolgenden Schritte bestanden darin, die Maus mit einer Hand am Schwanz zu fixieren und mit der anderen Hand das Fell vom Bauch weg über Gesicht und Kopf nach hinten in den Nacken zu stülpen. Dabei wurde der Kopf überstreckt. Nun konnten die submandibulären dLK links und rechts mit einer Uhrmacherpinzette herausgelöst und in PBS bis zur Weiterverarbeitung am selben Tag gelagert werden.

**Entnahme der Milz**

Nach Eröffnung des Bauchraumes mit der Schere wurden die Adhäsionen von Milz und Zwerchfell gelöst sowie die zu- und abführenden Gefäße des Organs durchtrennt. Bis zur Weiterverarbeitung am selben Tag wurde die Milz in PBS gelagert.



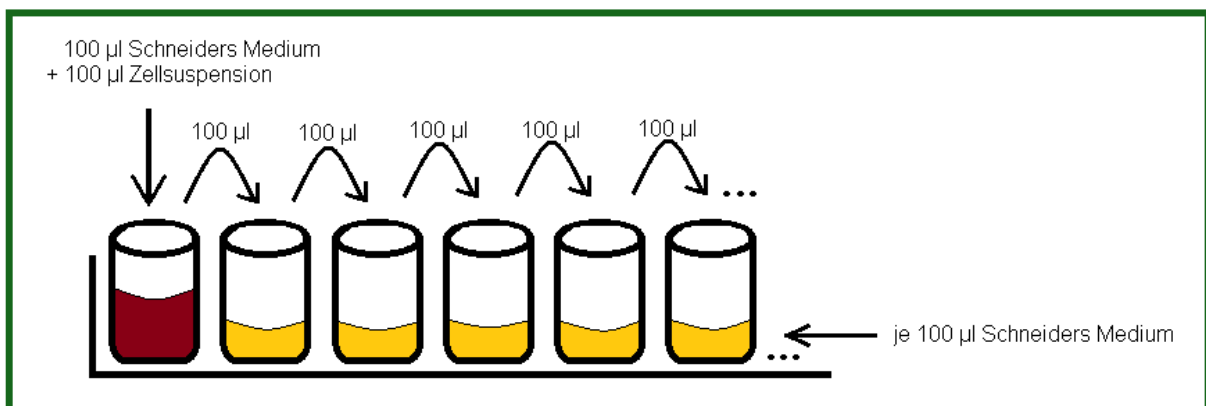
### 3.2.8 Ohrmessung

Für den Versuch der Ohrmessung wurden promastigote *L. major* in einer Konzentration von  $0,1 \times 10^6$  metazyklischen Parasiten/ml benötigt.

Der Maus wurden jeweils 10  $\mu$ l dieser Niedrigdosis-*Leishmania*-Suspension ( $10^3$  Parasiten/10  $\mu$ l) in beide Ohren mit einer 0,3 mm durchmessenden Kanüle injiziert. Das entspricht in etwa der physiologischen Infektionsdosis durch den Stich einer Sandmücke (Griewank et al., 2014). In den nachfolgenden 15 Wochen wurde jedes Ohr wöchentlich auf Granulome untersucht. Deren Volumina wurden mit Hilfe einer digitalen Schieblehre in drei Ebenen vermessen. Hierfür wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt.

### 3.2.9 Parasitenlasten von Ohr und Milz: Verdünnungsreihe und Auswertung

Pro Well einer 96 Well Platte wurden 100  $\mu$ l Schneiders Medium vorgelegt. Von der Zellsuspension der zu untersuchenden Parasitenlast wurden 100  $\mu$ l in das erste Well und nach erfolgter Resuspension hiervon 100  $\mu$ l in das nächste Well überführt. Nach Resuspension wurden hieraus wiederum 100  $\mu$ l in das nachfolgende Well überführt und auf diese Art das Prozedere fortgeführt. Für die Parasitenlasten der Milzen wurden insgesamt 16 Verdünnungsschritte (2 Reihen) und für die Parasitenlasten der Ohren insgesamt 32 Verdünnungsschritte (4 Reihen der 96 Well Platte) durchgeführt.



**Abb. 14: Ansetzen einer Verdünnungsreihe für Parasitenlasten**

In jedes Well wurden 100  $\mu$ l Schneiders Medium vorgelegt. In das erste Well wurden hierzu 100  $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert und resuspendiert. Hiervon wurden 100  $\mu$ l in das nächste Well überführt und resuspendiert, hiervon wiederum 100  $\mu$ l in das dritte Well und nach diesem Verfahren 16 (Milzen) bzw. 32 (Ohren) Verdünnungsschritte ausgeführt.

**Herstellung der Parasitenlast aus murinen Ohren**

Die Ohren wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der physiologischen relevanten Niedrigdosis-Infektion mit  $10^3$  Parasiten/Ohr (Griewank et al., 2014) wie oben beschrieben präpariert und in PBS verbracht. Um den Verdau der Ohrhälften zu beginnen, galt es, das hierfür benötigte Kollagenase-Medium frisch herzustellen. Der Verdau fand in 6 Well Platten statt und in jedes Well wurde das Kollagenase-Medium vorgelegt. Es folgte die Splittung der Ohren, für welche die Ohren in einer Petrischale mit der ventralen/vorderen Seite nach unten gelegt und mit einer Uhrmacherpinzette die seitlichen Verwachsungen zwischen Vorder- und Hinterblatt der Ohren an der Basis gelöst wurden. Dies ermöglichte die Trennung beider Blätter durch vorsichtigen Zug von der Basis ausgehend. Die so generierten Hälften wurden nun mit der dermalen Seite nach unten zusammen in ein Well mit Kollagenase-Medium gelegt, pro Ohr 1 Well. Es folgte eine Inkubation für 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden GentleMACS™ M Tubes mit je einem Ohr bestückt (= 2 Hälften) und ca. 1 ml RPMI-Complete hinzugegeben. Mit dem GentleMACS™ Octo Dissociator erfolgte in etwa 80 s die Zerkleinerung der Ohren („-“: Drehung gegen den Uhrzeigersinn):

- (1) Start: 700 rpm für 5 s, - 200 rpm für 1 s
- (2) 3x Zyklus: 900 rpm für 5 s, - 900 rpm für 1 s, 1200 rpm für 5 s, - 600 rpm für 1 s
- (3) 2x Zyklus: 1800 rpm für 5 s, - 600 rpm für 1 s, 2200 rpm für 5 s, - 800 rpm für 1 s
- (4) Ende: 2400 rpm für 5 s, - 1000 rpm für 1 s, 2000 rpm für 5 s

Die mechanisch zerstückelten Ohren und die frei gewordenen Leishmanien wurden über einen 70 µm Sieb in ein 50 ml Falcon gesiebt und mit dem Collagenase A Medium aus dem entsprechenden Well der 6 Well Platte gepoolt.

Das GentleMACS™ M Tube wurde mit 10 ml PBS gespült und die Lösung ebenfalls über das Sieb in das Falcon gegeben. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml Schneiders Medium resuspendiert und hiervon 100 µl in die Verdünnungsreihe gegeben. Dies entspricht einer Ausgangsverdünnung von 1:10. Die fertigen 96-Well-Platten wurden mit Parafilm umschlossen und für eine Woche unter anaeroben Bedingungen bei 27°C gelagert.

**Herstellung der Parasitenlast aus murinen Milzen**

Die Milzen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der physiologisch relevanten Niedrigdosis-Infektion mit  $10^3$  Parasiten/Ohr (Griewank et al., 2014) präpariert und in PBS 1x verbracht. Nun wurden 5 ml PBS 1x in eine kleine Petrischalen-Hälfte vorgelegt, ein 70  $\mu$ m Zellsieb hinein gestellt und die Milz innerhalb des Siebes mit dem Stempel einer 3 ml Spritze zerkleinert. Das anhaftende Fett wurde vorher entfernt. Das Sieb konnte nach leichtem Schwenken zum Ausspülen der Zellen in das PBS 1x mit dem Restgewebe verworfen werden. Die Zellsuspension wurde nun mit einer serologischen Pipette in ein 15 ml Falcon pipettiert, ebenso die 5 ml PBS 1x, mit welchen die Petrischale anschließend gespült wurde. Die nächsten Schritte bestanden aus Zentrifugieren für 10 min bei 200 g und 4°C und der Resuspension der Pellets mit je 2,5 ml PBS. Davon wurden 500  $\mu$ l in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und 1 min lang mit dem Pelletpestler zerkleinert. Es folgte ein Zentrifugieren in der Eppendorf-Zentrifuge bei 3000 g für 8 min und RT. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l Schneiders Medium aufgenommen und in die Verdünnungsreihe gegeben.

**Auslesen der Parasitenlasten**

Das Auslesen der Parasitenlasten erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Es wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

Begonnen wurde mit der mikroskopischen Betrachtung des ersten Wells, also mit der geringsten Verdünnung. Bei einer Detektion von *L. major* galt dieses als positiv und das nächste Well wurde betrachtet. So wurde Well für Well entlang der Verdünnungsreihe auf das Vorhandensein von Parasiten untersucht, bis in einem Well keine *L. major* mehr aufzufinden waren. Dieses galt dadurch als negativ. Zur Kontrolle wurden die drei nachfolgenden Wells ebenfalls untersucht. Waren hierin keine Parasiten zu finden (ab nur einem Parasiten gilt der Nachweis als positiv), wurde das letzte positive Well mit sichtbaren *L. major* notiert und die Anzahl der Parasiten aus der untenstehenden Tabelle ausgelesen. Wurde in einem der drei nachfolgenden Kontroll-Wells doch noch mindestens ein Parasit erkannt, galt nun dieses Well als positiv und war somit zum einen Ausgangspunkt für drei weitere Kontroll-Wells und zum anderen das Referenzwell zum Auslesen der Parasitenzahl aus der nachstehenden Tabelle.

	1.Reihe	2. Reihe	3.Reihe	4.Reihe	5.Reihe	...
A	2	512	131.072	$33,6 \times 10^6$	$85,6 \times 10^8$	...
B	4	1024	262.144	$67,2 \times 10^6$	$17,1 \times 10^9$	...
C	8	2048	524.288	$13,4 \times 10^7$	$34,2 \times 10^9$	...
D	16	4096	$1,05 \times 10^6$	$26,8 \times 10^7$	$68,4 \times 10^9$	...
E	32	8192	$2,10 \times 10^6$	$53,6 \times 10^7$	$13,7 \times 10^{10}$	...
F	64	16.384	$4,20 \times 10^6$	$10,7 \times 10^8$	$27,4 \times 10^{10}$	...
G	128	32.768	$8,40 \times 10^6$	$21,4 \times 10^8$	$54,8 \times 10^{10}$	...
H	256	65.536	$16,8 \times 10^6$	$42,8 \times 10^8$	$11,0 \times 10^{11}$	...

**Tabelle 2: Auswertungshilfe für Parasitenlasten aus murinen Milzen und Ohren.**

### 3.2.10 Restimulierung der murinen drainierenden Lymphknoten

Nach der Inokulation in beide Mausohren mit einer physiologischen Niedrigdosis von  $10^3$  Parasiten/Ohr (Griewank et al., 2014) und Ablauf der gewünschten Infektionsdauer wurden die dLKs wie beschrieben (siehe S. 45) präpariert und in PBS überführt. Die dLKs wurden in PBS zur weiteren Verarbeitung in ein  $70 \mu\text{m}$  Sieb, welches in einer kleinen Petrischalen-Hälfte stand, transferiert und mit Hilfe des Stempels einer 3 ml Spritze zerkleinert. Die dLK-Zellsuspension wurde über dieses Sieb in ein 50 ml Falcon pipettiert, ebenso die 3 ml RPMI-Complete, mit welchen anschließend die Petrischale gespült wurde. Es folgte ein Zentrifugierungsschritt über 8 min bei 200 g und  $4^\circ\text{C}$ . Das Pellet wurde je nach zu erwartender Zellzahl mit 1-3 ml RPMI-Complete resuspendiert und 1:10 in Trypanblau gezählt. Die Zellkonzentration wurde auf  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt und hiervon  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well in einer 96 Well Platte ausgesät. Als Positivkontrolle wurden  $20 \mu\text{l}$  des Superantigens *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB; 1 mg/ml Stocklösung) und als Negativkontrolle reine unstimulierte Zellen ausgesät. In ein drittes Well pro Ansatz wurden  $10 \mu\text{l}$  von *L. major*-Lysat (SLA, Soluble Leishmania Antigen,  $25 \mu\text{l}/\text{ml}$ ) zugegeben. Hierdurch sollten die Zellen restimuliert werden, falls sie *in vivo* bereits Kontakt mit *Leishmania major* hatten. Die Inkubation für 48h erfolgte im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Nach Ablauf der 48h wurden die 96 Well Platten bei 200 g und Raumtemperatur für 6 min zentrifugiert, die Medienüberstände abgenommen, in eine neue Platte überführt und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingelagert.

### 3.2.11 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Diese Methode ist ein hochempfindliches Antikörper-vermitteltes Nachweisverfahren für Antigene. Bei dem sogenannten Sandwich-ELISA werden zwei monoklonale Antikörper eingesetzt, die verschiedene Epitope eines Antigens, wie z.B. die von Zytokinen detektieren. Mit dem ersten Antikörper (*Capture Antibody*), der spezifisch für das Zytokin ist, wird die Plastikoberfläche der 96 Well ELISA Platte am Vortag beschichtet. Dieser bindet nach Zugabe der Probe das Antigen. Der zweite Antikörper (*Detection Antibody*) ist ebenfalls spezifisch für das zu untersuchende Zytokin, markiert diesen Komplex aus Antikörper und Antigen und ist außerdem mit Biotin konjugiert. Im nächsten Schritt wird ein Enzym (Meerrettich-Peroxidase) zugegeben, welches mit Streptavidin konjugiert ist und sich aufgrund dessen hoher Affinität zu Biotin an das Biotin des Detektionsantikörpers legt. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgt jeweils ein dreimaliger Waschschrift der Platten mit ELISA-Waschpuffer und anschließendem Ausklopfen der Platten auf einer Unterlage. Nach Zugabe des Substrates wird dieses von der Meerrettich-Peroxidase in einer Farbreaktion umgesetzt. Die Reaktion wird mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Phosphorsäure) abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Zum Vergleich wird ebenfalls die Extinktion von Standardproben gemessen, deren Konzentrationen bekannt sind. Aus diesen Werten lässt sich eine Regressionsgerade berechnen, anhand derer die Konzentrationen der untersuchten Zytokine bestimmt werden.

Die ELISA der Zytokine wurden entsprechend der Herstellerangaben unter Verwendung der Kits von eBioscience und R&D durchgeführt.

### 3.2.12 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie an einem FACS-Gerät (engl. *fluorescence-activated cell sorting*) können einzelne Zellen detektiert werden. Anhand ihrer Granularität, Größe und der anhaftenden fluoreszierenden Antikörper können sie unterschieden und hierdurch Zellpopulationen zugeordnet werden. Die Zellen fließen hierfür einzeln an einem Photodetektor vorbei. Das dahinter stehende Prinzip macht sich zunutze, dass Zellen, abhängig von ihrer Beschaffenheit, Licht unterschiedlich stark streuen. Die Beschaffenheit bezieht sich z.B. auf die Größe der Zelle und deren Aufbau. So

streuen große Zellen mit vielen Vesikeln das Licht deutlich breiter als kleine Zellen mit weniger komplexem Inhalt. Ungefärbte Zellen lassen sich bereits durch den alleinigen Einsatz des Vorwärtsstreulichtes und des Seitwärtsstreulichtes unterscheiden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC=*forward scatter*) wird durch das Volumen, also der Größe der Zelle beeinflusst, das Seitwärtsstreulicht (SSC=*side scatter*) von der intrazellulären Beschaffenheit.

Um die Oberflächenmarker der gesuchten Zellen detektieren zu können, bedarf es im Vorfeld einer Färbung dieser Marker mit fluoreszierenden Antikörpern. Bei zwei oder mehreren Antikörpern erscheinen die Daten als Streudiagramm, in welchem die Fluoreszenz eines Antikörpers gegen die eines anderen aufgetragen wird. So ist es möglich, durch die Kombination verschiedener Antikörper, gezielt nach Populationen zu suchen (Murphy, 2018).

Es wurden  $0,2-1 \times 10^6$  Zellen in z.B. jeweils 200  $\mu\text{l}$  des zellspezifischen Mediums ausgesät. Die Färbung erfolgte in unbeschichteten 96 Well Rundbodenplatten. Die Platte wurde 5 min bei 300 g und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und bei sichtbarem Pellet wurde das Medium anschließend mit einer schwungvollen Bewegung verworfen. Der folgende Waschschrift mit 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer/Well und Zentrifugieren bei 200 g für 5 min, erfolgte zweimal, bevor 10  $\mu\text{l}$  des Fc- Blocks in jedes Well pipettiert und die Platte für 5 min im Kühlschrank inkubiert wurde. Der Fc- Block dient dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen. Unmittelbar darauf wurden 10  $\mu\text{l}$  des Antikörpers (Färbeschritt) hinzu pipettiert und die Platte für weitere 15 min im Kühlschrank inkubiert. Es folgte ein Waschschrift und je nach zu detektierenden Zellen evtl. ein zweiter Färbeschritt mit weiteren Antikörpern. Es wurden zwei weitere Waschschriffe durchgeführt und schließlich die Zellen mit 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aus dem Well herausgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer Accuri™ C6.

## 3.2.13 Färbeschemata der FACS-Analysen

Well	FITC (FL-1)	APC (FL-4)	PE (FL-2)
1	CD11b	Ly-6G	Ly-6C
2	F7/4	MHC II	F4/80
3	CD11c	MHC II	F4/80
4	rlgG2b	rlgG2a	rlgG2b
5	rlgG2a	rlgG2b	rlgG2a
6	Arm. H. IgG1	rlgG2b	rlgG2a
7	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt

Fluorochrom	Antikörper	Isotypkontrolle
FITC FL-1	CD11b	rlgG2b
	F7/4	rlgG2a
	CD11c	Arm. Hamster IgG1
APC FL-4	Ly-6G	rlgG2a
	MHC-II	rlgG2b
PE FL-2	Ly-6C	rlgG2b
	F4/80	rlgG2a

Tabelle 3: Färbeschema Makrophagen-FACS

Well	1. Färbeschritt		2. Färbeschritt
1	MHC II	CD11c	CD86
2	MHC II	CD11c	CD54
3	MHC II	CD11c	CD40
4	rlgG 2b	Arm. Ham. IgG	-
5	MHC II	CD11c	rlgG 2a
6	MHC II	CD11c	Arm. Ham. IgG
7	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt

Filter	Fluorochrom	Antikörper	Isotypkontrolle
FL-1	FITC	CD86	rlgG 2a
		CD54	Arm. H. IgG
		CD40	Arm. H. IgG
FL-2	PE	CD11c	Arm. H. IgG
FL-4	APC	MHC II	rlgG 2b

Tabelle 4: Färbeschema BMDC-FACS

**3.2.14 Statistische Auswertung**

Für die Auswertungen der Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit wurde das Statistik-Programm StatView® 5.0 (SAS Institute Inc., USA) für Windows genutzt. Die statistische Analyse dieser Ergebnisse erfolgte mittels ungepaartem studentischem t-Test dieses Programms.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 *In vivo*-Infektionsversuche

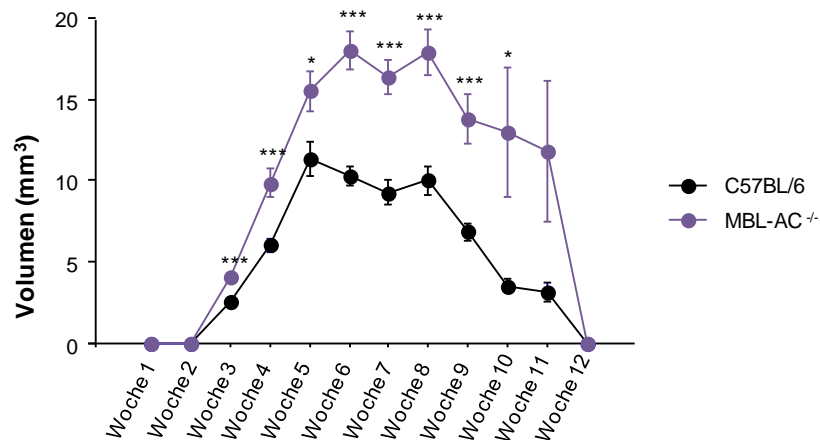
Für die folgenden Versuche wurden unsere Versuchstiere primär mit einer physiologischen Infektionsdosis ( $10^3$  *L. major*, promastigote Lebensform) in die Ohrfalten infiziert und im Anschluss die entsprechenden Untersuchungen durchgeführt: Ohrläsionskurven (siehe S. 59 bzw. 64), Parasitenlasten (siehe S. 61 bzw. 65) sowie die Auswertung der Zytokinprofile in drainierenden Lymphknoten (dLK) nach Restimulation mit SLA (*Soluble Leishmania Antigen*) mittels ELISA (siehe S. 63 bzw. 67). Verglichen wurden jeweils die Wildtyp-Mäuse C57BL/6 mit MBL-AC<sup>-/-</sup> (siehe S. 59 ff) und C3<sup>-/-</sup> Mäusen (siehe S. 63 ff).

#### 4.1.1 Ohrläsionskurven: C57BL/6 vs. MBL-AC<sup>-/-</sup>

Um einen ersten klinischen Eindruck vom Verlauf einer kutanen *L. major* Infektion in MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen zu erhalten, wurden diese mit einer physiologischen Infektionsdosis *L. major*-Promastigoten ( $10^3$  Parasiten/Ohr) in die Ohrfalte infiziert und über einen Zeitraum von 12 Wochen beobachtet (siehe Abb. 15). Wöchentlich wurden die entstehenden Granulome in allen drei Ebenen gemessen und der Granulomgröße von C57BL/6 Mäusen gegenüber gestellt. In unserer Versuchsreihe zeigten sich in der MBL-AC<sup>-/-</sup> Gruppe (lila) signifikante Größenunterschiede bezüglich der sich knötchenartig ausbildenden Verdickung an den Ohren im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz).

In Woche 3 (Läsionsvolumen  $4 \text{ mm}^3$ ), Woche 4 ( $10 \text{ mm}^3$ ), Woche 6 ( $18 \text{ mm}^3$ ), Woche 7 ( $16 \text{ mm}^3$ ), Woche 8 ( $18 \text{ mm}^3$ ) und Woche 9 ( $14 \text{ mm}^3$ ) lag die Signifikanz bei  $***p \leq 0,002$  im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen. Im Verlauf ulzerierte die Haut der MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse um die Einstichstelle und zeigte zunehmend einen Progress. Bei den C57BL/6 Mäusen fand sich das maximale Läsionsvolumen in Woche 5 mit  $11 \text{ mm}^3$ . Ab diesem Zeitpunkt, und bei den MBL-AC<sup>-/-</sup> Tieren ab Woche 6, zeigten sich die Läsionen rückläufig und ab Woche 9 Heilungstendenzen bis zur vollständi-

gen Inapparenz nach Woche 12. Der terminale Verlauf gestaltete sich somit ähnlich, jedoch mit zwischenzeitlich signifikant größeren Volumina bei den MBL-AC<sup>-/-</sup> Tieren.



**Abb. 15: Ohrläsionskurven: C57BL/6 vs. MBL-AC<sup>-/-</sup>.**

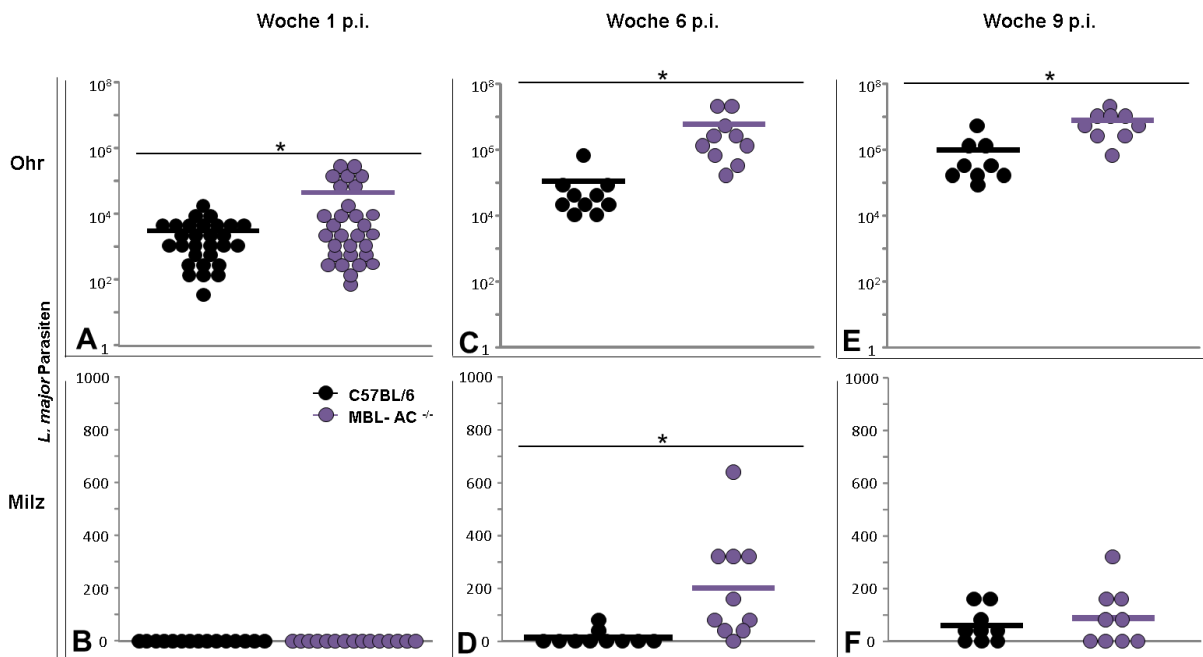
Dargestellt sind Messreihen von Läsionsvolumina nach einer Niedrigdosis-Infektion ( $10^3$  *L. major*) mit Promastigoten in beide Ohren bei MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen (über 12 Wochen,  $n \leq 6$ ,  $\geq 8$  Tiere/ Gruppe). Als Kontrolle dienten C57BL/6 Mäuse ( $\geq 8$  Tiere/Gruppe). Das Volumen der Läsion an der Inokulationsstelle (Ohr) wurde wöchentlich in 3 Dimensionen mittels einer Schieblehre ermittelt. Alle ermittelten Volumina entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM, \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,002$ .

