

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

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in
der murinen kutanen Leishmaniasis

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

Vorgelegt von
Annemarie Wegehaupt-Speith
aus Gelsenkirchen

Gelsenkirchen, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand: gelöscht

1. Gutachter: gelöscht

2. Gutachter: gelöscht

Tag der Promotion: 12 Juli 2022

Für meine Familie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und mit keinen anderen als den darin angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Die wörtlich oder sinngemäß aus fremden Arbeiten entnommenen Stellen und bildlichen Darstellungen sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere die Vorgaben der Ethik-Kommission, gemäß Tierschutzgesetz und gemäß Gentechnikgesetz in ihrer jeweils geltenden Fassung zur Kenntnis genommen zu haben und ihre Grundsätze bei der wissenschaftlichen Arbeit eingehalten zu haben. Ich versichere, dass diese Arbeit noch nicht in gleicher oder anderer Form an irgendeiner Stelle als Dissertation vorgelegt worden ist.

Annemarie Wegehaupt-Speith

Gelsenkirchen, den 02.06.2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|--------|
| Abkürzungsverzeichnis | S. IV |
| Abbildungsverzeichnis | S. VII |
| Tabellenverzeichnis | S. VII |
| 1 Ziele der Arbeit | S. 1 |
| 2 Einleitung | S. 2 |
| 2.1 Leishmaniasis | S. 2 |
| 2.1.1 Epidemiologie | S. 2 |
| 2.1.2 Klinische Erscheinungsformen der Leishmaniasis | S. 3 |
| 2.1.3 Lebenszyklus von <i>L. major</i> | S. 4 |
| 2.1.4 Experimentelle murine kutane Leishmaniasis (CL) | S. 5 |
| 2.1.5 Unterschiedliche Immunantworten auf die Infektion mit <i>L. major</i> | S. 7 |
| 2.2 Neutrophile Granulozyten | S. 12 |
| 2.2.1 Allgemeine Fakten und Funktionen der PMN | S. 12 |
| 2.3 PMN in der Leishmaniasis | S. 14 |
| 2.3.1 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Leishmaniasis | S. 14 |
| 2.3.2 Grundlagen der Phagozytose von <i>L. major</i> durch neutrophile Granulozyten | S. 17 |
| 2.3.3 Depletion von neutrophilen Granulozyten im Mausmodell - Aktueller Forschungsstand | S. 18 |
| 3 Material und Methoden | S. 22 |
| 3.1 Materialien | S. 22 |
| 3.1.1 Parasiten | S. 22 |
| 3.1.2 Versuchstiere | S. 22 |
| 3.1.3 Reagenzien und Puffer | S. 22 |
| 3.1.4 Verbrauchsmaterialien | S. 24 |
| 3.1.5 Geräte | S. 25 |
| 3.1.6 Antikörper | S. 26 |
| 3.1.7 Medien und Puffer | S. 27 |
| 3.1.8 Software und Programme | S. 29 |
| 3.2 Methoden | S. 30 |
| 3.2.1 Berechnung von Lebendzellzahlen | S. 30 |
| 3.2.2 Herstellung von löslichem Leishmanienlysat (SLA) | S. 30 |
| 3.2.3 Kultivierung und Isolation promastigoter Leishmanien aus der Flüssigkultur | S. 31 |
| 3.2.4 Gewinnung und Aufreinigung amastigoter Leishmanien | S. 31 |
| 3.2.5 Opsonisierung pro- und amastigoter Leishmanien | S. 32 |
| 3.2.6 Gewinnung und Charakterisierung von neutrophilen Granulozyten | S. 32 |
| 3.2.7 Herstellung von Zytospins | S. 33 |
| 3.2.8 Infektion von neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> | S. 33 |
| 3.2.9 Testung des NIMP-Antikörpers auf seine Fähigkeit, neutrophile Granulozyten zu depletieren | S. 34 |
| 3.2.10 Depletion der neutrophilen Granulozyten von C57BL/6 Mäusen vor und nach Infektion mit <i>L. major</i> | S. 35 |

| | | |
|----------|--|-------|
| 3.2.11 | Messung und Berechnung des Läsionsvolumens | S. 37 |
| 3.2.12 | Gewinnung intradermaler Zellen aus Mausohren | S. 37 |
| 3.2.13 | Gewinnung und Restimulation von Zellen aus submandibulären Lymphknoten der Maus | S. 38 |
| 3.2.14 | Färbung und Restimulation von Lymphozyten aus submandibulären Lymphknoten mittels Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) und deren Restimulation | S. 38 |
| 3.2.15 | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Sandwich-Prinzip | S. 39 |
| 3.2.16 | Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)-Analyse | S. 40 |
| 3.2.17 | Statistische Analysen und Software | S. 41 |
| 4 | Ergebnisse | S. 42 |
| 4.1 | <i>In vitro</i> -Infektion neutrophiler Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen mit <i>L. major</i> | S. 42 |
| 4.1.1 | Reinheit der neutrophilen Granulozyten-Präparationen | S. 42 |
| 4.1.2 | Einfluss von Komplementfaktoren auf die Infizierbarkeit der PMN | S. 43 |
| 4.1.3 | Einfluss von Immunglobulinen auf die Infektion neutrophiler Granulozyten | S. 46 |
| 4.1.4 | Einfluss von Fcγ-Rezeptoren auf die Infektion neutrophiler Granulozyten | S. 50 |
| 4.1.5 | Infektion von neutrophilen Granulozyten mit Gewebeamastigoten aus B-Zell defizienten Mäusen | S. 52 |
| 4.1.6 | Einfluss einer Antikörper-vermittelten Blockade des Phosphatidylserins auf der Oberfläche promastigoter Leishmanien auf die Infektion neutrophiler Granulozyten | S. 55 |
| 4.2 | <i>In vivo</i> -Infektion von C57BL/6 Mäusen mit <i>L. major</i> | S. 57 |
| 4.2.1 | Depletierende Eigenschaften des NIMP-Hybridom-Überstands | S. 57 |
| 4.2.2 | Effekt der Neutrophilendepletion auf das frühe Granulom nach <i>high-dose</i> -Infektion und in Abhängigkeit des gewählten Antikörpers | S. 58 |
| 4.2.3 | Charakterisierung und Messung des prozentualen Anteils intradermaler Zellen aus infizierten Mausohren mittels Durchflusszytometrie | S. 60 |
| 4.2.4 | Einfluss der 7-4- bzw. NIMP-AK-Behandlung auf die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen | S. 64 |
| 4.2.5 | Einfluss der Neutrophilendepletion auf das Zytokinprofil antigenspezifisch restimulierter dLK-Zellen | S. 66 |
| 5 | Diskussion | S. 68 |
| 5.1 | Infektionsversuche <i>in vitro</i> | S. 68 |
| 5.1.1 | Phagozytose amastigoter und promastigoter <i>L. major</i> durch PMN im Vergleich | S. 68 |
| 5.1.2 | Einfluss der Interaktion von Komplementfaktoren und –rezeptoren auf die Phagozytose von <i>L. major</i> | S. 69 |
| 5.1.3 | Einfluss der Interaktion der Fcγ-Rezeptoren mit Leishmanien-spezifischem IgG auf die Phagozytose von <i>L. major</i> | S. 70 |
| 5.1.4 | Einfluss von Phosphatidylserin auf die Phagozytose von promastigoten Leishmanien | S. 71 |
| 5.1.5 | Zytokinsekretion durch infizierte murine neutrophile Granulozyten | |

| | | |
|----------|---|-------|
| 5.2 | Behandlung von C57BL/6 Mäusen mit PMN-depletierenden Antikörpern | S. 76 |
| 5.2.1 | Messung der Läsionsvolumina nach einer Infektion mit <i>L. major</i> in AK-behandelten und PBS-behandelten Mäusen | S. 76 |
| 5.2.2 | Bestimmung der Zellzusammensetzung an der Inokulationsstelle der Leishmanien | S. 78 |
| 5.2.3 | Spielen neutrophile Granulozyten bei dem Priming der Lymphozyten eine Rolle? | S. 80 |
| 5.2.4 | Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die Zytokinsekretion von Lymphozyten | S. 81 |
| 6 | Zusammenfassung | S. 84 |
| 7 | Literaturverzeichnis | S. 86 |
| 8 | Danksagung | S. 97 |
| 9 | Lebenslauf | S. 98 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| 10 x | zehnfach |
| % | Prozent |
| Ø | unstimuliert |
| + | in Anwesenheit, mit, positiv |
| - | in Abwesenheit, ohne, negativ, gegen den Uhrzeigersinn |
| α | anti, alpha |
| Abb. | Abbildung |
| AG | Arbeitsgruppe |
| APC | antigenpräsentierende Zelle |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| β | beta |
| b | Breite |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Komplementfaktor |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| CD | cluster of differentiation |
| CFDA-SE | Carboxyfluorescein Diazetat Succinimidyl Ester |
| CFSE | Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CF | Komplementfaktoren |
| CR | Komplementrezeptor |
| CTL | zytotoxische T-Zellen |
| d | day(s), Tag(e); Dicke |
| DC | dendritic cell(s), Dendritische Zelle(n) |
| d.h. | das heißt |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| dLK | drainierende Lymphknoten |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| Dr. | Doktor |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| et al. | et alii, et aliae, et alia, und andere |

| | |
|-----------------|---|
| FACS | fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie |
| Fc | fragment, crystallizable |
| FcR | Fc-Rezeptor(en) |
| FCS | fetal calf serum, fötales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| FSC | forward scatter, Vorwärtsstreulicht |
| γ | gamma |
| g | Gramm |
| g | Erdbeschleunigung (1 g = 9,80665 m/s ²) |
| GmbH | Gesellschaft mit begrenzter Haftung |
| GM-CS | Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor |
| gp | Glykoprotein |
| i.d. | intradermal |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| IMS | Immunserum |
| i. p. | intraperitoneal |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| LCF | <i>Leishmania chemotatic factor</i> |
| <i>L. major</i> | <i>Leishmania major</i> |
| LPG | Lipophosphoglykan |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplexes |
| NE | Neutrophilen Elastase |
| NET | Neutrophil Extracellular Trap |
| NK | natürlicher Killerzellen |
| NMS | Normalserum |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinasen |
| PAMP | pathogen associated molecular pattern |
| PMN | polymorphkernige neutrophile Granulozyten |
| ROS | reaktive Sauerstoffverbindungen |
| s.c. | subkutan |
| SEB | Staphylokokken Enterotoxin B |
| SLA | löslichem Leishmanienantigen |

| | |
|----------|-----------------------------------|
| spez. | spezifisch |
| SSC | side scatter |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TGF | transformierender Wachstumsfaktor |
| Th-Zelle | T-Helferzelle |
| TLR | Toll like Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Tregs | regulatorische T-Zellen |
| u. a. | unter anderem |
| v. a. | vor allem |
| vgl. | vergleiche |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-------|
| Abb. 1 | Verbreitungsgebiete der kutanen Leishmaniasis | S. 2 |
| Abb. 2 | Biphasischer Lebenszyklus von <i>Leishmania sp.</i> | S. 4 |
| Abb. 3 | Modell über die Differenzierung naiver CD4+-Zellen nach Antigenpräsentation | S. 11 |
| Abb. 4 | Der "Trojanisches Pferd"-Transfer im Vergleich zu dem "Trojanischen Kaninchen"-Transfer | S. 16 |
| Abb. 5 | Exemplarisches Pipettierschema einer 24-Well-Platte | S. 34 |
| Abb. 6 | PMN-Depletion und Infektion von C57BL/6-Mäusen - Versuchsablauf | S. 36 |
| Abb. 7 | Reinheit der PMN | S. 42 |
| Abb. 8 | Fotografie eines PMN | S. 42 |
| Abb. 9 | Lichtmikroskopisches Bild eines PMN nach Koinkubation mit <i>L. major</i> | S. 43 |
| Abb. 10 | Einfluss von unbehandelten und CF-opsonisierten <i>L. major</i> auf die Infizierbarkeit von PMN und deren Zytokinbildung | S. 45 |
| Abb. 11 | Effekt von <i>Leishmania</i> -spezifischen Immunglobulinen auf die Infektion neutrophiler Granulozyten und deren Zytokinproduktion | S. 49 |
| Abb. 12 | Einfluss des Fc γ R auf die Phagozytose von <i>L. major</i> durch PMN und deren Zytokinproduktion | S. 50 |
| Abb. 13 | Einfluss der Zucht von Amastigoten in μ MT-Mäusen auf die Infizierbarkeit von PMN und deren Zytokinbildung | S. 53 |
| Abb. 14 | Einfluss der Blockade des Phosphatidylserins an der Oberfläche promastigoter Leishmanien auf deren Infektiosität und Fähigkeit der Zytokinmodulierung bei PMN | S. 56 |
| Abb. 15 | Fähigkeit des NIMP-AK, PMN zu depletieren | S. 58 |
| Abb. 16 | Läsionsvolumina nach Hochdosisinfektion AK-behandelter und nicht-behandelter C57BL/6-Mäuse | S. 59 |
| Abb. 17a/b | Charakterisierung und Messung des prozentualen Anteils intradermaler Zellen aus infizierten Mausohren – DotPlot- Darstellung der isolierten Zellen aus einer Maus mit Gating- Strategie. | S. 61 |
| Abb. 17c/d | Charakterisierung und Messung des prozentualen Anteils intradermaler Zellen aus infizierten Mausohren – Arithmetische Mittelwerte \pm SEM | S. 62 |
| Abb. 18 | Bestimmung des prozentualen Anteils der CD4+ und CD8+- Lymphozyten aus submandibulären Lymphknoten nach Restimulation mit SLA | S. 65 |
| Abb. 19 | Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Überständen SLA-stimulierter Zellen aus submandibulären Lymphknoten infizierter Mäuse | S. 66 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------|---|-------|
| Tab. 1 | Auswahl der durch PMN sezernierten Zytokine | S. 12 |
| Tab. 2 | Übersicht über den Versuchsaufbau der im Text zitierten Arbeitsgruppen | S. 21 |

1 Ziele der Arbeit

Mit zirka (ca.) 1,3 Millionen Neuinfektionen jährlich gehört die Leishmaniasis zu den häufigsten vektorübertragenen Infektionserkrankungen weltweit (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2019). Sie wird durch humanpathogene, protozoische Erreger der Gattung *Leishmania (L.) spp.* ausgelöst. Je nach Erregerspezies kann die Erkrankung in verschiedenen klinischen Erscheinungsformen auftreten.

L. major ist der Erreger der kutanen Leishmaniasis. Dessen promastigote Form wird durch den Stich einer infizierten weiblichen Sandmücke der Gattungen *Phlebotomus* oder *Lutzomyia* auf den Menschen übertragen. Nach der Infektion werden innerhalb weniger Stunden zahlreiche polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) an die Eintrittsstelle rekrutiert. Diese phagozytieren die eingedrungenen Parasiten mithilfe spezieller Rezeptoren. Während für humane PMN bereits Rezeptoren, wie der Fc-Rezeptor (FcR) und der Komplementrezeptor 3 (CR3) definiert werden konnten (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Laufs *et al.*, 2002), sind für murine PMN noch keine bekannt. Der erste Teil der Arbeit befasst sich daher mit der Identifikation von murinen PMN-Rezeptoren, die für die Phagozytose von *L. major* von Bedeutung sind.

Des Weiteren wird die genaue immunologische Bedeutung der PMN im Krankheitsverlauf der Leishmaniasis kontrovers diskutiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ihre Depletion in Leishmanien-resistenten Mäusen einen Anstieg der Parasitenlast an der Inokulationsstelle sowie größere Ulzerationen und fulminantere Krankheitsverläufe zur Folge hat (Lima *et al.*, 1998; Launois *et al.*, 1998; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). Zudem wurde eine geringere Produktion Th1-relevanter Zytokine durch Makrophagen festgestellt, woraus gefolgert wurde, dass die PMN wesentlich an einer protektiven Th1-dominierenden Immunantwort in resistenten Mäusen beteiligt sind (McFarlane *et al.*, 2008). Andere Arbeitsgruppen zeigten wiederum, dass der Anstieg der Parasitenlast nur temporär besteht und die Läsionen an der Inokulationsstelle im Verlauf vollständig abheilen. Darüber hinaus liegt auch bei PMN-depletierten Mäusen eine protektive, Th1-vermittelte Immunantwort vor. Die PMN scheinen demzufolge für die Ausbildung einer Th1-vermittelten Immunantwort nicht obligat zu sein (Lima *et al.*, 1998; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). Im zweiten Teil der Arbeit soll, durch Depletion der PMN in C57BL/6 Mäusen, die Funktion der PMN innerhalb der murinen Leishmaniasis genauer analysiert werden.

2 Einleitung

2.1 Leishmaniasis

2.1.1 Epidemiologie

Mit zwölf Millionen infizierten Menschen weltweit gehört die Leishmaniasis zu den häufigsten vektorübertragenen Erkrankungen. Jährlich werden ca. 1,3 Millionen Neuinfektionen registriert (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2019). Die Erkrankung wird durch obligat intrazelluläre Parasiten der Gattung *Leishmania* hervorgerufen und kann in mehreren klinisch unterschiedlichen Erscheinungsformen auftreten (Vanloubbeek und Jones, 2004). Die kutane Leishmaniasis, die unter anderem durch die Spezies *L. major* hervorgerufen wird, ist mit zehn Millionen Infizierten die häufigste klinische Erscheinungsform. Wie in Abbildung 1 dargestellt, kommt sie vor allem in Nordafrika, im Südwesten Asiens und im Norden Südamerikas vor. Immer häufiger werden jedoch auch Infektionen aus Ländern Südeuropas, wie Türkei, Griechenland und Italien, gemeldet (Hepburn, 2000). Schätzungen zufolge liegt die weltweite Inzidenz bei ca. 1,2 Mio. Neuerkrankungen pro Jahr (Altmeyer, 2018). Dies hat vor allem mit der Zunahme an Fernreisen, aber auch mit der Aufnahme von Flüchtlingen aus endemischen Gebieten zu tun (Ngoka und Mutinga, 1978; Magill *et al.*, 1993).