#### 4.1.2 Parasitenlasten: C57BL/6 vs. MBL-AC<sup>-/-</sup>

Durch den Vergleich von Parasitenlasten in den infizierten Ohren gewinnt man einen exemplarischen Aufschluss über die Fähigkeit eines Organismus die Infektion einzudämmen und zu kontrollieren. Des Weiteren kann man durch den Befall der Milz eine Viszeralisierung der Erkrankung erkennen.

Da das Fehlen von MBL-AC anscheinend zu dickeren Ohrläsionen führt (siehe Abb. **15**), war es für uns von Interesse, eine quantitative Analyse der Parasiten in den infizierten Ohren und Milzen durchzuführen und mit immunkompetenten Mäusen (C57BL/6) zu vergleichen. In Woche 1, 6 und 9 p.i. konnten zu jedem Zeitpunkt bei den MBL-AC<sup>-/-</sup> Tieren signifikant mehr Parasiten (jeweils \*p≤0,05) in den Ohrläsionen gezählt werden als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. **16**).

In den drei Spalten aufgetragen sind die nach Wochen (1, 6 und 9) gegliederten Auswertungen der Parasitenlasten mit C57BL/6 (schwarz) und MBL-AC<sup>-/-</sup> (violett) Mäusen. Die oberen Abbildungen (**A**, **C**, **E**) zeigen die Ergebnisse in Bezug auf die Ohren, die unteren (**B**, **D**, **F**) in Bezug auf die Milzen. In Woche 1 lag die Anzahl an Parasiten im Ohr bei den C57BL/6 Tieren durchschnittlich bei  $3,2 \times 10^3$  Promastigote, bei den MBL<sup>-/-</sup> Tieren bei  $4,6 \times 10^4$  (**A**). In Woche 6 zählten wir in der C57BL/6 Gruppe  $9,8 \times 10^4$  und in der MBL<sup>-/-</sup> Gruppe  $5,6 \times 10^6$  Promastigote (**C**). In Woche 9 lag die Anzahl bei  $1,0 \times 10^6$  (C57BL/6) bzw. bei  $7,6 \times 10^6$  (MBL<sup>-/-</sup>) Promastigote/Ohr (**E**). In den Milzen ist von Woche 1 (0 Parasiten/Milz in beiden Stämmen (**B**)) zu Woche 6 (**D**), wie bei den Ohren, eine Zunahme der Parasitenlast zu erkennen (C57BL/6: 12 *L. major*/Milz und MBL-AC<sup>-/-</sup>: 200 *L. major*/Milz). Hier zeigte sich auch eine Signifikanz mit \*p≤0,05. In Woche 9 (**F**) hingegen waren die Parasiten in der Milz der MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse rückläufig (89 *L. major*/Milz), während die Zahl der Promastigote in der Kontrollgruppe noch leicht weiter anstieg (58 *L. major*/Milz). Dies war nicht signifikant.



**Abb. 16: Parasitenlasten: C57BL/6 vs. MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse.**

Zu sehen sind die Ergebnisse von Parasitenlasten eine Woche (A, B; n=3, 15 Tiere/Gruppe), 6 Wochen (C, D; n=2, 10 Tiere/Gruppe) und 9 Wochen (E, F; n=2, 9 Tiere/Gruppe) nach einer *in vivo* Infektion mit physiologischer Niedrigdosis ( $10^3$  *L. major*/Ohr) in beide Ohren der C57BL/6 (schwarz) bzw. MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse (violett). Hierfür wurden die Milzen, ebenso wie die Ohren der Tiere, nach der Verarbeitung nach Protokoll in einer 96 Well Platte in einer Verdünnungsreihe mit Schneiders Medium angesetzt. Es folgte eine Kultivierung für 6-9 Tage bei 27°C unter anaeroben Bedingungen und die anschließende Untersuchung unter dem Lichtmikroskop. Die ermittelten Parasitenzahlen/Organ/Stamm sind als absolute Zahlen angegeben, \* $p \leq 0,05$ , der Balken entspricht dem jeweiligen Mittelwert.

#### 4.1.3 ELISA der dLK-Restimulation: C57BL/6 vs. MBL-AC<sup>-/-</sup>

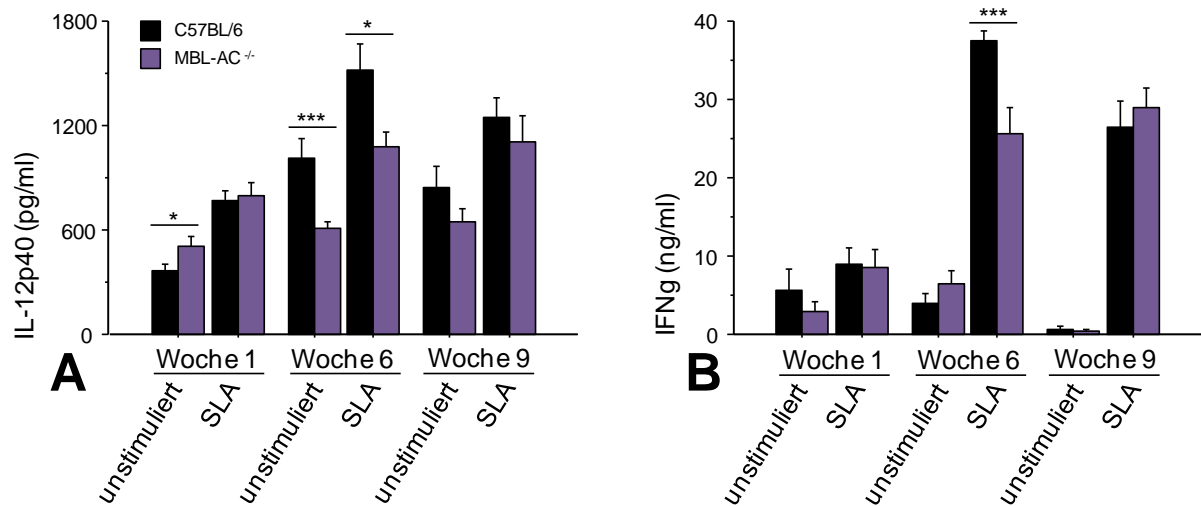
Ergänzend zur Parasitenlast wurden die Konzentrationen der Interleukine IL-12p40 und IFN- $\gamma$  in den Medienüberständen der drainierenden Lymphknoten (dLK) der Tiere mittels ELISA bestimmt. Durch die Restimulation der dLK-Zellen mit SLA (Soluble Leishmania Antigen, Stocklösung, 25  $\mu$ l/ml) werden diese zu einer vermehrten T<sub>H</sub>1-spezifischen IFN- $\gamma$ -Produktion (*in vitro*) angeregt, wenn die Zellen im Vorfeld (*in vivo*) bereits Kontakt mit *L. major* Antigenen hatten. Hierfür wurden 10  $\mu$ l des *L. major*-Lysats in das entsprechende Well zugegeben. Mittels Analyse der Medienüberstände 48h nach der dLK-Restimulation sollte untersucht werden, ob sich die Zytokinprofile zwischen den MBL-AC<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen unterscheiden und somit ein Anhaltspunkt für die anscheinend primär verzögerte Kontrolle der Infektion in den MBL-AC<sup>-/-</sup> Tieren vorliegt (siehe Abb. 17).

Es konnte sowohl für IL-12p40 (**A**) als auch für IFN- $\gamma$  (**B**) in Woche 6 p.i. eine verminderte Produktion in der MBL-AC<sup>-/-</sup> Gruppe detektiert werden. In Woche 9 p.i. waren die Unterschiede aber nicht mehr zu sehen.

Sowohl in Woche 1 p.i. (C57BL/6: 368 pg/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup>: 507 pg/ml, \*p $\leq$ 0,05) als auch in Woche 6 p.i. (C57BL/6: 1,0x10<sup>3</sup> pg/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup>: 0,6x10<sup>3</sup> pg/ml, \*\*\*p $\leq$ 0,002) zeigten sich bei den unstimulierten Zellen signifikante Unterschiede bzgl. der IL-12p40 Sekretion (**A**). In Woche 9 waren die Ergebnisse nicht signifikant (C57BL/6: 0,8x10<sup>3</sup> pg/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup>: 0,7x10<sup>3</sup> pg/ml). Ebenfalls signifikant in Woche 6 p.i. zeigten sich die Unterschiede bei mit SLA restimulierten Zellen: C57BL/6: 1,5x10<sup>3</sup> pg/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup>: 1,1x10<sup>3</sup> pg/ml, \*p $\leq$ 0,05). Im SLA-Ansatz in Woche 1 p.i. (C57BL/6: 0,8x10<sup>3</sup> pg/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup>: 0,8x10<sup>3</sup> pg/ml) und Woche 9 p.i. (C57BL/6: 1,3x10<sup>3</sup> pg/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup>: 1,1x10<sup>3</sup> pg/ml) konnten keine Signifikanzen detektiert werden.

Die Analyse des Zytokins IFN- $\gamma$  (**B**) zeigte in Woche 6 und 9 p.i., im Vergleich zu Woche 1 p.i., im SLA-Ansatz gegenüber den jeweiligen unstimulierten Ansätzen eine vermehrte Produktion von IFN- $\gamma$ . Zwischen den Stämmen zeigte sich nur im SLA-Ansatz in Woche 6 p.i. ein signifikanter Unterschied (C57BL/6: 38 ng/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup>: 26 ng/ml, \*\*\*p $\leq$ 0,002). In Woche 1 lagen hier die Mittelwerte im C57BL/6 Stamm bei 9 ng/ml und im MBL-AC<sup>-/-</sup> Stamm bei 8 ng/ml. In Woche 9 p.i. lagen die SLA-Werte der C57BL/6 Mäuse bei 26 ng/ml und der MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse bei 29 ng/ml. Die

unstimulierten dLK-Zellen sezernierten in Woche 1 p.i. 6 ng/ml (C57BL/6) und 3 ng/ml (MBL-AC<sup>-/-</sup>), in Woche 6 p.i. 4 ng/ml (C57BL/6) und 6 ng/ml (MBL-AC<sup>-/-</sup>) und in Woche 9 p.i. 0,5 ng/ml (C57BL/6) bzw. 0,4 ng/ml (MBL-AC<sup>-/-</sup>) des IFN- $\gamma$ .



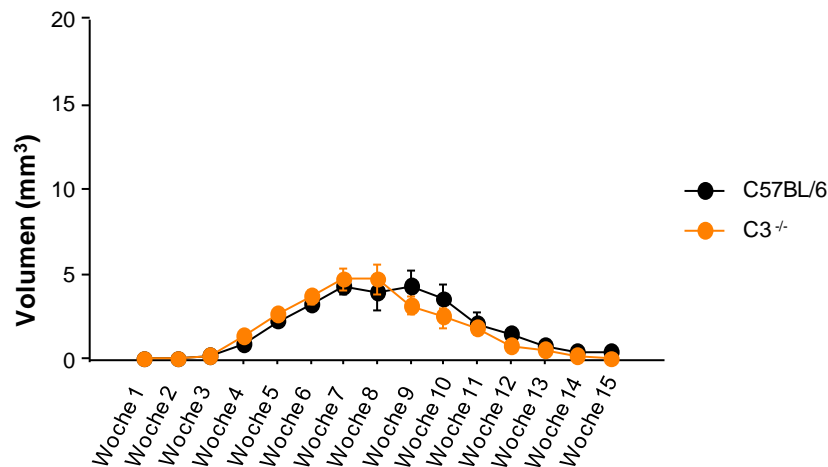
**Abb. 17: ELISA der dLK-Restimulation: C57BL/6 vs. MBL-AC<sup>-/-</sup>**

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse der mit SLA (*Soluble Leishmania Antigen*) durchgeführten Restimulation der submandibulär gelegenen drainierenden Lymphknoten nach einer physiologischen Infektionsdosis ( $10^3$  metazyklische *L. major*/Ohr) bei C57BL/6 und MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt. Untersucht wurden die Konzentrationen der Interleukine IL-12p40 (A) und IFN- $\gamma$  (B) in den Wochen 1, 6 und 9 p.i. (jeweils  $n=3$ , in Woche 1 und 6 jeweils 5 Tiere/Stamm/Woche, in Woche 9  $\geq 4$  Tiere/Stamm) mittels ELISA. Die eingestellte Zellzahl betrug  $1 \times 10^6$  Zellen/Well. Es wurden für die Restimulation 10  $\mu$ l des *L. major* Lysats (SLA, Stocklösung 25  $\mu$ g/ml) zugeführt, als Negativkontrollen dienten reine, unstimulierte Zellen in gleicher Konzentration. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben, \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,002$ .

#### 4.1.4 Ohrläsionskurven: C57BL/6 vs. C3<sup>-/-</sup>

Auch hier wurden zu Beginn der Versuchsreihe mit C3<sup>-/-</sup> Tieren die Ohrläsionen über einen Zeitraum von 15 Wochen wöchentlich in allen drei Ebenen gemessen und mit immunkompetenten C57BL/6 Mäusen verglichen. So erhielten wir einen ersten Eindruck vom klinischen Infektionsverlauf im C3<sup>-/-</sup> Tiermodell. C3<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des sichtbaren Verlaufs und der Größe der Läsionsvolumina (siehe Abb. 18). In der Knockout-Gruppe (orange) lag das maxima-

le Läsionsvolumen bei  $5 \text{ mm}^3$  (Woche 8), in der Wildtyp-Gruppe (schwarz) bei  $4 \text{ mm}^3$  in Woche 7. In Woche 15 waren in beiden Gruppen keine pathologischen Verdickungen mehr zu sehen und zu tasten.



**Abb. 18: Ohrläsionskurven: C57BL/6 vs. C3<sup>-/-</sup> Mäuse.**

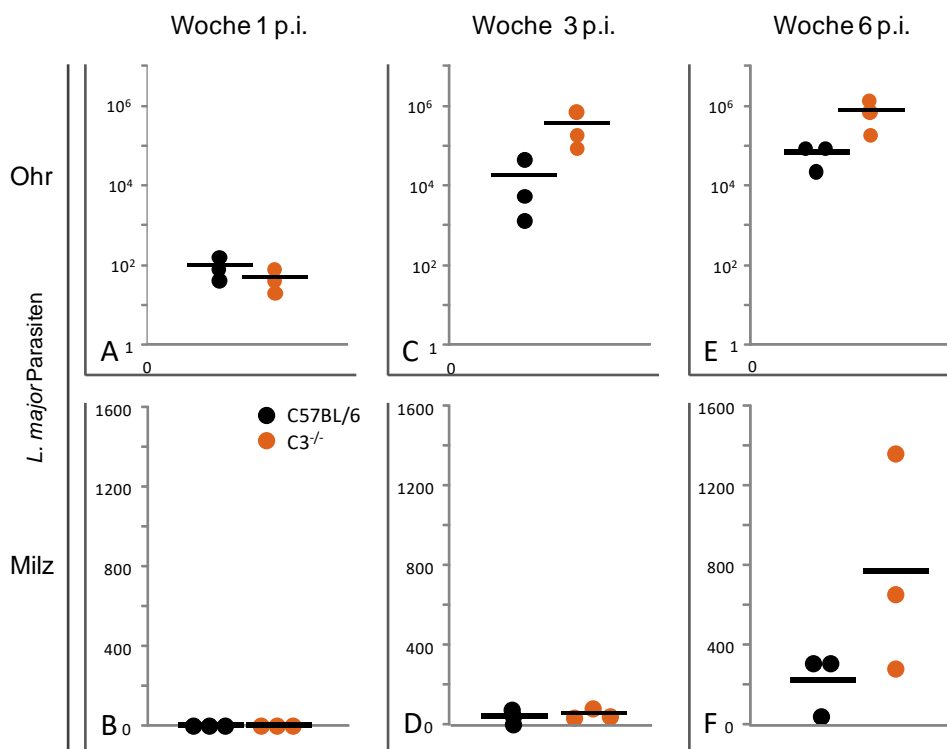
In dieser Messreihe sind die Läsionsvolumina nach einer Niedrigdosis-Infektion ( $10^3$  *L. major*) mit Promastigoten in beide Ohren bei C3<sup>-/-</sup> Mäusen dargestellt (15 Wochen, n=2,  $\geq 3$  Tiere/ Gruppe). Als Kontrolle dienten C57BL/6 Mäuse ( $\geq 3$  Tiere/Gruppe). Das Volumen der Läsion an der Inokulationsstelle (Ohr) wurde wöchentlich in 3 Dimensionen mittels einer Schieblehre ermittelt. Alle ermittelten Volumina entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM.

#### 4.1.5 Parasitenlasten: C57BL/6 vs. C3<sup>-/-</sup>

Wie in den Parasitenlasten mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen (siehe Abb. 16) wurde dieser Versuch mit C3<sup>-/-</sup> Mäusen, jedoch in Woche 1, 3 und 6 p.i., jeweils n=1, durchgeführt (siehe Abb.19). Hier konnte im Verlauf zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen sowohl in den Ohren (A, C, E) als auch in den Milzen (B, D, F) detektiert werden. Dies zeigt im quantitativen Vergleich, dass auch die C3<sup>-/-</sup> Tiere in der Lage sind die Infektion mit *L. major* unter Kontrolle zu halten, obwohl das als Schlüsselprotein angegebene Protein C3 der Komplementkaskade fehlt.

Bei den C57BL/6 Tieren lag die durchschnittliche Parasitenzahl in Woche 1 bei  $93$  *L. major*/Ohr (A), in Woche 3 p.i. bei  $1,5 \times 10^4$  *L. major*/Ohr (C) und in Woche 6 p.i. bei  $6,1 \times 10^4$  *L. major*/Ohr (E). Im Vergleich hierzu zeigten sich bei den C3<sup>-/-</sup> Mäusen folgende Durchschnittswerte: nach Woche 1 p.i.  $47$  *L. major*/Ohr (A), nach Woche 3 p.i.  $3 \times 10^5$  *L. major*/Ohr (C) und nach Woche 6 p.i.  $7,1 \times 10^5$  *L. major*/Ohr (E).

Bei der Untersuchung der Milzen konnten in Woche 1 p.i. in beiden Stämmen keine Parasiten nachgewiesen werden (**B**). In Woche 3 p.i. konnten bei den C57BL/6 Mäusen durchschnittlich 38 *L. major*/Milz (**D**) und in Woche 6 p.i. 215 *L. major*/Milz (**F**) gezählt werden. Im Falle der C3<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten sich in Woche 3 p.i. durchschnittlich 51 Parasiten/Milz (**D**) und in Woche 6 p.i. 760 Parasiten/Milz (**F**). Keines der Ergebnisse war signifikant.



**Abb. 19: Parasitenlast: C57BL/6 vs. C3<sup>-/-</sup> Mäuse.**

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse von Parasitenlasten eine Woche (A, B; n=1, 3 Tiere/Gruppe), drei Wochen (C, D; n=1, 3 Tiere/Gruppe) und sechs Wochen (E, F; n=1, 3 Tiere/Gruppe) nach einer *in vivo* Infektion mit physiologischer Niedrigdosis (10<sup>3</sup> *L. major*/Ohr) in beide Ohren von C57BL/6 (schwarz) und C3<sup>-/-</sup> Mäuse (orange) dargestellt. Die Milzen, ebenso wie die Ohren der Tiere, wurden nach der protokollgetreuen Verarbeitung in einer 96 Well Platte in einer Verdünnungsreihe mit Schneiders Medium angesetzt. Die Kultivierung erfolgte für 8-9 Tage bei 27°C unter anaeroben Bedingungen und die anschließende Untersuchung unter dem Lichtmikroskop. Die ermittelten Parasitenzahlen/Organ/Stamm sind als absolute Zahlen angegeben. Untersucht wurde zu jedem Zeitpunkt ein Ohr/Tier.



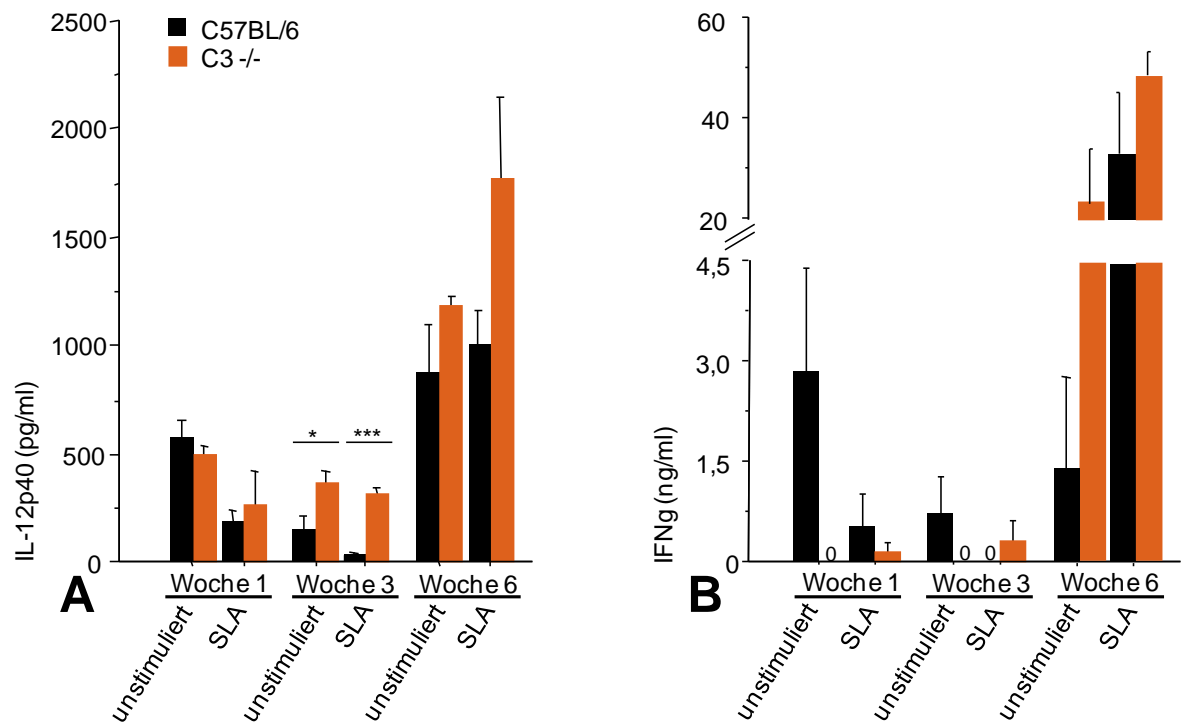
#### 4.1.6 ELISA der dLK-Restimulation: C57BL/6 vs. C3<sup>-/-</sup>

Von den Tieren, deren Organe in den Parasitenlasten (siehe Abb. 19) ausgelesen wurden, entnahmen wir zu den entsprechenden Zeitpunkten die drainierenden submandibulären Lymphknoten (dLK, siehe Abb. 20). Nach Präparation und Restimulation der aufbereiteten Lymphknotenzellen mittels 10 µl *L. major*-Lysat (SLA, *Soluble Leishmania Antigen*, 25 µl/ml) wurden die Medienüberstände 48h später entnommen und auf ihren Zytokingehalt (IL-12p40, **A** und IFN-γ, **B**) hin untersucht. Als Positivkontrolle diente die Zugabe von 20 µl des Superantigens *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB; 1 mg/ml Stocklösung) und als Negativkontrolle wurden reine unstimulierte Zellen (jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/Well) ausgesät.

Sowohl in (**A**) als auch in (**B**) sind die Ergebnisse den Wochen nach aufgliedert. Die dLK-Medienüberstände der C3<sup>-/-</sup> Tieren zeigten in Woche 3 p.i. eine signifikant höhere IL-12 Produktion sowohl im unstimulierten als auch im SLA-Ansatz im Vergleich zur Kontrollgruppe (**A**). Alle anderen Ansätze wiesen keine Signifikanz auf.

In (**A**), Woche 1, betrug der Mittelwert für IL-12p40 der unstimulierten dLK-Zellen 571 pg/ml (C57BL/6) bzw. 494 pg/ml (C3<sup>-/-</sup>) und der mit SLA restimulierten dLK-Zellen 189 (C57BL/6) bzw. 265 pg/ml (C3<sup>-/-</sup>). In Woche 3 zeigt sich der oben erwähnte signifikante Unterschied in der IL-12p40-Produktion der unstimulierten Zellen (C57BL/6: 138 pg/ml vs. C3<sup>-/-</sup>: 367 pg/ml, \*p≤0,05) als auch der mit SLA restimulierten Zellen (C57BL/6: 24 pg/ml vs. C3<sup>-/-</sup>: 316 pg/ml, \*\*\*p≤0,002). Zu Woche 6 hin ist ein Anstieg der Werte in beiden Stämmen sowohl bei den unstimulierten Zellen (C57BL/6: 876 pg/ml vs. C3<sup>-/-</sup>: 1,1x10<sup>3</sup> pg/ml) als auch im SLA-Ansatz zu erkennen (C57BL/6: 1,0x10<sup>3</sup> pg/ml vs. C3<sup>-/-</sup>: 1,8x10<sup>3</sup> pg/ml).

In (**B**) ist die IFN-γ-Produktion der dLK-Zellen dargestellt. In Woche 6 ist ein starker Anstieg des IFN-γ zu erkennen. Unstimulierte dLK-Zellen produzierten 1,4 ng/ml (C57BL/6) bzw. 23 ng/ml (C3<sup>-/-</sup>) des Zytokins. Mit SLA restimulierte dLK-Zellen zeigten in Woche 6 in beiden Stämmen einen Anstieg auf 33 ng/ml (C57BL/6) bzw. 48 ng/ml (C3<sup>-/-</sup>), jedoch ohne Signifikanz.



**Abb. 20: ELISA der dLK-Restimulation: C57BL/6 vs. C3<sup>-/-</sup> Mäuse.**

Gezeigt sind hier die dLK-Restimulationen mit SLA (engl. *Soluble Leishmania Antigen*) im Rahmen der Parasitenlasten in Woche 1, 3 und 6 p.i. Untersucht wurden IL-12p40 (A) und IFN- $\gamma$  (B). Die Infektion in beide Ohren fand mit einer physiologischen Dosis ( $10^3$  metazyklische *L. major*/Ohr) statt. Verglichen wurden C57BL/6 Mäuse (Kontrolle) mit C3<sup>-/-</sup> Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund. Hierfür wurden die Tiere (3 Tiere/Stamm/Woche) in der entsprechenden Woche 1, 3 und 6 euthanasiert und ihnen jeweils die submandibulären Lymphknoten (dLK) entnommen. Nach Präparation und Einstellen der gewünschten Zellzahl ( $1 \times 10^6$  Zellen/Well) wurden die Zellen im SLA-Ansatz mit 10  $\mu$ l des *L. major* Lysats (SLA, 25  $\mu$ g/ml) antigenspezifisch restimuliert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , \*\*\* $p \leq 0,002$ .

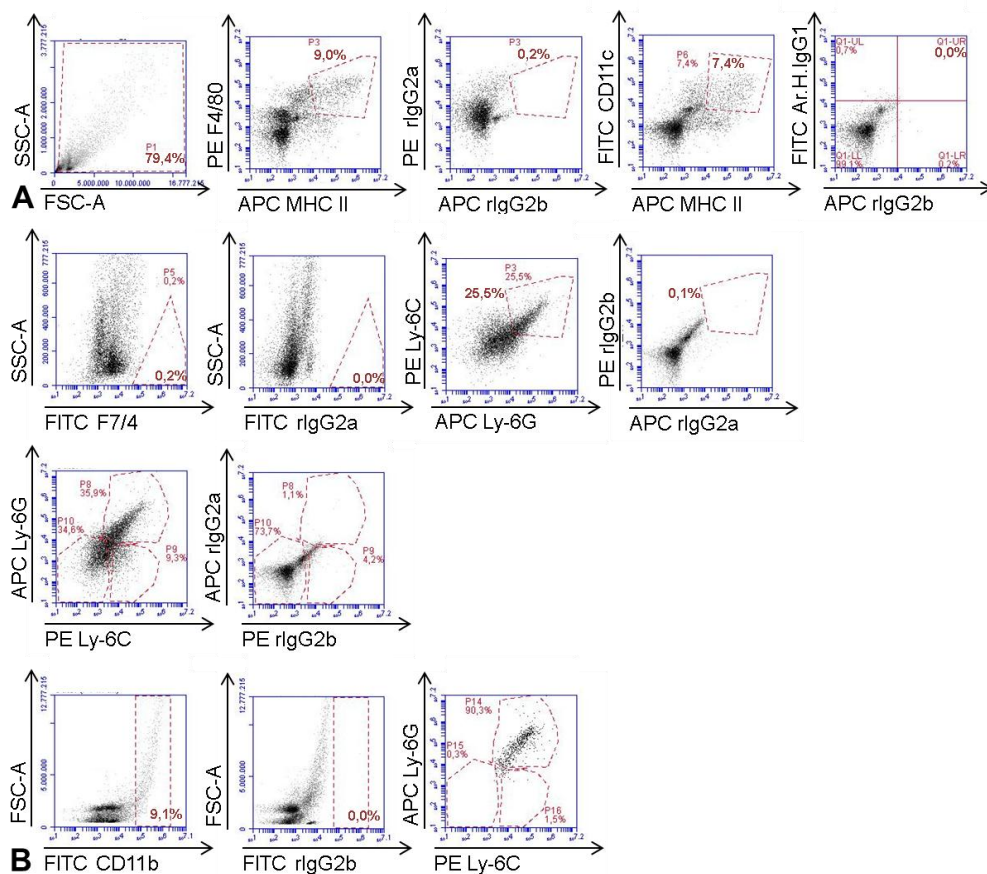
## 4.2 *In vitro*-Untersuchungen

In den nachfolgenden Experimenten wurden die Auswirkungen einer *L. major*-Infektion *in vitro* untersucht. Wir isolierten hierfür Makrophagen (MΦ) und *bone marrow derived dendritic cells* (BMDC), Blutsera und Amastigote aus C57BL/6 (Kontrolle) bzw. den Knockout-Mäusen MBL-AC<sup>-/-</sup>, C5<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup>.

### 4.2.1 Qualitätskontrolle von MΦ und BMDC mittels FACS

Hierfür wurden durchflusszytometrisch die von uns generierten Zellen auf typische Oberflächenmarker untersucht.

#### Qualitäts-FACS der Biogel-MΦ



#### Abb. 21: Qualitäts-FACS: Biogel-MΦ.

In **A** exemplarisch zusammengestellt sind dot plots für die aus Biogel gewonnenen MΦ der *in vitro* Versuchsreihen mit den typischen Oberflächenmarkern wie MHC-II, F4/80, CD11b, CD11c und Ly-6C. Als Negativkontrollen wurden die Isotypen rIgG2a, rIgG2b und Arm. Hamster-IgG1 benutzt. In **B** sind die Zellen auf CD11b vorgegattet.

Qualitäts-FACS der BMDC

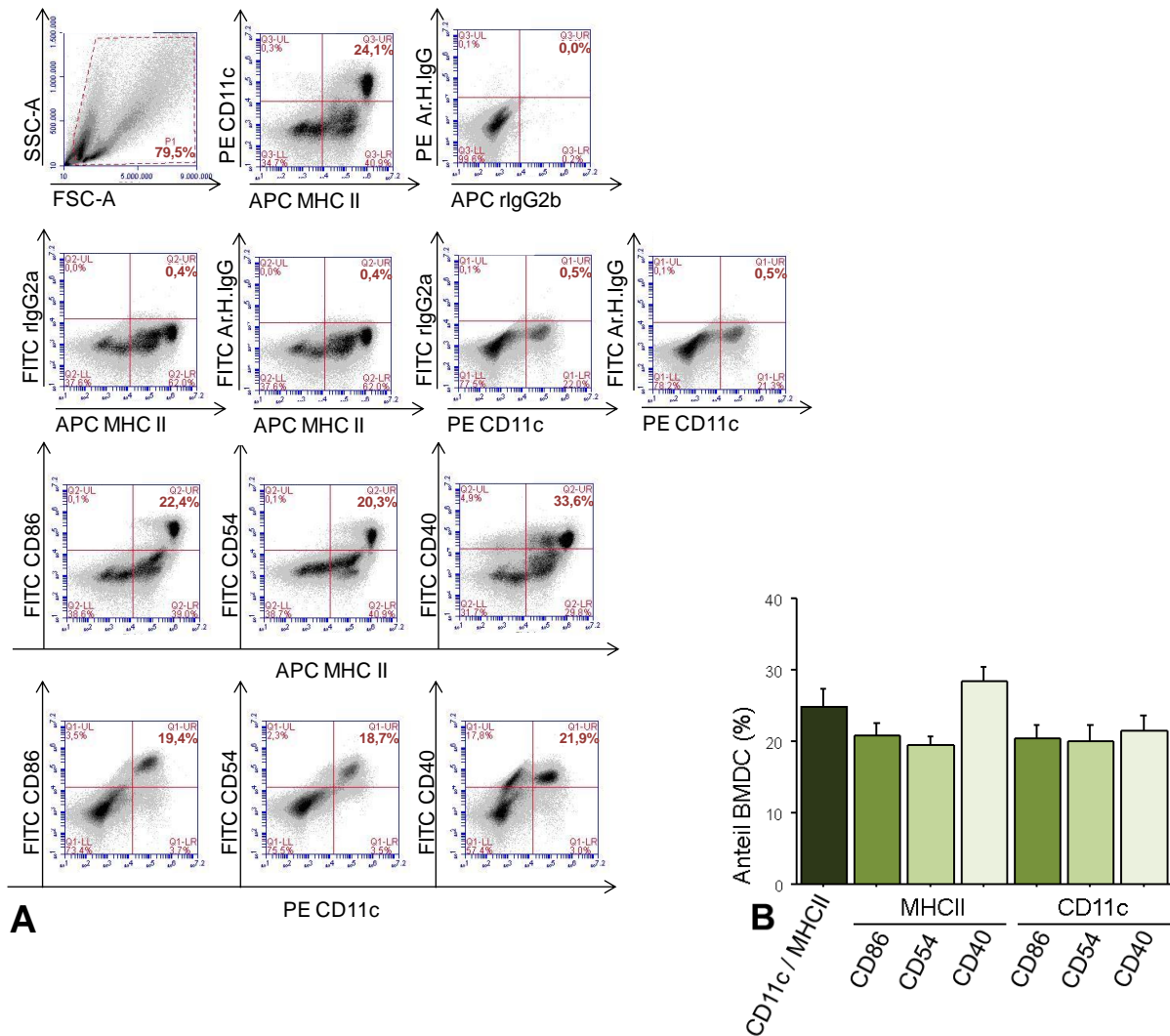


Abb. 22: Qualitäts-FACS: BMDC.

Exemplarisch dargestellt sind Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung *in vitro* generierter BMDCs. Mit Hilfe der Oberflächenantikörper MHC-II (APC-Fluorochrom), CD11c (PE-Fluorochrom), CD86, CD54 und CD40 (FITC-Fluorochrome) und der entsprechenden Isotyp-Kontrollen wurden BMDC-Zellpopulationen detektiert (A). Das Balkendiagramm (B) zeigt eine Übersicht über die gemittelten Zellraten der BMDCs mit den entsprechenden Oberflächenmarkern (Zeile drei und vier in A), die in unseren *in vitro* Infektionen mit Promastigoten benutzt wurden (n=5).

#### 4.2.2 Einfluss von MBL-AC, C3 oder C5 auf die Promastigoten-Aufnahme und Zytokinproduktion in MΦ und BMDC

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der *in vitro* Infektionen mit (opsonisierten) *L. major* Promastigoten anhand von Zytospinauszählungen sowie der Zytokinprofiluntersuchung mittels ELISA (Interleukin IL-6, IL-10, IL-12p40) vorgestellt. Es sind nacheinander die Resultate der MΦ-Infektionen (siehe S. 65-68) und die der BMDC-Infektionen (siehe S. 69-72) aufgeführt.

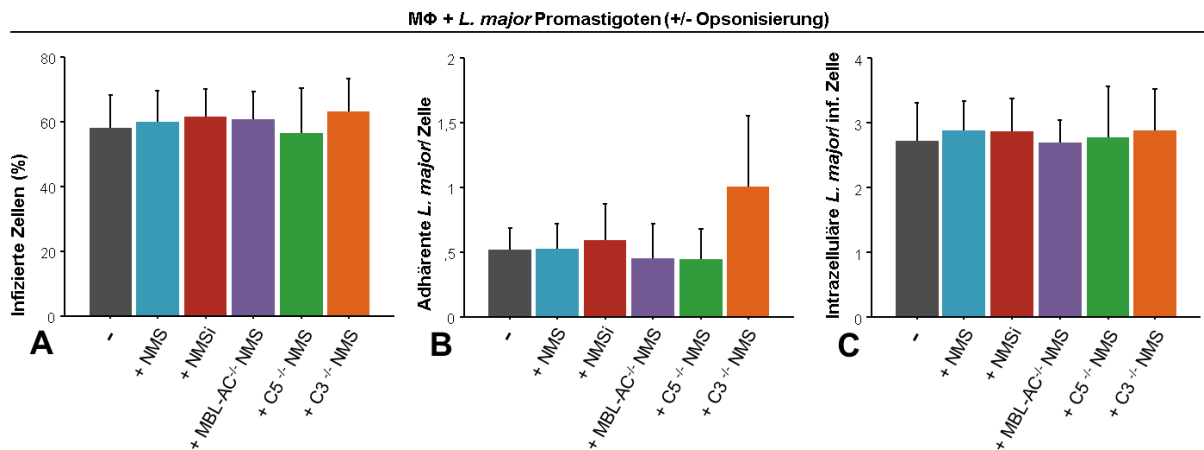
##### MΦ *in vitro* Infektion mit Promastigoten (+/- Opsonisierung)

MΦ sind Untersuchungsgegenstand der folgenden Versuche. Sie wurden mittels Biogel-Methode aus C57BL/6 Mäusen gewonnen, separiert und mit einer Zellzahl von  $0,2 \times 10^6$ /Well ( $c=0,4 \times 10^6$ /ml) in unbeschichteten Wellplatten ausgesät. Die jeweiligen Normalblutsera (NMS) der Tiere (MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS, C5<sup>-/-</sup> NMS, C3<sup>-/-</sup> NMS, jeweils 50 µl) wurden mit aufgereinigten metazyklischen Promastigoten (1 ml, entspricht 5% v/v) resuspendiert und im Warmwasserbad bei 37°C für 10 min inkubiert. Als Kontrolle diente Normalserum aus C57BL/6 Mäusen (NMS) und bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviertes/denaturiertes Normalserum aus C57BL/6 Mäusen (NMSi). Es folgte die Infektion der MΦ mit den opsonisierten Parasiten im Verhältnis 1:5 (das Volumen/Well wurde mit MΦ-Medium auf 1 ml ergänzt), die Inkubation für 18h, Bestückung der Objektträger, Färbung dieser mit der DiffQuick-Färbung und Auszählung von jeweils 200 Zellen/Ansatz unter dem Lichtmikroskop.

Untersucht wurde die Rate an infizierten MΦ (A), die Anzahl der adhärennten (B) und der intrazellulären Parasiten (C). Als Kontrollen dienten nicht-opsonisierte Parasiten (-), und die mit Normalserum (NMS) bzw. mit hitzeinaktiviertem Normalserum (NMSi) behandelten Parasiten (siehe Abb.23).

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen (X-Achse) und für die untersuchten Kriterien (Y-Achsen von **A**, **B**, **C**) finden. Die Infektionsraten (**A**) lagen bei durchschnittlich 58% (-), 60% (NMS), 61% (NMSi), 60% (MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS), 56% (C5<sup>-/-</sup> NMS) und 63% (C3<sup>-/-</sup> NMS). Für die Adhärenz (**B**) ergaben sich folgende Werte: 0,51 (-), 0,52 (NMS), 0,58 (NMSi), 0,45 (MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS), 0,44 (C5<sup>-/-</sup> NMS), und 0,99 (C3<sup>-/-</sup> NMS) *L. major*/Zelle. Bei der Auszählung der intrazellulären Parasiten (**C**) zeigten sich ähnliche Ergebnisse: 2,7 (-), 2,9 (NMS),

2,9 (NMSi), 2,7 (MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS), 2,8 (C5<sup>-/-</sup> NMS) und 2,9 (C3<sup>-/-</sup> NMS) *L. major*/infizierter Zelle.



**Abb. 23: MΦ *in vitro* Infektion mit *L. major*-Promastigoten +/- Opsonisierung.**

In dieser Versuchsreihe wurden mittels der Biogel-Methode gewonnene Gewebe-MΦ aus C57BL/6 Mäusen *in vitro* im Verhältnis 1:5 mit metazyklischen *L. major*-Promastigoten +/- Opsonisierung infiziert und für 18 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Opsonisierung der Parasiten erfolgte mit den entsprechenden Seren für 10 min im 37°C warmen Wasserbad. Anschließend wurden, getrennt nach den Ansätzen, Zytospins der MΦ angefertigt, die Objektträger mittels DiffQuick-Kit gefärbt und unter dem Lichtmikroskop gezählt (200 Zellen/Ansatz). Die ermittelten und die absoluten Zellzahlen sind als Mittelwert ± SEM (n ≥ 3) dargestellt.

#### ELISA der Medienüberstände der MΦ *in vitro* Infektion mit Promastigoten (+/- Opsonisierung)

Die Medienüberstände der MΦ *in vitro*-Versuche (n≥3) wurden mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf ihre Zytokinprofile untersucht. Hierfür wurden die Überstände aus den *in vitro*-Infektionen (siehe oben) nach 18 Stunden entnommen, ihren Ansätzen (siehe X-Achse) entsprechend gepoolt und mit den ELISA-Kits den Herstellerangaben protokollgetreu angesetzt. Untersucht wurden die Interleukine IL-6, IL-10 und IL-12p40, um eine mögliche Rolle in unseren Knockout-Modellen zu untersuchen. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte MΦ (0,2x10<sup>6</sup>/ml, --). Als Positivkontrolle nutzten wir MΦ, die mit Lipopolysaccharid (LPS, Stocklösung 10 µg/ml, 10 µl/Well) und IFN-γ (Stocklösung 10<sup>5</sup> U/ml, 10 µl/Well) versetzt waren (- LPS<sup>+</sup> IFN<sup>+</sup>).

IL-6 (**D**) scheint in keinem Stamm aufgrund der Infektion mit *L. major*-Promastigoten vermehrt gebildet zu werden. Unsere Ergebnisse liegen in allen Ansätzen nahe der Detektionsgrenze:

In den Überständen der singulären M $\Phi$  (- -, schwarzer Balken) war nahezu kein IL-6 (0,3 pg/ml) nachzuweisen. Im Ansatz mit den M $\Phi$ , die mit nicht-opsonisierten (grauer Balken) und mit C3-defizientem Serum opsonisierten Promastigoten (oranger Balken) infiziert waren, konnte kein IL6 (0) detektiert werden. Auch M $\Phi$  der Promastigote-Normalserum-Gruppe (NMS, hellblauer Balken) zeigten ein ähnliches Zytokinprofil mit 3 pg/ml. Wurden die M $\Phi$  mit Promastigote infiziert, die vorher dem NMSi-Serum (roter Balken) ausgesetzt waren, so bildeten diese APC 8 pg/ml IL-6. Im Falle einer Opsonisierung mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Serum (lila Balken) fiel das Ergebnis mit 13 pg/ml ähnlich gering aus. Auch das C5<sup>-/-</sup> Serum (grüner Balken) ließ die M $\Phi$  nur geringe Mengen an IL-6 bilden (3 pg/ml).

IL-10 (**E**) wurde in unsere Versuche mit aufgenommen, da es ein breit gefächertes Wirkspektrum und einen richtungsweisenden Einfluss auf die T-Zell-Immunität besitzt. Ursprünglich wurde es als ein typisch T<sub>H2</sub> abstammendes Zytokin identifiziert. Mittlerweile weiß man jedoch, dass es auch von T<sub>Reg</sub>-Zellen, T<sub>H1</sub>-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen, M $\Phi$ , DCs, Mastzellen, Eosinophilen und NK-Zellen gebildet wird. Wir untersuchten die Sekretion des IL-10 in unseren Ansätzen im Hinblick auf eventuelle Auffälligkeiten und Parallelen zu unseren *in vitro*-Infektionsraten. Vergleicht man die unstimulierten M $\Phi$  (schwarz, 13 pg/ml) mit den M $\Phi$  des Promastigoten-Ansatzes (grau, 117 pg/ml), so zeigt der Versuch, dass die Sekretion von IL-10 parasitenabhängig ist. Hierbei scheint es wiederum unabhängig davon zu sein, ob und mit welchem Serum die Parasiten zuvor opsonisiert wurden. Lediglich im MBL-AC<sup>-/-</sup> Ansatz (lila) zeigte sich die IL-10-Sekretion etwas vermindert (58 pg/ml), im Vergleich mit dem NMS-Ansatz (hellblau, 187 pg/ml) sogar signifikant mit \*p $\leq$ 0,05.

M $\Phi$  der NMSi-Gruppe (rot) sezernierten 106 pg/ml IL-10. Bei Vorliegen eines C5- (grün) bzw. C3-Knockouts (orange) kam es bei Opsonisierung der Parasiten mit diesem defizienten Serum zur Bildung von 96 pg/ml bzw. 129 pg/ml der jeweiligen Zytokine durch die M $\Phi$ .

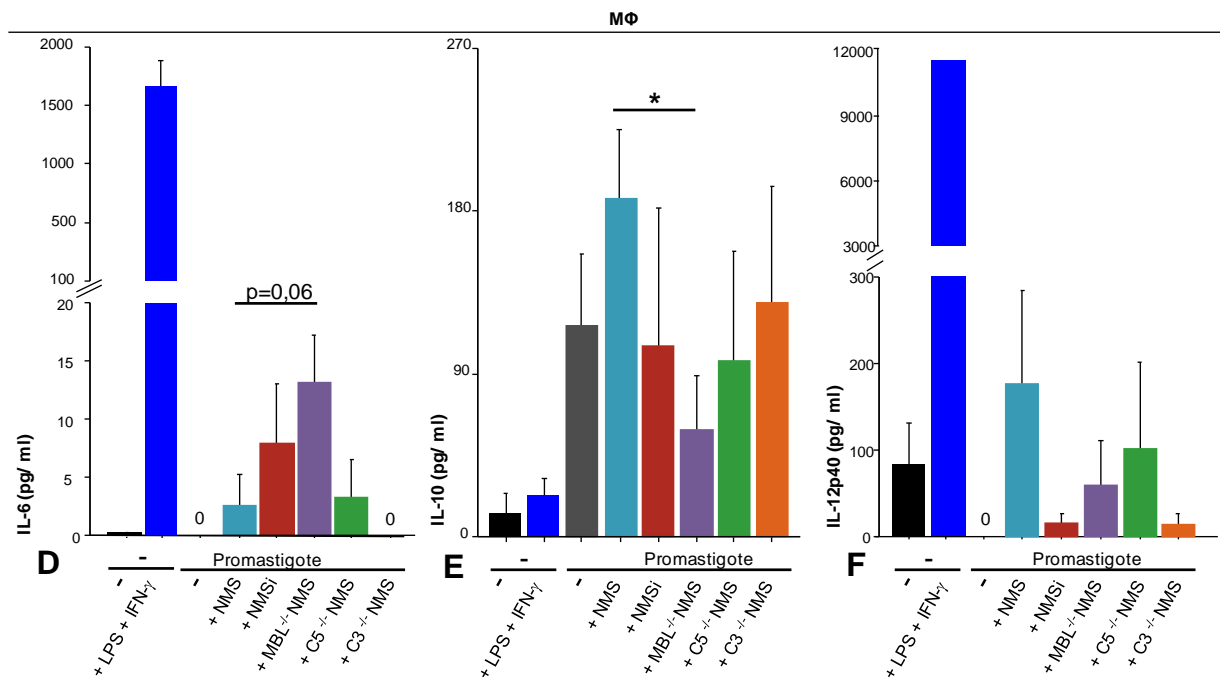
IL-12p40 (**F**) wird im Falle einer CL erst als Folge einer vorausgegangenen Aufnahme von Amastigoten in DCs durch DCs gebildet. Zu diesem Zeitpunkt sind M $\Phi$  von

Promastigoten längst infiltriert und deren IL-12-Produktion gestoppt. Ob die Unterdrückung der Signalgebung in M $\Phi$  eventuell von der Opsonisierung bzw. dem Fehlen eines Opsonins abhängt, sollte Anlass für diese Untersuchung sein. Es konnte jedoch keine durch den Parasiten getriggerte Freisetzung des Zytokins detektiert werden. In den Überständen der singulären M $\Phi$  (--, schwarz) waren 83 pg/ml IL-12p40 nachzuweisen, während die M $\Phi$ , die mit nicht-opsonisierten Promastigoten infiziert waren, kein detektierbares IL-12p40 sezernierten.

M $\Phi$  der Promastigote-Normalserum-Gruppe (NMS, hellblau) zeigten im Zytokinprofil eine Sekretion von 176 pg/ml des Interleukins. M $\Phi$ , welche mit Promastigote infiziert wurden, die vorher dem NMSi-Serum (rot) ausgesetzt waren, bildeten nur 16 pg/ml. Eine Opsonisierung mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Serum (lila) hatte eine IL-12p40-Sekretion von 60 pg/ml zur Folge. Auch das C5<sup>-/-</sup> Serum (grün) ließ die M $\Phi$  nur 101 pg/ml des Zytokins bilden. Die Opsonisierung der Parasiten mit C3<sup>-/-</sup> Serum (orange) resultierte mit 14 pg/ml in einer niedrigen IL12p40-Sekretion.

Vergleicht man somit die IL-12p40-Sekretion der unstimulierten M $\Phi$  (--) mit allen anderen Ansätzen, so konnte durch An- bzw. Abwesenheit der Proteine MBL-AC, C5 und C3 keine vermehrte oder verringerte Sekretion nachgewiesen werden (Abb. 24).





**Abb. 24: ELISA: MΦ *in vitro*-Infektion mit Promastigoten.**

Aufgeführt sind hier die Ergebnisse der ELISA von IL-6 (A), IL-10 (B), IL-12p40 (C) mit den Medienüberständen der MΦ *in vitro*-Infektionen. Die verschiedenen Ansätze waren singuläre MΦ (--), MΦ mit LPS (Stocklösung 10  $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ l/Well) und IFN- $\gamma$  (Stocklösung 10<sup>5</sup> U/ml, 10 $\mu$ l/Well) als Positivkontrolle, MΦ mit nicht-opsonierten Promastigoten und MΦ mit opsonierten Promastigoten (MOI 1:5). Die Opsonisierung erfolgte im Vorfeld mit Seren aus Knockout-Mausstämmen (NMS, NMSi, MBL-AC<sup>-/-</sup>, C5<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup>). Die Abnahme der Medienüberstände erfolgte nach 18h Inkubation, die Durchführung der ELISAs nach Herstellerangaben und die Messungen bei 450 nm. Die Konzentrationen auf der Y-Achse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angeben ( $n \geq 3$ , \* $p \leq 0.05$ ).