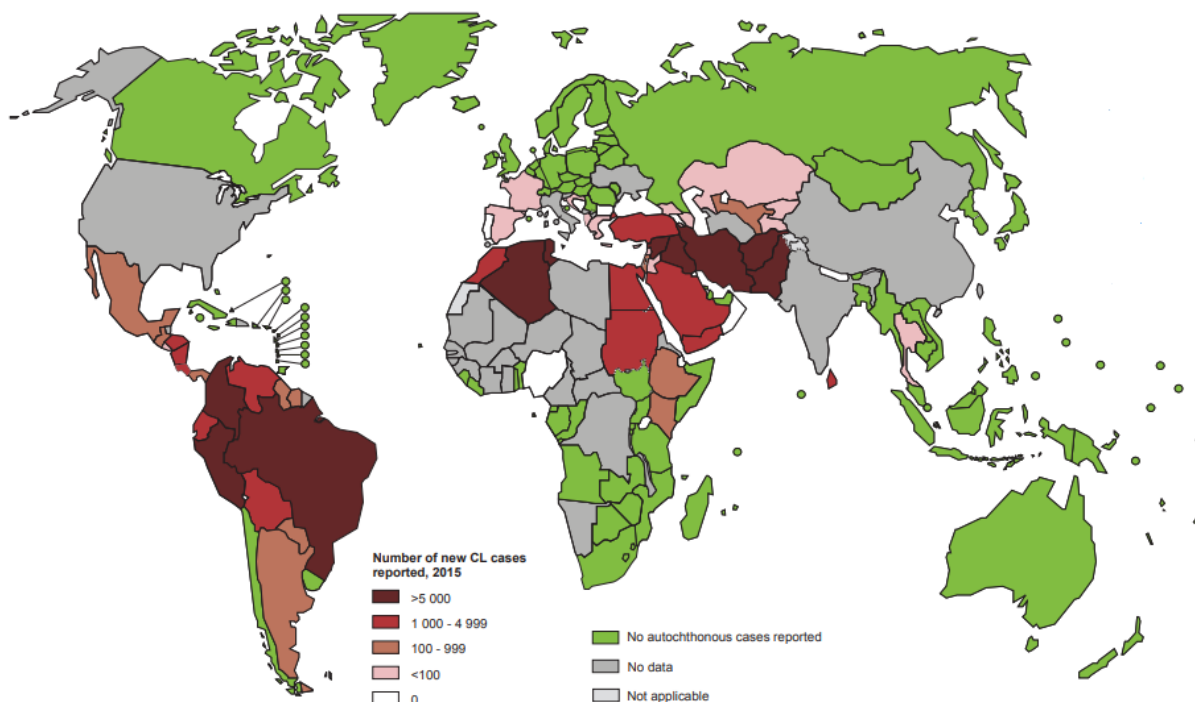


Abb. 1: Verbreitungsgebiete der kutanen Leishmaniasis. Die Weltkarte zeigt die endemischen Gebiete der kutanen Leishmaniasis im Jahr 2016 (WHO, 2019).

2.1.2 Klinische Erscheinungsformen der Leishmaniasis

Die Leishmaniasis tritt in vier verschiedenen klinischen Erscheinungsformen auf, die in der Regel durch unterschiedliche Erregerspezies hervorgerufen werden (Vanloubbeeck und Jones, 2004). Es wird zwischen der lokalen kutanen, der diffusen kutanen, der mukokutanen und der viszeralen Leishmaniasis unterschieden.

Lokale kutane Leishmaniasis (Orientbeule)

L. major, *L. mexicana* und *L. aethiopica* sind die Erreger der lokal kutanen Leishmaniasis. Die Erkrankung äußert sich durch ein Hautgeschwür, das sich nach zwei bis sechs Wochen an der Einstichstelle bildet und unter Narbenbildung abheilt. Ein erneutes Ausbrechen der Krankheit durch dieselbe Subspezies wird durch eine lebenslänglich erworbene Immunität verhindert.

Diffuse kutane Leishmaniasis

Sie ist eine Folgeform der kutanen Leishmaniasis, bei der sich die Erreger im gesamten Körper ausbreiten und multiple Hautläsionen entstehen. Sie kommt vor allem bei immunsupprimierten Personen vor. Die Läsionen heilen in diesem Fall nicht selbstlimitierend ab.

Mukokutane Leishmaniasis

Bei der mukokutanen Leishmaniasis handelt es sich um eine Folgeform einer unzureichend therapierten kutanen Leishmaniasis. Hier wird nicht nur die Haut, sondern es werden auch die Schleimhäute von den Erregern zerstört.

Viszerale Leishmaniasis (Kala-Azar)

Die viszerale Leishmaniasis ist eine chronisch verlaufende Form der Leishmaniasis, die unter anderem durch die Spezies *L. donovani* verursacht wird. Sie kommt vor allem in Indien, Bangladesch, Ostafrika, dem Sudan und Brasilien vor. Des Weiteren tritt sie immer häufiger als opportunistische Infektion bei Personen mit erworbener Immunschwäche auf. Der Erreger befällt innere Organe, wie Milz und Leber, was unbehandelt in über 90 % der Fälle zu einem tödlichen Verlauf der Krankheit führt.

2.1.3 Lebenszyklus von *L. major*

Der Lebenszyklus der Leishmanien wird als biphasisch bezeichnet (Dedet *et al.*, 1999), da sie einen Wirtswechsel und im Zuge dessen eine Morphogenese durchlaufen. In Abhängigkeit davon, in welchem Wirt sich die Erreger befinden, lassen sich eine promastigote und eine amastigote Lebensform unterscheiden. Im Verdauungstrakt der weiblichen Sandmücke der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia* liegen die Parasiten extrazellulär in ihrer infektiösen, promastigoten Form vor. Phänotypisch sind dies begeißelte, längliche (6 -10 μm) Parasiten. Die amastigote Form der Erreger persistiert obligat intrazellulär in Phagozyten von Säugetieren. Es handelt sich um unbegeißelte, kugelige (ca. 2 μm Durchmesser) Parasiten, deren Wirtszellen hauptsächlich Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) sind (Blank *et al.*, 1993; Antoine *et al.*, 1998). In ihnen vermehren sich die Parasiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole. Der Lebenszyklus der Leishmanien ist in Abbildung 2 dargestellt.

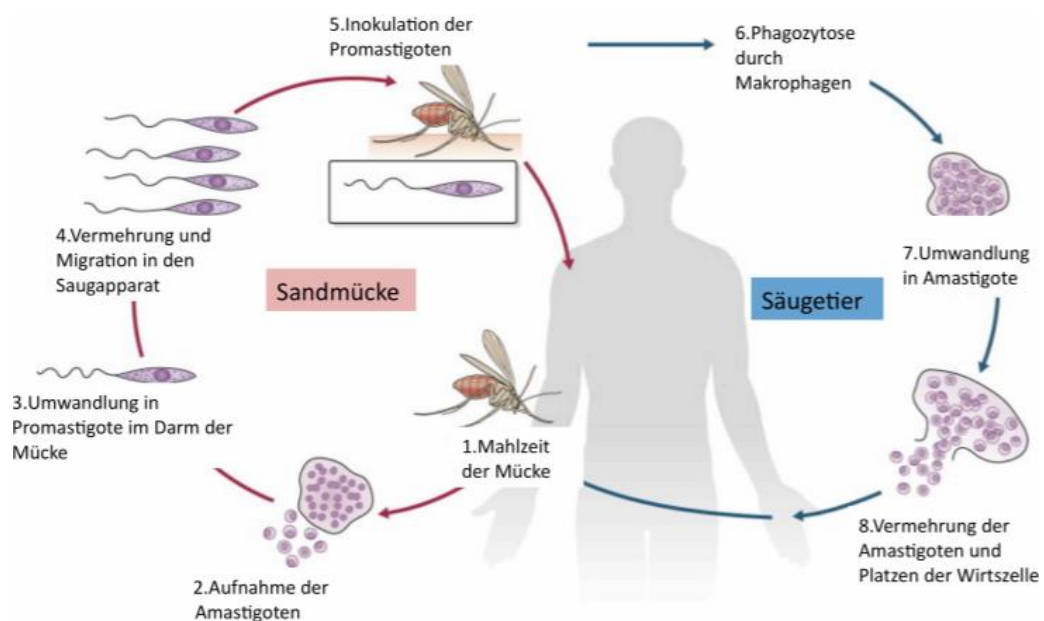


Abb. 2: Biphasischer Lebenszyklus von *Leishmania sp.* Promastigote Leishmanien gelangen durch den Stich einer Sandmücke in ein Säugetier. Hier findet in Makrophagen die Transformation von Promastigoten zu Amastigoten statt. Wird das infizierte Säugetier erneut von einer Sandmücke gestochen, nimmt diese während ihrer Blutmahlzeit amastigote Leishmanien auf. Diese wandeln sich in ihre infektiöse, promastigote Form um. Der Kreislauf beginnt von vorn (in Anlehnung an Farrar *et al.*, 2014).

Beim Stich einer Sandmücke nimmt diese während ihrer Blutmahlzeit die Parasiten eines infizierten Säugetieres auf. In diesem Stadium liegen die Parasiten in ihrer amastigoten Form vor. Die Leishmanien gelangen in den Darm des Insekts, wo sie sich in ihre promastigote Form transformieren und proliferieren (Awasthi *et al.*, 2004). Nach etwa einer Woche wandeln sich die prozyklischen, promastigoten Leishmanien wiederum in ihre infektiöse, metazyklische Form um (Bates, 1994). In diesem Stadium wandern sie in den Ösophagus und den Pharynx der Mücke ein. Bei der nächsten Blutmahlzeit der Sandmücke gelangen die Parasiten mit dem Speichel des Insekts in ihren Wirt, wobei es sich hierbei in der Regel um kleinere Säugetiere handelt (Sacks und Kamhawi, 2001). Der Mensch stellt in diesem Zusammenhang einen Fehlwirt dar. Die promastigoten Leishmanien werden im Wirtsorganismus zunächst von PMN phagozytiert. Diese werden nach der Aufnahme apoptotisch und von Makrophagen phagozytiert. Zusätzlich können diese Phagozyten den Erreger direkt über einen rezeptorvermittelten Prozess aufnehmen (Peters *et al.*, 2008). Die Zellen mit den internalisierten Parasiten befinden sich nach der Phagozytose im sogenannten „Phagosom“ der Makrophage. Durch mehrere Fusionsereignisse entsteht aus ihm die „parasitophore Vakuole“. In ihr wandeln sich die Leishmanien in ihre amastigote Form um und proliferieren so lange, bis die Wirtszelle lysiert wird. Die freiwerdenden Parasiten infizieren weitere Wirtszellen und setzen in ihnen ihre Vermehrung fort. Der Kreislauf schließt sich, wenn eine Sandmücke während ihrer Blutmahlzeit Amastigote des infizierten Säugers aufnimmt.

2.1.4 Experimentelle murine kutane Leishmaniasis (CL)

Um den Infektionsverlauf der kutanen Leishmaniasis analysieren zu können, wurde von Belkaid und seinen Kollegen ein neues Infektionsmodell etabliert, dessen Ziel es war, die natürlichen Infektionsbedingungen möglichst genau zu imitieren. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6 Mäusen lediglich 100 metazyklische promastigote Leishmanien (low-dose-Modell) anstelle von 10^5 - 10^7 – wie es im sogenannten high-dose-Modell üblich ist – injiziert. Des Weiteren wurden die Parasiten in die Dermis ihrer Wirte und nicht subkutan (s.c.) eingebracht (Belkaid *et al.*, 2000). Der darauffolgende Krankheitsverlauf lässt sich in Anlehnung an die genannte Arbeit in zwei Phasen einteilen.

In der ersten Phase, der sogenannten „stillen Phase“, dringen promastigote Leishmanien in die Dermis eines Säugetieres ein, wo sie von residenten Makrophagen aufgenommen werden. Intrazellulär findet eine Transformation der promastigoten Form in die amastigote Form statt. Daran anschließend folgt durch Zellteilung eine drastische Vermehrung der Parasiten. Klinische Symptome sind in dieser, vier bis fünf Wochen andauernden Phase nicht vorhanden.

Um ihre Reproduktion zu gewährleisten, stehen den Leishmanien eine Reihe von Mechanismen zur Verfügung mit deren Hilfe sie dem humoralen, unspezifischen (angeborenen) Immunsystem des infizierten Wirtes entgehen können. Zu diesem Teil des Immunsystems gehört das Komplementsystem, das sich aus über 20 Serumproteinen zusammensetzt und zu den enzymatisch katalysierten Proteinkaskadensystemen gehört. Seine Hauptaufgaben sind die Opsonisierung von Fremdpartikeln und damit deren Aufnahme durch Phagozyten, die direkte Zerstörung von Erregern und die Aktivierung von Abwehrzellen des Immunsystems.

Leishmanien sind dazu befähigt, diesen ersten Abwehrmechanismus mithilfe leishmanieneigener Proteinkinasen (c-Ipk2 und LPK-1) zu entgehen, indem sie Komplementfaktoren phosphorylieren und dadurch die Proteinkaskade inhibieren (Hermoso *et al.*, 1991; Power *et al.*, 1997). Des Weiteren machen sich die obligat intrazellulären Parasiten die Opsonisierung ihrer Oberfläche mit dem Komplementfaktor C3b zunutze, um ihre Aufnahme durch Makrophagen zu fördern. Hierzu wird mithilfe der Metalloproteinase gp63 der Komplementfaktor C3b in ein C3bi-ähnliches Molekül umgewandelt, das mit dem CR3 der Phagozyten interagiert (Reiner und Locksley, 1995; Brittingham *et al.*, 1995; von Stebut, 2007). Daneben können sowohl gp63 als auch Lipophosphoglycan (LPG) – ein Oberflächenmolekül der Parasiten - direkt mit dem Mannose-Fukose-Rezeptor und dem CR3 von Phagozyten interagieren und eine Aufnahme induzieren (Franco L. *et al.*, 2012). Weitere Mechanismen der Parasiten, um der Immunantwort ihres Wirtes zu entgehen sind die Unterdrückung der Synthese leishmanizider Zellprodukte (Bogdan und Rollinghoff, 1999), die Hemmung lysosomaler Enzyme sowie die Modulation der Zytokinsekretion durch infizierte Zellen. Damit verbunden ist die Hemmung der Aktivierung durch T-Zellen. Vor allem die Unterdrückung der IL-12-Produktion durch Makrophagen spielt hierbei eine tragende Rolle (Belkaid, Butcher, Sacks, 1998).

Die zweite Phase beginnt mit dem Einstrom von PMN an der Inokulationsstelle der Leishmanien. Sie sind je nach injizierter Erregeranzahl nach viereinhalb Wochen (low-dose-Modell) oder bereits nach wenigen Stunden (high-dose-Modell) nachweisbar (Belkaid *et al.*, 2000; Beil *et al.*, 1992). Des Weiteren verweilen sie - je nach verwendetem Mausstamm - entweder für ca. drei Tage (C57BL/6 Mäuse) oder für mehr als eine Woche (Balb/c Mäuse) an der Injektionsstelle (Beil *et al.*, 1992; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Den PMN folgen zeitnah Makrophagen. Später DCs und T-Zellen. Den DCs fällt eine gesonderte Aufgabe zu. Sie werden durch die Freisetzung von Amastigoten aus lysierten Makrophagen angelockt und nehmen die mit IgG opsonisierten Parasiten aktiv über den FcγR I und FcγR III auf (Locksley *et al.*, 1988; Woebling *et al.*, 2006). Hiernach wandern sie in die drainierenden Lymphknoten (dLK) und präsentieren die prozessierten *Leishmania*-Antigene naiven T-Zellen mittels ihrer MHC-Moleküle (Moll *et al.*, 1993). Zusätzlich zu den eingewanderten DCs existiert in den dLK eine DC-Population, die ebenfalls in hohem Maße lösliche *Leishmania*-Antigene präsentiert (Lezzi *et al.*, 2006). Eine Aktivierung von sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen erfolgt nun, indem - zusätzlich zur Antigenpräsentation - IL-12 durch die Phagozyten sezerniert wird (Belkaid *et al.*, 2002). Die aktivierten, auf *Leishmania*-AG geprägten Th1-Zellen produzieren ihrerseits INF-γ (von Stebut *et al.*, 2000). Das Zytokin aktiviert infizierte Makrophagen, die jetzt in der Lage sind, die internalisierten Parasiten abzutöten (Blos *et al.*, 2003; von Stebut *et al.*, 2004).

Klinisch kommt es in dieser Phase der Erkrankung zu einer Entzündungsreaktion an der Einstichstelle, die mit einer Granulombildung einhergeht. Dieses heilt nach ca. elf Wochen vollständig ab (Belkaid *et al.*, 2000).

2.1.5 Unterschiedliche Immunantworten auf die Infektion mit *L. major*

Der Verlauf der kutanen Leishmaniasis ist davon abhängig, ob zu Beginn der Infektion eine durch T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) oder Typ 2 (Th2) vermittelte Immunantwort generiert wird. Die beim Menschen beobachteten Krankheitsformen der kutanen Leishmaniasis können experimentell durch die Infektion verschiedener Maus-Inzuchtstämme mit *L. major* reproduziert werden. Oft werden die Stämme BALB/c und C57BL/6 verwendet.

Th1-Zellen

C57BL/6 Mäuse sind gegen *L. major* resistent (Sacks und Noben-Trauth, 2002), da bei ihnen eine durch Th1-Zellen vermittelte Immunantwort induziert wird. Antigenpräsentierende Zellen phagozytieren dabei die eingedrungenen Parasiten und präsentieren unter Verwendung des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) Klasse-II ein Epitop des Erregers. Die Antigen-MHC-II-Komplexe der antigenpräsentierenden Zellen interagieren mit den CD4-Rezeptoren und weiteren kostimulatorischen Molekülen der naiven Th0-Zellen. Durch gleichzeitige Stimulation mit IL-12, das hauptsächlich von Makrophagen und DCs sezerniert wird (Seder *et al.*, 1993; Yamane *et al.*, 1999), differenzieren sich die CD4⁺-T-Vorläuferzellen zu Th1-Zellen (Scott *et al.*, 1988; Heinzel *et al.*, 1989). Die Th1-Zellen sorgen zum einen für eine Aktivierung der Makrophagen durch Rezeptorinteraktionen bei gleichzeitiger Sezernierung der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und Tumornekrosefaktor (TNF) - α . Zum anderen wird eine durch Th2-Zellen vermittelte Immunantwort durch IFN- γ inhibiert.

CT-Lymphozyten

Eine weitere für den Krankheitsverlauf wesentliche T-Zellpopulation sind die aktivierten CD8⁺-T-Zellen, die auch zytotoxische T-Zellen (CTL) genannt werden. Für ihre Aktivierung sind sowohl CD4⁺-T-Zellen als auch DCs erforderlich (Melief, 2003). Unreife DCs präsentieren CD4⁺-T-Zellen, die prozessierten *Leishmania*-Antigene exogenen Ursprungs über MHC-II-Rezeptoren. Diese werden dadurch aktiviert, und beginnen zu proliferieren. Zudem findet eine Differenzierung statt. Die CD4⁺-T-Zellen tragen nun vermehrt den sogenannten CD40-Liganden auf ihrer Oberfläche, der wiederum mit dem CD40-Rezeptor auf den DCs interagiert. Gleichzeitig sezernieren sie bestimmte Zytokine, die sowohl die DCs als auch die ruhenden CD8⁺-T-Zellen aktivieren. Werden den aktivierten CD8⁺-T-Zellen *Leishmania*-Antigene von nun reifen DCs über MHC-I-Rezeptoren präsentiert, kommt es zur Proliferation und Generierung der CTL. Diese wiederum können ihrerseits Antigene, auf die sie geprimt wurden, erkennen und die präsentierende Zelle zerstören (Ruiz und Becker, 2007). Dies geschieht mittels Granzymen und Perforinen, die die Zielzelle lysieren, oder über eine Interaktion des Oberflächenmoleküls Fas auf der Zielzelle mit dem Fas-Liganden (CD95L) der CTL. Die Bindung führt zur Induktion von Apoptose-Mechanismen in der Zielzelle (Arens und Schoenberger, 2010). Des Weiteren fördern CTL durch ihre Sekretion von Interferon (IFN) - γ die Aktivierung von Makrophagen und damit die

Eliminierung der intrazellulären Parasiten.