### **BMDC *in vitro* Infektion mit *L. major*-Promastigoten (+/- Opsonisierung)**

Dendritische Zellen (DC) nehmen bei einer Infektion mit *L. major* primär über FC $\gamma$ RI und FC $\gamma$ RIII Amastigoten auf, die sich zuvor in MΦ aus Promastigoten entwickelten. Durch infizierte DCs wird im Verlauf IL-12 gebildet, welches CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Ausdifferenzierung zu T<sub>H</sub>1-Zellen und diese wiederum zur IFN- $\gamma$  Produktion anregt. DC sind aber auch in der Lage Promastigoten aufzunehmen (Woelbing et al., 2006). Auch für BMDCs (siehe Abb. 25) führten wir eine quantitative Analyse der Infektionsraten (A), der Parasitenaufnahme (B) und der Adhärenz der Parasiten (C) durch. Ziel war es hier, Anhaltspunkte zu finden, ob das Fehlen der Komplementproteine MBL-AC, C5 und C3 einen Einfluss auf das Phagozytose-/Makropinozytose-Verhalten der DCs im *L. major*-Infektionsmodell hat. Benutzt wurden hierfür *in vitro*

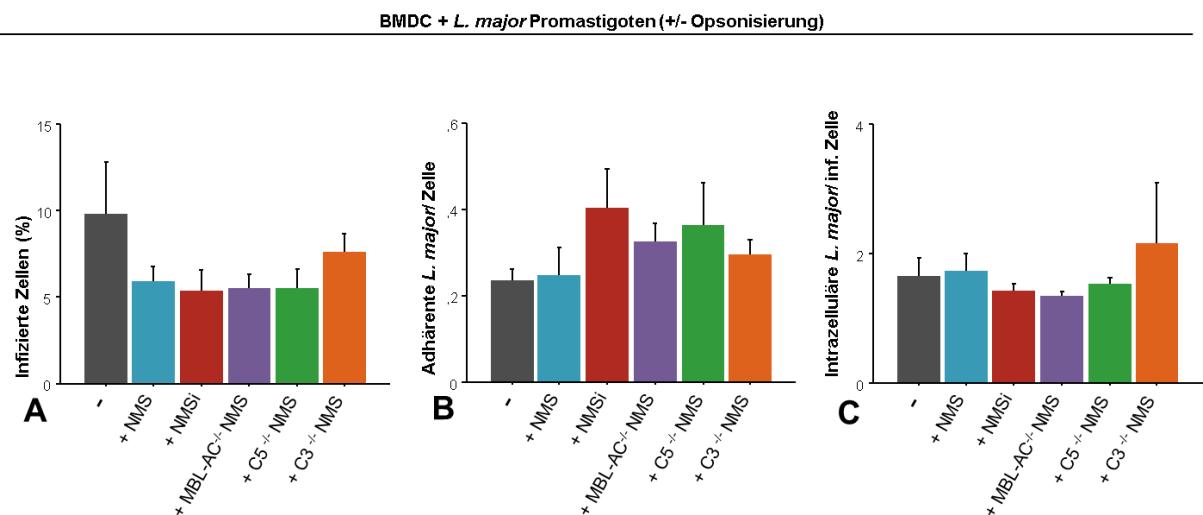
generierte BMDCs und *in vitro* kultivierte Promastigoten.

Unabhängig davon, welches Serum (C57BL/6 NMS, NMSi, MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS, C5<sup>-/-</sup> NMS, C3<sup>-/-</sup> NMS) für die Opsonisierung der Parasiten gewählt wurde, fielen die Ergebnisse in dieser Versuchsreihe ähnlich aus.

Der Prozentsatz infizierter Zellen (**A**) lag bei 10 % im Ansatz mit nicht-opsonisierten Promastigoten (-) und bei 6 % im NMS-Ansatz. Bei Promastigoten, die mit hitzeinaktiviertem Normalserum (NMSi) aus C57BL/6 Mäusen, mit MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS und C5<sup>-/-</sup> NMS behandelt waren, lag die Rate bei 5 % und bei Promastigoten, die in Kontakt C3<sup>-/-</sup> NMS kamen, bei 8 %.

Bzgl. der Adhärenz (**B**) ergaben sich folgende Ergebnisse: Mit durchschnittlich 0,4 Promastigoten/BMDC waren im NMSi-Ansatz die meisten Promastigoten adhären, gefolgt vom C5<sup>-/-</sup> NMS-Ansatz mit 0,36 Promastigoten/BMDC, dem MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS-Ansatz mit 0,33 Promastigoten/BMDC, dem C3<sup>-/-</sup> NMS-Ansatz mit 0,30 Parasiten/BMDC, dem C57BL/6 NMS-Ansatz mit 0,25 *L. major*/BMDC und schließlich dem nicht-opsonisierten Ansatz mit 0,24 Promastigoten/BMDC.

Bei der Auszählung der intrazellulären Promastigoten/infizierter Zelle (**C**) wurden die nachfolgenden Zahlen ermittelt: von den nicht-opsonisierten Promastigoten (-) wurden durchschnittlich 1,65 Parasiten von einer BMDC aufgenommen. Von den mit NMS-opsonisierten Parasiten 1,72 pro infizierter BMDC. 1,42 Parasiten wurden in BMDCs gezählt, wenn der Ansatz mit hitzeinaktiviertem NMS (NMSi) behandelt war und 1,33 Parasiten im Falle einer vorherigen MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS-Behandlung von *L. major*. Mit 1,53 Promastigoten/inf. Zelle von mit C5<sup>-/-</sup> NMS-opsonisierten Parasiten und mit 2,16 Promastigoten/inf. Zelle von mit C3<sup>-/-</sup> NMS-opsonisierten Parasiten lagen die Anzahlen der intrazellulär gezählten Parasiten ebenfalls auf ähnlichem Niveau.



**Abb. 25: BMDC *in vitro*-Infektion: *L. major*-Promastigote +/- Oponisierung.**

In dieser Versuchsreihe wurden die Rate an infizierten Zellen (A), die Anzahl der adhärenenten (B) und der intrazellulären Parasiten (C) bei einer 1:5 *in vitro*-Infektion von BMDCs ( $0,2 \times 10^6$  BMDCs/Well,  $c=0,4 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit der promastigoten Form von *L. major* untersucht. Zuerst erfolgte nach Protokoll die Generierung der APCs aus C57BL/6 Mäusen über 6 Tage. Anschließend wurden diese infiziert und für 18 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Die Parasiten wurden hierfür je nach Ansatz 10 min bei 37 °C im Wasserbad mit 5% (v/v) des entsprechenden Serums (C57BL/6 NMS, NMSi, MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS, C5<sup>-/-</sup> NMS und C3<sup>-/-</sup> NMS) opsonisiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die BMDCs mithilfe einer Cellspin-Zentrifuge auf Objektträger geschleudert und mit dem DiffQuick-Kit gefärbt. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Die Rate infizierter Zellen sowie die absoluten Zellzahlen adhärenenten und intrazellulärer *L. major* sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, n=5.

#### ELISA der Medienüberstände der BMDC *in vitro*-Infektion mit Promastigote (+/- Oponisierung)

Die Medienüberstände der BMDC *in vitro*-Infektionsreihen wurden nach 18-stündiger Inkubation entnommen und der ELISA-Auswertung zugeführt (siehe Abb. 26). Auch hier wurden die Zytokine IL-6 (D), IL-10 (E) und IL-12p40 (F) untersucht. Als Negativkontrolle nutzten wir die Überstände reiner unstimulierter BMDCs (schwarzer Balken) und als Positivkontrolle mit LPS (Stocklösung 10 µg/ml, 10 µl/Well) und IFN-γ (Stocklösung 10<sup>5</sup> U/ml, 10 µl/Well) versetzte BMDCs (dunkelblau).

IL-6 (D) wird als eines der wichtigsten Zytokine in Akute Phase-Reaktionen auch von DCs gebildet und stimuliert die Differenzierung von Monozyten zu MΦ. Bisher ist nicht geklärt, ob und wenn ja, welche tragende Rolle dem Interleukin in der CL zukommt. In unseren Versuchen liegen die Werte für IL-6 ähnlich wie in den MΦ *in vitro*

Infektionsreihen nahe der Detektionsgrenze. Auch wurde die Bildung des Interleukins durch BMDCs weder von den Parasiten beeinflusst noch zeigte die Opsonisierung der Parasiten mit den Sera unserer Knockoutstämme (MBL-AC<sup>-/-</sup>, C5<sup>-/-</sup>, C3<sup>-/-</sup>) eine Wirkung. Die BMDCs unserer Negativkontrolle (schwarz) bildeten 14 pg/ml IL-6. BMDC, die mit unbehandelten Promastigoten (grauer Balken) versetzt waren, 4 pg/ml. NMS-BMDC (hellblau) sezernierten 10 pg/ml und NMSi-BMDC (rot) 5 pg/ml. Mit 6 pg/ml lag die IL-6-Produktion von BMDC, die mit Promastigoten infiziert wurden, die wiederum mit MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS (lila) opsonisiert waren, etwas unter dem Niveau der C5<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Ansätze (grün bzw. orange, jeweils 8 pg/ml).

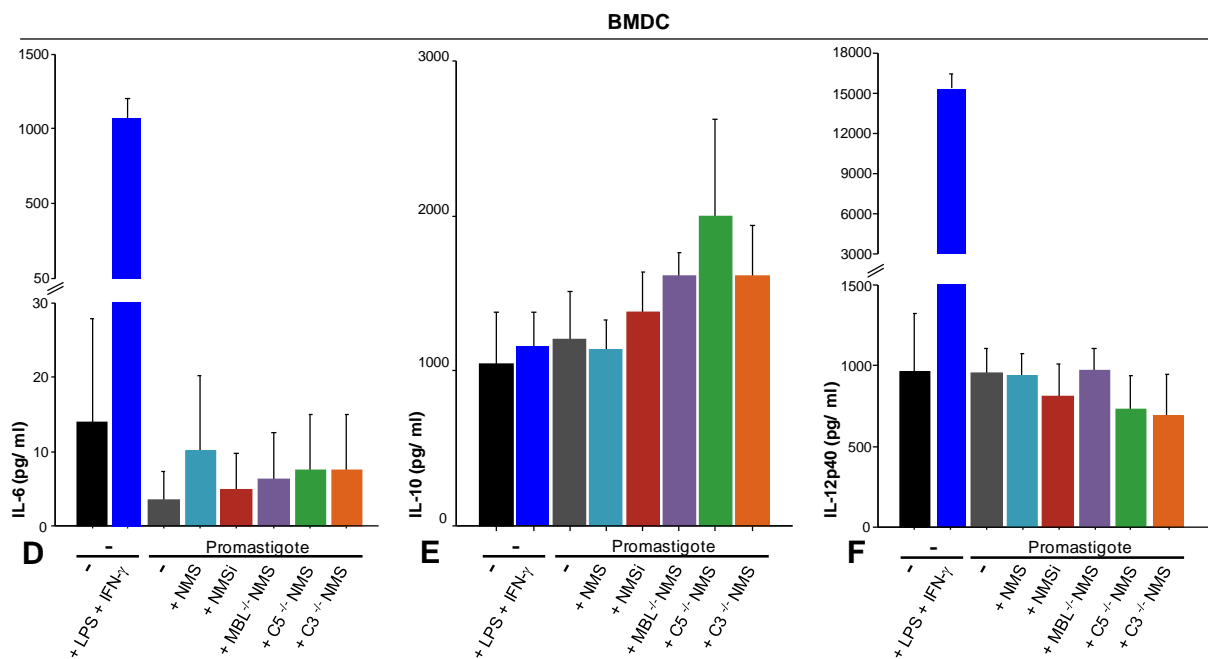
Aufgrund der anti-inflammatorischen Effekte von IL-10 (E) auf u.a. DCs (es hemmt die Phagozytose, die Ausbildung von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie von co-stimulierenden Molekülen sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine) nahmen wir es in unsere Analyse mit auf. Man ist sich bis heute nicht sicher, welche Zellen über eine IL-10-Sekretion die von IL-10 vermittelte Unterdrückung der anti-*Leishmania* Immunantwort steuern. Bei Menschen spielt es in der *L. major*-Abwehr zweifellos eine kritische Rolle, da eine CL hier mit erhöhten IL-10-Levels einhergeht (Schwarz et al., 2013). Wir wollten in unseren Versuchen herausfinden, ob sich die Zytokinproduktion von BMDCs durch das Fehlen der Komplementproteine MBL-AC, C5 und C3 im *in vitro*-Infektionsmodell verändert.

Man kann bei IL-10 eine etwas höhere IL-10-Produktion im MBL<sup>-/-</sup> NMS- (1,6x10<sup>3</sup> pg/ml), C5<sup>-/-</sup> NMS- (2x10<sup>3</sup> pg/ml) und C3<sup>-/-</sup> NMS-Ansatz (1,6x10<sup>3</sup> pg/ml) erkennen, die Freisetzung des Interleukins geschieht jedoch nicht parasiteninduziert (vergleiche unstimuliert (schwarz) mit singulären Promastigoten (grau)) und es konnten keine signifikante Unterschiede detektiert werden.

IL-12 (F) ist das wohl wichtigste Interleukin in der CL. Es wird von DCs gebildet, wenn diese durch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Amastigoten stimuliert werden (Kautz-Neu et al., 2012). In der, diesem Versuch vorausgegangen, *in vitro*-Infektion wurden Promastigoten benutzt, welche die BMDCs nur in geringerem Maße phagozytieren. In der Komplexität unseres Immunsystems bleibt ein Kontakt von DCs zu opsonisierten Promastigoten im Falle einer CL aber nicht aus. Deshalb sollte hier untersucht werden, ob sich Auffälligkeiten finden lassen, wenn BMDCs in Kontakt mit opsonisierten Promastigoten treten, bzw. ob das Fehlen eines

opsonisierenden Proteins (MBL-AC, C5, C3) eine Auswirkung auf die IL-12-Produktion hat.

Betrachtet man die Auswertung für IL-12p40 sieht man auch hier keine signifikanten Unterschiede. IL-12p40 ist im C5<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> NMS-Ansatz lediglich etwas weniger (729 pg/ml bzw. 690 pg/ml) vorhanden als bei den restlichen Ansätzen (nicht-opsonisiert: 950 pg/ml, C57BL/6-NMS: 935 pg/ml, C57BL/6-NMSi: 810 pg/ml).



**Abb. 26: ELISA: BMDC *in vitro*-Infektion mit Promastigote.**

Dargestellt sind die ELISA-Ergebnisse der BMDC *in vitro*-Infektionen (MOI 1:5). Untersucht wurden die Zytokine IL-6 (D), IL-10 (E), IL-12p40 (F) in den Medienüberständen nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die verschiedenen Ansätze waren singuläre BMDC, BMDC mit LPS (Stocklösung 10 µg/ml, 10µl/Well) und IFN-γ (Stocklösung 10<sup>5</sup> U/ml, 10µl/Well) als Positivkontrolle, BMDC mit nicht-opsonierten Promastigoten und BMDC mit opsonierten Promastigoten. Die Opsonisierung erfolgte bei der zuvor durchgeführten *in vitro*-Infektion mit Seren aus unterschiedlichen (Knockout-)Mausstämmen (C57BL/6 NMS, C57BL/6 NMSi, MBL-AC<sup>-/-</sup> NMS, C5<sup>-/-</sup> NMS und C3<sup>-/-</sup> NMS). Anhand der Herstellerangaben wurden die ELISA durchgeführt und die ELISA-Platten anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die auf der Y-Achse angegebenen Konzentrationen sind Mittelwerte ± SEM (n=5).

### 4.2.3 Phagozytose- und Zytokinverhalten von M $\Phi$ und BMDC bei Infektion mit Gewebeamastigoten aus MBL-AC- oder C3-defizienten Tieren

In der nachfolgenden Versuchsreihe untersuchten wir, ob Amastigoten aus MBL-AC<sup>-/-</sup> bzw. C3<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu Amastigoten aus C57BL/6 Mäusen in unterschiedlichem Maße von M $\Phi$  (siehe S. 73-76) und BMDCs (siehe S. 76-79) aus Wildtyp-Mäusen phagozytiert werden. Ob also ein Mangel dieser Opsonine im Organismus der infizierten Maus prinzipiell die Phagozytose durch M $\Phi$  bzw. BMDCs beeinflusst. Zur Gewinnung der Amastigoten wurden die Tiere (C57BL/6, MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup>) vier Wochen vor Versuch in beide Ohren mit einer Hochdosis ( $2 \times 10^5$ ) an metazyklischen Promastigoten infiziert. Am Versuchstag erfolgte die Separation der mittlerweile zu Amastigoten umgewandelten *L. major*-Parasiten aus den Ohren.

#### M $\Phi$ -Infektion mit Gewebeamastigoten aus MBL-AC- und C3-defizienten Tieren

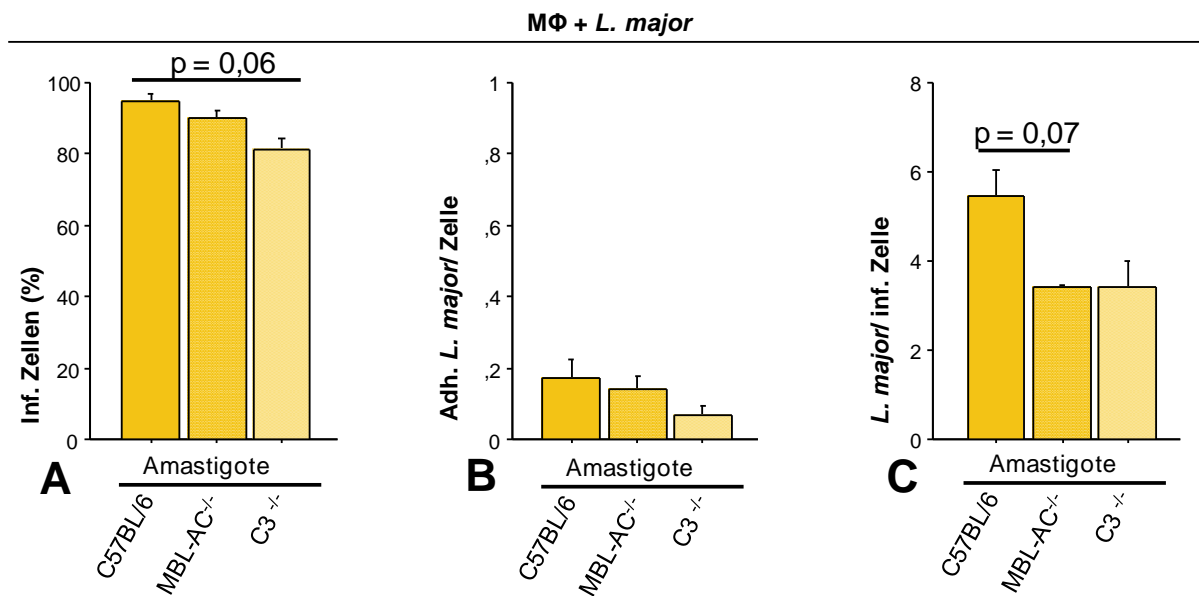
M $\Phi$  nehmen sowohl Promastigote als auch Amastigote auf. Bei einer physiologischen Infektion phagozytieren sie jedoch primär die übertragenen Promastigoten (Woelbing et al., 2006). Für unseren Versuch wurden sie in C57BL/6 Mäusen mithilfe von Biogel generiert, separiert und *in vitro* 1:5 mit den jeweiligen Parasiten infiziert (siehe Abb. 27). Die Infektionsraten (A) der M $\Phi$  mit C57BL/6 Amastigoten lagen bei 95 %, mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Amastigoten bei 90 % und bei C3<sup>-/-</sup> Amastigoten bei 81 %. Es zeigte sich mit  $p=0,06$  eine Tendenz für eine erniedrigte Infektionsrate bei Amastigoten aus C3<sup>-/-</sup> Mäusen.

Das mittlere Diagramm (B) zeigt, dass die ausgezählten Durchschnittswerte der adherenten Amastigoten bei 0,17 *L. major*/Zelle im C57BL/6 Amastigoten-Ansatz, bei 0,14 *L. major*/Zelle im MBL-AC<sup>-/-</sup> Amastigoten-Ansatz und bei 0,07 *L. major*/Zelle im C3<sup>-/-</sup> Amastigoten-Ansatz lagen, jeweils ohne Signifikanz.

Die Anzahl der MBL-AC<sup>-/-</sup> Amastigoten und C3<sup>-/-</sup> Amastigoten pro infizierter M $\Phi$  (C) lag bei jeweils 3,4 *L. major*/Zelle. Stammten die Amastigoten aus MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich eine Tendenz ( $p=0,07$ ) für eine verringerte Aufnahme in Wildtyp-M $\Phi$  im Vergleich zu Amastigoten aus C57BL/6 Tieren. Insgesamt betrachtet, lassen sich in unseren Versuchen keine Unterschiede bzgl. der Abstammung der Amastigote finden. Lediglich Tendenzen zur verringerten Infektionsrate von Amastigoten aus C3<sup>-/-</sup> Tieren (A) und zur verminderten Aufnahme nach intrazellulär von Amastigoten

aus MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen (**C**) ließen sich erkennen.

Unsere Versuche zeigten ferner, dass die Infektionsraten der MΦ durch Amastigote höher ist als durch Promastigote (siehe Anhang, Abb. 34 A-C). Bei der Auszählung der adhärennten Parasiten pro MΦ zeigte sich hingegen eine verringerte Adhärenz bei Infektion mit Amastigoten. Mit der Aufnahme von durchschnittlich 5,5 C57BL/6 Amastigote/inf. Zelle nahmen die MΦ signifikant (\*p≤0,05) mehr amastigote Parasiten auf als MΦ in den *in vitro*-Infektionen mit Promastigoten.



**Abb. 27: MΦ *in vitro*-Infektion mit *L. major*-Amastigoten.**

Für die Bestimmung der Rate an infizierten Zellen (**A**), die Anzahl der adhärennten (**B**) und intrazellulären Amastigoten in infizierten MΦ (**C**) wurden mittels Biogel-Methode MΦ aus C57BL/6-Mäusen separiert. Anschließend erfolgte die 1:5 *in vitro*-Infektion mit der amastigoten Form von *L. major* ( $1 \times 10^6$  *L. major*/Well) aus C57BL/6, MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Tieren und eine Inkubation im Brutschrank für 18 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Die MΦ wurden nach der Inkubation, den Ansätzen entsprechend getrennt, mit der Cellspin-Zentrifuge auf Objektträger geschleudert. Die Färbung erfolgte mit dem DiffQuick-Kit und die Auszählung unter dem Lichtmikroskop. Die ermittelten Raten infizierter Zellen und absoluten Zellzahlen sind als Mittelwerte ± SEM (n=2) angegeben.

**ELISA-Auswertung der MΦ-Infektion mit Amastigoten aus MBL-AC- und C3-defizienten Tieren**

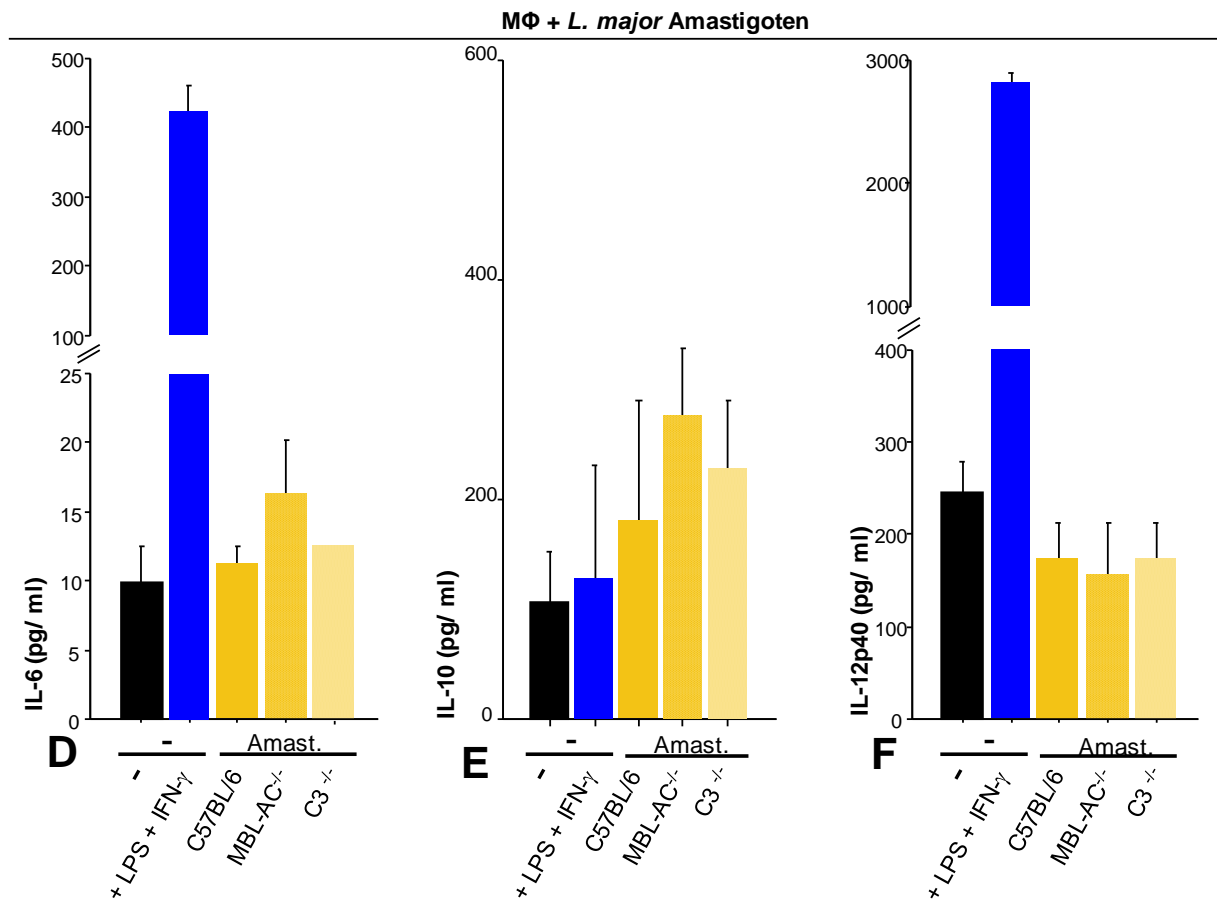
Wir untersuchten die Medienüberstände der Amastigoten *in vitro*-Infektionsreihen nach 18h Inkubationszeit mittels ELISA auf ihr Zytokinprofil (siehe Abb. **28**). Ziel war es herauszufinden, ob ein *in vivo* vorliegender Knockout in MBL-AC oder C3 Einfluss auf die intrazelluläre Zytokinproduktion in MΦ aus Wildtyp-Mäusen hat.