Neben diesem indirekten Mechanismus der T-Zell-Aktivierung durch Kreuzpräsentation, wird auch ein direkter Mechanismus vermutet, bei dem die CD8⁺-T-Zelle direkt durch Makrophagen aktiviert wird. Hierbei präsentiert die antigenpräsentierende Zelle (APC) das Antigen via MHC-I-Moleküle auf ihrer Rezeptoroberfläche direkt der T-Zelle (Ruiz und Becker, 2007).

Im Rahmen der experimentellen murinen Leishmaniasis ist bekannt, dass CD8⁺-T-Zellen eine wichtige protektive Rolle bei der Reinfektion mit *L. major* in C57BL/6 besitzen (Muller *et al.*, 1994; Belkaid *et al.*, 2002). Deren Funktion bei der Erstinfektion ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Studien bei denen CD8⁺-defiziente C57BL/6Mäuse mit Leishmanien (hochdosierte) infiziert wurden, bzw. C57BL/6 Mäuse, bei denen die CD8⁺-T-Zellen depletiert wurden, zeigen, dass diese Zellen für die Heilung der Erkrankung nicht notwendig waren (Huber *et al.*, 1998). In neueren Studien wurde das physiologisch relevante Niedrigdosis-Infektionsmodell angewandt. Es konnte gezeigt werden, dass CD8⁺-T-Zellen bei der Primärinfektion von C57BL/6 Mäusen mit *L. major* durch Sekretion von IFN- γ eine frühe Th2-Immunantwort herunterregulieren und wiederum eine Th1-Immunantwort fördern (Belkaid *et al.*, 2002; Jude *et al.*, 2004). Des Weiteren scheinen CD8⁺-T-Zellen bei der Eliminierung von Leishmanien und der Aufrechterhaltung der Immunität gegen diesen Erreger eine Rolle zu spielen (Müller *et al.*, 1991). Im Hinblick auf CD4⁺-T-Zellen demonstrieren Studien, dass es eine Interaktion zwischen ihnen und den CD8⁺-T-Zellen geben muss, da letztere nicht nur selbst IFN- γ sezernieren, sondern auch die Produktion von IFN- γ durch CD4⁺-T-Zellen fördern. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass CD8⁺-T-Zellen die Dichte von CD4⁺-T-Zellen in Lymphknoten positiv beeinflussen (Herath *et al.*, 2003).

Th2-Zellen

Ein nicht ausheilender Krankheitsverlauf ist die Folge einer Differenzierung von Th0-Zellen zu Th2-Zellen. Diese sezernieren vor allem die Zytokine Interleukin (IL)-4, IL-5 und IL-10, was zu einer Proliferation von B-Zellen und damit zu einer Bildung von Antikörpern führt, die gegen den intrazellulären Erreger jedoch nicht wirksam sind (Coffman *et al.*, 1988). Balb/c Mäuse sind gegenüber *L. major* suszeptibel. Bei ihnen wird im Falle einer Infektion mit den Parasiten eine durch Th2-Zellen vermittelte Immunantwort induziert. Hierbei werden vor allem Th2-spezifische (spez.) Zytokine in

erhöhtem Maße sezerniert. Bei der Th2-vermittelten Immunantwort differenzieren sich Th0-Zellen zu Th2-Zellen aus. Dies geschieht vor allem durch Stimulation der T-Zellen mit IL-4, das durch verschiedene Zellen, wie basophile Granulozyten und Mastzellen, sowie einer bestimmten Subpopulation von T-Zellen ausgeschüttet wird (Ben-Sasson *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 1990; Seder *et al.*, 1991), und mit dem Zytokin IL-6, das von antigenpräsentierenden Zellen sezerniert wird (Rincon *et al.*, 1997). Th2-Zellen sezernieren ihrerseits eine Reihe von Interleukinen, die einerseits eine durch Th1-Zellen vermittelte Immunantwort inhibieren und andererseits für eine Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen sorgen. Plasmazellen wiederum sezernieren AK, die jedoch bei den obligat intrazellulären Erregern wirkungslos bleiben.

Th17-Zellen

Eine weitere, für den Krankheitsverlauf wesentliche T-Zell-Population sind die Th17-Zellen, die sich unter dem Einfluss von IL-6 und dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β aus Th0-Zellen differenzieren. Sie produzieren in hohem Maße das proinflammatorische Interleukin IL-17, das an spezifische Oberflächenrezeptoren auf PMN und Lymphozyten bindet. In der experimentellen, murinen Leishmaniasis konnte gezeigt werden, dass Leishmanien-resistente C57BL/6 Mäuse nach Infektion mit *L. major* deutlich weniger IL-17 produzieren als susceptible Balb/c Mäuse. Des Weiteren entwickelten infizierte IL-17^{-/-}-Mäuse auf BALB/c Hintergrund, die genetisch nicht in der Lage waren, das Interleukin zu bilden, kleinere Läsionen als der Wildtypstamm - trotz Ausbildung einer Th2-dominierenden Immunantwort (Lopez Kosta *et al.*, 2009). An der Parasiten-Inokulationsstelle der Knockout-Mäuse wurden deutlich weniger PMN detektiert, sodass aktuell davon ausgegangen wird, dass eine erhöhte Konzentration an IL-17 zu einer vermehrten Einwanderung von PMN führt, was mit einer schweren Entzündungsreaktion einhergeht (Lopez Kosta *et al.*, 2009).

Regulatorische T-Zellen

Als eine letzte T-Zellpopulation, die den Krankheitsverlauf negativ beeinflusst, sind die in der Haut vorkommenden regulatorischen $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen (Tregs) zu nennen. Sie haben eine antiinflammatorische Wirkung auf örtliche Entzündungsprozesse, indem sie über IL-10-abhängige und IL-10-unabhängige Mechanismen $CD4^+CD25^-$ Effektorzellen hemmen. Im Zusammenhang mit der kutanen Leishmaniasis scheint aber genau dieser Prozess zu einem Überleben der Parasiten beizutragen (Belkaid *et al.*, 2002).

In Abbildung 3 sind die erläuterten Effektorzellen und ihre Entstehung grafisch dargestellt.

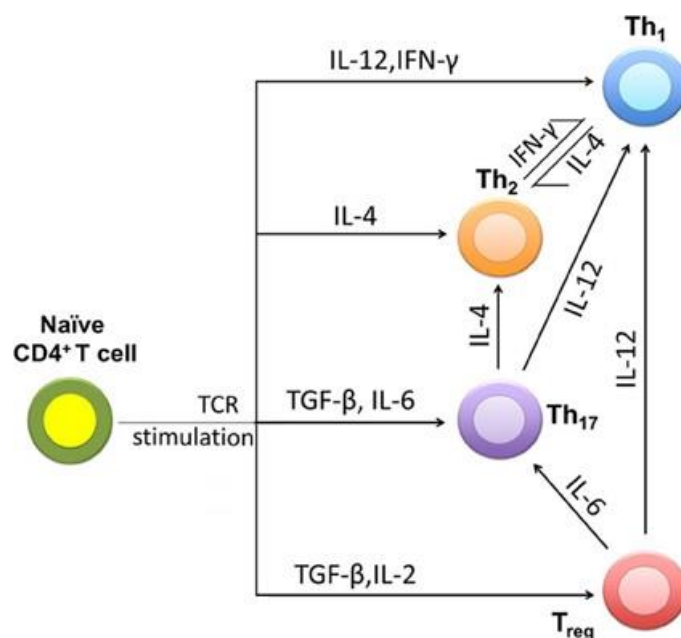


Abb. 3: Modell über die Differenzierung naiver $CD4^+$ -Zellen nach Antigenpräsentation. Naive $CD4^+$ -Zellen sind die gemeinsamen Vorläuferzellen verschiedenster Effektorzellen. Welche Zellart sich aus ihnen entwickelt, hängt u. a. von den Zytokinen ab, mit denen sie stimuliert werden (in Anlehnung an Magombedze *et al.*, 2013).

2.2 Neutrophile Granulozyten

2.2.1 Allgemeine Fakten und Funktionen der PMN

PMN, wie sie aufgrund ihres charakteristischen Zellkerns häufig bezeichnet werden, sind eine Untergruppe der Leukozyten im Blut von Wirbeltieren. Ihre Entwicklung beginnt im Knochenmark, wo sie nach einer Reifezeit von 15 Tagen in das periphere Blut gelangen. Von hier aus können sie in ihr Zielgewebe einwandern und gehen nach ca. ein bis zwei Tagen in Apoptose über (Lloyd und Oppenheim, 1992; Smith, 1994). Als Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems dienen sie der Identifizierung und Abwehr pathogener Mikroorganismen. Des Weiteren sind sowohl humane als auch murine PMN in der Lage, verschiedene Zytokine, wie beispielsweise IL-12, INF- γ , TNF- α , sowie Chemokine, wie CCL3, zu produzieren (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Ethuin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Charmoy *et al.*, 2009; Mayadas *et al.*, 2013). Die Zytokine sind bei der Entwicklung einer adaptiven Immunantwort vonnöten, während die Chemokine antigenpräsentierende Zellen, wie beispielsweise DCs, an den Infektionsort rekrutieren. Somit schlagen PMN eine Brücke zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem.

| Gruppe | Zytokine |
|-------------------------------|---|
| Proinflammatorische Zytokine | IL-1 α , IL-1 β , IL-7, IL-12, IL-17, IL-18, IFN- α , IFN- γ , TNF- α |
| Antiinflammatorische Zytokine | IL-10, TGF- β |
| Chemokine | CCL2-4, CCL17-20, CCL22, CXCL1-6, CXCL8-11 |

Tabelle 1: Auswahl der durch PMN sezernierten Zytokine (Cassatella, 1999; Mantovani *et al.*, 2011; Tamassia *et al.*, 2018).

Für ihre Abwehrfunktion stehen PMN verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Zum einen enthalten sie spezifische Granula, die in die Umgebung abgegeben werden können und Mikroorganismen schädigen. Zum anderen sind sie in der Lage, durch sogenannte „*Neutrophil Extracellular Traps*“ (NETs) Mikroorganismen zu binden und diese unschädlich zu machen (Brinkmann *et al.*, 2004).

Einer der wichtigsten Abwehrmechanismen in Zusammenhang mit Erregern ist die Phagozytose. Dringen Mikroorganismen in ihren Wirt ein, werden innerhalb von etwa zehn Stunden zahlreiche PMN an die Inokulationsstelle rekrutiert (Müller *et al.*, 2001). Ihre Aufnahme kann direkt über die Erkennung pathogener Strukturen, wie beispielsweise LPS, Flagellin oder virale RNA erfolgen. Die hierfür benötigten Rezeptoren sind Toll-like Rezeptoren (TLR) sowie CD14 (Sabroe *et al.*, 2002). Ein anderer Weg führt über die Erkennung von Opsoninen (Janeway *et al.*, 2002). Dies sind körpereigene Stoffe, die an Erreger binden und deren Phagozytose durch Immunzellen vermitteln. Als Opsonine fungieren beispielsweise Proteine, wie die Faktoren C3b oder Cb3i, aber auch AK, vor allem vom Immunglobulin G (IgG)-Typ (Kuhlman *et al.*, 1989). PMN stellen somit die erste Barriere für Erreger dar. Mithilfe verschiedener Enzyme, wie der Myeloperoxidase, der Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat-Oxidase, aber auch Elektronenpumpen und reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) (Segal, 2005; Nathan, 2006) töten die Immunzellen die Erreger ab. Hiernach gehen sie in Apoptose, wodurch sich ihre Oberflächenstruktur ändert. Diese weist ab diesem Zeitpunkt vermehrt Phosphatidylserin auf. Dieses Phospholipid stellt für Makrophagen das Signal dar, die apoptotischen Zellen zu phagozytieren, jedoch ohne, dass ihre toxischen Abwehrmechanismen („oxidative burst“) aktiviert werden (Borisenko *et al.*, 2003).

Neben lebenden Mikroorganismen sind PMN ebenfalls in der Lage, apoptotische Zellen zu phagozytieren, wobei eine solche Aufnahme mit einer Inhibierung der ROS-Produktion einhergeht und eine erhöhte IL-8-Sekretion zur Folge hat (Esmann *et al.*, 2010).

Wie alle kernhaltigen Zellen besitzen PMN auf ihrer Oberfläche MHC-I-Moleküle, mit deren Hilfe sie prozessierte Antigene CD8⁺-T-Zellen präsentieren können. Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen sowohl humane als auch murine PMN MHC-II-Moleküle auf ihren Oberflächen exprimieren. Dies erlaubt ihnen, aktiv CD4⁺-T-Zellen zu primen und eine humorale Immunantwort zu induzieren (Fanger *et al.*, 1997; Radsak *et al.*, 2000; Culshaw *et al.*, 2008). Für humane PMN konnte gezeigt werden, dass sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* MHC-II sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 ausbilden, wenn sie mit dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) oder IFN- γ stimuliert wurden (Fanger *et al.*, 2016). Des Weiteren konnte bei Patienten, die an chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie der Wegener-Granulomatose, litten, PMN

nachgewiesen werden, die auf ihrer Oberfläche MHC-II tragen (Radsak *et al.*, 2000). Im Unterschied hierzu wurde über einen längeren Zeitraum die Expression des MHC-II durch murine PMN nicht für möglich gehalten. Erst 2008 wiesen Culshaw *et al.* in einem *in vitro*-Experiment – nach Koinkubation muriner PMN mit OVA₃₂₃₋₃₃₉ und T-Zellen – MHC-II sowie das kostimulatorische Molekül CD40 auf der Oberfläche der PMN nach (Culshaw *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu humanen PMN, wurden die Moleküle CD80 und CD86 von murinen PMN nicht exprimiert.

Ein weiterer Unterschied zwischen den PMN der beiden verschiedenen Spezies ist ihr prozentualer Anteil im peripheren Blut. Während beim Menschen PMN den größten Teil der Leukozyten ausmachen (50 %-65 %), sind es bei Mäusen nur 10 %-25 %. Weiterhin zeigen sich Unterschiede bei Enzymen und Oberflächenmolekülen der PMN. Als Beispiel hierfür seien die kohlenhydratbindenden Adhäsionsmoleküle genannt, die sich auf der Oberfläche der PMN und auf dem Gefäßendothel befinden. Die sogenannten Selektine sorgen für eine feste Bindung der PMN an das Endothel und für deren Extravasation. Für humanes L-Selektin wurde gezeigt, dass es hochaffin an E-Selektin bindet. Für murines L-Selektin konnte dies nicht nachgewiesen werden (Zöllner *et al.*, 1997). Ein letztes Beispiel betrifft die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Signalkaskaden, die zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) in PMN führen. Während gezeigt werden konnte, dass in humanen PMN die Bildung der ROS von den PI3K γ und PI3K δ abhängen, ist in murinen PMN allein der Signalweg der PI3K γ vonnöten (Condliffe *et al.*, 2005).

2.3 PMN in der Leishmaniasis

2.3.1 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Leishmaniasis

Die Inokulation promastigoter *Leishmanien* in die Dermis eines Säugetieres führt zu einem Influx von PMN, der durch gewebeständige Mastzellen getriggert wird (von Stebut *et al.*, 2003, Maurer *et al.*, 2006). Anhand von *in vitro*-Studien mit *L. amazonensis* konnte gezeigt werden, dass die Immunzellen in der Lage sind, die Parasiten durch Phagozytose bzw. unter Verwendung von NETs zu eliminieren (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009; Carlsen *et al.*, 2013). Dies funktioniert jedoch nur unzureichend, da Leishmanien besondere Strategien entwickelt haben, um den Abwehrmechanismen ihrer Wirte zu entgehen. Abbildung 4 stellt zwei Hypothesen zum Thema Abwehrstrategien von Leishmanien im humanen Modell grafisch dar.

Gelangen promastigote Leishmanien in ihren Wirt, befinden sich sowohl lebende als auch tote Promastigote an der Inokulationsstelle. Die Parasiten produzieren hierfür einen speziellen Faktor, den „*Leishmania chemotactic factor*“ (LCF), der gezielt PMN an die Inokulationsstelle rekrutiert (van Zandbergen *et al.*, 2002). Gleichzeitig wird durch LCF die Freisetzung des IFN- γ -induzierbaren Protein 10 (IP-10) und damit die Aktivierung natürlicher Killerzellen (NK) verhindert. Treffen die PMN auf die Parasiten, erkennen sie das Phospholipid „Phosphatidylserin“ auf der Oberfläche der abgestorbenen Leishmanien. Dies, die Produktion des TGF- β und IL-10 sowie die Hemmung der Produktion von TNF- α , bedingt durch die toten Leishmanien, sorgen dafür, dass sowohl die lebenden als auch die apoptotischen Leishmanien durch PMN zwar phagozytiert, die Abwehrmechanismen der Immunzelle jedoch nicht induziert werden (Voll *et al.*, 1997; van Zandbergen *et al.*, 2006). Nach Aufnahme der Erreger gehen die PMN ihrerseits in Apoptose. Dieser Vorgang setzt, bedingt durch die Aufnahme der Parasiten, jedoch um bis zu 48 Stunden verzögert ein (Aga *et al.*, 2002; van Zandbergen *et al.*, 2004). Die Folge ist, dass die parasitenbeladenen Immunzellen verstärkt durch Makrophagen aufgenommen werden, die ca. 24 bis 48 Stunden nach Infektion an der Inokulationsstelle eintreffen (Aga *et al.*, 2002; van Zandbergen *et al.*, 2004). In diesen Zellen wandeln sich die promastigoten in amastigote Leishmanien um und proliferieren. Die Strategie, PMN zu nutzen, um verborgen in Makrophagen eindringen zu können, wird als „Hypothese des Trojanischen Pferds“ bezeichnet und ist in Abbildung 4 grafisch dargestellt (Laskay *et al.*, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2004).

Eine ähnliche Strategie wird durch Ritter (Ritter *et al.* (2009) postuliert und als „Trojan-rabbit-Transfer“ bezeichnet (Ritter *et al.*, 2009), (vgl. ebenfalls Abb. 4). Dieser Theorie liegt zugrunde, dass Leishmanien sechs bis sieben Tage nach Infektion zwar vorwiegend in CD11b⁺-Makrophagen detektiert werden, sich jedoch zum Zeitpunkt der Phagozytose außerhalb der apoptotischen PMN befinden (Peters *et al.*, 2008). Die abgestorbenen PMN werden zusammen mit den Leishmanien von Makrophagen phagozytiert und verhindern deren Aktivierung. Dies gibt den Leishmanien die Möglichkeit, in Makrophagen zu überleben und sich in ihnen zu vermehren.