Die Ergebnisse der IL-6-Auswertung (**D**) liegen auch hier, wie bei der MΦ *in vitro*-Infektion mit Promastigoten nahe der Detektionsgrenze und man kann keine vermehrte Freisetzung von IL-6 durch den Parasiten erkennen. C57BL/6-Amastigoten führten in den C57BL/6-MΦ zu einer Freisetzung von 11 pg/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup> Amastigoten zu einer Sekretion von 16 pg/ml und C3<sup>-/-</sup> Amastigoten zu einer Bildung von 12 pg/ml.

Für IL-10 (**E**) liegen die ermittelten Werte bei folgenden: unstimulierte MΦ (--) bilden 105 pg/ml des Interleukins. Mit 180 pg/ml fiel die Sekretion durch die mit C57BL/6-Amastigote infizierten MΦ etwas geringer aus als durch MBL-AC<sup>-/-</sup> Amastigote (275 pg/ml) oder C3<sup>-/-</sup> Amastigote (229 pg/ml).

Zu guter Letzt wurde die Freisetzung von IL-12p40 (**F**) durch MΦ untersucht, die mit Amastigote (C57BL/6 bzw. C3<sup>-/-</sup> Amastigote: 172 pg/ml, MBL-AC<sup>-/-</sup> Amastigote: 156 pg/ml) infiziert wurden. Die Sekretion von unstimulierten MΦ (--) lag bei 246 pg/ml. Die Versuchsreihe zeigt keine relevanten Unterschiede in der Zytokinproduktion (IL-6, IL-10 und IL-12p40) durch C57BL/6-MΦ, unabhängig davon, mit welchen Amastigoten sie infiziert wurden.





**Abb. 28: ELISA: MΦ *in vitro*-Infektion mit Amastigoten.**

Hier werden die Ergebnisse der ELISA von IL-6 (D), IL-10 (E), IL-12p40 (F) mit Medienüberständen der *in vitro*-Infektionen von C57BL/6-MΦ mit Amastigote gezeigt. Untersucht wurden Ansätze mit Amastigote aus C57BL/6-Wildtyp-, MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Mäusen. Als Kontrolle dienten singuläre Wildtyp-MΦ und mit LPS und IFN-γ stimulierte. 18h nach der 1:5 Infektion ( $0,2 \times 10^6$  MΦ/Well) erfolgte die Abnahme der Medienüberstände. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die dargestellten Zytokin-Konzentrationen sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=2).

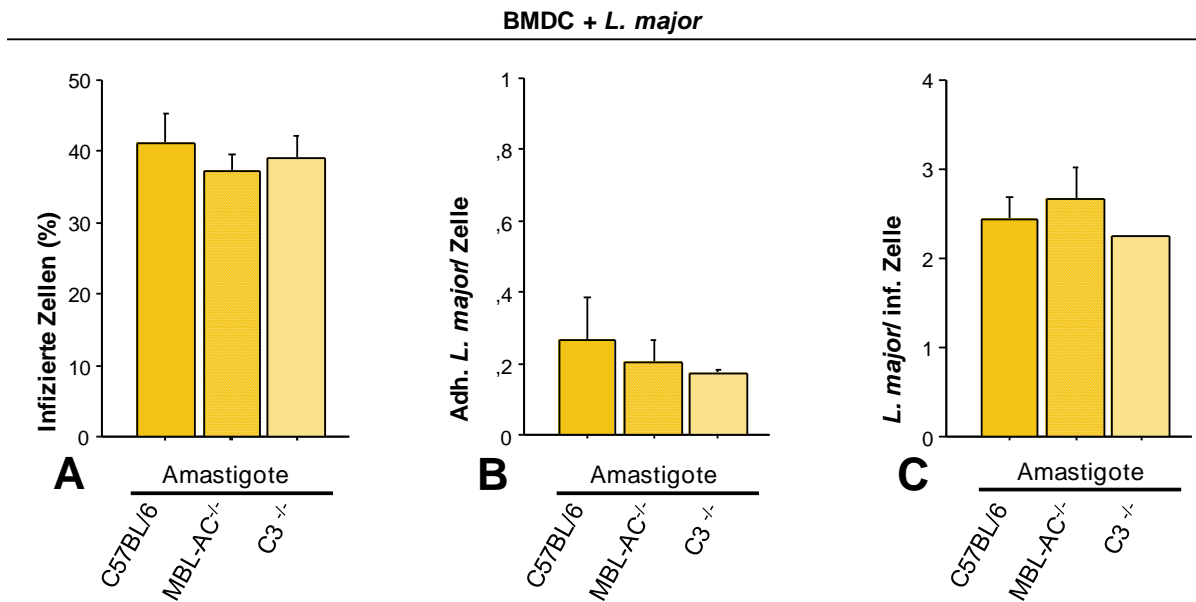
### **BMDC-Infektion mit Gewebeamastigote aus MBL-AC- und C3-defizienten Tieren**

Amastigoten sind die typische Lebensform von *L. major*, welche von Dendritischen Zellen phagozytiert und endozytiert werden. Wir generierten BMDCs aus Knochenmark von C57BL/6-Tieren und infizierten diese anschließend *in vitro* mit Amastigoten aus MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Tieren (siehe Abb. **29**).

Die Infektionsraten der BMDCs (**A**) bei Infektion mit Amastigoten aus C57BL/6 lagen bei 41 %, gefolgt von 39 % infizierten BMDCs mit Amastigoten aus C3<sup>-/-</sup> Tieren und 37 % im Falle einer Infektion mit Amastigoten aus der MBL-AC<sup>-/-</sup> Maus.

Parallel hierzu wurden die an BMDCs adhärenen *L. major*-Amastigoten gezählt (**B**): aus C57BL/6 stammend waren 0,27 Amastigoten pro BMDC, aus MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen stammend 0,21 und aus C3<sup>-/-</sup> Tieren stammend 0,17 Amastigoten pro BMDC adhärenent.

Um herauszufinden, in welchem Maße BMDCs die aus unterschiedlichen Stämmen generierten Amastigote aufnehmen, wurden die intrazellulären Amastigote in den infizierten BMDCs gezählt (**C**): Von den Amastigoten aus C57BL/6 Mäusen wurden 2,43 *L. major*/inf. Zelle aufgenommen, bei Amastigote aus MBL-AC<sup>-/-</sup> Tieren waren es 2,67 und bei Amastigote aus C3<sup>-/-</sup> Tieren 2,25 *L. major*/inf. Zelle. Die Infektionsraten der BMDCs bei Infektion mit Amastigoten aus C57BL/6, MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> lagen signifikant höher (\*\*p≤0,002) als bei Infektion mit Serumopsonisierten Promastigoten in unseren vorangegangenen *in vitro*-Versuchen (siehe auch Anhang, Abb. **34 D-F**).



**Abb. 29: BMDC *in vitro*-Infektion mit *L. major*-Amastigoten.**

In dieser Versuchsreihe wurden über 6 Tage BMDCs aus C57BL/6-Mäusen generiert und jeweils  $0,2 \times 10^6$ /Well ausgesät. Anschließend wurden sie *in vitro* 1:5 mit der amastigoten Form von *L. major* infiziert und für 18 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Amastigote stammten aus C57BL/6-Wildtyp-Mäusen und aus MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Tieren auf C57BL/6-Hintergrund. Sie wurden vier Wochen zuvor in beide Ohren mit  $10^3$  metazyklischen Promastigoten infiziert. Am Versuchstag wurden die Amastigote aus den Ohren der Tiere separiert. Nach der 18-stündigen Inkubation wurden die BMDCs den Ansätzen entsprechend getrennt auf Objektträger geschleudert, mit der DiffQuick-Färbung gefärbt und unter dem Lichtmikroskop gezählt. Untersucht wurde die Rate an infizierten Zellen (A), die Anzahl der adhärenenten (B) und der intrazellulären amastigoten Parasiten (C). Die dargestellten ermittelten Zellraten und absoluten Zellzahlen stehen für Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=2).

**ELISA: BMDC-Infektion mit Amastigote aus MBL-AC- und C3-defizienten Tieren**

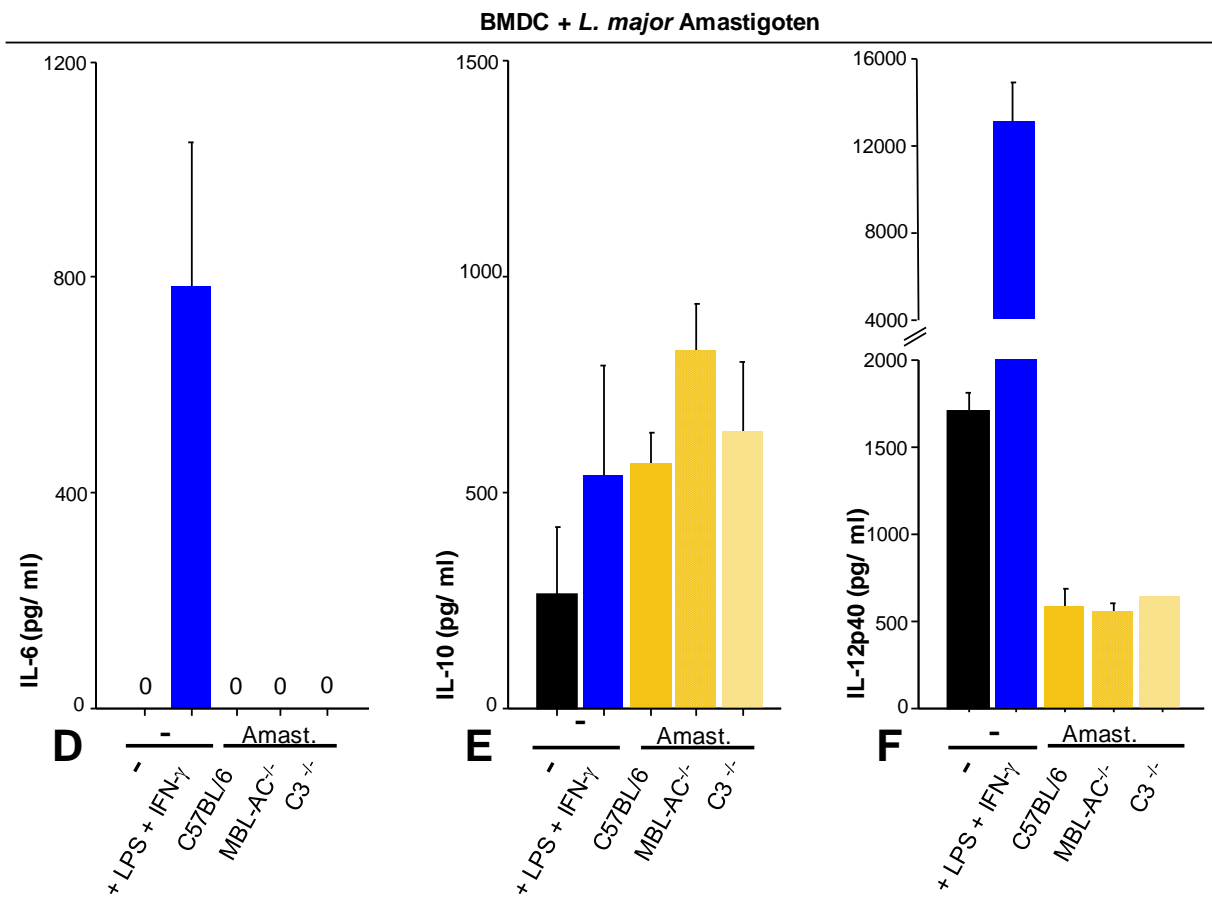
Die Medienüberstände der Amastigoten *in vitro*-Infektionsreihen wurden nach 18h Inkubationszeit entnommen. Mittels ELISA analysierten wir hier das Zytokinprofil unserer BMDCs aus C57BL/6-Tieren hinsichtlich der Interleukine IL-6 (siehe Abb. **30 D**), IL-10 (**E**) und IL-12p40 (**F**). Ziel war es zu untersuchen, ob unsere Wildtyp-BMDCs auf die Amastigote aus den Knockout-Tieren (MBL-AC<sup>-/-</sup> bzw. C3<sup>-/-</sup>) mit unterschiedlichen Zytokinproduktionen reagieren.

Abb. (**D**) zeigt, dass, abgesehen von der Positivkontrolle (siehe LPS (Stocklösung 10 µg/ml, 10µl/Well) und IFN-γ (Stocklösung 10<sup>5</sup> U/ml, 10µl/Well)), keine IL-6-Produktion stattfand. Da auch in der *in vitro*-Infektionsreihe von BMDCs mit Promastigoten (siehe Abb. **26 D**) nur sehr geringe Mengen an IL-6 detektiert wurden, liegt dies durchaus im möglichen Bereich.

Die IL-10-Produktion (**E**) lag in den Ansätzen mit C57BL/6, MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Amastigoten bei 568 pg/ml, 827 pg/ml bzw. bei 644 pg/ml.

Bei der Untersuchung von IL-12p40 (**F**) bildeten die C57BL/6-BMDCs, die mit C57BL/6-Amastigoten infiziert wurden, 584 pg/ml und BMDCs, die mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Amastigoten infiziert waren, 548,77 pg/ml des Interleukin. Im dritten Ansatz mit C3<sup>-/-</sup> Amastigoten wurden 638 pg/ml IL-12p40 detektiert.

Für keines der Interleukine zeigte sich in unseren Versuchen eine Signifikanz hinsichtlich der Sekretionsrate durch BMDCs.



**Abb. 30: ELISA: BMDC *in vitro*-Infektion mit Amastigote.**

Gezeigt werden hier die Ergebnisse der ELISA von IL-6 (D), IL-10 (E), IL-12p40 (F) mit den Medienüberständen der BMDC-Amastigoten *in vitro*-Infektionen (1:5 Infektion). Die Amastigote stammten aus C57BL/6-Mäusen und Knockout-Mäusen (MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup>) auf C57BL/6-Hintergrund, die BMDC aus C57BL/6-Mäusen. Ansätze mit unstimulierten und mit LPS (Stocklösung 10  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ l/Well) und IFN- $\gamma$  (Stocklösung 10<sup>5</sup> U/ml, 10  $\mu$ l/Well) stimulierten BMDCs dienten als Kontrolle. Die Abnahme der Medienüberstände erfolgte nach 18h Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Messung der nach Protokoll durchgeführten ELISA erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die ermittelten Konzentrationen sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (n=2).

## 5 Diskussion

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit waren unter anderem das Mannose-bindende Lektin (MBL), die Komplementfaktoren C3 und C5 sowie die durch Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen (M $\Phi$ ) gebildeten Zytokine IL-6, IL-10 und IL-12p40 im Falle einer Infektion mit *Leishmania major*. Für unsere *in vivo*- und *in vitro*-Versuche nutzten wir das Mausmodell. Hintergrund ist der bisherige Wissensstand, dass im ersten Schritt der Immunantwort bei einer *L. major*-Infektion das angeborene Immunsystem mittels Komplementsystem zum Einsatz kommt. Es ist in der Lage, nach dem Stich einer Sandmücke bereits etwa 90% der Parasiten unschädlich zu machen (Dominguez et al., 2003). MBL kommt hier eine Rolle als sogenannter „Vor-Antikörper“ (engl. „*ante-antibody*“) zu, da es agiert, bevor das adaptive Immunsystem zeitlich versetzt eingreifen kann (Ezekowitz, 1991). Die Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunreaktion bilden u.a. Abwehrzellen wie DCs und M $\Phi$  über ihre Zytokinproduktion (Fischer et al., 2013).

### 5.1 MBL-AC-Knockout in der kutanen Leishmaniasis

Leishmanien besitzen sowohl als Promastigote wie auch als Amastigote mannose-containing lipophosphoglycan (LPG) und mannose glycoinositol-phospholipids auf ihrer Oberfläche. Diese Glukokonjugate fungieren als **pathogen associated molecular patterns** (PAMPs) und werden von der **carbohydrate recognition domain** (CRD) des MBL erkannt (Mishra et al., 2015). Dessen Rolle scheint sich zwischen *Leishmania*-Stämmen, die eine viszerale Verlaufsform (z.B. *L. donovani* und *L. infantum*) und solchen, die eine kutane Leishmaniasis (z.B. *L. major* und *L. guyanensis*) verursachen (von Stebut et al., 2016), zu unterscheiden (de Araujo et al., 2015, Alonso et al., 2007, Mishra et al., 2015, Asgharzadeh et al., 2007).

#### Dickere Ohrläsionen nach *L. major*-Infektion mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen

In unseren *in vivo*-Ohrläsionsversuchen ( $n \leq 6$ , *low dose* Infektion mit  $10^3$  *L. major*/Ohr nach Belkaid et al., 2000) mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten diese im Zeitraum von drei bis zehn Wochen post infectionem (p.i.) einen signifikant schlechteren klinischen In-

fektionsverlauf als unsere Kontrollgruppe mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. In beiden Gruppen heilten die Läsionen jedoch vollständig aus. Dass die Ohrläsionen der MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant dickere Läsionen zeigten, bestätigt die bisherige Annahme, dass MBL für die Infektionsabwehr relevant ist. Unklar ist, inwiefern. Der Infektionsverlauf in unseren MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen deutet darauf hin, dass das Fehlen des Proteins bei einer Infektion mit *L. major* vorübergehend zu einer Immunkompromittierung führt, letztlich jedoch nicht ausschlaggebend für eine Heilung sein muss. Die signifikant höheren Parasitenlasten in den Ohrläsionen unserer MBL-AC<sup>-/-</sup> Tiere und auch die schnellere Viszeralisierung, gemessen anhand der Milzbelastung mit *L. major*, zeigen diese vorübergehende Immunkompromittierung.

In einer Untersuchung zu kutaner Leishmaniasis in Verbindung mit dem Parasiten *L. guyanensis* in der brasilianischen Bevölkerung wurde beobachtet, dass die Genvarianten, die für hohe MBL-Levels kodieren (YA/YA + YA/XA), einen Schutz gewährleisten. Umgekehrt finden sich hier bei CL-Patienten signifikant häufiger Genvarianten, die mit niedrigen MBL-Levels einhergehen (de Araujo et al., 2015). Dieses Erkenntnis lässt sich mit unseren Beobachtungen in Einklang bringen, da in beiden Fällen (MBL-Mangel bzw. -Knockout) der klinische Verlauf schlechter ist.

Dagegen zeigte sich bei Studien zur Anfälligkeit für viszerale Leishmaniasis in der indischen Population, dass VL-Patienten bei Infektion mit *L. donovani* erhöhte MBL-Level aufweisen (Mishra et al., 2015). Durch Analyse der MBL-Konzentrationen und der zugrunde liegenden genetischen Ausstattung in mehreren Studien zu viszeraler Leishmaniasis (VL) wurde gezeigt, dass die physiologisch vorliegenden Serumlevels von MBL (sog. *baseline levels*) direkt und signifikant mit der Wahrscheinlichkeit, eine VL durch *L. chagasi* zu entwickeln, korrelieren (Santos et al., 2001). Alonso und Kollegen konnten das Ergebnis 2007 bestätigen. Das Risiko, symptomatisch an einer VL zu erkranken, steigt ab einem Grenzwert von >500 ng/ml MBL im Serum. Genotypen, die mit hohen MBL-Levels einhergehen, kommen signifikant häufiger in Patienten vor, die klinisch eine VL aufweisen als in solchen, die zwar infiziert, aber asymptomatisch sind. Diese Genvarianten kommen ebenso häufiger bei Patienten vor, die klinische Komplikationen (z.B. Anämie) entwickeln. Umgekehrt kann ein niedriger MBL-Spiegel vor einem Progress der Infektion mit *L. chagasi* schützen (Alonso et al., 2007).

Ein weiteres Beispiel, das die Schwierigkeit aufzeigt, MBL eine eindeutige Rolle zukommen zu lassen, ist die im Iran auftretende VL in Verbindung mit der Spezies *Leishmania infantum*. Auch hier sind Allelvarianten, die mit hohen MBL-Serumkonzentrationen einhergehen, bei VL-Patienten signifikant häufiger vertreten als in gesunden Kontrollen (Asgharzadeh et al., 2007). Die Allele, die mit hohen MBL-Levels einhergehen, kamen in iranischen VL-Patienten bei Infektion mit *L. infantum* mit 95% (vs. 86% in der Kontrollgruppe,  $p=0,03$ ) häufiger vor. Dahingegen weisen ca. 5% der Kontrollen (vs. 0%) einen absoluten MBL-Mangel auf (Asgharzadeh et al., 2007). Hier ist zu überlegen, ob ein Umkehrschluss möglich ist (schützt ein absoluter Mangel vor VL?), wie ihn die Autoren getroffen haben. Deren Untersuchungsbedingungen und Formulierung lassen die Möglichkeit offen, dass die "normalen" Probanden mit niedrigen MBL-Levels überhaupt noch nie mit dem Parasiten in Kontakt kamen. Eine Abschätzung der Infektionsfolge lässt sich somit kaum treffen.

Unsere Messdaten zeigen, dass im Falle einer *L. major*-Infektion ein absoluter MBL-AC-Mangel in der Maus zur Aggravation der kutanen Leishmaniasis führt. Die entgegengesetzten Ausprägungen einer Leishmania-Infektion bei unterschiedlichen MBL-Levels weisen darauf hin, dass sich einerseits die Rolle des MBL nicht nur auf extrazelluläre Opsonisierungs- und Komplementaktivierungseigenschaften beschränkt sondern sich andererseits die Parasiten der einzelnen Stämme individuell an immunologische Begebenheiten angepasst haben. Eine quantitative Analyse der MBL-AC-Serumkonzentration in unseren C57BL/6-Mäusen haben wir nicht durchgeführt, da es in unseren Versuchen primär um die Detektion eines Unterschiedes zwischen generell vorhandenem und absolut defizientem MBL ging. Mittels Bestimmung der Serumlevels in C57BL/6-Mäusen ließe sich evtl. nach einer Korrelation zwischen MBL-Serumkonzentration und klinischem Infektionsverlauf schauen. Unsere C57BL/6-Mäuse entwickelten nach der physiologischen *low dose*-Infektion jedoch ausnahmslos Läsionen. Daraus kann man entweder schließen, dass die MBL-Levels alle in der gleichen Größenordnung liegen, sollte die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion mit *L. major* mit der Serumkonzentration korrelieren, wie im Falle der VL durch *L. chagasi* (Santos et al., 2001) oder aber die reine Empfänglichkeit in diesen



Tieren für *L. major* ist womöglich doch MBL-unabhängig, da auch die MBL-AC<sup>-/-</sup> Tiere ausnahmslos Läsionen ausbildeten.

Wir vermuten für unsere Experimente, dass ab einem Wendepunkt des Infektionsverlaufs immunologisch ein alternativer Weg mit Umgehen des MBL beschritten wird und dieser letztlich genauso effizient ist.

Da sich die Ohrläsionskurven der MBL-AC<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäuse erst nach Woche 10 p.i. wieder einander annäherten, wäre es von Interesse, die Bestimmung der Parasitenlasten (siehe Abb. 17) zu diesen späteren Zeitpunkten zu wiederholen. So könnte man bestätigen oder widerlegen, dass auch die MBL-AC<sup>-/-</sup> Tiere in der Lage sind, eine Viszeralisierung einzudämmen.

### **MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen auch T<sub>H</sub>1-spezifische Zytokinantworten**

In BALB/c Mäusen, die bei Infektion mit *L. major* eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort ausbilden, führt die Applikation von neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen IL-4 innerhalb der ersten Woche nach Infektion zur Heilung (Gessner et al., 1994). Die Rekonvaleszenz geht mit einer verminderten Parasitenlast in den Mausorganen, der Entwicklung vorwiegend T<sub>H</sub>1 typischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einer schützenden Immunität gegen die Infektion einher. In deren dLK- und Milzzellen steigen nach Infektion zu Tag 7 p.i. hin die IL-4 Levels stark an, bevor sie anschließend wieder fallen. Nicht infizierte BALB/c Mäuse bilden kein IL-4. Erst ab Tag 3 p.i. wird IL-4-mRNA gebildet, deren Konzentration um das 8-10-fache zwischen Tag 7 und 14 p.i. ansteigt (Gessner et al., 1994).

Die von uns durchgeführten ELISA zur Zytokindetektion in dLK aus MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen, eine Woche nach Infektion, zeigten eine signifikant erhöhte IL-4-Produktion in den Knockout-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Dieses anti-inflammatorisch wirkende Interleukin, welches die IL-12-Produktion durch DCs herunter reguliert und die MΦ-Funktion hemmt, induziert eine Differenzierung naiver T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen (Koch et al., 1996). Unsere Beobachtungen und die Ergebnisse der oben aufgeführten Studie von Gessner et al. lassen darauf schließen, dass in MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen, wie auch in den für *L. major* anfälligen BALB/c Mäusen, primär eine T<sub>H</sub>2 Immunität initiiert wird. Unsere Analyse zeigte weiterhin, dass MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse in Woche 6 p.i. signifikant weniger IFN-γ und IL-12 bilden als Wildtyp-Mäuse. IFN-γ aktiviert MΦ und hemmt die

T<sub>H</sub>2 Antwort. IL-12 induziert eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu T<sub>H</sub>1 Zellen (Fischer et al., 2013). Beides ist typisch für die Immunantwort in resistenten C57BL/6-Mäusen (Brosch et al., 2015). Durch Anpassung des Zytokinprofils im Verlauf zwischen Woche 6 und 9 p.i. an das der Kontrollen scheinen MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse zwar später, aber dennoch eine T<sub>H</sub>1-Antwort zu initiieren.

### **Promastigote-Opsonisierung mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Serum führt *in vitro* zu keiner Beeinflussung von Biogel-MΦ und BMDCs**

Wir konnten in den MΦ- und BMDC-Infektionsmodellen mittels Serum-Opsonisierung von metazyklischen Promastigoten weder Unterschiede bzgl. der Infektionsrate, Adhärenz noch der intrazellulären Parasitenzahl feststellen. MBL gilt als ein die Phagozytose aktivierender Oberflächenligand, welcher auch *L. major*-Promastigoten opsonisiert. Generell verbessert es die Aufnahme von Partikeln in Phagozyten über den Fc-Rezeptor und Komplementrezeptor 1 (CR1), die nicht optimal mit IgG oder C4b/C3b opsonisiert sind (Bohlon et al., 2007, Mishra et al., 2015). Deshalb hatten wir erwartet, dass die Infektionsraten in unseren Versuchen bei Vorliegen eines MBL-Knockouts verringert sind. Dies konnten wir jedoch nicht bestätigen.

Die IL-6 Sekretion durch MΦ wies keine Signifikanz auf (p=0,06). Verglichen mit Studien, in welchen für *L. major* anfällige BALB/B Mäuse im Vergleich zu resistenten Mäusen die 2- bis 4-fache Menge an IL-6 (Titus et al., 2001) bilden, zeigt unser Versuch lediglich, dass die Opsonisierung mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Serum zu gering vermehrter IL-6 Sekretion durch APC führt. Da C57BL/6 IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse gegen *L. major* resistent sind (Moskowitz et al., 1997) und unsere MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse ebenso eine Infektionskontrolle schafften, gingen wir nicht davon aus, dass IL-6 für das Outcome in MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen ausschlaggebend ist. Da auf den Objektträgern neben MΦ u.a. immer wieder neutrophile Granulozyten zu erkennen waren, ist es wahrscheinlich, dass auch Zytokine anderer Zelllinien vom ELISA erfasst wurden, zumal die Zytokinlevels, gemessen an der Positivkontrolle (LPS/IFN-γ), sehr gering waren.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen aus der dLK-Zytokinanalyse, zeigten unsere MΦ- und BMDC-Versuche nicht, dass ein MBL-Knockout die Immunantwort in Richtung T<sub>H</sub>2-Abwehr triggert. Die Sekretion von IL-10 durch unsere Biogel-MΦ zeigte sich sogar signifikant vermindert im Vergleich zur Kontrolle. Eine erhöhte IL-10 Pro-

duktion führt prinzipiell zur Verkürzung der Antigen-Präsentationszeit auf MHC-II-Molekülen und dadurch zur Unterdrückung einer Immunantwort (Baravalle et al., 2011, De Gassart et al., 2008). Es ist aber auch ein typisches Interleukin, welches in für *L. major* anfälligen BALB/c Mäusen nachgewiesen werden kann. In 70% deren kutaner *L. major*-Läsionen finden sich sowohl mRNA von IL-10 als auch des „Gegenspielers“ IFN- $\gamma$ . IL-10 scheint nicht per se die Etablierung einer T<sub>H</sub>1-Antwort zu unterbinden (Louzir et al., 1998), aber dennoch über eine Hemmung der IFN- $\gamma$ -Signalkaskade die Parasiteneliminierung zu verringern (Girard-Madoux et al., 2015). Ebenfalls ließ sich für das T<sub>H</sub>1-Immunantwort-typische Zytokin IL-12p40 keine verminderte Sekretion nachweisen. Der zu Beginn klinisch schlechtere Verlauf der MBL-AC<sup>-/-</sup> Tiere in den *in vivo*-Ohrläsionsversuchen, die höhere Parasitenzahl in Ohr und Milz und der geringere IL-12p40-Nachweis im ELISA der restimulierten dLK, ließ uns dies vermuten. Man muss allerdings beachten, dass die Medienüberstände der *in vitro*-Infektionen bereits 18 Stunden nach der Infektion separiert und untersucht wurden. Die oben in den *in vivo*-Versuchen genannten Unterschiede zur Kontrollgruppe wurden jeweils erst zu späteren Zeitpunkten (Ohrläsionen ab Woche 1 p.i., Parasitenlasten in Woche 1 p.i. und dLK-Restimulation in Woche 1, 6 und 9 p.i.) beobachtet. Was in dieser großen Zeitspanne dazwischen geschieht, entzieht sich unserer Kenntnis.

Der direkte Vergleich unserer M $\Phi$ - und BMDC *in vitro*-Infektionen mit opsonisierten Promastigoten ließ uns erkennen, dass IL-12p40 von BMDCs generell in höherer Konzentration gebildet wird als von Biogel-M $\Phi$ . Unsere Ergebnisse sind mit den bisherigen Daten somit kongruent (von Stebut and Tenzer, 2017).

#### **Amastigote aus MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen lösen *in vitro* ähnliche Reaktionen in M $\Phi$ und BMDCs aus wie C57BL/6-Amastigote**

Es stellte sich uns die Frage, ob ein fehlender Kontakt von Amastigoten mit MBL-AC während des Differenzierungsprozesses aus Promastigoten einen weiterführenden Einfluss auf das Phagozytoseverhalten unserer Wildtyp-APCs und deren Zytokinsekretion hat. Wir konnten jedoch nur bei BMDCs die bekannte Präferenz zur Aufnahme von Amastigoten bestätigen und eine, im Vergleich zu MBL-AC<sup>-/-</sup> voropsonisierten Promastigoten, signifikant erhöhte intrazelluläre MBL-AC<sup>-/-</sup>

Amastigoten-Zahl in diesen erkennen. Interessant war, dass die M $\Phi$ -Infektionszahlen durch Amastigote prozentual höher lagen als durch Promastigote. Bisherige Studien zeigen, dass eine primäre Promastigoten-Phagozytose durch M $\Phi$  typisch ist und Amastigoten von DCs aufgenommen werden (Girard-Madoux et al., 2015, von Stebut, 2017b).

Wie vorbeschrieben, wurden das pro-inflammatorische IL-10 und das, die T<sub>H</sub>1 Immunantwort induzierende IL-12p40, vorrangig von BMDC gebildet (von Stebut, 2017b, Girard-Madoux et al., 2015).

Bleibt die Frage, über welchen Mechanismus MBL-AC in den Infektionsverlauf eingreift, sodass es initial zu einem so ausgeprägten Krankheitsverlauf führt, letztlich aber nicht ausschlaggebend für die Heilung zu sein scheint. Auf zellulärer Ebene konnten wir in M $\Phi$  und BMDCs keinen Anhaltspunkt hierzu finden.

## 5.2 C3-Knockout in kutaner Leishmaniasis

Das Oberflächenprotein gp63 auf *L. major*-Promastigoten ist der vorrangige Akzeptor für das Komplementprotein C3. Die Parasitenaufnahme durch Makrophagen (M $\Phi$ ) wird durch die Opsonisierung von *Leishmania* mit C3 *in vitro* begünstigt (Mosser and Edelson, 1987), bzw. durch die Anlagerung von C3 an gp63 gesteigert (Brittingham et al., 1999). Durch Konversion des C3b zu iC3b (inaktive Form) verbessert die Protease gp63 die Resistenz gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse. Somit sind gp63-defiziente *L. major* zwar anfälliger für Komplement-vermittelte Lyse, zeigen aber eine vergleichbare Infektiosität wie Wildtyp-*L. major*. Zusätzlich interagiert gp63 *in vitro* direkt mit einer Vielzahl an Rezeptoren auf M $\Phi$ , was zur Phagozytose sogar in Abwesenheit des Komplementsystems führt. Wenn auch in viel geringerem Ausmaß (Brittingham et al., 1999).

Mit *L. major* infizierte transgene BALB/c-Mäuse, welche den *cobra venom factor* (CVF) ausbilden, sind weitestgehend resistent gegenüber der Infektion mit *L. major* und zeigen eine reduzierte Parasitendissemination im Gegensatz zu anfälligen Wildtyp-BALB/c-Mäusen. Die Expression des CVF führt über eine ununterbrochene Komplementaktivierung zur Erschöpfung des C3 im Serum. Auch eine vorüberge-

hende Depletion des C3 in Wildtyp-BALB/c-Mäusen durch CVF-Injektionen zögert den Progress der Läsionen um 7-10 Tage hinaus (Läsionsbeginn normalerweise ab Tag 43 p.i.). Typischerweise beginnen die C3-Levels 3-5 Tage nach der CVF-Injektion wieder zu steigen und erreichen 7-10 Tage später normale Konzentrationen. Sowohl transgene als auch Wildtyp-BALB/c-Mäuse weisen eine  $T_H2$ -Immunantwort auf. In den CVF-transgenen Mäusen kann jedoch keine Neutrophilen-Infiltration und die damit einhergehende Parasitendissemination detektiert werden, wie sie typisch für eine Infektion in BALB/c Mäusen ist. Die Parasitenlast ist reduziert. Zusätzlich fehlt die Ausbildung der für BALB/c-Mäuse typischen Hautläsionen in Abwesenheit von C3. Wirtszellen können *in vivo* und *in vitro* also auch ohne C3-Opsonisierung von Promastigoten infiziert werden. Eine C3-Defizienz verändert den Infektionsverlauf in BALB/c-Mäusen jedoch dramatisch. Es scheint, dass die Komplementaktivierung durch *L. major* eine raffinierte Balance zwischen suizidaler Lyse und dem Benefit der Neutrophilen-Rekrutierung herstellt (Jacobs et al., 2005).

In einer Studie zu *L. amazonensis*-Infektionen in Wildtyp-BALB/c- und via CVF Komplement-depletierten BALB/c-Mäusen zeigte sich, dass 30 Tage nach Injektion des Parasiten in die Hinterpfote der Tiere in den Läsionen der depletierten Mäuse mehr Neutrophile detektiert wurden. Auch war die Parasitenzahl höher (Laurenti et al., 2004). Die unterschiedlichen Reaktionen von *L. major* und *L. amazonensis* auf An- bzw. Abwesenheit des Faktors C3 verdeutlicht, wie schwierig es ist, die immunologischen Vorgänge der verschiedenen Leishmania-Stämme zu analysieren und zu verstehen.

### **C3<sup>-/-</sup> Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund zeigen *in vivo* Immunkompetenz**

Um das Läsions- und Infektionsverhalten bei C3-Defizienz und ansonsten vorliegender Immunkompetenz zu untersuchen, wählten wir C3<sup>-/-</sup> Tiere auf C57BL/6-Hintergrund. Wider unsere Erwartungen, zeigte sich in unseren Ohrläsionsversuchen mit C3<sup>-/-</sup> Mäusen kein klinisch schlechterer Verlauf als bei C57BL/6-Kontrollen. Auch die Parasitenlasten in Ohr und Milz in Woche 1, 3 und 6 p.i. ließen keine Unterschiede der Viszeralisierungstendenz erkennen.

Vergleichen wir die IL-12p40-Sekretion bei Restimulation der dLK mittels SLA mit Ergebnissen vorheriger Untersuchungen, können wir davon ausgehen, dass auch in

den C3<sup>-/-</sup> Tieren über IL-12p40 und IFN- $\gamma$  eine T<sub>H</sub>1-Immunität angeregt wird und dadurch klinisch kein Nachteil besteht.

Bei der Analyse von epidermalen Zellen auf das Vorkommen der intrazellulären Interleukine IL-12p40 und IFN- $\gamma$  mittels Durchflusszytometrie zeigte sich in einer Untersuchung von Belkaid et al. zur *L. major*-Infektion in C57BL/6-Mäusen ab der vierten Woche p.i. ein Nachweis und in Woche 6-8 p.i. ein Konzentrationshöhepunkt derer. Weiter zeigte die quantitative Bestimmung von IFN- $\gamma$  mit Hilfe des ELISA nach Restimulation der dLK mit SLA, dass IFN- $\gamma$  erst ab Woche 4 p.i. in geringen Mengen nachweisbar ist. Danach stieg die Konzentration, parallel zum Läsionsvolumen, stark an (Peak in Woche 6 p.i.). Mit Rückgang der Läsionen fielen die Spiegel von IFN- $\gamma$  steil ab, wobei ein niedriges Niveau während der chronischen Phase stets erhalten blieb (Belkaid et al., 2000). Diesem Verlauf in C57BL/6-Mäusen entsprach in etwa auch der von uns analysierte in C57BL/6-C3<sup>-/-</sup> Mäusen.

### **M $\Phi$ und BMDCs unterscheiden nicht zwischen Serum aus C3<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen**

Um den Effekt von C3 auf die Infektiosität von *L. major*-Promastigoten zu analysieren, wurden durch Jacobs und Kollegen peritoneale Exsudatzellen ohne Maussserum, mit Serum aus CVF-transgenen Mäusen und mit Serum aus nicht-transgenen BALB/c-Mäusen infiziert. In Anwesenheit des Normalserums waren innerhalb von 30 min 40% der M $\Phi$  infiziert, ohne Serum waren es nur 5%. Bei Serum aus CVF-transgenen Mäusen waren es 7% der M $\Phi$ . Nach 1h waren die Ergebnisse immer noch signifikant, wenn auch weniger deutlich (Jacobs et al., 2005).

Ein monoklonaler Antikörper für den Komplementrezeptor CR3 reduziert die Adhärenz und Aufnahme von *L. major* durch M $\Phi$  um bis zu 63%. Dies zeigt, dass die Opsonisierung mit dem Komplementfaktor C3 das intrazelluläre Überleben für Pathogene verbessern kann (Mosser and Edelson, 1985).

Unsere Versuche zeigten, dass die *in vitro*-Opsonisierung der metazyklischen *L. major*-Promastigoten mit C3<sup>-/-</sup> Serum weder das Phagozytoseverhalten unserer Biogel-M $\Phi$  noch der BMDCs aus C57BL/6 Mäusen beeinflusst. Allerdings wählten wir eine 18-stündige Inkubationszeit. Innerhalb der ersten Stunde scheint das Fehlen

von C3 in BALB/c Mäusen jedoch gravierende Folgen für die Infektion der MΦ zu haben, wie Jacobs und Kollegen zeigten.

Da die IL-6-Sekretion in unseren *in vitro*-Infektionen durchgehend nahe der Detektionsgrenze lag, können wir diesem Zytokin keine aussagekräftige Rolle zuweisen. Hinzu kommt, dass Untersuchungen an IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund sowieso keine Beeinträchtigung ihrer Resistenz gegenüber *L. major* zeigten (Moskowitz et al., 1997). Patienten mit kutaner Leishmaniasis weisen in der Regel erhöhte IL-6-Spiegel auf, welche abhängig sind vom Schweregrad der Erkrankung (Espir et al., 2014, Latifynia et al., 2012). *In vitro* kann das Interleukin zwar zur MΦ-Deaktivierung führen (Hatzigeorgiou et al., 1993, Moskowitz et al., 1997), ob es pro- oder antiparasitär wirkt, ist jedoch noch nicht klar herausgearbeitet (Oualha et al., 2019). Wir können anhand unserer Untersuchungen festhalten, dass innerhalb der 18-stündigen Inkubationszeit unserer Versuche weder Biogel-MΦ noch BMDCs relevante Mengen des Zytokins bilden, um daraus eine pro- oder antiparasitäre Wirkung ableiten zu können. Dies zeigte sich unabhängig davon, ob ein C3-Knockout vorlag.

Neben erhöhten IL-6-Werten, weisen CL-Patienten auch erhöhte IL-10-Levels auf. Eine Vielzahl an Zelltypen bilden es, dennoch ist man sich bis heute nicht einig, welche Zellen über dessen Sekretion die Unterdrückung der anti-*Leishmania*-Immunantwort steuern. IL-10<sup>-/-</sup> Mäuse auf BALB/c-Hintergrund sind in der Lage eine *L. major*-Infektion zu kontrollieren. IL-10<sup>-/-</sup> Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund erreichten sogar eine sterile Immunität (Schwarz et al., 2013). Die Sekretion durch unsere APCs wurde innerhalb der ersten 18 Stunden nach Infektion durch einen C3-Knockout jedoch nicht beeinflusst.

Das von *L. major*-Promastigoten gebildete inaktive C3-Spaltprodukt iC3b gilt als wichtiger Ligand für den Rezeptor CR3 auf MΦ. Zusammen ermöglichen sie die „stille“ Aufnahme in MΦ und die Blockade deren IL-12-Signalkaskade (Kaye and Scott, 2011, Mosser and Edelson, 1985). Dies hat das Überleben der Promastigote und deren ungestörte Umwandlung zu Amastigote innerhalb der MΦ zur Folge (Brittingham and Mosser, 1996, Kautz-Neu et al., 2012). Die Aufnahme von *L. major* via CR3-unabhängige Rezeptoren in CR3-Knockoutmodell induziert hingegen die Freisetzung von IL-12 in MΦ, während die Sekretion durch die Aufnahme von opsonisierten Parasiten via CR3 in MΦ unterdrückt wird (Schönlau et al., 2000).

Aufgrund dieser Annahmen vermuteten wir, dass ein  $C3^{-/-}$  Serum, durch die fehlende C3-Opsonisierung der Promastigoten, ebenso zu höheren IL-12-Sekretionsraten durch  $M\Phi$  führt als dies bei Normalserum ( $C3^{+/+}$ ) der Fall ist. Unsere Ergebnisse fielen hinsichtlich dieser Vermutung jedoch negativ aus. Im Gegenteil konnten wir im  $C3^{-/-}$  NMS-Ansatz der  $M\Phi$  sogar weniger IL-12p40 nachweisen (14 pg/ml) als im C57BL/6 NMS-Ansatz (176 pg/ml). Durch die Ergebnisstreuung konnte jedoch keine Signifikanz gezeigt werden. Da die Populationen der Biogel- $M\Phi$  trotz Aufreinigung sehr heterogene Zellsuspensionen darstellen, ließen sich eventuell über eine Verbesserung der  $M\Phi$ -Isolation genauere Ergebnisse herausarbeiten.

### **Endogene Amastigoten-Generierung in $C3^{-/-}$ Mäusen führt nicht zu verändertem APC-Verhalten**

Unser Ziel war es herauszufinden, ob das Fehlen des Faktors C3b, welcher der Promastigoten-Opsonisierung dient (Naderer et al., 2004) während des Reifungsprozesses zur Amastigote nachhaltigen Einfluss auf das Verhalten der APCs hat. Die amastigote Plasmamembran enthält wahrscheinlich eine Fülle an Transportern, die durch die Schicht aus Glykolipiden verdeckt und deren genaue Aufschlüsselung bisher nicht gelungen ist (Naderer et al., 2004). Die hierfür durchgeführten Versuche mit Amastigoten aus  $C3^{-/-}$  Mäusen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Infektionsrate, der Adhärenz und Anzahl intrazellulärer Amastigoten in infizierten  $M\Phi$  bzw. BMDC.

Unsere Annahme war, dass  $C3^{-/-}$  Amastigoten schlechter von Biogel- $M\Phi$  aus C57BL/6 aufgenommen werden, da sie nicht mit iC3b opsonisiert und via CR3 aufgenommen werden können. Amastigote aus CL-verursachenden Leishmania-Stämmen sind anfälliger für eine Komplement-vermittelte Lyse als viszerale Stämme. Dies deutet darauf hin, dass Komplementfaktoren die Infektion in der Haut limitieren (Laurenti et al., 2004). Sollte dies so sein, führt das Fehlen von C3 laut unseren Ergebnissen jedoch nicht zu einer Einschränkung der Abwehrzellen, die sich, neben Neutrophilen (Dietze-Schwonberg, 2016), zu Beginn der Infektion am Infektionsort einfinden. Unsere Auszählung zeigte zwar eine Tendenz mit  $p=0,06$  für eine verminderte Infektionsrate im Vergleich zu Amastigoten aus C57BL/6 Mäusen. Da die Infektionsrate der  $M\Phi$  dennoch bei ca. 80% lag, muss davon ausgegangen werden, dass



auch andere Faktoren eine Rolle spielen, die letztlich effektiv zu einer Aufnahme der Parasiten in M $\Phi$  führen, wenn C3 als Opsonisierungsfaktor fehlt.

CD18<sup>-/-</sup> Mäuse (CR3<sup>-/-</sup>) sind nicht in der Lage, eine *L. major*-Infektion zu kontrollieren, obwohl am Infektionsort ähnlich viele M $\Phi$  einwandern (gemessen 2 Wochen p.i.) wie in CD18<sup>+/+</sup> C57BL/6-Mäusen. Infizierte CD18<sup>-/-</sup> M $\Phi$  phagozytieren bei fehlender Opsonisierung etwa so viele *L. major* wie CD18<sup>+/+</sup> M $\Phi$  (33,3% vs. 40,4%). Bei Opsonisierung steigt der Anteil infizierter CD18<sup>+/+</sup> M $\Phi$  auf 72,6%, während die CD18<sup>-/-</sup> M $\Phi$  ihr Phagozytoseverhalten nicht ändern (32,8%). So werden viele, aber nicht alle opsonisierten *L. major* über CR3 in M $\Phi$  aufgenommen (Schönlau et al., 2000). In unseren Versuchen lag die Infektionsrate im Ansatz mit C57BL/6-M $\Phi$  und C3<sup>-/-</sup> Amastigoten lediglich etwa 14% unter der Infektionsrate im Kontrollansatz. Dadurch könnte man darauf schließen, dass der Rezeptor CR3 eine wichtigere Rolle als C3 spielt. Eine höhere Versuchszahl (hier n=2) könnte das Ergebnis u.U. validieren.

Da auch die Analyse der sezernierten Zytokine IL-6, IL-10 und IL-12p40 durch M $\Phi$  keine Erkenntnisse brachte, vermuten wir auch hier, dass das Komplementprotein C3 letztlich nicht ausschlaggebend für den weiteren Infektionsverlauf ist und die Aufnahme der Parasiten über andere Rezeptoren/Faktoren einen entscheidenderen Einfluss auf die M $\Phi$ -Antwort hat. Laut unseren Ergebnissen ist es auch unerheblich, ob *L. major* in einem C3<sup>-/-</sup> Organismus zu Amastigoten heranreift oder als Promastigote mit C3-defizientem Serum opsonisiert wird. Beides zeigt keine Nachteile im Infektionsverlauf unserer Experimente.

Der analoge Versuchsaufbau mit BMDS zeigte ebenso keine Auffälligkeiten. Für IL-6 hatten wir keine unerwarteten Ergebnisse erhofft. Die auf der T<sub>H</sub>2-Immunantwort-basierende Anfälligkeit von BALB/c-Mäusen geht zwar mit einer 2-4-fach höheren Bildung von IL-6 einher, ein IL-6-Knockout in diesem Mausmodell hatte in Untersuchungen allerdings keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf (Titus et al., 2001). Da unsere C3<sup>-/-</sup> Mäuse immunkompetent zu sein scheinen, rechneten wir hier nicht mit erhöhten Zytokinwerten.

IL-10 kann unter anderem von DCs gebildet werden (Schwarz et al., 2013). Es blockiert aber auch beispielsweise die Produktion von IL-12 durch APCs und mindert

hierdurch deren Fähigkeit zur Unterstützung der Differenzierung und Stabilisierung der T<sub>H</sub>1-Zellen (Schwarz et al., 2013, Saraiva and O'Garra, 2010). Nach einer lokalen Immunantwort in der Haut infolge einer *L. major*-Infektion, ist die Heilung mit der Produktion von IFN- $\gamma$  assoziiert, IL-10 wurde nur in persistierenden Läsionen gefunden (Lakhal-Naouar et al., 2019, Belkaid et al., 2001). Da unsere C3<sup>-/-</sup> Mäuse aber keine Läsionspersistenz oder sonstige klinische Unterschiede im Outcome aufwiesen, gingen wir nicht davon aus, erhöhte IL-10-Levels zu detektieren.

In Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse muss man zwar davon ausgehen, dass die Bindung des iC3b an CR3 ein wichtiger Schritt in der Parasitenaufnahme in M $\Phi$  ist (Schönlau et al., 2000). Man muss sich aber auch fragen, ob CR3 eventuell noch über andere Moleküle angesteuert wird, außer eben über C3. Bournazos und Ravetch beschreiben, dass für Phagozyten wie DCs und M $\Phi$  bekannt ist, dass deren Fc $\gamma$ R-vermittelte Aktivierung sowohl von einer effizienten Aufnahme IgG-opsonisierter Partikel als auch von einer verbesserten Endosomenreifung begleitet ist. In den Lysosomen werden diese Partikel abgebaut. Der durch diesen Weg induzierte effizientere Abbau von lysosomalem Inhalt führt auch zu einer verbesserten Antigenprozessierung und -präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen. Dies wiederum induziert potente T-Zell-Antworten. Da Subpopulationen der M $\Phi$  ebenfalls den Fc $\gamma$ RI besitzen und dieser bekanntermaßen in DCs zur Aufnahme der mit IgG opsonisierten Parasiten führt (Murphy, 2018, Bournazos and Ravetch, 2017), könnte der Rezeptor möglicherweise auch in M $\Phi$  eine Rolle spielen, wenn z.B. die Aufnahme des Parasiten über iC3b/CR3 nicht möglich ist (Reiner and Locksley, 1995).

### 5.3 *In vitro*-Versuche zu C5-Knockout in kutaner Leishmaniasis

Hawlish und Kollegen belegten, dass ein Mangel des Komplementproteins C5 bei einer *L. major*-Infektion Vorteile haben kann. Das Anaphylatoxin C5a zeigte auf mRNA-Ebene einen negativen Einfluss auf die TLR4-induzierte Produktion von IL-12, IL-23 und IL-27 durch inflammatorische M $\Phi$ . Diese Wirkung tat sich jedoch nur in Anwesenheit des C5aR auf. In C5aR-defizienten Mäusen war dies nicht der Fall, wodurch der Fokus auf den Rezeptor gelegt werden kann. Diese verminderte

Zytokinausschüttung bewirkte wiederum eine verminderte  $T_H1$ - Immunantwort *in vitro* und *in vivo*. Dazu passend, fanden sie eine verbesserte  $T_H1$ -Immunantwort in  $C5aR^{-/-}$  Mäusen mit erhöhter Anzahl an  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen. Ein Umstand, der zur besseren Immunlage gegen *L. major*-Infektionen führt. Andere Zytokine wie  $TNF-\alpha$  und IL-10, die ebenso im Zusammenhang mit TLR4 stehen, wurden durch C5a nicht beeinflusst (Hawlich et al., 2005). Puentes et al. schrieben bereits 1990, dass infektiöse, metazyklische *L. major*-Promastigoten zwar das Komplementsystem adäquat aktivieren und durch die Kaskade auch ein C5b-9-Komplex (Membran-angreifender Komplex, engl. *complement membrane attack complex*, MAC) gebildet wird, dieser jedoch nicht auf der Promastigotenoberfläche bestehen bleibt und somit den Parasiten nicht durch Zellyse tötet (Puentes et al., 1990).