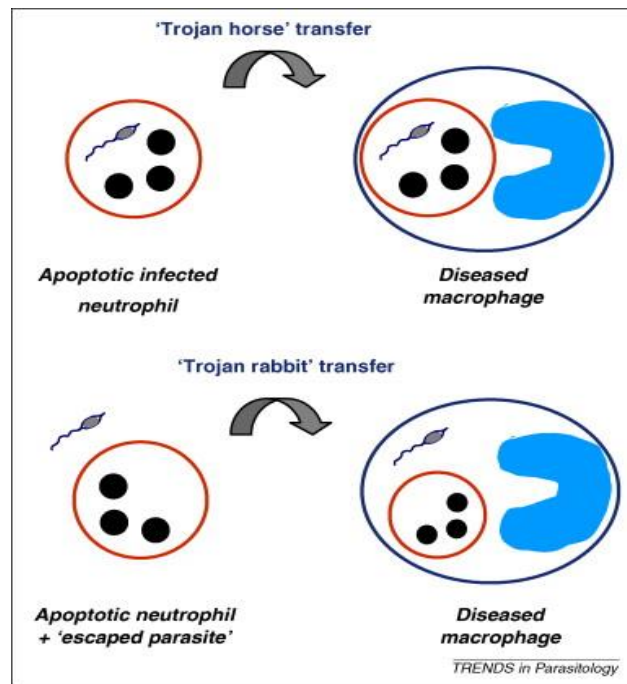


Abb. 4: Der “Trojanisches Pferd“-Transfer im Vergleich zum “Trojanischen Kaninchen“-Transfer. Im Unterschied zur Hypothese des “Trojanisches Pferd“-Transfers, bei dem promastigote Leishmanien innerhalb von PMN in die Makrophagen gelangen, geht die Hypothese des „Trojanischen Kaninchen“-Transfers davon aus, dass sich einige Promastigote während der Phagozytose durch Makrophagen außerhalb der PMN befinden (Ritter *et al.*, 2009).

Im Infektionsmodell der Maus werden PMN ebenfalls an die Inokulationsstelle der Parasiten rekrutiert. Ribeiro-Gomes *et al.* konnten zeigen, dass dieser Einstrom sowie die Interaktion der PMN mit den Parasiten abhängig von deren Inokulationstiefe ist (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2014). C57BL/6 Mäuse, denen promastigote *L. major* intradermal (i.d.) appliziert wurden, zeigten – im Vergleich zu einer s. c. Injektion – einen erhöhten PMN-Influx sowie eine vermehrte Internalisierung der Parasiten durch die Immunzellen. Dieser Umstand ging mit einer 10-fach erhöhten Parasitenlast einher. Weitere, die Einwanderung der PMN beeinflussende Faktoren sind die Art der Parasiteninjektion (Peters *et al.*, 2008), der Speichel des Vektors (Teixeira *et al.*, 2005), die Ausschüttung chemotaktischer Stoffe durch die Parasiten (Müller *et al.*, 2001), die Konzentration des proinflammatorischen Zytokin IL-17 an der Inokulationsstelle der Parasiten (Lopez Kostka *et al.*, 2009) sowie das Vorhandensein von gewebeständigen Mastzellen und deren TNF- α -Sekretion (Maurer *et al.*, 2006).

Die eingewanderten PMN phagozytieren Promastigote gehen in Apoptose und werden ihrerseits von Makrophagen aufgenommen, die durch die Sekretion von MIP-1 α angelockt werden (Maurer *et al.*, 2006). Ribeiro-Gomes konnte zeigen, dass mit *L. major* infizierte Balb/c Mäuse ein erhöhtes Parasitenwachstum aufweisen, wenn sie tote, genetisch identische PMN erhalten. Der Grund hierfür wurde in der vermehrten Ausschüttung von PGE₂ und TGF- β durch Makrophagen gesehen. Ein gegenteiliger Effekt wurde in C57BL/6 Mäusen bei gleichem Versuchsaufbau erzielt. Die leishmanizide Aktivität ihrer Makrophagen stieg in Abhängigkeit von der neutrophilen Elastase (NE) und der erhöhten TNF α -Produktion durch die Phagozyten nach der Aufnahme von PMN an (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte Ribeiro-Gomes 2007 zeigen, dass PMN aus C57BL/6 Mäusen – verglichen mit PMN aus Balb/c Mäusen – zwei bis dreimal so viel NE produzieren. Diese Serinprotease dient der Aktivierung der Makrophagen über deren TLR 4 und ist damit wichtig für die Bekämpfung der Parasiten (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007).

2.3.2 Grundlagen der Phagozytose von *L. major* durch neutrophile Granulozyten

Eine Voraussetzung für die Aufnahme von Fremdpartikeln durch PMN ist deren Erkennung durch eine Antigen-Rezeptor-Interaktion. Es wurde bereits eine Vielzahl an Rezeptoren auf der Oberfläche von PMN beschrieben, die sich in fünf Gruppen einteilen lassen: Die an ein G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die Fc-Rezeptoren, die Adhäsionsrezeptoren, die Zytokinrezeptoren und die Gruppe der Rezeptoren, die zum angeborenen Immunsystem gehören (Futosi *et al.*, 2012).

Die bisher für die Phagozytose von *Leishmania* bekannten Rezeptorgruppen sind CR, die an Oberflächen gebundene Komplementfaktoren (CF) erkennen, sowie FcR, die den Fc-Teil von AK registrieren (Laufs *et al.*, 2002). Folgende werden von PMN exprimiert: Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) und Fc α RI (CD89), CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) (van Kessel *et al.*, 2014; Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Eine effektive Aufnahme von promastigoten Leishmanien durch humane PMN erfolgt serumabhängig durch ein Zusammenspiel des Fc γ R und des CR3 (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Laufs *et al.*, 2002). Der Interaktion zwischen CR3 mit dem Komplementfaktor

C3bi (aus humanem Serum) fällt dabei eine besondere Rolle zu. Sie ist für eine schnelle Phagozytose der Parasiten vonnöten (Laufs *et al.*, 2002). Obligat für eine Aufnahme der Leishmanien ist sie jedoch nicht. Eine eher untergeordnete Rolle spielt die serumunabhängige Aufnahme der Leishmanien. Sie ist zum einen durch die Bindung von Lipophosphoglykan (LPG) und Glykoprotein 3 (gp3) an den CR3 (Lima *et al.*, 1998; Laufs *et al.*, 2002; Briem, 2009), zum anderen durch *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs) und ihre Rezeptoren möglich (Laskay *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse postuliert Briem in seiner Arbeit, dass murine PMN wahrscheinlich ebenfalls sowohl den FcγR als auch den CR3 für die Phagozytose von Leishmanien benötigen (Briem, 2009). Die Begründung hierfür war, dass seine Ergebnisse zeigten, dass die Aufnahme amastigoter Leishmanien aus Balb/c Mäusen – im Gegensatz zu promastigoten Leishmanien aus der Kultur – signifikant erhöht ist. Amastigote Leishmanien aus Balb/c Mäusen sind mit hohen Mengen an Leishmanien-spezifischen IgG-Molekülen beladen (Woelbing *et al.*, 2006), die an die FcγR auf der Zelloberfläche von PMN binden. Ebenso binden *in vivo* CF an die Parasiten, was durch die zusätzliche Inkubation mit NMS unterstützt wird. Die verwendeten Promastigoten stammten aus einer Flüssigkultur und werden durch die Inkubation mit NMS lediglich mit CF und unspezifischem IgG opsonisiert (Woelbing *et al.*, 2006). Da in mehreren Versuchen von Briem gezeigt werden konnte, dass Promastigote durch die Opsonisierung mit CF nicht vermehrt phagozytiert werden, vermutete er, dass die Interaktion der FcγR mit Leishmanien-spezifischen IgG-Molekülen den wichtigsten Phagozytosefaktor darstellt (Briem, 2009).

2.3.3 Depletion von neutrophilen Granulozyten im Mausmodell - Aktueller Forschungsstand

Balb/c Mäuse sind einer Infektion mit *L. major* gegenüber suszeptibel. Im Falle einer Infektion wird bei ihnen eine durch Th2-Zellen vermittelte Immunantwort induziert. An der Injektionsstelle entwickeln sich zunächst Hautulcerationen. Später breiten sich die Erreger im gesamten Organismus aus und führen nach einigen Wochen zum Tod (Sacks und Noben-Trauth, 2002).

Bei C57BL/6 Mäusen wird eine durch Th1-Zellen vermittelte Immunantwort induziert, die eine Resistenz der Mäuse gegenüber den Erregern gewährleistet (Sacks und Noben-Trauth, 2002). Das klinische Erscheinungsbild präsentiert sich an der

Injektionsstelle ebenfalls mit Ulzerationen. Im Vergleich zu denen der Balb/c Mäuse sind sie jedoch wesentlich kleiner und heilen nach ca. zwölf Wochen aus. Hiernach sind die Mäuse gegenüber einer Neuinfektion mit dem gleichen Erregerstamm immun (Moll, 1995).

Mit der Aufgabe, die Rolle der PMN bei den unterschiedlichen Krankheitsverläufen zu klären, haben sich bereits mehrere Arbeitsgruppen beschäftigt. Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich.

PMN aus Leishmanien-resistenten Mäusen exprimieren Zytokine, die für die Induktion einer Th1-vermittelten Immunantwort vonnöten sind (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). Hierzu gehören IL-12, IFN- γ und TNF- α . Die Depletion der PMN in resistenten C57BL/6 oder C3H/HeJ Mäusen mit dem RB6-8C5-AK oder dem NIMP-AK führte zu einem Anstieg der Parasitenlast an der Injektionsstelle, größeren Ulzerationen und zu fulminanteren Krankheitsverläufen (Lima *et al.*, 1998; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). Auf molekularer Ebene kam es – zusätzlich zum Ausbleiben der Zytokinproduktion durch PMN – zu einer geringeren Produktion Th1-relevanter Zytokine durch Makrophagen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass PMN wesentlich an einer protektiven Th1-dominierenden Immunantwort in resistenten Mäusen beteiligt sind. Andere Arbeitsgruppen zeigten wiederum, dass der Anstieg der Parasitenlast nur temporär besteht. Die Leishmanien-induzierten Läsionen heilen gleichermaßen vollständig ab. Darüber hinaus liegt bei den PMN-depletierten Mäusen ebenfalls eine protektive Th1-vermittelte Immunantwort vor (Lima *et al.*, 1998; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). PMN scheinen demnach die Ausbildung einer Th1-vermittelten Immunantwort zu unterstützen, sind hierfür jedoch nicht obligat.

Die Depletion von PMN in suszeptiblen Mausstämmen führt ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen. Tacchini-Cottier und ihre Gruppe zeigten, dass eine Depletion der PMN in Balb/c Mäusen durch den NIMP-R14-AK sechs Stunden vor der Infektion der Mäuse mit *L. major* einen protektiven Effekt hat (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Makroskopisch wird dies durch deutlich kleinere Läsionen an der Leishmanien-Inokulationsstelle sichtbar. Auf molekularer Ebene wiesen sie eine verminderte IL-4-mRNA-Transkription durch spezifische V β 4Va8 CD4⁺-T-Zellen nach, wodurch CD4⁺-T-Zellen generell auch nach der Infektion mithilfe von IL-12 stimuliert werden konnten. Dies ist in suszeptiblen Mäusen, deren PMN nicht depletiert wurden, nicht möglich, da IL-4 die Expression der IL-12R β 2-Kette in CD4⁺-T-Zellen verhindert. Aus den beschriebenen Ergebnissen folgerten im Jahr 2000 Tacchini-Cottier *et al.*, dass die Depletion der PMN in Balb/c Mäusen die Entstehung einer Th2-dominierenden Immunantwort verhindert. Weitere Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls, dass die Depletion der PMN mit einer vermehrten Ausschüttung von IFN- γ und IL-12 sowie einer verminderten Ausschüttung von IL-4 einhergeht. Diese Zytokinkonstellation führt zu einer Th1-vermittelten Immunantwort, die mit einer Reduktion der Parasitenlast sowohl an der Injektionsstelle als auch in den dLK sowie mit kleineren Ulzerationen einhergeht (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004, Sousa *et al.*, 2014).

Konträre Ergebnisse präsentiert die Arbeitsgruppe von Chen (Chen *et al.*, 2005). Sie zeigen, dass die Depletion von PMN mittels RB6-8C5-AK 24 Stunden vor der Infektion mit *L. major* ($2 \cdot 10^6$ s.c.) in Balb/c Mäusen zu einem deutlich schwereren Krankheitsverlauf führt. In den Mäusen kam es zu einer verminderten Expression von IL-12 und IFN- γ sowie zu einer vermehrten Bildung von IL-4 durch dLK. Diese Zytokinkonstellation führt zu einer Th2-vermittelten Immunantwort, die nicht protektiv ist. Klinisch kommt es zu einem progressiven Krankheitsverlauf dieser Mäuse, einhergehend mit einer erhöhten Parasitenlast, großen Schwellungen und Ulzerationen an der Injektionsstelle sowie einer Schädigung der inneren Organe (Chen *et al.*, 2005, McFarlane *et al.*, 2008).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Aufbau der Versuche der zitierten Arbeitsgruppen.

| Mausstamm | Parasit | AK | Angriffspunkt | Dosis | Zeitpunkt | Arbeitsgruppe |
|--------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|--|---------------------------------------|
| C57BL/6/ BALB/c | <i>L. major</i> | NIMP R14 (1 mg) | murines Ly-6G/ Ly-6C | $3 * 10^6$ | - 6 Stunden vor Infektion | Tacchini-Cottier <i>et al.</i> , 2000 |
| C3H/HeJ | <i>L. major</i> | RB6-8C5 (0,25 mg) | Ly6G/Ly6C | $2 * 10^6$ | - 1 d vor Infektion | Chen <i>et al.</i> , 2005 |
| C57BL/6 | <i>L. major</i> | RB6-8C5 (2 mg) | Ly6G/Ly6C | $1 * 10^7$ | - 3 d vor Infektion - Infektionstag - 3 d nach Infektion | Lima <i>et al.</i> , 1998 |
| C57BL/6/ BALB/c | <i>L. major</i> | RB6-8C5 (0,1 mg) | Ly6G/Ly6C | $1 * 10^6$ | - 1 d vor Infektion - 2;5;8;11 d nach Infektion | Ribeiro-Gomes <i>et al.</i> , 2004 |
| BALB/c | <i>L. donovani</i> | NIMP R14 (0,25 mg) | Ly6G/Ly6C | 1-2 * 10^7 | - Infektionstag - 3;6;9;12 d nach Infektion | McFarlane <i>et al.</i> , 2008 |
| BALB/c | <i>L. amazonensis</i> | RB6-8C5 (0,5 mg) | Ly6G/Ly6C | $1 * 10^6$ | 16 Stunden vor Infektion | Sousa <i>et al.</i> , 2014 |

Tabelle 2: Übersicht über den Versuchsaufbau der im Text zitierten Arbeitsgruppen (in Anlehnung an Carlsen *et al.*, 2015).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Parasiten

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

3.1.2 Versuchstiere

Balb/c Mäuse: Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich
C57BL/6 Mäuse: Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich
C57BL/6 FcγR^{-/-} Mäuse: Eigenzucht, Universitätsmedizin Mainz
C57BL/6 μMT Mäuse: Prof. Dr. Kerstin Steinbrink, Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz (Kitamura *et al.*, 1991).

3.1.3 Reagenzien und Puffer

| | |
|------------------------------------|--|
| ACK-Lysepuffer | BioWhittaker/Cambrex BioScience, Verviers, Belgien |
| Adenin | Carl Roth, Karlsruhe |
| Alkopharm 70 (Ethanol 70%) | Brüggemann Alcohol, Heilbronn |
| Aqua dest. | B. Braun, Melsungen |
| β-Mercaptoethanol, 99% p.a. | Carl Roth, Karlsruhe |
| BioGel P 100 Gel | BioRad Laboratories, München |
| CFDA SE Cell Tracer Kit (CFSE) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Collagenase, Clostridiopeptidase A | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| DMEM w/o Pyruvate | Merck, Darmstadt |
| Diff-Quick-Färbung | Dade Behring, Düdingen, Schweiz |
| Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| EDTA (Ethyldiamintetraacetat) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| FACS Clean Solution | BD Pharmingen, Heidelberg |
| FACS Flow Sheath Fluid | BD Pharmingen, Heidelberg |
| FACS Rinse Solution | BD Pharmingen, Heidelberg |
| Ficoll 400 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

| | |
|--|-------------------------------------|
| FCS (fötales Kälberserum) | PAA, Pasching, Österreich |
| Forene (Isoflurane) | Abbott, Wiesbaden |
| Glucose (D- (+)-Glucose, p.a. | Carl Roth, Karlsruhe |
| HEPES, Pufferan $\geq 99,5$ % | Carl Roth, Karlsruhe |
| Helipur H plus | B. Braun, Melsungen |
| Hemin (Chlorid), 98 % | Carl Roth, Karlsruhe |
| HEPES Pufferan, 99,5 % | Carl Roth, Karlsruhe |
| Human-Albumin, 20 % | Behring, salzarm (HSA) CSL Behring, |
| Immersionsöl (Mikroskopie) | Merck, Darmstadt |
| Interferon-gamma (INF- γ) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Isopropanol | Hedinger, Stuttgart |
| L-Glutamin | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Liberase T-Flex | Roche Applied Science, Penzberg |
| Lipopolysaccharid (LPS) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| | Marburg |
| M199 Medium | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Natriumazid (NaN_3) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumkarbonat (Na_2CO_3) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumdihydrogenphosphat, ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Nicht-essenzielle Aminosäuren | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Paraformaldehyd | Merck, Darmstadt |
| Pen Strep 10.000 U/ml Penicillin + 10.000 g/ml Streptomycin | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Rekombinantes murines GM-CSF | PeproTech, Offenbach |
| RPMI 1640 Medium | Biochrome, Berlin |
| Salzsäure (HCl, für pH-Werteinstellungen) | Merck, Darmstadt |
| Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Trypanblau-Lösung | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Greiner Tubes, 15 ml | Greiner-One, Frickenhausen |
| Greiner Tubes, 50 ml | Greiner-One, Frickenhausen |
| Kanüle, 23Gx1¼, 0,6 x 30 | B. Braun, Melsungen |
| Kanüle, 26Gx1½, 0,45 x 12 | B. Braun, Melsungen |
| Kanüle, 23Gx1½, 0,3 x 13 | BD, Heidelberg |
| MaxiSorp Nunc-Immuno Platten, 96 Well | Nunc, Brandt, Wertheim |
| Medicon, 50 µm, steril | BD, Heidelberg |
| Objektträger | Diagonal, Münster |
| Parafilm M Laboratory Film | Pechiney Plastic, Chicago, USA |
| Petrischalen | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Pipettenspitzen, 0,1-10 µl | Carl Roth, Karlsruhe |
| PD-Tips Plastibrand, 0,5 ml | Brand, Wertheim |
| PD-Tips Plastibrand, 2,5 ml | Brand, Wertheim |
| PD-Tips Plastibrand, 5,0 ml | Brand, Wertheim |
| Reagiergefäß 0,5 ml | Sarstedt, Nürnberg |
| Reagiergefäß 1,5 ml | Sarstedt, Nürnberg |
| Reagiergefäß 2,0 ml | Sarstedt, Nürnberg |
| Spritze, 0,5 ml | B. Braun, Melsungen |
| Spritze, 1 ml | B. Braun, Melsungen |
| Spritze, 2 ml | B. Braun, Melsungen |
| Spritze, 5 ml | B. Braun, Melsungen |
| Spritze, 10 ml | B. Braun, Melsungen |
| Spritze, 20 ml | B. Braun, Melsungen |
| ZapCap-S Bottel-top Filter, 0,2 µm | Schleicher & Schuell, Darmstadt |
| Zellkulturflasche, 25 cm ² | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturflasche, 75 cm ² | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturplatte 6 Well, Flachboden | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturplatte 24 Well, Flachboden | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturplatte 48 Well, Flachboden | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturplatte 96 Well, Flachboden | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellsieb, 70 µm Falcon | Fisher Scientific, Schwerte |

3.1.5 Geräte

| | |
|---|---|
| Absorption Mikroplattenleser ELx808 | BioTEK Instruments, Bad Friedrichshall |
| CO ₂ -Inkubator | Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold |
| Durchflusszytometer LSR II | BD, Heidelberg |
| FACS-Calibur | BD, Heidelberg |
| Medimachine | BD, Heidelberg |
| Magnetrührer mit Heizplatte | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Magnetstäbchen | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Mikroskop Diavert | Leitz, Wetzlar |
| Mikroskop DM IL | Leica, Wetzlar |
| Mikroskop Eclipse TS100 | Nikon, Düsseldorf |
| Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,02 mm) | Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim |
| Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,100 mm) | LO-Laboroptik Ltd, Lancing, UK |
| pH-Meter | Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG, Weilheim |
| Pipetten Pipetman | Gilson, Villiers de Bel, Frankreich |
| Pipettierhilfe Pipetus | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Sterilbank | Nuaire Inc., Plymouth |
| Varioklav | H+PLabortechnik, |
| OberschleißheimVortex-Genie Touch Mixer | Scientific Industries, New York, USA |
| Waage MC1 LC2200P | Sartorius, Göttingen |
| Waage MC1 Analytic AC 210S | Sartorius, Göttingen |
| Wasserbad TW2 | Julabo, Seelbach |
| Zentrifuge Biofuge pico | Heraeus, Kendro, Langenselbold |
| Zentrifuge Biofuge fresco | Heraeus, Kendro, Langenselbold |
| Zentrifuge Multifuge 3 L-R | Heraeus, Kendro, Langenselbold |
| Zytospinzentrifuge Cellspin II | Tharma, Waldsolms |

3.1.6 Antikörper

Infektionsversuche

AK

Phosphatidylserin-AK
(abcam # 8005 clone 4B5)

Firma

Abcam, Cambridge

Depletionsversuche

AK

IgG2a monoklonaler AK,
7-4: Ratte anti-Maus
NIMP-AK
(vergleichbar mit Ratte IgG_{2b}
NIMP-R14 von Hbt)

Firma

AbD Serotec, Puchheim

Aus eigener Kultur

Methode: ELISA

Maus IL-4 ELISA Ready-SET-GO![®]
Maus IL-10 ELISA Ready-SET-GO![®]
Maus TNF-alpha ELISA Ready-SET-GO![®]
Maus IL-6 DuoSet
Maus IL-12p40 DuoSet
Maus INF-γ DuoSet

eBioscience, Frankfurt
eBioscience, Frankfurt
eBioscience, Frankfurt
R&D Systems, Wiesbaden
R&D Systems, Wiesbaden
R&D Systems, Wiesbaden

Methode: FACS

AK

Anti-Maus-CD11c PE,
Klon HL3

Anti-Maus-Ly-6B.2 FITC, Klon 7/4

anti-Maus-CD16/32 Fc-Block purified,
Klon 2.4G2

Anti-Maus CD8a FITC, Klon 53-6.7

Anti-Maus CD4 APC, Klon RM4-5

Anti-Maus F4/80 PE, Klon BM8

Firma

Pharmingen, BD Biosciences, Life
Science Research, D-69126
Heidelberg

Serotec, München

Pharmingen, BD Biosciences, Life
Science Research, D-69126
Heidelberg

BD Pharmingen, Heidelberg

eBioscience, Frankfurt

BD Pharmingen, Heidelberg

| | |
|--|---|
| Anti-Maus Ly-6G AF647, Klon 1A8 | Biolegend, über Biozol, Eching |
| Anti-Maus-IgG1 biotinyliert, Klon A85-1 | Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg |
| anti-Maus-IgG2a/2b biotinyliert, Klon R2-40 | Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg |
| Anti-Rat IgG2a, PE, Klon R35-95 | Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg |
| Anti-Rat IgG2b, FITC, Klon A95-1 | Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg |
| <u>Isotyp-AK</u> | <u>Firma</u> |
| Hamster IgG, Gruppe 1, FITC, Klon A19-3 | Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg |
| Hamster IgG Gruppe 1, PE, Klon G235-2356 | Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg |
| Ratte IgG2a AF647, Klon eBR2a | eBioscience, Frankfurt |

3.1.7 Medien und Puffer

Phosphate buffered saline (PBS 10 x)

- 1 l Aqua dest.
 - + 1,38 M NaCl
 - + 0,1 M NaH₂PO₄ x 1 H₂O
- pH-Wert 6,6

PBS (1 x)

- PBS (10 x)
 - Aqua dest. im Verhältnis 1:10
- pH-Wert 7,2 - 7,3, autoklavieren

RPMI complete-Medium (RPMI 1640)

- + 5 % FCS
- + 1 % Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin / 1000 µg/ml Streptomycin)
- + 1 % 200 mM Glutamin
- + 1 % 1 M HEPES
- + 1 % nicht essentielle Aminosäuren
- + 0,1 % 50 mM β-Mercaptoethanol

Leishmanien-Medium

- M199 (1 x) 350 ml
- + M199 (10 x) 14,25 ml
- + FCS 100 ml
- + HEPES (1 M) 20 ml
- + Adenin (10 mM) 5 ml
- + Hemin (0,25 %) 1 ml
- + Penicillin/Streptomycin 5 ml
- + Glutamin 5 ml

Adenin

- Aqua dest.
- + 10 mM Adenin
- 5 % HEPES (1 M)

Hemin

- Aqua dest.
- + 50 % Triethanolamin (TEA)
- + 0,25 % Hemin

Ficoll-Lösung 20 %ig

20 % Ficoll in dH₂O

Ficoll-Lösung 10 %ig

- 20 % Ficoll
 - + DMEM
- Verhältnis 1:1

PBS/Glucose/EDTA-Puffer

- steriles 1 x PBS
- + 0,2 % Glukose
- 2 mM EDTA (pH 6,5)

FACS-Puffer

- steriles PBS
- + 2 % FCS
- + 50 µl NaN₃ (10 %ige Lösung)

Herstellung von Biogel

- 50 ml PBS (erhitzen, nicht kochen!)
 - + 6,25 g Biogel-Pulver (1 Stunde rühren)
- über Nacht bei 4 °C quellen lassen, autoklavieren
im Verhältnis 1:1 mit sterilem PBS auffüllen

Liberase-Medium-Gebrauchslösung (0,4 mg/ml)

Für eine Maus (4 Ohrhälften)

- 3.113 µl RPMI 1640-Medium
- + 53 µl Liberase-Stocklösung
- 167 µl Penicillin/Streptomycin

3.1.8 Software und Programme

Ascent Software

AxioCam

CellQuest Pro Version 3.0.1

Microsoft Excel

Microsoft Word

StatView

3.2 Methoden

3.2.1 Berechnung von Lebendzellzahlen

Um die Lebendzellzahl einer Zellsuspension berechnen zu können, wurde ein Aliquot der Suspension mit einer Trypanblau-Lösung (1:10) verdünnt. Im Anschluss wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Hierzu wurden 16 kleine Quadrate ausgezählt. Die Lebendzellzahl berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Lebendzellzahl pro Großquadrat} * V * 10^4$$

V = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension

10^4 = Kammerkonstante

3.2.2 Herstellung von löslichem Leishmanienantigen (SLA)

SLA ist ein Gemisch löslicher *Leishmania* ssp.-Antigene. Es wurde zur antigenspezifischen Restimulation von mit Leishmanien-geprägten T-Zellen benutzt. Um das Lysat herstellen zu können, wurden Promastigote aus der Zellkultur geerntet und zweimal in RPMI *complete* gewaschen (Zentrifugation bei 200 g für 8 min.). Hiernach wurden die Parasiten bei 3.000 g zentrifugiert. Das entstandene Parasitenpellet wurde gelöst und $300 * 10^6$ Parasiten/ml in RPMI *complete*-Medium eingestellt. Durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wurden die Parasiten wie folgt lysiert:

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

Der beschriebene Zyklus wurde mindestens zehnmal wiederholt. Die Immunogenität des SLA wurde durch Restimulationsexperimente und Messung der dabei freigesetzten Zytokine bestimmt.

3.2.3 Kultivierung und Isolation promastigoter Leishmanien aus der Flüssigkultur

Um für die Versuche hochinfektiöse, metazyklische promastigote Leishmanien zu erhalten, wurden $5 \cdot 10^6$ Amastigote in *L. major*-Medium bei 27 °C unter anaeroben Bedingungen kultiviert (Belkaid, Butcher, Sacks, 1998; von Stebut *et al.*, 1998). Unter diesen Bedingungen wandeln sich die Parasiten in ihre promastigote Form um. Die Kultur wurde alle zwei bis drei Tage gesplittet, um eine logarithmische Wachstumsphase aufrechtzuerhalten.

Für die Isolation wurden sechs bis neun Tage alte Leishmanienkulturen benötigt. Diese wurden in 50 ml Falconröhrchen überführt und zweimal für 8 min. bei 200 g gewaschen. Der Überstand wurde in ein frisches Falconröhrchen pipettiert und für 10 min. bei 3.000 g zentrifugiert. Das Parasiten-Pellet wurde in 2 ml DMEM resuspendiert. In einem 15 ml Falconröhrchen wurde ein Ficoll-Dichtegradient hergestellt, bestehend aus 2 ml einer 20 %igen Ficoll-Lösung, über die 2 ml einer 10 %igen Ficoll-Lösung geschichtet wurden. Darüber wurden 2 ml des resuspendierten Leishmanien-Pellets pipettiert. Der Gradient wurde 15 min. bei 2.000 g ohne Bremse zentrifugiert. Die angereicherten, hochinfektiösen Promastigoten befanden sich in der gesamten oberen und in den oberen 2/3 der mittleren Phase. Um die Parasiten zu erhalten, wurden ca. 3,5 ml der oberen Schichten abpipettiert und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit 40 ml DMEM aufgefüllt und für 10 min. bei 3.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Leishmanienpellet in 1 ml DMEM resuspendiert. Um die Parasiten zu zählen, wurden 10 µl der Leishmaniensuspension mit vierprozentiger Paraformaldehydlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt, um die Parasiten zu fixieren. Diese wurden dann mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.2.4 Gewinnung und Aufreinigung amastigoter Leishmanien

Um amastigote Leishmanien gewinnen zu können, wurden Balb/c Mäusen bzw. µMT Mäusen $2 \cdot 10^5$ promastigote Leishmanien intradermal in die Ohren injiziert (von Stebut *et al.*, 1998). Vier bis sechs Wochen nach der Infektion wurden die infizierten Mäuse mittels CO₂ getötet. Die Ohren wurden abgetrennt, desinfiziert und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, in dem sich ein Puffer, bestehend aus Glukose, PBS und

EDTA, befand. Das Gewebe wurde mechanisch zerkleinert und in einen Homogenisator nach Dounce überführt. Dieser wurde mit 10 ml des zuvor verwendeten Puffers befüllt. Durch Auf- und Abwärtsbewegungen eines speziellen Stempels wurden die Zellwände des Gewebes aufgebrochen und die intrazellulären Parasiten freigesetzt. Die Suspension wurde durch ein 70 µm Sieb in ein 50 ml Falkonröhrchen pipettiert. Der Homogenisator wurde mit 10 ml PBS gespült und die Flüssigkeit ebenfalls in das Falkonröhrchen überführt. Die Parasiten wurden zweimal für 8 min. bei 3000 g mit DMEM gewaschen. Das Parasitenpellet wurde in 1 ml DMEM resuspendiert. 10 µl der Leishmaniensuspension wurden im Verhältnis von 1:100 mit Trypanblau verdünnt und unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.2.5 Opsonisierung pro- und amastigoter Leishmanien

Als Opsonisierung wird der Vorgang bezeichnet, bei dem AK oder Komplementfaktoren an Oberflächenmoleküle von Mikroorganismen binden. Sie werden dadurch von Immunzellen als körperfremd erkannt und phagozytiert.

Promastigote sowie amastigote Leishmanien wurden, wie zuvor beschrieben, gewonnen und aufgereinigt (s. 3.2.3/4). Zu jeweils 1 ml Leishmaniensuspension wurden je nach Versuchsansatz 50 µl BALB/c Normalserum (NMS), 50 µl BALB/c Immunsrum (IMS) oder 20 µl des monoklonalem Phosphatidylserin-AK (100 µl/ml) pipettiert. Nach 10 min. Inkubation in einem 37 °C warmen Wasserbad wurden 5 ml DMEM-Medium zu allen Versuchsansätzen hinzugefügt und die Parasitensuspension für 8 min. bei 3.000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 1 ml DMEM-Medium resuspendiert und die Leishmanien, wie zuvor beschrieben, gezählt.

3.2.6 Gewinnung und Charakterisierung von neutrophilen Granulozyten

Die Gewinnung der PMN aus Mäusen fand mithilfe der Biogel-Methode statt. Hierzu wurden Mäuse mittels Isofluran betäubt und 2 ml steriles Biogel (autoklavierte Emulsion, bestehend aus Polyarylamidkügelchen und PBS) s.c. injiziert. Nach 18 Stunden wurden die Tiere mittels CO₂ getötet und die Gelemulsion in ein mit 20 ml PBS gefülltes 50 ml Falkonröhrchen überführt. Das Biogel-PBS-Gemisch wurde unter sterilen Bedingungen durch ein 70 µm Sieb filtriert und die Zellsuspension für 8 min.

bei 200 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 - 2 ml RPMI gelöst. Anschließend wurden $20 \cdot 10^6$ Zellen zusammen mit 9 ml RPMI *complete* in eine Petrischale pipettiert. Die Zellen inkubierten 1-2 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Hiernach wurde der Überstand in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Um noch verbliebene PMN zu ernten, wurde die Schale mit 10 ml PBS befüllt und vorsichtig geschwenkt. Danach wurde die phosphatgepufferte Kochsalzlösung abpipettiert und zum Überstand hinzugegeben. Die Zellsuspension zentrifugierte für 8 min. bei 200 g. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 2-5 ml RPMI resuspendiert.

3.2.7 Herstellung von Zytospins

Die Anfertigung von Zytospins ist eine Methode, mit deren Hilfe sich die in einem Medium befindlichen Zellen auf Objektträger transferieren lassen. Für einen solchen Zelltransfer wurden 100 µl ($0,5-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) einer Zellsuspension in einen speziellen Zytospin-Trichter pipettiert. Durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 g wurden die Zellen auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung des Objektträgers wurden die Zellen mittels Diff-Quick-Färbung nach Angaben des Herstellers gefärbt und bei 1000-facher Vergrößerung durch ein Ölimmersionsobjektiv beurteilt.

3.2.8 Infektion von neutrophilen Granulozyten in vitro

Für die Versuchsreihe wurden PMN aus C57BL/6 Mäusen und FcγR^{-/-} Mäusen isoliert. Amastigote Leishmanien (aus Balb/c oder µMT Mäusen) sowie Promastigote wurden aufgereinigt und mit NMS, IMS oder mit einem monoklonalen AK gegen Phosphatidylserin inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Parasiten. In eine 24-Well-Platte wurden pro Well $0,5 \cdot 10^6$ PMN in 500 µl RPMI *complete* ausgesät. Je nach Versuchsansatz wurden diese mit Pro- oder Amastigoten im Verhältnis 1:3 kokultiviert. Als Positivkontrollen fungierten PMN, zu denen 5 µl einer Lipopolysaccharidlösung (LPS) (100 ng/ml) pipettiert wurden, sowie PMN, die mit 50 µl IFN-γ (1000 U/ml) plus 5 µl LPS stimuliert wurden. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle.

| Ansatz | PMN | Stimulanz | <i>L. major</i> (1:3) | Opsonisierung |
|------------------|-----|---------------------|-----------------------|---------------|
| Negativkontrolle | Ja | nein | nein | Nein |
| Positivkontrolle | Ja | LPS | nein | Nein |
| Positivkontrolle | Ja | LPS + IFN- γ | nein | Nein |
| Ansatz 1 | Ja | Nein | ja | Nein |
| Ansatz 2 | Ja | Nein | ja | NMS |
| Ansatz 3 | Ja | Nein | ja | IMS |

Abb. 5: Exemplarisches Pipettierschema einer 24-Well-Platte.

Die Platte wurde für 18 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen für 5 min. bei 200 g zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und mittels ELISA-Technik die Menge an IL-10, IL-12p40, IL-6 und TNF- α bestimmt. Die Zellen wurden mittels Zytospin auf Objektträger übertragen und die Infektionsrate (Anzahl infizierter Zellen in Prozent) sowie die durchschnittliche Parasitenzahl pro PMN bestimmt.

3.2.9 Testung des NIMP-Antikörpers auf seine Fähigkeit, neutrophile Granulozyten zu depletieren

Bevor mithilfe des NIMP-AK aus eigener Kultur die Depletionsexperimente *in vivo* durchgeführt werden konnten, musste erneut verifiziert werden, dass der AK PMN depletiert. Bereits in Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass 200 μ l des verwendeten Kulturüberstandes genug AK enthielten, um isoliert PMN erfolgreich zu depletieren.

Mäusen wurden jeweils 200 μ l des NIMP-AK intraperitoneal (i. p.) injiziert. Als Negativkontrolle fungierten Mäuse, denen 200 μ l PBS i. p. verabreicht wurden. 24 Stunden später wurden den Tieren, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, 2 ml Biogel in den Nacken injiziert. 18 Stunden später wurden die Zellen aus dem Biogel isoliert und aufgereinigt. Die Zellen wurden unter Verwendung der Durchflusszytometrie charakterisiert.