Um im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, ob *L. major* zu den wenigen Krankheitserregern gehört, die auf zellulärer Ebene von C5 positiv oder, wie durch Hawlich et al. gezeigt, auch negativ beeinflusst werden, wurde das  $C5^{-/-}$  Tiermodell in unsere *in vitro*-Versuchsreihen der M $\Phi$  und BMDCs mit aufgenommen. Sowohl die mikroskopischen Zellauszählungen nach Opsonisierung der Promastigoten mit  $C5^{-/-}$  Serum als auch die Zytokinproduktion von IL-6, IL-10 und IL-12p40 führten zu keiner richtungsweisenden Annahme.

Wie Hawlich et al. beschreiben, trat der negative Effekt von C5a nur in Anwesenheit des C5a-Rezeptors auf. Da unser verwendetes Serum zwar einen Knockout für C5 auswies, das Serum und die Zellen jedoch keinen Knockout für C5aR, kann man unsere Versuche als eventuelle Bestätigung der bisherigen Beobachtung von Hawlich et al. betrachten, dass C5 allein keinen negativen oder auch positiven Einfluss auf den Infektionsverlauf hat.

Ramer-Tait et al. konnten zeigen, dass *L. chagasi*-Promastigote in der Log-Phase mehr C5 an ihrer Oberfläche binden als Parasiten in der ruhenden (Stat-)Phase (65% vs. 25%). Ähnlich verhielt es sich mit C3, auch hier war das Ergebnis signifikant zugunsten der Log-Phase-Promastigoten ausgefallen (81,2% vs. 29.3%) (Ramer-Tait et al., 2012). Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass C5 zum Zeitpunkt der Log-Phase durchaus eine Rolle spielt, Leishmania sich jedoch durch gezielte Mechanismen dieser Komplementfaktoren entledigt. Für *L. major* ist bekannt, dass sich auf den metazyklischen Promastigoten, im Gegensatz zu Log-Promastigoten, ein

Schutzmantel aus phosphorylierten Saccharideinheiten befindet, der die LPG-Membran (Lipophosphoglykan) um ca. 10nm dicker werden lässt. Insgesamt sind sie von einer 20-40 nm dicken Glykokalix ummantelt. Durch die so vorliegende Abstandsvergrößerung zwischen formiertem C5b-9-Komplex und der Parasitenoberfläche kann sich der MAC nicht in die Parasitenoberfläche einlagern und zur Zelllyse führen (Pimenta et al., 1989, Puentes et al., 1990, Naderer et al., 2004).

*L. donovani* hingegen macht sich die Peptidase LdISP2 (*L. donovani* inhibitorische Serinpeptidase 2; engl. *L. donovani inhibitor of serine peptidase 2*) zunutze, um sich gegenüber Komplementangriffen zu erwehren. Diese führt über Zwischenschritte zu geringeren Produktionen von C3- und C5-Konvertasen und folglich zur Verminderung des MACs. Ebenso reguliert sie über eine Inhibition der Neutrophilen Elastase-Aktivität (NE-Aktivität) die C5aR-Expression (Rezeptor für C5a) hoch. Dies hat letztlich eine Verminderung der IL-12-Sekretion zur Folge. Umgekehrt führt die Infektion von MΦ mit LdISP2-knock-down-Parasiten zu ansteigenden IL-12-Produktionen (Verma et al., 2018).

Auch für die ISP2 von *L. major* ist bekannt, dass sie über die Inhibierung der NE-Aktivität das Parasitenüberleben in MΦ begünstigt (Faria et al., 2011). NE spaltet den C5a-Rezeptor und inaktiviert hierdurch dessen Signalwirkung (van den Berg et al., 2014).

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, deuten sie darauf hin, dass dem Komplementprotein C5 in der Abwehr einer *L. major* Infektion eine weniger wichtige Rolle zuteilwird als z.B. CR5. Im Hinblick auf die Tatsache, dass der C5b-9-Komplex in der Literatur oft als essentielle Komponente des Komplementsystems erwähnt wird, scheint dies für *L. major* nicht zu gelten. In unseren Versuchen konnten wir keine neuen Erkenntnisse gewinnen, die das Gegenteil nahelegten.

## 6 Zusammenfassung

Diese experimentelle Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung von Mannose-bindendem Lektin (MBL) und den Komplementfaktoren C3 und C5 im murinen Modell einer *Leishmania major*-Infektion. Bei einer physiologischen Infektionsdosis zeigen MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse einen initial schlechteren Krankheitsverlauf als Wildtyp-Mäuse. Hierbei fallen sowohl die Ulzerationen an Ohr als auch die Viszeralisierung signifikant gravierender aus. Die Ohrläsionen heilen jedoch in beiden Gruppen vollständig ab. Wie die Versuche in dieser Arbeit andeuten, korreliert die Aggravation der Läsionen der MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäuse mit einer vorübergehend verminderten Synthese von IFN- $\gamma$  (\*\* $p \leq 0,005$ ) und IL-12p40 (\* $p \leq 0,05$ ). Beide Zytokine tragen in der Kontrollgruppe die schützende T<sub>H</sub>1-Immunität. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes ließen sich keine Unterschiede in der Zytokinproduktion mehr nachweisen. Unsere *in vitro*-Versuche mit Promastigoten (mit MBL-AC<sup>-/-</sup> Serum voropsonisiert) oder endogen gereiften Amastigoten aus MBL-AC<sup>-/-</sup> Mäusen ließen jedoch keine Erkenntnisse zu, wie sich das unterschiedliche Infektionsgeschehen auf zellulärer Ebene in M $\Phi$  oder BMDCs abspielt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der anfängliche Nachteil des MBL-Knockouts im Infektionsverlauf durch andere Mechanismen ausgeglichen wird, da die MBL-AC<sup>-/-</sup>-Mäuse letztlich ihre Infektion genauso kontrollieren können wie Wildtyp-Mäuse. Somit bleibt die Frage offen, über welche Rolle MBL den Infektionsverlauf richtungsweisend beeinflusst und welche Alternativen des Immunsystems zum Tragen kommen, um den MBL-Mangel effektiv auszugleichen.

Wir untersuchten weiterhin, ob das Fehlen des Komplementschlüsselproteins C3 negative Auswirkungen auf eine *L. major*-Infektion im Mausmodell hat. C3<sup>-/-</sup> Tiere wiesen jedoch ähnliche Ergebnisse wie die C57BL/6-Tiere auf. Sowohl die Ohrläsionen als auch die Bestimmung der Parasitenlasten von Ohr und Milz zeigten keine Verlaufsunterschiede. Die Analyse der Zytokine lässt uns vermuten, dass C3<sup>-/-</sup> Mäuse ebenfalls über IL-12p40 in Richtung T<sub>H</sub>1-Immunantwort steuern. Unsere *in vitro*-Infektionen der M $\Phi$  bzw. BMDCs mit (+/- C3-voropsonierten) Promastigoten und endogen gereiften Amastigoten aus C3<sup>-/-</sup> Mäusen sowie die Zytokinuntersuchung mittels ELISA von IL-6, IL-10, IL-12p40 wiesen keine Unterschiede auf.

Zuletzt betrachteten wir die Sekretionsrate der Interleukine IL-6, IL-10 und IL-12p40

in unseren *in vitro*-Infektionen mit C5<sup>-/-</sup> Serum. Wir infizierten hierfür ebenfalls MΦ bzw. BMDCs aus C57BL/6-Mäusen mit voropsonisierten metazyklischen Promastigoten. Aber für keines der Zytokine konnte eine verminderte oder vermehrte Produktion im Falle eines C5-Knockouts nachgewiesen werden. Auch die Auszählung von infizierten Zellen unter dem Lichtmikroskop zeigte sich unauffällig im Vergleich zur C57BL/6-Kontrolle.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit lieferten keine wesentlichen neuen Erkenntnisse im Forschungsfeld der *L. major*-Infektion. Sie bestätigen jedoch zum Teil schon vorhandene Studien und können richtungsweisende Anregungen für weitere Forschungen geben. Bis zur Entwicklung einer adäquaten Therapiemöglichkeit oder sogar einer Impfung wird noch einige Zeit verstreichen, denn *L. major* besitzt bisher unbekannte Mechanismen, sich das intrazelluläre Überleben zu sichern. Obwohl das Komplementsystem zu den ältesten Abwehrsystemen des menschlichen Organismus zählt, wissen wir noch immer zu wenig über die genaue Aufgabe der einzelnen Komponenten während einer *Leishmania*-Infektion. Daher sind weitere *in vivo*-Studien mit *Leishmania*-Infektionen in Knockout-Mausmodellen (C3b<sup>-/-</sup>, C5b<sup>-/-</sup>, C5a<sup>-/-</sup> etc.) von unschätzbarem Wert für ein grundlegendes molekulares Verständnis, wie das Komplement in die Infektion eingreift.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- ALONSO, D. P., FERREIRA, A. F., RIBOLLA, P. E., DE MIRANDA SANTOS, I. K., DO SOCORRO PIRES E CRUZ, M., AÉCIO DE CARVALHO, F., ABATEPAULO, A. R., LAMOUNIER COSTA, D., WERNECK, G. L., FARIAS, T. J., SOARES, M. J. & COSTA, C. H. 2007. Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *J Infect Dis*, 195, 1212-7.
- ALVAR, J., VELEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J. & DEN BOER, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7, e35671.
- ASGHARZADEH, M., MAZLOUMI, A., KAFIL, H. S. & GHAZANCHAEI, A. 2007. Mannose-binding lectin gene and promoter polymorphism in visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Pak J Biol Sci*, 10, 1850-4.
- ASHOK, D. & ACHA-ORBEA, H. 2014. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. *Trends Parasitol*, 30, 499-507.
- BARAVALLE, G., PARK, H., MCSWEENEY, M., OHMURA-HOSHINO, M., MATSUKI, Y., ISHIDO, S. & SHIN, J. S. 2011. Ubiquitination of CD86 is a key mechanism in regulating antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*, 187, 2966-73.
- BARNUM, S. R. 2015. C4a: An Anaphylatoxin in Name Only. *J Innate Immun*, 7, 333-9.
- BAYLY-JONES, C., BUBECK, D. & DUNSTONE, M. A. 2017. The mystery behind membrane insertion: a review of the complement membrane attack complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372.
- BELKAID, Y., HOFFMANN, K. F., MENDEZ, S., KAMHAWI, S., UDEY, M. C., WYNN, T. A. & SACKS, D. L. 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*, 194, 1497-506.
- BELKAID, Y., MENDEZ, S., LIRA, R., KADAMBI, N., MILON, G. & SACKS, D. 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, 969-77.
- BELKAID, Y., PICCIRILLO, C. A., MENDEZ, S., SHEVACH, E. M. & SACKS, D. L. 2002a. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 420, 502-7.
- BELKAID, Y., VON STEBUT, E., MENDEZ, S., LIRA, R., CALER, E., BERTHOLET, S., UDEY, M. C. & SACKS, D. 2002b. CD8<sup>+</sup> T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol*, 168, 3992-4000.
- BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., KORN, T., STROM, T. B., OUKKA, M., WEINER, H. L. & KUCHROO, V. K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-8.
- BLOCH, E. F., KNIGHT, E. M., CARMON, T., MCDONALD-PINKETT, S., CARTER, J., BOOMER, A., OGUNFUSIKA, M., PETERSEN, M., FAMA KIN, B., ANIAGOLU, J., WALKER, J., GANT, R., WALTERS, C. S. & GAITHER, T. A. 1997. C5b-7 and C5b-8 precursors of the membrane attack complex (C5b-9) are effective killers of *E. coli* J5 during serum incubation. *Immunol Invest*, 26, 409-19.

- BOECKEN, G., SUNDERKOTTER, C., BOGDAN, C., WEITZEL, T., FISCHER, M., MULLER, A., LOBERMANN, M., ANDERS, G., VON STEBUT, E., SCHUNK, M., BURCHARD, G., GROBUSCH, M., BIALEK, R., HARMS-ZWINGENBERGER, G., FLEISCHER, B., PIETRAS, M., FAULDE, M. & ERKENS, K. 2011. [Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 9 Suppl 8, 1-51.
- BOHLSON, S. S., FRASER, D. A. & TENNER, A. J. 2007. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol*, 44, 33-43.
- BOURNAZOS, S. & RAVETCH, J. V. 2017. Diversification of IgG effector functions. *Int Immunol*, 29, 303-310.
- BRITTINGHAM, A., CHEN, G., MCGWIRE, B. S., CHANG, K. P. & MOSSER, D. M. 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun*, 67, 4477-84.
- BRITTINGHAM, A. & MOSSER, D. M. 1996. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today*, 12, 444-7.
- BROSCH, S., DIETZE-SCHWONBERG, K., LOPEZ KOSTKA, S., LORENZ, B., HAAK, S., BECHER, B. & VON STEBUT, E. 2015. Disease control in cutaneous leishmaniasis is independent of IL-22. *J Invest Dermatol*, 135, 308-311.
- BROSCH, S., TENZER, S., AKKAD, N., LORENZ, B., SCHILD, H. & VON STEBUT, E. 2012. Priming of *Leishmania*-reactive CD8<sup>+</sup> T cells in vivo does not require LMP7-containing immunoproteasomes. *J Invest Dermatol*, 132, 1302-5.
- BURCHARD, G. 2016. S1 Leitlinie Viszerale Leishmaniasis (Kala-Azar), Diagnostik und Therapie. *AWMF online - Das Portal der wissenschaftlichen Medizin*.
- CARTER, C. R., WHITCOMB, J. P., CAMPBELL, J. A., MUKBEL, R. M. & MCDOWELL, M. A. 2009. Complement receptor 3 deficiency influences lesion progression during *Leishmania* major infection in BALB/c mice. *Infect Immun*, 77, 5668-75.
- COURRET, N., FREHEL, C., GOUHIER, N., POUCHELET, M., PRINA, E., ROUX, P. & ANTOINE, J. C. 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci*, 115, 2303-16.
- DE ARAUJO, F. J., MESQUITA, T. G., DA SILVA, L. D., DE ALMEIDA, S. A., DE, S. V. W., CHRUSCIAK-TALHARI, A., DE, O. G. J. A., TALHARI, S. & RAMASAWMY, R. 2015. Functional variations in MBL2 gene are associated with cutaneous leishmaniasis in the Amazonas state of Brazil. *Genes Immun*, 16, 284-8.
- DE GASSART, A., CAMOSSETO, V., THIBODEAU, J., CEPPI, M., CATALAN, N., PIERRE, P. & GATTI, E. 2008. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3491-6.
- DEGN, S. E., THIEL, S., NIELSEN, O., HANSEN, A. G., STEFFENSEN, R. & JENSENIUS, J. C. 2011. MAp19, the alternative splice product of the MASP2 gene. *J Immunol Methods*, 373, 89-101.
- DIETZE-SCHWONBERG, K. 2016. Parasite Clearance in Leishmaniasis in Resistant Animals is Independent of the IL-23/ IL-17A Axis. *Journal of INvestigative Dermatology (2016)*, 136, 1906-1908.



- DOMINGUEZ, M., MORENO, I., AIZPURUA, C. & TORANO, A. 2003. Early mechanisms of Leishmania infection in human blood. *Microbes Infect*, 5, 507-13.
- DROGARI-APIRANTHITOU, M., KUIJPER, E. J., DEKKER, N. & DANKERT, J. 2002. Complement activation and formation of the membrane attack complex on serogroup B Neisseria meningitidis in the presence or absence of serum bactericidal activity. *Infect Immun*, 70, 3752-8.
- ENGEL, P., BOUMSELL, L., BALDERAS, R., BENSUSSAN, A., GATTEI, V., HOREJSI, V., JIN, B.-Q., MALAVASI, F., MORTARI, F., SCHWARTZ-ALBIEZ, R., STOCKINGER, H., VAN ZELM, M. C., ZOLA, H. & CLARK, G. 2015. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *The Journal of Immunology*, 195, 4555-4563.
- ESPIR, T. T., FIGUEIRA LDE, P., NAIFF MDE, F., DA COSTA, A. G., RAMALHO-ORTIGAO, M., MALHEIRO, A. & FRANCO, A. M. 2014. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *J Immunol Res*, 2014, 481750.
- EZEKOWITZ, K. T. A. R. A. B. 2005. The Role of mannose-binding lectin in innate immunity. *CID Clinical Infectious Diseases*, 41, 440-444.
- EZEKOWITZ, R. A. 1991. Ante-antibody immunity. *Curr Biol*, 1, 60-2.
- EZEKOWITZ, R. A. 1998. Genetic heterogeneity of mannose-binding proteins: the Jekyll and Hyde of innate immunity? *Am J Hum Genet*, 62, 6-9.
- FARIA, M. S., REIS, F. C., AZEVEDO-PEREIRA, R. L., MORRISON, L. S., MOTTRAM, J. C. & LIMA, A. P. 2011. Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. *J Immunol*, 186, 411-22.
- FISCHER, M. R., JOHN, D., KAUTZ-NEU, K., SCHERMANN, A. I., SCHWONBERG, K. & VON STEBUT, E. 2013. Animal model for cutaneous leishmaniasis. *Methods Mol Biol*, 961, 389-402.
- GAL, P., HARMAT, V., KOCSIS, A., BIAN, T., BARNA, L., AMBRUS, G., VEGH, B., BALCZER, J., SIM, R. B., NARAY-SZABO, G. & ZAVODSZKY, P. 2005. A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations. *J Biol Chem*, 280, 33435-44.
- GARRED, P. 2016. A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. *Immunological Reviews by © 2016 John Wiley & Sons A/S.*, 274, 74-97.
- GESSNER, A., SCHRÖPPEL, K., WILL, A., ENSSLE, K. H., LAUFFER, L. & RÖLLINGHOFF, M. 1994. Recombinant soluble interleukin-4 (IL-4) receptor acts as an antagonist of IL-4 in murine cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immun*, 62, 4112-7.
- GIRARD-MADOUX, M. J. H., KAUTZ-NEU, K., LORENZ, B., OBER-BLOBAUM, J. L., VON STEBUT, E. & CLAUSEN, B. E. 2015. IL-10 signaling in dendritic cells attenuates anti-Leishmania major immunity without affecting protective memory responses. *J Invest Dermatol*, 135, 2890-2894.
- GRIEWANK, K. G., LORENZ, B., FISCHER, M. R., BOON, L., LOPEZ KOSTKA, S. & VON STEBUT, E. 2014. Immune modulating effects of NKT cells in a physiologically low dose Leishmania major infection model after alphaGalCer analog PBS57 stimulation. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2917.

- GROS, P., MILDER, F. J. & JANSSEN, B. J. 2008. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*, 8, 48-58.
- GUERMONPREZ, P., VALLADEAU, J., ZITVOGEL, L., THERY, C. & AMIGORENA, S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 20, 621-67.
- HANSEN, C. B., CSUKA, D., MUNTHE-FOG, L., VARGA, L., FARKAS, H., HANSEN, K. M., KOCH, C., SKJODT, K., GARRED, P. & SKJOEDT, M. O. 2015. The Levels of the Lectin Pathway Serine Protease MASP-1 and Its Complex Formation with C1 Inhibitor Are Linked to the Severity of Hereditary Angioedema. *J Immunol*, 195, 3596-604.
- HANSEN, S., THIEL, S., WILLIS, A., HOLMSKOV, U. & JENSENIUS, J. C. 2000. Purification and characterization of two mannan-binding lectins from mouse serum. *J Immunol*, 164, 2610-8.
- HASSIM, S. 2015. *Promastigote and Amastigote* [Online]. Available: <http://www.slideshare.net/syahidahassim/kinetoplasta-trypanosoma-leishmania>.
- HATZIGEORGIOU, D. E., HE, S., SOBEL, J., GRABSTEIN, K. H., HAFNER, A. & HO, J. L. 1993. IL-6 down-modulates the cytokine-enhanced antileishmanial activity in human macrophages. *J Immunol*, 151, 3682-92.
- HAWLISCH, H., BELKAID, Y., BAELDER, R., HILDEMAN, D., GERARD, C. & KOHL, J. 2005. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity*, 22, 415-26.
- HEGELE, R. A., BUSCH, C. P., YOUNG, T. K., CONNELLY, P. W. & CAO, H. 1999. Mannose-binding lectin gene variation and cardiovascular disease in Canadian Inuit. *Clin Chem*, 45, 1283-5.
- HESS, K., AJJAN, R., PHOENIX, F., DOBO, J., GAL, P. & SCHROEDER, V. 2012. Effects of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation. *PLoS One*, 7, e35690.
- IBORRA, S., MARTINEZ-LOPEZ, M., CUETO, F. J., CONDE-GARROSA, R., DEL FRESNO, C., IZQUIERDO, H. M., ABRAM, C. L., MORI, D., CAMPOS-MARTIN, Y., REGUERA, R. M., KEMP, B., YAMASAKI, S., ROBINSON, M. J., SOTO, M., LOWELL, C. A. & SANCHO, D. 2016. Leishmania Uses Mincle to Target an Inhibitory ITAM Signaling Pathway in Dendritic Cells that Dampens Adaptive Immunity to Infection. *Immunity*, 45, 788-801.
- JACK, D. L., KLEIN, N. J. & TURNER, M. W. 2001. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev*, 180, 86-99.
- JACOBS, T., ANDRÄ, J., GAWORSKI, I., GRAEFE, S., MELLENTHIN, K., KRÖMER, M., HALTER, R., BORLAK, J. & CLOS, J. 2005. Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection. *Med Microbiol Immunol*, 194, 143-9.
- JOHN, D., FISCHER, M. R. & VON STEBUT, E. 2013. Model for generation of large numbers of primary, inflammatory skin-derived neutrophils, and macrophages. *Methods Mol Biol*, 961, 403-10.

- KALINSKI, P., VIEIRA, P. L., SCHUITEMAKER, J. H., DE JONG, E. C. & KAPSENBERG, M. L. 2001. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood*, 97, 3466-9.
- KAUTZ-NEU, K., NOORDEGRAAF, M., DINGES, S., BENNETT, C. L., JOHN, D., CLAUSEN, B. E. & VON STEBUT, E. 2011. Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response. *J Exp Med*, 208, 885-91.
- KAUTZ-NEU, K., SCHWONBERG, K., FISCHER, M. R., SCHERMANN, A. I. & VON STEBUT, E. 2012. Dendritic cells in Leishmania major infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Med Microbiol Immunol*, 201, 581-92.
- KAYE, P. & SCOTT, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9, 604-15.
- KHAMESIPOUR, A., DOWLATI, Y., ASILIAN, A., HASHEMI-FESHARKI, R., JAVADI, A., NOAZIN, S. & MODABBER, F. 2005. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*, 23, 3642-8.
- KISHIMOTO, T. 2005. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*, 23, 1-21.
- KLING, J., GOLLAN, R., FROMM, P. & KORNER, H. 2011. Redundancy of interleukin-6 in the differentiation of T cell and monocyte subsets during cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*, 129, 270-6.
- KOCH, F., STANZL, U., JENNEWEIN, P., JANKE, K., HEUFLER, C., KAMPGEN, E., ROMANI, N. & SCHULER, G. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med*, 184, 741-6.
- KRUG, A., VEERASWAMY, R., PEKOSZ, A., KANAGAWA, O., UNANUE, E. R., COLONNA, M. & CELLA, M. 2003. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med*, 197, 899-906.
- LAKHAL-NAOUAR, I., KOLES, N., RAO, M., MORRISON, E. B., CHILDS, J. M., ALVING, C. R. & ARONSON, N. E. 2019. Transcutaneous immunization using SLA or rLACK skews the immune response towards a Th1 profile but fails to protect BALB/c mice against a Leishmania major challenge. *Vaccine*, 37, 516-523.
- LATIFYNIA, A., KHAMESIPOUR, A., BOKAIE, S. & KHANSARI, N. 2012. Antioxidants and proinflammatory cytokines in the sera of patients with cutaneous leishmaniasis. *Iran J Immunol*, 9, 208-14.
- LAURENTI, M. D., ORN, A., SINHORINI, I. L. & CORBETT, C. E. 2004. The role of complement in the early phase of Leishmania (Leishmania) amazonensis infection in BALB/c mice. *Braz J Med Biol Res*, 37, 427-34.
- LOCKSLEY, R. M., HEINZEL, F. P., FANKHAUSER, J. E., NELSON, C. S. & SADICK, M. D. 1988. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect Immun*, 56, 336-42.
- LOUZIR, H., MELBY, P. C., BEN SALAH, A., MARRAKCHI, H., AOUN, K., BEN ISMAIL, R. & DELLAGI, K. 1998. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major. *J Infect Dis*, 177, 1687-95.