3.2.10 Depletion der neutrophilen Granulozyten von C57BL/6 Mäusen vor und nach Infektion mit *L. major*

Um die immunologische Relevanz von PMN innerhalb der Leishmaniasis zu untersuchen, wurden *in vivo*-Depletionsexperimente unter Verwendung resistenter C57BL/6 Mäuse und spezieller PMN-depletierender AK durchgeführt.

Ein Versuch umfasste zwei Gruppen mit jeweils drei bis fünf Mäusen. Bei der Verwendung des 7-4-AK (Konzentration: 0,5 mg/ml) wurden den Mäusen der ersten Gruppe regelmäßig einmal pro Woche 400 µl AK i. p. über einen Zeitraum von dreieinhalb Wochen gespritzt. Den Mäusen der zweiten Gruppe, die als Negativkontrolle fungierten, wurden zur selben Zeit 400µl PBS i. p. injiziert. In der zweiten Versuchswoche wurden alle Mäuse mit $2 * 10^5$ hochinfektiösen Promastigoten infiziert. Die Injektion der Parasiten erfolgte i. d. in die Ohren der Mäuse. An dieser Stelle bildete sich eine Läsion, deren Volumen in der dritten und vierten Woche nach Versuchsbeginn einmal wöchentlich als Ellipsoid gemessen und protokolliert wurde.

Im Gegensatz dazu wurden den Mäusen dreimal pro Woche, im Abstand von drei Tagen, 200 µl NIMP-AK (eigene Kultur) i. p. injiziert. Ebenso wurden der Kontrollgruppe dreimal pro Woche 200 µl PBS i. p. gespritzt. Der restliche Versuchsablauf war identisch zu dem der 7-4-Gruppe.

Zu Beginn der vierten Woche wurden die PMN der Mäuse einmalig depletiert. Zwei Tage später erfolgte die Tötung der Versuchstiere mittels CO₂ und die Isolation der Zellen aus den Ohren und den drainierenden submandibulären Lymphknoten.

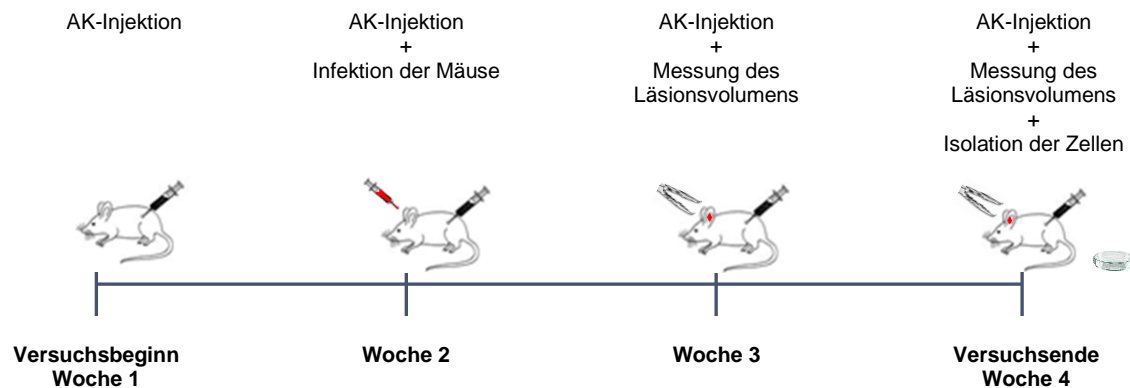


Abb. 6: AK-Injektion und Infektion von C57BL/6 Mäusen - Versuchsablauf. C57BL/6 Mäusen wurden über einen Zeitraum von über drei Wochen NIMP-AK bzw. 7-4-AK regelmäßig i. p. verabreicht. In Woche Zwei wurden die Mäuse mit $2 \cdot 10^5$ metazyklischen Promastigoten infiziert. Die Volumina der im Verlauf entstandenen Läsionen wurden in der dritten und vierten Woche nach Versuchsbeginn ermittelt. In der vierten Woche wurden den Mäusen einer der AK einmalig injiziert. Zwei Tage später wurden die Mäuse getötet und die Zellen aus den Ohren und den drainierenden submandibulären Lymphknoten isoliert.

Unter Verwendung der Durchflusszytometrie (FACS) wurde ermittelt, welche Zellen des Immunsystems an der Injektionsstelle präsent waren. Die AK, die für die Färbungen benutzt worden waren, sind in Kapitel 3.1.6 aufgelistet. Sie richten sich gegen die folgenden Oberflächenantigene: Gr1, 7-4, Ly6G, CD11c F4/80, CD4 und CD8.

Die aus den Lymphknoten gewonnenen Zellen wurden aufgeteilt (vgl. Kapitel 3.2.13). Je $1 \cdot 10^6$ Zellen/200 μ l wurden mit SLA oder mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) restimuliert. Weitere $1 \cdot 10^6$ Zellen/200 μ l wurden nicht stimuliert. Die SEB-stimulierten Zellen dienten als Positivkontrolle, unstimulierte Zellen als Negativkontrolle. Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Überstände auf das Vorhandensein von IL-4, IL-10 und INF- γ mittels ELISA untersucht.

Von den restlichen Lymphknotenzellen wurden $10 \cdot 10^6$ /ml mittels Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) gefärbt - einem Farbstoff, der die Analyse proliferierender Zellen ermöglicht (s. Kapitel 3.2.14). Je $1 \cdot 10^6$ Zellen/200 μ l der gefärbten Zellen wurden mit SLA bzw. SEB restimuliert oder blieben unbehandelt. SEB fungierte als Positivkontrolle. Die nicht restimulierten Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach anschließender vier- bis sechstägiger Inkubation bei 37 °C und

5 % CO₂ wurden die Zellen geerntet. Mittels der Durchflusszytometrie wurde die prozentuale Proliferation an CD4⁺- und CD8⁺-T- Zellen ermittelt.

3.2.11 Messung und Berechnung des Läsionsvolumens

Mäuse, die mit hochinfektiösen Promastigoten ($2 \cdot 10^5$ /Ohr) infiziert wurden, entwickeln an der Inokulationsstelle Granulome. Diese wurden mithilfe einer Schieblehre als dreidimensionale Ellipsoide vermessen. Um das Volumen der entstehenden Granulome zu bestimmen, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = [\text{Höhe (mm)} \cdot \text{Breite (mm)} \cdot \text{Länge (mm)}] / 2 \cdot 4/3 \cdot \pi$$

3.2.12 Gewinnung intradermaler Zellen aus Mausohren

Um Lymphozyten aus infizierten Mausohren zu isolieren, wurden die Tiere zuvor mittels CO₂ getötet. Jeweils vier Hälften wurden in ein Well einer 6-Well-Platte mit der Dermisseite nach unten gelegt und 1,5 ml der Liberase-Gebrauchslösung hinzupipettiert. Die Ohren wurden in der Lösung für 1,5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ enzymatisch angedaut. Nach Ablauf der Zeit wurde die Liberase durch Zugabe von 1,5 ml RPMI *complete* pro Well inaktiviert. Ein 50 µm Medicon wurde mit jeweils zwei Ohrhälften beladen und 1 ml RPMI *complete* hinzugefügt. Unter Verwendung einer zu den Medicons gehörenden Medimaschine wurden die Ohrhälften 7 min. lang zerkleinert. Nach Ablauf der Zeit wurde die entstandene Zellsuspension abgesaugt und durch ein 70 µm Sieb in ein 50 ml Falconröhrchen pipettiert. Das Falconröhrchen wurde bei 200 g für 8 min. zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer gelöst.

Mittels Durchflusszytometrie wurde das Pellet auf seine zelluläre Zusammensetzung hin untersucht.

3.2.13 Gewinnung und Restimulation von Zellen aus submandibulären Lymphknoten der Maus

Für die Gewinnung von submandibulären Lymphknoten wurden die Mäuse mittels CO₂ getötet. Die Lymphknoten wurden unterhalb des Kiefers entnommen und in ein mit PBS befülltes 15 ml Falconröhrchen überführt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Lymphknoten zerkleinert und durch ein 70 µm Sieb in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben. Das Falconröhrchen wurde 8 min. bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml RPMI *complete* resuspendiert. Die Zellen wurden auf $1 \cdot 10^6/200 \mu\text{l}$ eingestellt und je 200 µl in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Für die Restimulation wurden 10 µl SLA (25 µg/ml) zu den Zellen hinzugefügt. Als Positivkontrolle fungierten 20 µl SEB/Well (1 mg/ml). Als Negativkontrolle blieben die Zellen unstimuliert und lagen ausschließlich in RPMI *complete* vor. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Überstände abgenommen und für die anschließenden ELISA-Versuche bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.14 Färbung von Lymphozyten aus submandibulären Lymphknoten mittels Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) und deren Restimulation

CFDA-SE ist ein nicht fluoreszierender Farbstoff, der passiv durch Zellmembranen diffundieren kann. Intrazellulär bindet er an freie Amine zytoplasmatischer Proteine. Zelluläre Esterasen sind in der Lage, zwei Azetatgruppen von ihm abzuspalten, wodurch der fluoreszierende Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) entsteht. Dieser kann die Zellmembranen kaum mehr passieren. Der Farbstoff ermöglicht die Analyse proliferierender Zellen, da die Farbstoffmenge immer genau zur Hälfte an die Tochterzelle weitergegeben wird. Die Intensität, mit der der Farbstoff strahlt, nimmt somit bei jeder Zellteilung um 50 % ab. Die Zellproliferationsrate kann im FACS anhand der Ausdünnung der Fluoreszenzintensität sichtbar gemacht werden (Lyons und Parish, 1994).

Zellen aus DLK wurden aus mit Leishmanien infizierten Mäusen isoliert (s. 3.2.13). Die gewonnenen Zellen wurden in PBS aufgenommen auf eine Konzentration von $10 \cdot 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis von 1:1 mit der CFDA-

SE-Gebrauchslösung (2 mM) in ein 50 ml Falconröhrchen pipettiert und für 15 min. in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt (Stocklösung 10 mM). Anschließend wurde das Falconröhrchen mit RPMI complete aufgefüllt und für 8 min. bei 200 g zentrifugiert. Hiernach wurden die Zellen auf $1 \cdot 10^6/200 \mu\text{l}$ eingestellt und für weitere 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden in jedes Well einer 96-Well-Platte 200 μl der Zellsuspension pipettiert und entweder 20 μl SEB (1 mg/ml) oder 10 μl SLA (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugegeben. Lymphozyten, zu denen keine weitere Substanz pipettiert wurde, fungierten als Negativkontrolle. Die Zellen wurden für vier bis sechs Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde mittels der FACS-Analyse die Proliferation der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen gemessen.

3.2.15 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Sandwich-Prinzip

Der ELISA stellt ein Verfahren dar, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert, um Antigene in einer Probe nachzuweisen. Beim „Sandwich“-Prinzip werden zwei AK eingesetzt, die beide spezifisch an unterschiedliche Epitope eines Antigens binden. Der unkonjugierte Erstantikörper bindet nach Hinzugabe der Probe das Zielantigen. Ein zweiter Antikörper, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, bindet ebenfalls an das Zielantigen, jedoch an einer anderen Stelle als der Erst-AK. Durch Hinzugabe eines chromogenen Substrats erfolgt eine Enzym-katalysierte Reaktion, die in einem Farbumschlag resultiert. Die Dichte der Färbung ist mittels eines *Microplate- Readers* photometrisch (bei 450 nm) messbar und gibt Auskunft über die Konzentration des Antigens in der untersuchten Probe.

Der Nachweis spezifischer Zytokine erfolgte nach Herstellerangaben mit ELISA-Kits von „R&D“ und „BD Biosciences“. Als Proben dienten Überstände Leishmanien-infizierter PMN sowie LK-Zellen aus Leishmanien infizierten Mäusen und deren Kontrollen. Quantifiziert wurden die Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, TNF- α und IFN- γ .

3.2.16 Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)-Analyse

Die Durchflusszytometrie ermöglicht unter Verwendung von fluorochrommarkierten AK eine genaue Analyse von Zellen. Mit dieser Methode sind die Phänotypisierung sowie eine Bestimmung des prozentualen Anteils einer Zellpopulation innerhalb eines Zellgemisches möglich. Hierfür wird die zu analysierende Zellsuspension durch den Kanal einer Küvette in das Messgerät gesaugt. Jede Zelle passiert den Messbereich eines Laserstrahls, wodurch es zur Entstehung von Streulicht kommt. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel in Abhängigkeit von der relativen Zellgröße. Das im rechten Winkel gebrochene Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) ist abhängig von der Größe des Zellkerns sowie der Größe und Anzahl intrazellulärer Vesikel und Granula. Zusammen mit dem gestreuten Licht lassen sich zusätzlich an AK gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe messen, die an bestimmte Bereiche der Zelle gebunden sind. Das von ihnen emittierte Licht kann unter Verwendung von Filtern und Spiegeln zu Photodetektoren geleitet werden und wird dort in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Für die FACS-Färbung wurden die zu untersuchenden Zellen zweimal bei 200 g für 5 min. mit FACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden jeweils $0,2 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen in ein Well einer 96-Well-Rundbodenplatte eingesät. Zu jedem Ansatz wurden 10 μ l eines FC-Blocks (10 μ g/ml FACS-Puffer) pipettiert. Danach wurden die Zellen für 5 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 10 μ l eines Erst-AK zu den Zellen hinzugefügt. Es erfolgte eine Inkubation von 20 min. bei 4 °C unter Lichtausschluss. Hiernach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Für den Fall einer Doppelfärbung wurden in jedes Well 10 μ l eines Zweit-AK pipettiert und die Platte erneut für 20 min. bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Zellen wurden im Anschluss mit FACS-Puffer gewaschen und für 10 min. mit einer 2 %igen PFA-Lösung unter Lichtausschluss bei 4 °C fixiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen wurden die Zellen in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und für die Messung in FACS-Röhrchen transferiert. Pro Röhrchen wurden mindestens 10.000 Zellen in Bezug auf ihre Intensität und Größe (Streuung) mithilfe des BD LSRII-Durchflusszytometers analysiert und die Ergebnisse ausgewertet

3.2.17 Statistische Analysen und Software

Die statistischen Analysen der Daten erfolgten mit der Software StatView® 5.0 (SAS Institute) für Windows unter Verwendung des ungepaarten studentischen t-Tests. Statistisch signifikante Unterschiede wurden dabei folgendermaßen markiert: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$; **** $\leq 0,002$.

Die Aufnahme der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der BD FACSDiva™-Software (BD Biosciences, USA). Mithilfe des Programmes FlowJo 7.2.2 und 7.6.3 (FlowJo, LLC, USA) erfolgte die Auswertung.

Photometrisch ermittelte *Microplate-Reader*-Daten wurden mit der Software KC Junior™ (BIO-TEK) ermittelt. Fotos von Zytospins wurden mit der Software Leica IM 50 Image Manager V5 Release 247 am Mikroskop Leica DM LB mit der Kamera Leica DFC 290 aufgenommen. Für die weitere Aufbereitung der Daten wurde Microsoft Office 2010 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro*-Infektion neutrophiler Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen mit *L. major*

4.1.1 Reinheit der neutrophilen Granulozyten-Präparationen

Bevor die *in vitro*-Infektionsexperimente durchgeführt werden konnten, musste verifiziert werden, dass unter Verwendung der Biogel-Methode PMN aus Mäusen isoliert werden können. Aufgrund dessen wurde der prozentuale Anteil der PMN an der Gesamtzellzahl (Reinheit) durch lichtmikroskopische Auszählung von Zytospins für weitere Versuche ermittelt (s. Abb. 7). Eine Unterscheidung der PMN von anderen, vereinzelt vorkommenden Zellen war aufgrund des charakteristischen Zellkerns problemlos möglich (s. Abb. 8).

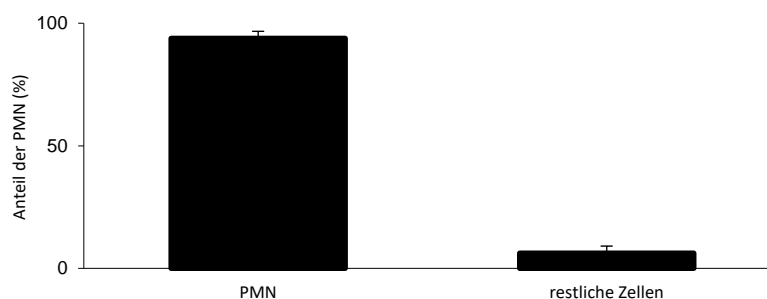


Abb. 7: Reinheit der PMN. PMN wurden aus 18 Stunden alten Biogel-Granulomen isoliert und anschließend ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl lichtmikroskopisch bestimmt (n = 6).



Abb. 8: Fotografie eines PMN. Die Aufnahme zeigt einen mittels Diff-Quick angefärbten PMN. Der Zellkern ist segmentiert (Der Pfeil deutet auf den Zellkern.).

Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, dass die Reinheit der PMN $93,8 \% \pm 6,2 \%$ betrug. Bei den restlichen Zellen handelte es sich zum Großteil um Monozyten bzw. Makrophagen, die aufgrund ihrer Größe und ihrem Zellkern gut von PMN zu unterscheiden waren.

4.1.2 Einfluss von Komplementfaktoren auf die Infizierbarkeit der PMN

Für humane PMN wurde eine effektive Aufnahme von Promastigoten beschrieben, wenn sie mit dem CF C3 opsonisiert wurden (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Laufs *et al.*, 2002). Da ein solcher Zusammenhang für murine PMN noch nicht gezeigt werden konnte, galt es zunächst zu ermitteln, inwieweit Leishmanien generell von murinen PMN phagozytiert werden. Ob hierbei die Opsonisierung der Parasiten mit CF ebenfalls eine Phagozytose-fördernde Rolle einnimmt, wurde im Anschluss untersucht. Hierfür wurden die zuvor aus C57BL/6 Mäusen isolierten PMN mit unbehandelten oder CF-opsonisierten Pro- bzw. Amastigoten in einem Verhältnis von 1:3 infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurden Zytospins angefertigt und sowohl die Infektionsrate als auch die Anzahl an Parasiten pro PMN ermittelt.



Abb. 9: Lichtmikroskopisches Bild eines PMN nach Koinkubation mit *L. major*. PMN wurden aus Mäusen unter Verwendung der Biogel-Methode isoliert und für 18 Stunden mit Leishmanien koinkubiert. Hiernach wurden Zytospins angefertigt und mit Diff-Quick angefärbt. Die PMN wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Dargestellt ist ein neutrophiler Granulozyt mit einem adhärenen Promastigoten (Der Pfeil deutet auf den Parasiten.).

Inwieweit *L. major* die Zytokinbildung von PMN beeinflusst, sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden. Die Konzentrationen folgender Zytokine wurden in den Überständen der unterschiedlich behandelten PMN via ELISA gemessen: IL-12p40, TNF- α , IL-10 und IL-6. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte PMN.

Die Grafik 10a stellt die Infektionsraten neutrophiler Granulozyten bildlich dar. Für PMN, die mit unbehandelten Amastigoten infiziert wurden, betrug sie 15,3 % \pm 3,5 %. Eine signifikant geringere Rate wurde für PMN ermittelt, die mit unbehandelten Promastigoten infiziert wurden (4,0 % \pm 0,9 %, p-Wert: 0,006). Dieser statistisch signifikante Unterschied zwischen der Phagozytose von Amastigoten und Promastigoten bestand nach Opsonisierung der Parasiten mit CF weiterhin.

Eine zusätzliche Opsonisierung der Parasiten mit CF hatte auf deren Phagozytose innerhalb einer Gruppe jedoch keinen relevanten Einfluss. $19,4 \% \pm 2,4 \%$ der murinen PMN beinhalteten CF-opsonisierte Amastigote. Dies war im Vergleich zur Anzahl der PMN die unbehandelte Amastigote internalisierten praktisch unverändert (p-Wert: 0,4). Ähnliches galt für die promastigote Form von *L. major*. $2,4 \% \pm 0,4 \%$ der ausgezählten PMN beinhalteten mit CF opsonisierte Promastigote. Die Anzahl war damit im Vergleich zu der von PMN mit unbehandelten Promastigoten etwas geringer. Eine statistische Signifikanz lag nicht vor (p-Wert: 0,3).

Bei der Anzahl internalisierter Parasiten pro Zelle zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Parasitenformen (Abb. 10b). Im Durchschnitt wurden $1,27 \pm 0,08$ unbehandelte Amastigote und $1,10 \pm 0,05$ unbehandelte Promastigote pro PMN phagozytiert.

Eine Opsonisierung der Leishmanien mit CF beeinflusste die Aufnahme der Amastigoten im Vergleich zu unbehandelten Amastigoten nicht. Dasselbe galt für promastigote *L. major*.

In Abbildung 10c sind die Zytokinkonzentrationen dargestellt, die in den Medien unterschiedlich behandelten PMN gemessen wurden. Die Konzentration des Zytokins IL-12p40 betrug in den Überständen nicht infizierter PMN $0,16 \text{ ng/ml} \pm 0,16 \text{ ng/ml}$. Die Aufnahme von unbehandelten Amastigoten durch PMN führte diesbezüglich zu keiner relevanten Veränderung. Durch zusätzliche Opsonisierung der Parasiten mit CF konnte im Vergleich zu unbehandelten Amastigoten lediglich eine geringe, statistisch jedoch nicht signifikante Steigerung der IL-12p40-Sekretion erzielt werden ($0,6 \text{ ng/ml} \pm 0,2 \text{ ng/ml}$; p-Wert: 0,13). Vergleichbare Zytokinkonzentrationen wurden in den äquivalenten Versuchsansätzen mit Promastigoten detektiert.

TNF- α wurde von nicht infizierten Neutrophilen nur in geringen Mengen freigesetzt ($0,6 \text{ ng/ml} \pm 0,4 \text{ ng/ml}$). Durch eine Infektion der Zellen mit unbehandelten Amastigoten zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine gesteigerte Sekretion, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies ($2,1 \text{ ng/ml} \pm 0,5 \text{ ng/m}$; p-Wert: 0,72). Eine Opsonisierung der Amastigoten mit CF hatte auch in diesem Fall keinen zusätzlichen Effekt. In den äquivalenten Versuchsansätzen mit Promastigoten wurden annähernd identische Zytokinkonzentrationen gemessen.

Eine Infektion der PMN mit Amastigoten führte generell zu einer vermehrten IL-10-Sekretion. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich nach Inkubation der PMN mit unbehandelten Amastigoten ein 4,7-facher Anstieg des Zytokins (0,4 ng/ml \pm 0,3 ng/ml versus 1,9 ng/ml \pm 0,9 ng/ml, p-Wert: 0,08). Geringer fiel der Anstieg nach Inkubation der PMN mit CF-opsonisierten Amastigoten aus (0,9 ng/ml \pm 0,5 ng/ml, p-Wert: 0,33). Ähnliches galt für die Infektion der PMN mit Promastigoten. Sie erhöhte die IL-10-Sekretion ebenfalls - jedoch im Vergleich zur Infektion mit Amastigoten in geringerem Maße. Die Werte der gemessenen Konzentrationen betragen 1,3 ng/ml \pm 0,5 ng/ml, p-Wert: 0,13 (unbehandelt) und 0,8 ng/ml \pm 0,5 ng/ml, p-Wert: 0,49 (NMS).

Die letzte Abbildung dieser Versuchsreihe zeigt die Ergebnisse der IL-6-Konzentration in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Stimulation der PMN.

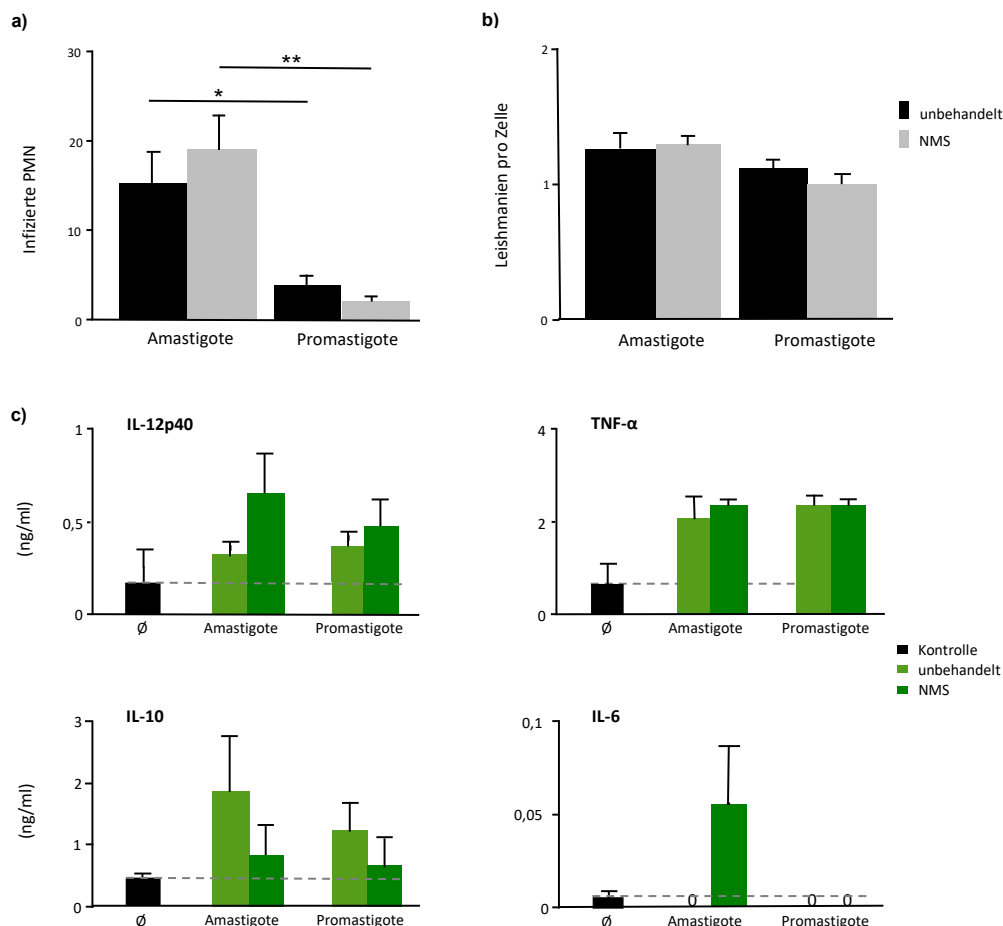


Abb. 10: Einfluss von unbehandelten und CF-opsonisierten *L. major* auf die Infizierbarkeit von PMN und deren Zytokinbildung. PMN wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert. Hiernach wurden $0,5 \cdot 10^6$ PMN/500 μ l RPMI *complete* zusammen mit unbehandelten oder mit CF-opsonisierten Amastigoten bzw. Promastigoten (Verhältnis: 1:3) für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträger übertragen und angefärbt. Die Infektionsraten in Prozent (a) sowie die absolute Zahl internalisierter Parasiten (b) wurden ermittelt. Zusätzlich wurde die Freisetzung der Zytokine IL-12p40, TNF- α , IL-10 und IL-6 in den Medienüberständen bestimmt (c). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (3-5 Tiere pro Gruppe, n = 5, * p \leq 0,05, ** p \leq 0,005).

Eine Infektion der Phagozyten mit *L. major* führte - im Vergleich zur Kontrolle - in keinem Versuchsansatz zu einer veränderten Sekretion des Interleukins.

Interessanterweise ist keine eindeutige Korrelation zwischen den Infektionsraten und der Zytokinbildung zu erkennen. Dies bedeutet, dass eine im Vergleich zu Promastigoten signifikant erhöhte Aufnahme von Amastigoten durch PMN nicht mit einer signifikant veränderten Zytokinsekretion einherging. Lediglich eine geringe Tendenz war in Hinblick auf IL-10 vorhanden. Hier zeigte sich, dass PMN, die mit Amastigoten infiziert wurden, generell mehr IL-10 sezernierten als PMN, die mit Promastigoten infiziert waren.

4.1.3 Einfluss von Immunglobulinen auf die Infektion neutrophiler Granulozyten

Es ist bekannt, dass eine effiziente Phagozytose von Leishmanien durch DCs abhängig von der Interaktion zwischen Leishmanien-spezifischen IgG sowie den Rezeptoren FcγRI und FcγRIII auf der Oberfläche der Phagozyten ist (Woelbing *et al.*, 2006). Eine solche Interaktion wurde für humane PMN ebenfalls beschrieben (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Laufs *et al.*, 2002). Um zu ermitteln, ob diese Wechselwirkung relevant für die Phagozytose amastigoter und promastigoter Leishmanien durch murine Neutrophile ist, wurden PMN mit AK-opsonisierten Leishmanien koinkubiert. IMS enthält - im Gegensatz zu NMS - Leishmanien-spezifisches IgG, das an die Parasiten bindet. Es wurden jeweils die Infektionsraten sowie die absolute Anzahl an internalisierten Parasiten pro Zelle ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit denen der unbehandelten und CF-opsonisierten Leishmanien verglichen (Abb. 11a,b). Des Weiteren wurden die Konzentrationen der Interleukine IL-12p40, TNF-α, IL-10 und IL-6 in den jeweiligen Zellüberständen gemessen. Hiermit sollte die Frage beantwortet werden, ob die Infektion der PMN mit unterschiedlich opsonisierten Leishmanien einen immunmodulierenden Effekt hat (Abb. 11c).

Eine Opsonisierung von *L. major* mit Leishmanien-spezifischen IgG hatte weder einen fördernden noch einen hemmenden Einfluss auf die Infektionsrate und die Anzahl internalisierter Parasiten pro PMN (vgl. Abb. 11a,b).

Die Werte der Infektionsraten der PMN, die mit AK-opsonisierten Amastigoten inkubierten, waren annähernd identisch zu denen der unbehandelten und der NMS-Gruppe. Die genauen Messwerte betragen $15,9 \% \pm 4,4 \%$ für unbehandelte Amastigote, $19,6 \% \pm 4,7 \%$ (p-Wert: 0,59) für CF-opsonisierte Amastigote und $16,0 \% \pm 4,3 \%$ (p-Wert: 0,98) für AK-opsonisierte Amastigote.

Ähnliches galt für die äquivalenten Versuchsansätze mit Promastigoten. Auch hier zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Infektionsraten der unterschiedlichen Gruppen. Die Werte beliefen sich auf $2,3 \% \pm 0,1 \%$ für unbehandelte Promastigote, $2,2 \% \pm 0,4 \%$ (p-Wert: 0,89) für CF-opsonisierte Promastigote und $4,2 \% \pm 0,9 \%$ (p-Wert: 0,08) für AK-opsonisierte Promastigote.

Im Hinblick auf die absolute Anzahl internalisierter Parasiten pro Zelle zeigten sich ebenfalls keine wesentlichen Differenzen. Die absoluten Werte betragen $1,3 \pm 0,1$ für unbehandelte Amastigote, $1,2 \pm 0,1$ (p-Wert: 0,71) für CF-opsonisierte Amastigote und $1,4 \pm 0,1$ (p-Wert: 0,38) für AK-opsonisierte Amastigote.

Für Promastigote beliefen sich die Werte auf: $1,0 \pm 0,0$ für unbehandelte Promastigote, $1,0 \pm 0,0$ für CF-opsonisierte Promastigote und $1,1 \pm 0,1$ (p-Wert: 0,36) für AK-opsonisierte Promastigote.

Abbildung 10c ist eine grafische Darstellung der Zytokinkonzentrationen, die in den Medien unterschiedlich behandelter PMN gemessen wurden. Nicht infizierte PMN sezernierten durchschnittlich nur sehr geringe Mengen IL-12p40 ($0,3 \text{ ng/ml} \pm 0,1 \text{ ng/ml}$). Eine Infektion der Granulozyten mit unbehandelten Parasiten hatte hierauf keinen Einfluss. Die Inkubation der PMN mit CF-opsonisierten Amastigoten führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Zytokinsekretion ($0,8 \text{ ng/ml} \pm 0,3 \text{ ng/ml}$). Demgegenüber wurde in den Überständen der PMN, die mit AK-opsonisierten Amastigoten inkubierten, eine Konzentration gemessen, die annähernd im Bereich der Kontrollgruppe lag ($0,4 \text{ ng/ml} \pm 0,2 \text{ ng/ml}$; p-Wert: 1,9).

Entsprechendes galt für die Infektion der Zellen mit promastigoten *L. major*. Eine zu der Kontrollgruppe identische Menge IL-12p40 wurde von PMN sezerniert, die mit unbehandelten Promastigoten infiziert wurden. Durch die Infektion der PMN mit CF- oder AK-opsonisierten Promastigoten wurden lediglich leichte, statistisch nicht signifikanter Anstiege der Zytokinsekretion erreicht.

Die TNF- α -Konzentration in den Medien nicht infizierter PMN betrug 1,5 ng/ml \pm 1,0 ng/ml. Eine Infektion der PMN mit unbehandelten bzw. CF-opsonisierten Amastigoten hatte einen leichten Anstieg zur Folge (2 ng/ml \pm 0,6 ng/ml (unbehandelt); 2,6 ng/ml \pm 0,6 ng/ml (NMS)). Dies galt nicht für die Inkubation der PMN mit AK-opsonisierten Amastigoten. Hier wurde eine Zytokinkonzentration gemessen, die annähernd der der Kontrollgruppe entsprach.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach der Infektion der PMN mit AK-opsonisierten Promastigoten. Eine Infektion der PMN mit unbehandelten, CF oder AK-opsonisierten Promastigoten führte generell zu einer Erhöhung der Zytokinkonzentration, wobei AK-opsonisierte Promastigote die Zytokinsekretion am wenigsten steigerten (2,0 ng/ml \pm 0,3 ng/ml). Ein statistisch signifikanter Anstieg lag in keinem der Fälle vor.

Die in den Überständen der Kontrollgruppe gemessene IL-10-Konzentration betrug 1,1 ng/ml \pm 0,6 ng/ml. Eine Infektion der PMN mit unbehandelten Amastigoten führte zu einer Steigerung der Konzentration auf 2,2 ng/ml \pm 1,7 ng/ml. Die Opsonisierung der Parasiten mit CF oder AK hatte hierauf keinen Einfluss. Die Werte lagen im Bereich der Kontrollgruppe.

PMN, die mit unbehandelten Promastigoten inkubierten, sezernierten 1,6 ng/ml \pm 0,6 ng/ml IL-10. Hiermit verglichen hatte die Opsonisierung der Parasiten mit AK eine geringe Erhöhung der Zytokinsekretion zur Folge (2,1 ng/ml \pm 1,0 ng/ml). Die Infektion der PMN mit CF-opsonisierten Parasiten führte in dieser Versuchsreihe zu der geringsten IL-10-Sekretion (0,7 ng/ml \pm 0,2 ng/ml).

Die letzte Abbildung zeigt die Ergebnisse der IL-6-Konzentration in Abhängigkeit von der Stimulation der PMN. In den Überständen sowohl nicht infizierter PMN als auch von PMN, die mit *L. major* infiziert wurden, ließen sich unabhängig von deren Opsonisierung keine signifikanten Mengen IL-6 nachweisen.

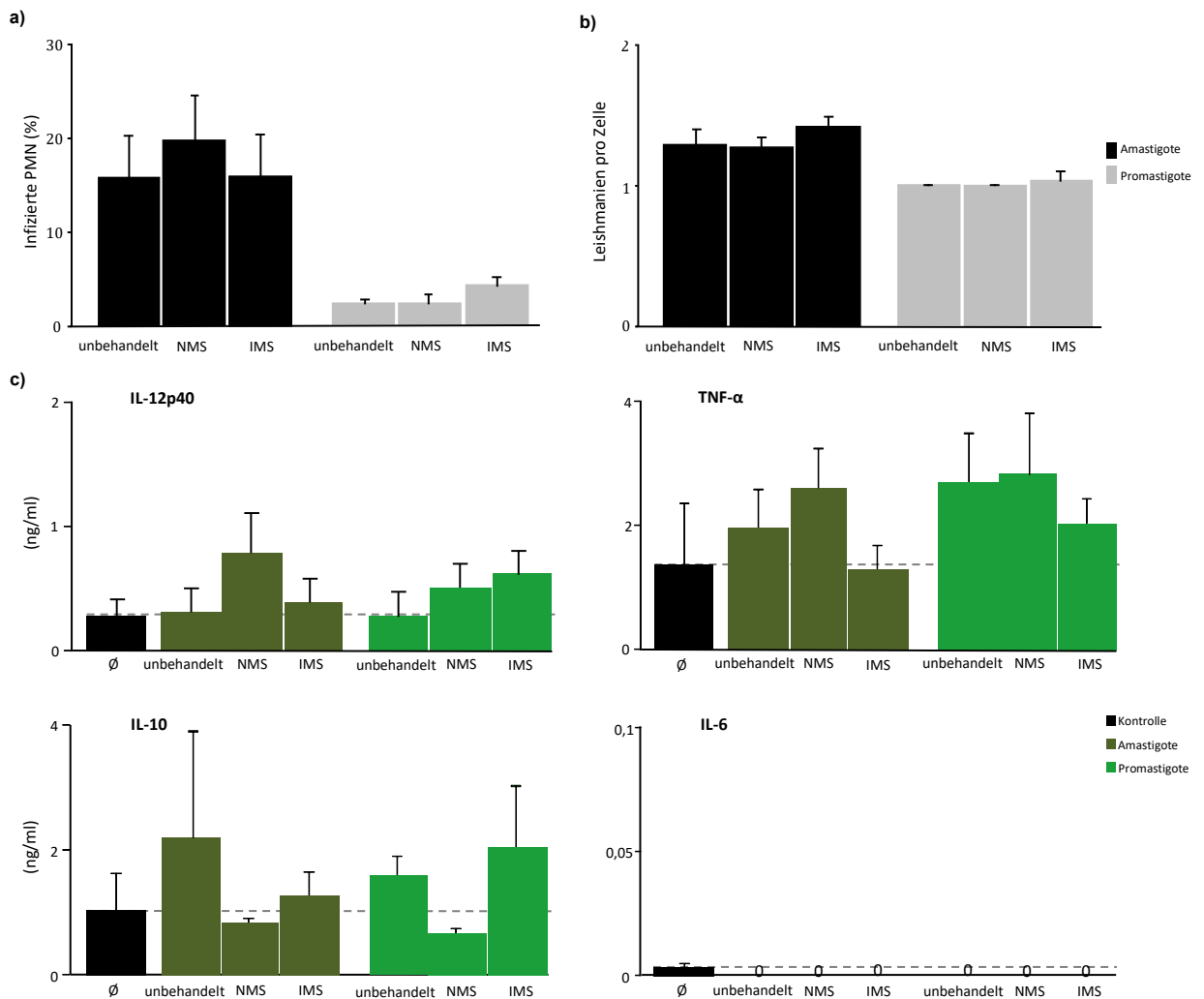


Abb. 11: Effekt von *Leishmania*-spezifischen Immunglobulinen auf die Infektion neutrophiler Granulozyten und deren Zytokinproduktion. PMN wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert ($0,5 \cdot 10^6$ PMN/500 μ l RPMI *complete*) und mit unbehandelten, CF-opsonisierten und AK-opsonisierten Parasiten (Verhältnis: 1:3) für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Infektionsraten in Prozent (a) sowie die absolute Zahl internalisierter Parasiten (b) ermittelt. Zusätzlich wurde die Freisetzung der Zytokine IL-12p40, TNF- α , IL-10 und IL-6 in den Medienüberständen bestimmt (c). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (3-5 Tiere pro Gruppe, n = 4).