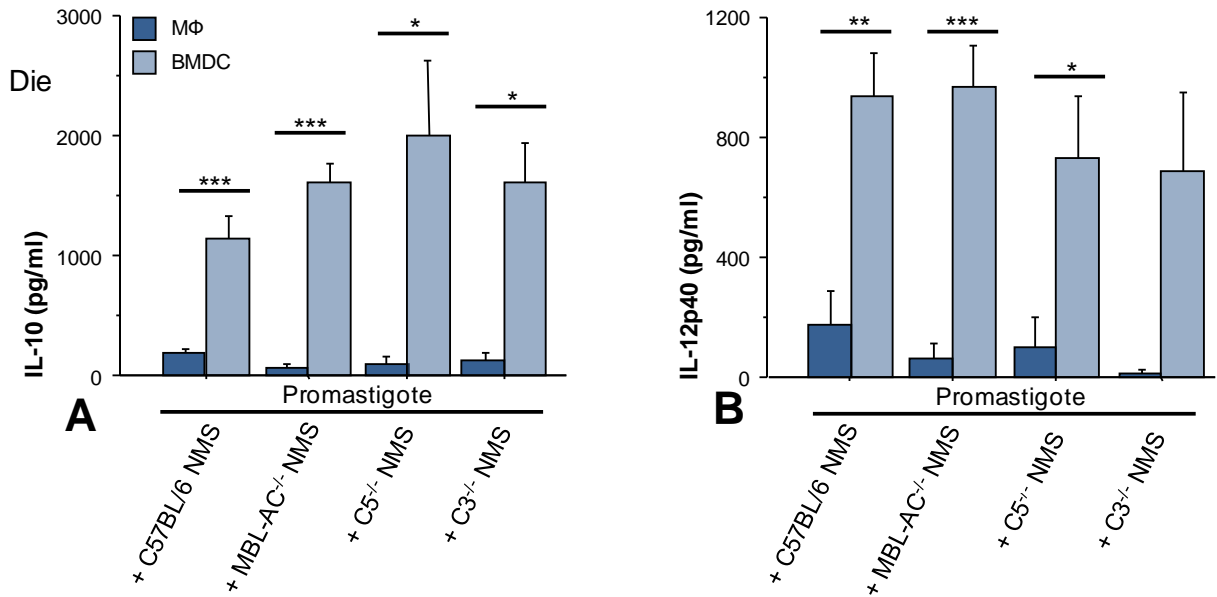
- MANSUETO, P., SEIDITA, A., VITALE, G. & CASCIO, A. 2014. Leishmaniasis in travelers: a literature review. *Travel Med Infect Dis*, 12, 563-81.
- MATSUSHITA, M., ENDO, Y., HAMASAKI, N. & FUJITA, T. 2001. Activation of the lectin complement pathway by ficolins. *Int Immunopharmacol*, 1, 359-63.
- MISHRA, A., ANTONY, J. S., GAI, P., SUNDARAVADIVEL, P., VAN, T. H., JHA, A. N., SINGH, L., VELAVAN, T. P. & THANGARAJ, K. 2015. Mannose-binding Lectin (MBL) as a susceptible host factor influencing Indian Visceral Leishmaniasis. *Parasitol Int*, 64, 591-6.
- MORADIN, N. & DESCOTEAUX, A. 2012. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 121.
- MORITA, Y., OHNO, M., NISHI, K., HIRAOKA, Y., SAIJO, S., MATSUDA, S., KITA, T., KIMURA, T. & NISHI, E. 2017. Genome-wide profiling of nardilysin target genes reveals its role in epigenetic regulation and cell cycle progression. *Sci Rep*, 7, 14801.
- MOSKOWITZ, N. H., BROWN, D. R. & REINER, S. L. 1997. Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. *Infect Immun*, 65, 2448-50.
- MOSSER, D. M. & EDELSON, P. J. 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania promastigotes*. *J Immunol*, 135, 2785-9.
- MOSSER, D. M. & EDELSON, P. J. 1987. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*, 327, 329-31.
- MURPHY, C. W., ALLAN MOWAT, LESLIE BERG, DAVID CHAPLIN 2018. *Janeway Immunologie*, S. 68, S. 74, S. 147, S. 154, S. 985-987, S. 1002-1004, New York, Springer-Verlag GmbH Deutschland.
- NADERER, T., VINCE, J. E. & MCCONVILLE, M. J. 2004. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med*, 4, 649-65.
- O'GARRA, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8, 275-83.
- OUALHA, R., BARHOUMI, M., MARZOUKI, S., HARIGUA-SOUJAI, E., BEN AHMED, M. & GUIZANI, I. 2019. Infection of Human Neutrophils With *Leishmania infantum* or *Leishmania major* Strains Triggers Activation and Differential Cytokines Release. *Front Cell Infect Microbiol*, 9, 153.
- PIMENTA, P. F., DA SILVA, R. P., SACKS, D. L. & DA SILVA, P. P. 1989. Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip. A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. *Eur J Cell Biol*, 48, 180-90.
- PODOLNIKOVA, N. P., PODOLNIKOV, A. V., HAAS, T. A., LISHKO, V. K. & UGAROVA, T. P. 2015. Ligand recognition specificity of leukocyte integrin  $\alpha M\beta 2$  (Mac-1, CD11b/CD18) and its functional consequences. *Biochemistry*, 54, 1408-20.
- PUENTES, S. M., DA SILVA, R. P., SACKS, D. L., HAMMER, C. H. & JOINER, K. A. 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*, 145, 4311-6.

- RAM, S., LEWIS, L. A. & RICE, P. A. 2010. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin Microbiol Rev*, 23, 740-80.
- RAMER-TAIT, A. E., LEI, S. M., BELLAIRE, B. H. & BEETHAM, J. K. 2012. Differential surface deposition of complement proteins on logarithmic and stationary phase *Leishmania chagasi* promastigotes. *J Parasitol*, 98, 1109-16.
- REINER, S. L. & LOCKSLEY, R. M. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*, 13, 151-77.
- REIS E SOUSA, C. 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*, 16, 27-34.
- RIBEIRO-GOMES, F. L., ROMANO, A., LEE, S., ROFFÊ, E., PETERS, N. C., DEBRABANT, A. & SACKS, D. 2015. Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8+ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death & Disease*, 6, e2018.
- ROCKEL, B., KOPEC, K. O., LUPAS, A. N. & BAUMEISTER, W. 2012. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochim Biophys Acta*, 1824, 237-45.
- SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, 2, 845-58.
- SANTOS, I. K., COSTA, C. H., KRIEGER, H., FEITOSA, M. F., ZURAKOWSKI, D., FARDIN, B., GOMES, R. B., WEINER, D. L., HARN, D. A., EZEKOWITZ, R. A. & EPSTEIN, J. E. 2001. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 69, 5212-5.
- SARAIVA, M. & O'GARRA, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 10, 170-81.
- SCHMALSTIEG, F. C., JR. & GOLDMAN, A. S. 2009. Jules Bordet (1870-1961): a bridge between early and modern immunology. *J Med Biogr*, 17, 217-24.
- SCHÖNLAU, F., SCHARFFETTER-KOCHANÉK, K., GRABBE, S., PIETZ, B., SORG, C. & SUNDERKOTTER, C. 2000. In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. *Eur J Immunol*, 30, 2729-40.
- SCHWARZ, T., REMER, K. A., NAHRENDORF, W., MASIC, A., SIEWE, L., MULLER, W., ROERS, A. & MOLL, H. 2013. T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS Pathog*, 9, e1003476.
- SETHI, S., FERVENZA, F. C., SIDDIQUI, A., QUINT, P. S. & PRITT, B. S. 2016. Leishmaniasis-Associated Membranoproliferative Glomerulonephritis With Massive Complement Deposition. *Kidney Int Rep*, 1, 125-130.
- SEYFARTH, J., GARRED, P. & MADSEN, H. O. 2006. Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (*mbl2*) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. *Mol Immunol*, 43, 962-71.
- SHI, L., TAKAHASHI, K., DUNDEE, J., SHAHROOR-KARNI, S., THIEL, S., JENSENIUS, J. C., GAD, F., HAMBLIN, M. R., SASTRY, K. N. & EZEKOWITZ, R. A. 2004. Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med*, 199, 1379-90.

- SKJOEDT, M. O., HUMMELSHOJ, T., PALARASAH, Y., HONORE, C., KOCH, C., SKJODT, K. & GARRED, P. 2010. A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J Biol Chem*, 285, 8234-43.
- STEIMLE, V., SIEGRIST, C. A., MOTTET, A., LISOWSKA-GROSPIERRE, B. & MACH, B. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*, 265, 106-9.
- SUSAN FARMAND, U. B., HORST VON BERNUTH, MICHAEL BORTE, STEPHAN BORTE, KAAAN BOZTUG, ELISABETH FÖRSTER-WALDL, KARSTEN FRANKE, PIRMIN HABERMEHL, FABIAN HAUCK, PETRA KAPAUN, GERD KLOCK, JOHANNES LIESE, REINHARD MARKS, RAINER MÜLLER, TIM NIEHUES, ULRICH SACK, ILKA SCHULZE, VOLKER SCHUSTER, KLAUS SCHWARZ, HARALD RENZ, KLAUS WARNATZ, TOBIAS WELTE, TORSTEN WITTE, STEPHAN EHL 2017. Leitlinie: Diagnostik auf Vorliegen eines primären Immundefekts. AWMF online: Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI).
- SY, J. 2002. *Die Disintegrin- und Metalloproteinase-Familie „ADAM“ im humanen hämatopoetischen System*. Doctor Dissertation, Eberhard-Karls-Universität.
- TAKAHASHI, K. 2011. Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9, 1179-90.
- TAKAHASHI, M., MORI, S., SHIGETA, S. & FUJITA, T. 2007. Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. *Adv Exp Med Biol*, 598, 93-104.
- THERY, C. & AMIGORENA, S. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 13, 45-51.
- TITUS, R. G., DEKREY, G. K., MORRIS, R. V. & SOARES, M. B. 2001. Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. *Infect Immun*, 69, 5189-92.
- UNDERHILL, D. M., BASSETTI, M., RUDENSKY, A. & ADEREM, A. 1999. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med*, 190, 1909-14.
- VAN DEN BERG, C. W., TAMBOURGI, D. V., CLARK, H. W., HOONG, S. J., SPILLER, O. B. & MCGREAL, E. P. 2014. Mechanism of neutrophil dysfunction: neutrophil serine proteases cleave and inactivate the C5a receptor. *J Immunol*, 192, 1787-95.
- VAN KEMPEN, G., MEIJVIS, S., ENDEMAN, H., VLAMINCKX, B., MEEK, B., DE JONG, B., RIJKERS, G. & BOS, W. J. 2017. Mannose-binding lectin and I-ficolin polymorphisms in patients with community-acquired pneumonia caused by intracellular pathogens. *Immunology*, 151, 81-88.
- VERMA, S., MANDAL, A., ANSARI, M. Y., KUMAR, A., ABHISHEK, K., GHOSH, A. K., KUMAR, A., KUMAR, V., DAS, S. & DAS, P. 2018. *Leishmania donovani* Inhibitor of Serine Peptidases 2 Mediated Inhibition of Lectin Pathway and Upregulation of C5aR Signaling Promote Parasite Survival inside Host. *Front Immunol*, 9, 63.
- VOGEL M., S.-Z. C., WASMUTH J., SPENGLER U., SAUERBRUCH T., ROCKSTROH J. 2010. Therapie der HIV-Infektion. *Dtsch Arztebl International*, 107, 507-516.

- VON STEBUT, E. 2015. Leishmaniasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 13, 191-201.
- VON STEBUT, E. 2017a. [Leishmaniasis : Diagnosis and therapy]. *Hautarzt*, 68, 548-552.
- VON STEBUT, E. 2017b. Parasites Dampen Dendritic Cell Activation to Ensure Their Survival. *Trends Parasitol*, 33, 78-80.
- VON STEBUT, E., BELKAID, Y., JAKOB, T., SACKS, D. L. & UDEY, M. C. 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med*, 188, 1547-52.
- VON STEBUT, E., BOECKEN, G., SUNDERKÖTTER, C. & BOGDAN, C. 2016. Importierte Dermatose: Kutane Leishmaniasis. *Dtsch Arztebl International*, 113, 717-.
- VON STEBUT, E. & SUNDERKOTTER, C. 2007. Kutane Leishmaniasis. *Hautarzt*, 58, 445-58; quiz 459.
- VON STEBUT, E. & TENZER, S. 2017. Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *Int J Med Microbiol*.
- VON STEBUT, P., LANDTHALER, BURGDORF, HERTL, RUZICKA 2012. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. *Springer Verlag*, 6., überarbeitete auflage, 365 - 373.
- WALKER, D. M., OGHUMU, S., GUPTA, G., MCGWIRE, B. S., DREW, M. E. & SATOSKAR, A. R. 2014. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci*, 71, 1245-63.
- WHO, W. H. O. 2019. *Leishmaniasis and HIV coinfection* [Online]. Available: [https://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv\\_coinfection/burden\\_hiv\\_coinfection/en/](https://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/) [Accessed 24. Januar 2019].
- WIEDER, E. 2003. *Dendritic cells - a basic review* [Online]. Available: [http://didattica.uniroma2.it/assets/uploads/corsi/145667/cellule\\_dendritiche1.pdf](http://didattica.uniroma2.it/assets/uploads/corsi/145667/cellule_dendritiche1.pdf) [Accessed 30.09.2018 2018].
- WOELBING, F., KOSTKA, S. L., MOELLE, K., BELKAID, Y., SUNDERKOETTER, C., VERBEEK, S., WAISMAN, A., NIGG, A. P., KNOP, J., UDEY, M. C. & VON STEBUT, E. 2006. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med*, 203, 177-88.
- YONGQING, T., DRENTIN, N., DUNCAN, R. C., WIJEYEWICKREMA, L. C. & PIKE, R. N. 2012. Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? *Biochim Biophys Acta*, 1824, 253-62.
- ZAHN, S., KIRSCHSIEFEN, P., JONULEIT, H., STEINBRINK, K. & VON STEBUT, E. 2010. Human primary dendritic cell subsets differ in their IL-12 release in response to *Leishmania major* infection. *Exp Dermatol*, 19, 924-6.
- ZAMANI, S., HOSEINI, A. Z. & NAMIN, A. M. 2019. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity can modulate macrophage response to *Leishmania major* infection. *Int Immunopharmacol*, 69, 178-183.

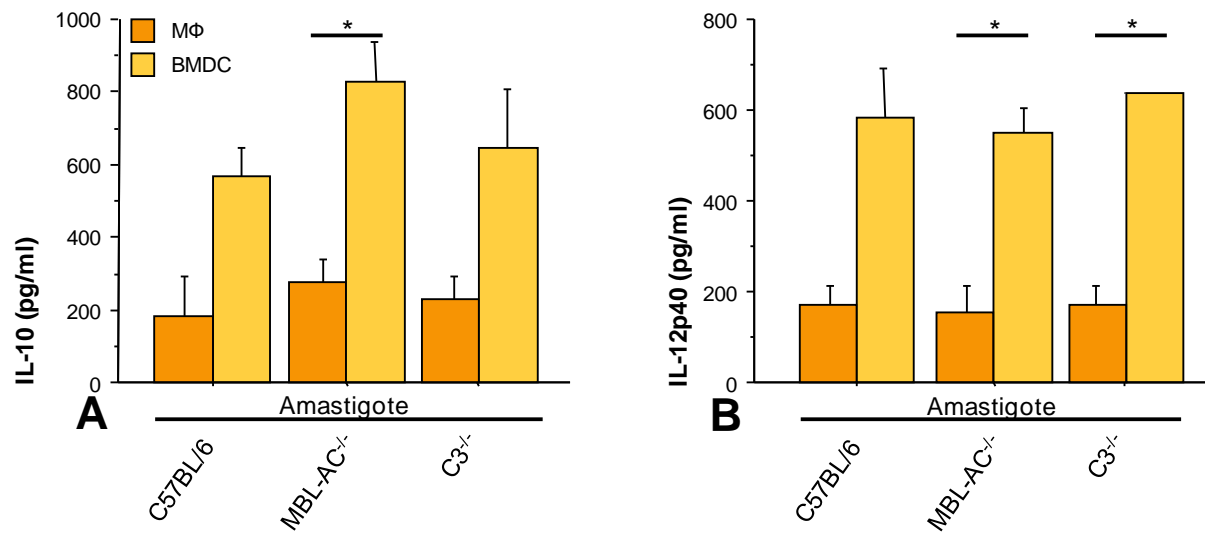
## 8 Anhang



**Abb. 31: Promastigoten *in vitro* Versuche: Vergleich der IL-10 und IL-12p40 Level zwischen MΦ und BMDC.**

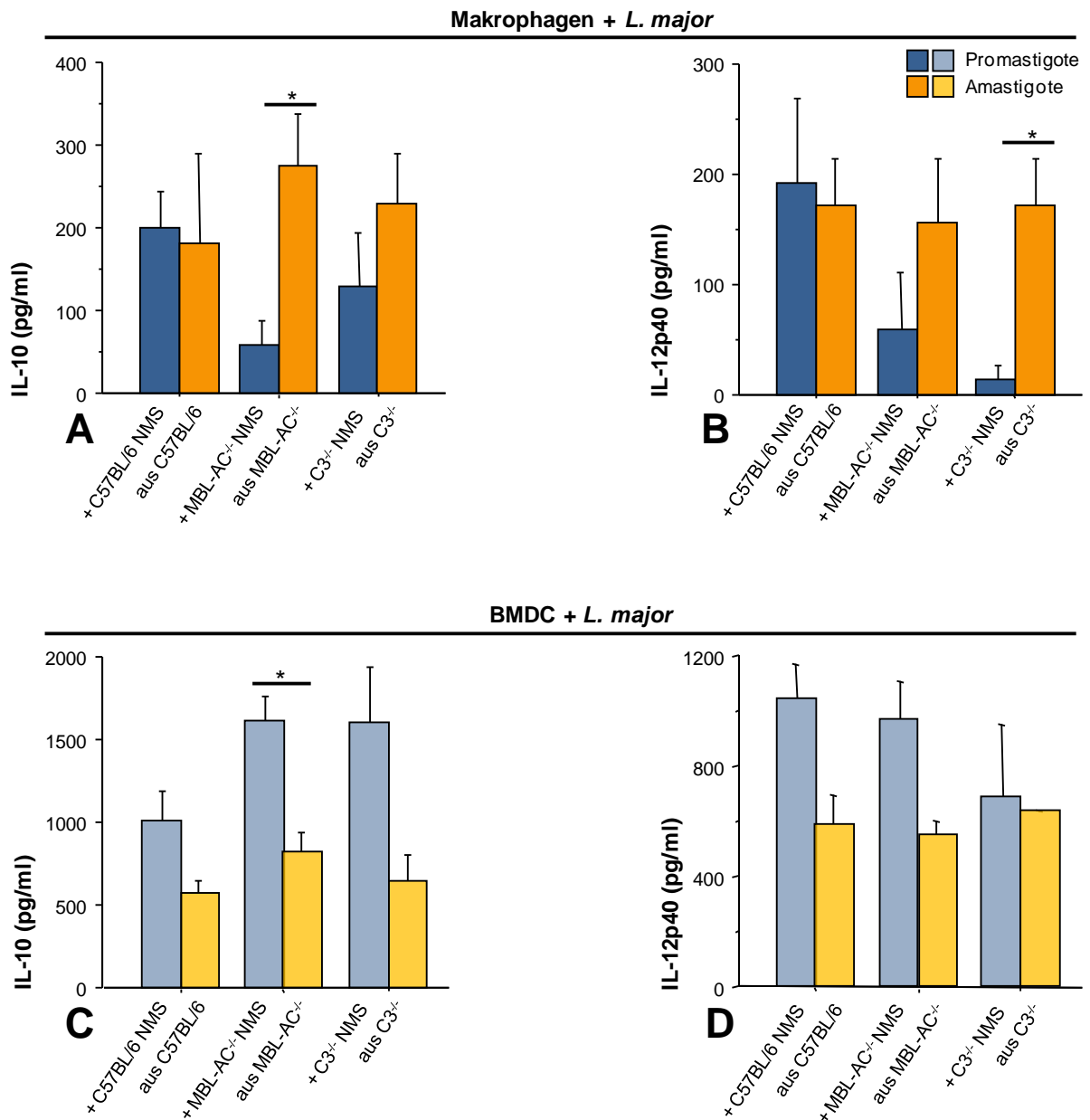
Darstellung zeigt den Vergleich der Zytokine IL-10 und IL-12p40 zwischen Biogel-MΦ und BMDC innerhalb unserer *in vitro* Versuche mit opsonisierten *L. major*. Hierfür generierten wir die APC aus C57BL/6 Mäusen, infizierten sie 1:5 mit aufgereinigten metazyklischen Promastigoten, inkubierten die Ansätze für 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> und analysierten im Anschluss die Medienüberstände mittels ELISA. Die Zytokinkonzentrationen sind als Mittelwerte ± SEM, n≥3, \*p≤0,05, \*\*p≤0,005, \*\*\*p≤0,002.





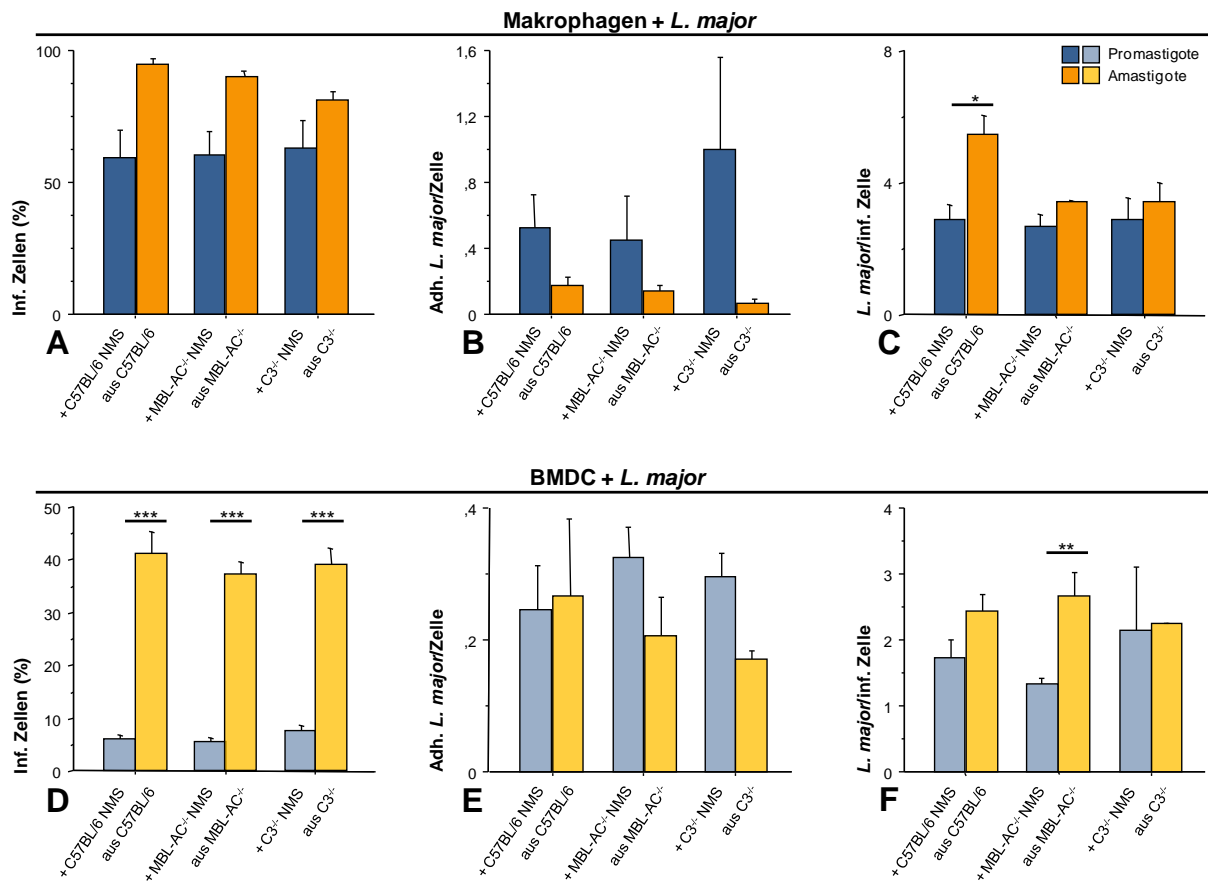
**Abb. 32: Amastigoten *in vitro* Infektionen: Vergleich von IL-10 und IL-12p40 Level zwischen MΦ und BMDC.**

Gezeigt ist der Vergleich der IL-12p40 und IL-10 Level in den Medienüberständen der *in vitro* Infektion (1:5) von C57BL/6 Biogel-MΦ bzw. BMDC mit endogen gereiften Amastigoten aus C57BL/6, MBL-AC<sup>-/-</sup> und C3<sup>-/-</sup> Tieren. Die Zellen wurden 18 Stunden mit den Amastigoten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor die Medienüberstände mittels ELISA analysiert wurden. Die Zytokinkonzentrationen sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt, n=2, \*p<0,05.



**Abb. 33: Vergleich von IL-10 und IL-12p40 zwischen *in vitro* Promastigoten- und Amastigoteninfektionen.**

Die Graphik vergleicht die IL-10 Produktion und die IL-12p40 Produktion durch MΦ (**A, B**) und durch BMDC (**C, D**) innerhalb der *in vitro* Versuchsreihen. Blau dargestellt sind jeweils die Zytokinkonzentrationen der APC, wenn diese mit opsonisierten Promastigoten (1:5) infiziert wurden. Gelb dargestellt sind die Zytokinkonzentrationen der APC, wenn diese mit endogen gereiften Amastigoten infiziert wurden (1:5). Die infizierten Zellen wurden jeweils für 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend die Medienüberstände separiert und die Zytokinlevel mittels ELISA ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, n≥2, \*p≤0,05.



**Abb. 34: Vergleich von Infektionsraten, adhärennten und intrazellulären *L. major* zwischen den *in vitro*-Promastigoten- und Amastigoten-Versuchen bei MΦ und BMDC.**

In dieser Darstellung werden die Infektionsraten, adhärennten und intrazellulären *L. major* zwischen den *in vitro* Versuchsaufbauten mit opsonisierten Promastigoten (siehe Abb. 23 und 25) und endogen gereiften Amastigoten (siehe Abb. 27 und 29) bei MΦ und BMDC verglichen. In blau dargestellt sind die Ansätze mit Zellen, die zuvor mit opsonisierten Promastigoten 1:5 infiziert und anschließend nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mittels Zytospin auf Objektträger verbracht und ausgezählt wurden. In gelb gezeigt sind die *in vitro* Infektionen mit in den (Knockout-)Organismen endogen gereiften Amastigoten. Die Infektion und Auswertung erfolgte identisch. Angegeben sind die ermittelten Raten und absoluten Zellzahlen als Mittelwerte ± SEM, NMS: Normalserum, \*p≤0,05, \*\*p≤0,005, \*\*\*p≤0,002, Promastigoten-Versuche n≥3, Amastigotenversuche n=2.

## 9 Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bedanken bei...

**10 Lebenslauf**