4.1.4 Einfluss von Fcγ-Rezeptoren auf die Infektion neutrophiler Granulozyten

In einem weiteren Versuchsansatz bezüglich der Fragestellung, ob die Interaktion der FcγR mit Leishmanien-spezifischem IgG wesentlich für die Phagozytose der Parasiten durch murine PMN ist, wurden für die einzelnen Versuchsansätze PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen verwendet. Diese Zellen bilden die FcγR auf ihrer Oberfläche nicht aus. Eine Interaktion der Rezeptoren mit Leishmanien-spezifischem IgG ist folglich nicht möglich. Die Versuchsanordnung glich ansonsten den vorherigen Versuchsreihen.

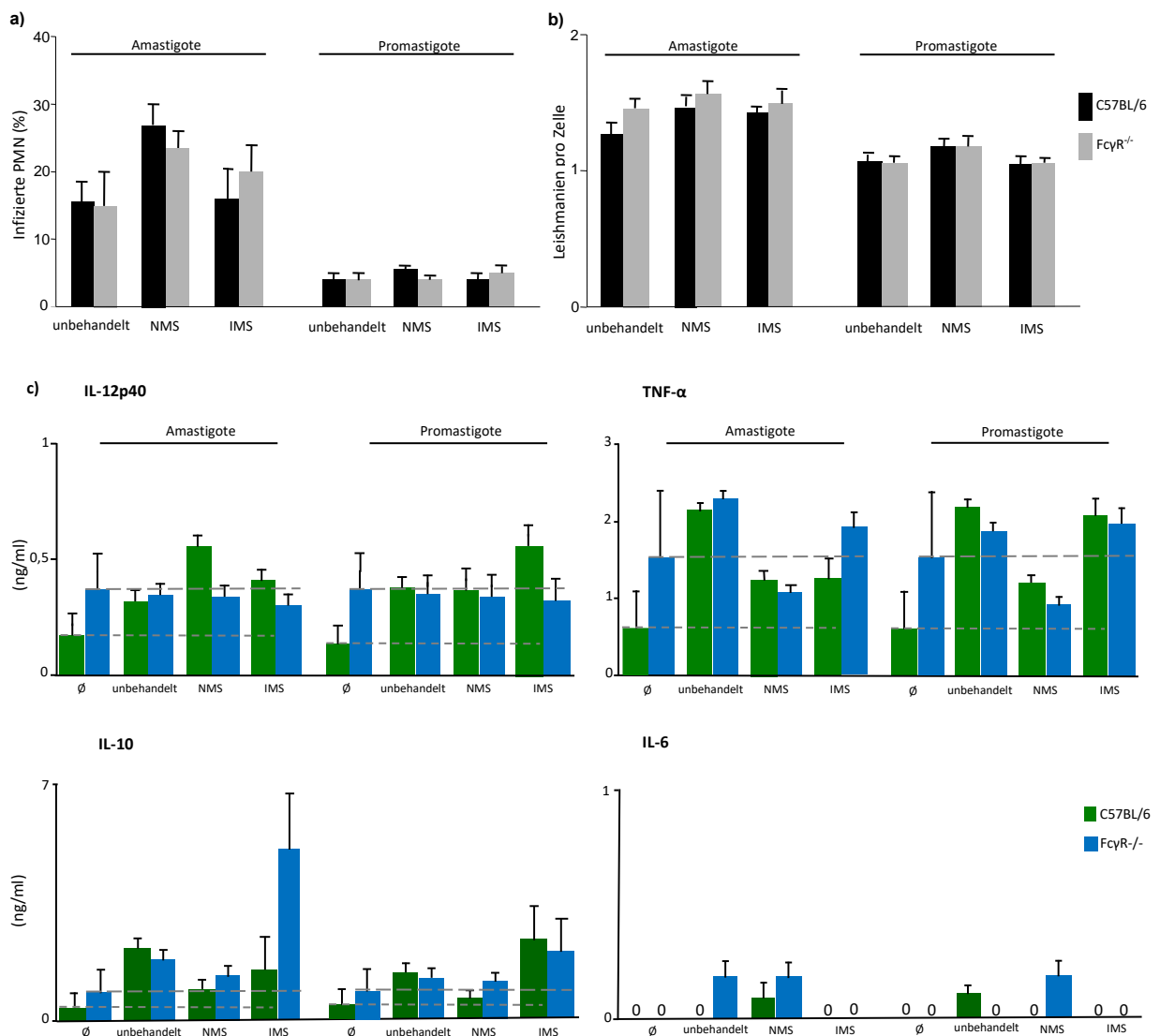


Abb. 12 Einfluss des FcγR auf die Phagozytose von *L. major* durch PMN und deren Zytokinproduktion. PMN wurden aus FcγR^{-/-} und C57BL/6 Mäusen isoliert und jeweils $0,5 \cdot 10^6$ PMN/500 μ l RPMI *complete* mit unbehandelten, CF- und AK-opsonisierten Amastigoten bzw. Promastigoten (Verhältnis 1:3) für 18 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger übertragen und angefärbt. Als Kontrollgruppe dienten PMN aus C57BL/6 Mäusen. Pro Objektträger wurden 200 Zellen ausgezählt und anschließend die Infektionsraten in Prozent (a) sowie die absolute Anzahl internalisierter Parasiten (b) ermittelt. Des Weiteren wurde die Konzentration der Zytokine IL-12p40, TNF- α , IL-10 und IL-6 in den Medienüberständen gemessen (c). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (3 - 5 Tiere pro Gruppe, n = 16).

Die Anzahl der mit Amastigoten infizierten PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen unterschied sich in allen Versuchsansätzen nur unwesentlich von der Anzahl infizierter PMN aus C57BL/6 Mäusen (s. Abb. 12a). Die Werte betragen im Einzelnen für PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen: 15,0 % ± 4,8 % (unbehandelt), 23,4 % ± 2,8 %, (NMS) und 20,0 % ± 2,8 % (IMS). Im Vergleich dazu betragen die Werte der C57BL/6 PMN aus äquivalenten Versuchsansätzen: 15,3 % ± 3,4 % (unbehandelt), 27,2 % ± 2,8 % (NMS) und 16,0 % ± 4,0 % (IMS).

Für Promastigote beliefen sich die Werte für PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen auf 3,9 % ± 0,8 % (unbehandelt), 3,9 % ± 0,5 % (NMS) und 4,9 % ± 1,1 % (IMS) im Vergleich zu 3,8 % ± 1,1 % (unbehandelt), 4,9 % ± 0,8 % (NMS) und 4,2 % ± 0,9 % (IMS) für PMN aus C57BL/6 Mäusen.

Dasselbe galt für die absolute Anzahl internalisierter Parasiten. Hier wurden keine Unterschiede zwischen den PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen und denen aus C57BL/6 Mäusen nachgewiesen (s. Abb. 12b).

Abbildung 12c stellt die Ergebnisse der in den Überständen gemessenen Zytokinkonzentrationen grafisch dar. Die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus der Versuchsreihe mit PMN aus C57BL/6 Mäusen waren, verglichen mit den äquivalenten Versuchsansätzen mit PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen, nahezu identisch.

Eine Ausnahme hierzu bildete IL-10. PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen, die mit AK-opsonisierten Amastigoten infiziert wurden, sezernierten 4,9 ng/ml ± 1,8 ng/ml des Interleukins. Verglichen mit dem äquivalenten Versuchsansatz mit PMN aus C57BL/6 Mäusen produzierten sie demnach fast viermal mehr IL-10 (1,3 ng/ml ± 0,9 ng/ml). Auch innerhalb der FcγR^{-/-} Gruppe war die IL-10-Konzentration in den Überständen der PMN dann am höchsten, wenn die Phagozyten AK-opsonisierte Amastigote aufnahmen (1,6 ng/ml ± 0,3 ng/ml (unbehandelt) bzw. (1,2 ng/ml ± 0,4 ng/ml (NMS)). Die geringste Konzentration wurde in den Überständen von nicht infizierten FcγR^{-/-} PMN gemessen (0,8 ng/ml ± 0,5 ng/ml). Statistisch signifikant waren die Differenzen jedoch in keinem der beschriebenen Fälle.

Ähnliches galt für die Versuche mit Promastigoten. Eine Infektion der FcγR^{-/-} PMN mit unbehandelten Promastigoten führte im Gegensatz zu nicht infizierten FcγR^{-/-} PMN zu einem leichten Anstieg der IL-10-Konzentration (0,8 ng/ml ± 0,5 ng/ml (Kontrolle) *versus* 1,1 ng/ml ± 0,5 ng/ml (unbehandelt)). Annähernd identische Werte wurden nach Infektion der FcγR^{-/-} PMN mit CF-opsonisierten Promastigoten gemessen (1,0 ng/ml ± 0,5 ng/ml). Innerhalb der FcγR^{-/-} Gruppe sezernierten PMN die höchste Menge IL-10, wenn sie mit AK-opsonisierten Promastigoten infiziert wurden (1,7 ng/ml ± 0,4 ng/ml). Ein Vergleich der C57BL/6 Gruppe mit der FcγR^{-/-} Gruppe zeigte jedoch (anders als bei Amastigoten), dass eine Infektion von C57BL/6 PMN mit AK-opsonisierten Promastigoten zu einer höheren IL-10-Sekretion führte als die Infektion von FcγR^{-/-} PMN mit AK-opsonisierten Promastigoten (2,0 ng/ml ± 1,0 ng/ml *versus* 1,7 ng/ml ± 0,4 ng/ml). Statistisch signifikant war keine der dargelegten Differenzen.

Bezüglich des Zytokins TNF-α führte die Infektion der PMN aus C57BL/6 Mäusen mit promastigoten und amastigoten Leishmanien - unabhängig von deren Opsonisierung - zu einer geringfügig gesteigerten Sekretion des Zytokins. Dasselbe galt für die PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen. Signifikante Differenzen zwischen der C57BL/6 Gruppe und der FcγR^{-/-} Gruppe lagen nicht vor.

IL-12p40 und IL-6 wurden von beiden Gruppen in allen Versuchsansätzen nur in geringsten Mengen sezerniert.

4.1.5 Infektion von neutrophilen Granulozyten mit Gewebeamastigoten aus B-Zell-defizienten Mäusen

Der letzte Versuchsansatz bezüglich der Fragestellung, ob eine Interaktion von Oberflächenrezeptoren mit Leishmanien-spezifischem IgG die Phagozytose der Parasiten durch PMN beeinflusst, bestand darin, PMN mit Amastigoten aus B-Zell-defizienten C57BL/6 Mäusen (μMT Mäuse) zu inkubieren. Diese Tiere tragen ein Stopp-Codon in ihrem ersten Membran-Exon der Iγμ-Region. Sie sind daher nicht in der Lage, Immunglobuline zu bilden, die die Parasiten nach einer Infektion opsonisieren könnten (Kitamura *et al.*, 1991). Aus diesem Mausstamm können Gewebeamastigote isoliert werden, die nicht bereits mit IgG opsonisiert sind.

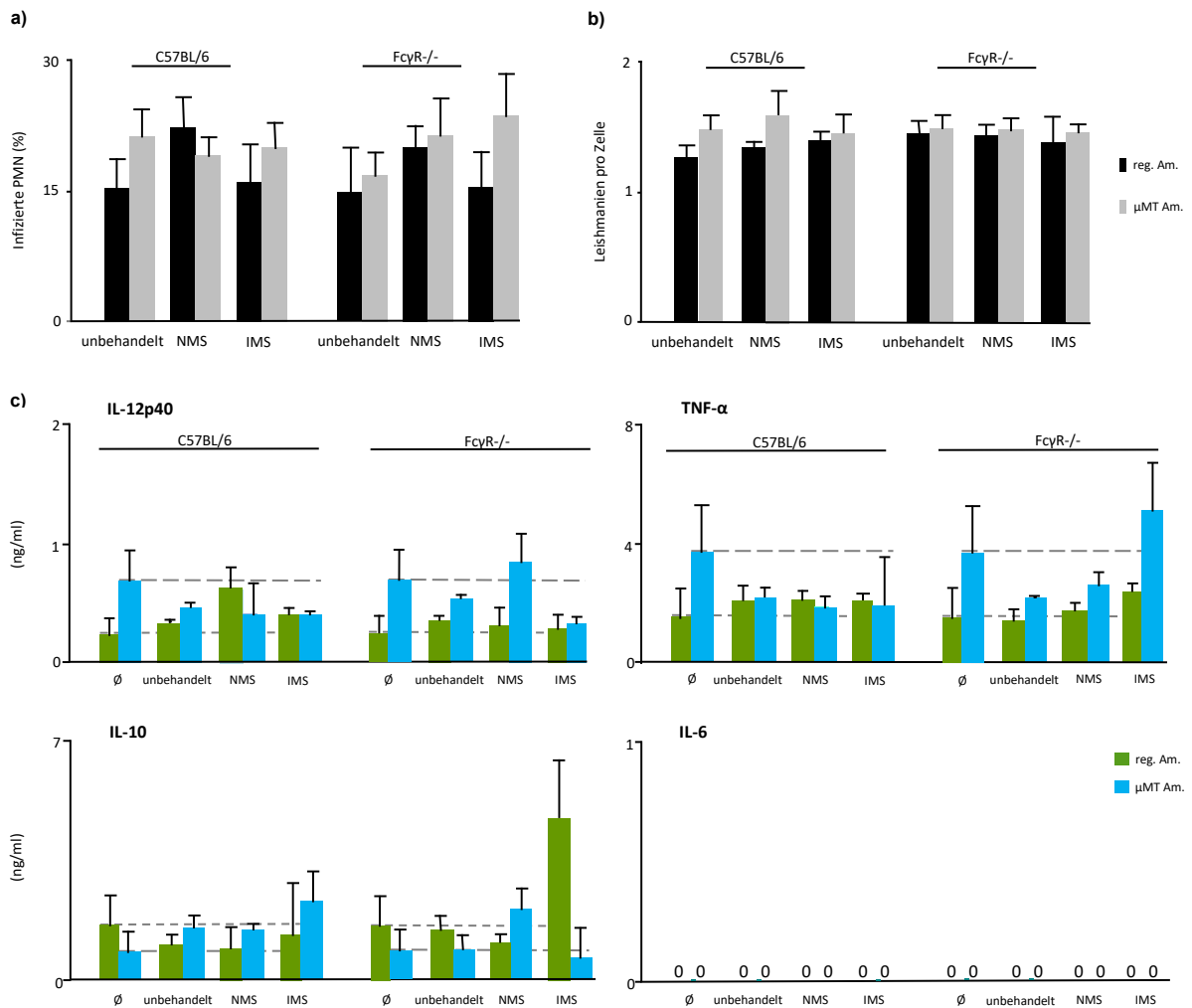


Abb. 13: Einfluss der Zucht von Amastigoten in µMT Mäusen auf die Infizierbarkeit von PMN und deren Zytokinbildung. PMN wurden aus C57BL/6 bzw. FcyR^{-/-} Mäusen isoliert ($0,5 \cdot 10^6$ PMN/500 µl RPMI *complete*) und mit unterschiedlich opsonisierten (NMS, IMS) Amastigoten aus BALB/c bzw. aus µMT Mäusen im Verhältnis 1:3 für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträger übertragen und angefärbt. Als Kontrollgruppe dienten PMN, die mit unbehandelten Parasiten infiziert wurden. Pro Objektträger wurden 200 Zellen ausgezählt und die Infektionsraten (a) sowie die absolute Anzahl internalisierter Parasiten pro PMN (b) ermittelt. Die Interleukinkonzentrationen in den Überständen wurden mittels ELISA bestimmt (c). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (3-5 Tiere pro Gruppe, n = 5).

Aus den in Abbildung 13a und 13b dargestellten Ergebnissen lässt sich erkennen, dass sowohl Amastigote aus Balb/c Mäusen als auch aus µMT Mäusen in ähnlicher Frequenz von PMN aus C57BL/6 Mäusen phagozytiert worden sind. Dasselbe galt für PMN aus FcyR^{-/-} Mäusen. Auch bei ihnen gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Phagozytose von Amastigoten aus C57BL/6 Mäusen und Amastigoten aus µMT Mäusen.

In Abbildung 13c sind die Ergebnisse der einzelnen Zytokinkonzentrationen grafisch dargestellt. Die Opsonisierung amastigoter Leishmanien mit Leishmanien-spezifischen IgG hatte weder einen fördernden noch einen hemmenden Einfluss auf die Sekretion der Zytokine IL-12p40 und IL-6 durch PMN.

PMN aus C57BL/6 Mäusen, die mit unterschiedlich opsonierten Amastigoten (unbehandelt, NMS, IMS) inkubiert wurden, sezernierten im Vergleich zu den äquivalenten Versuchsansätzen mit μ MT Amastigoten annähernd identische IL-12p40-Mengen. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch die Versuchsreihen, in denen PMN aus $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen isoliert wurden, und mit Amastigoten aus Balb/c Mäusen bzw. aus μ MT Mäusen infiziert wurden. Eine Gegenüberstellung aller Ergebnisse der C57BL/6 Gruppe mit den äquivalenten Versuchsansätzen der $Fc\gamma R^{-/-}$ Gruppe zeigte ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die höchste Konzentration des Zytokins TNF- α wurde von PMN aus $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen produziert, die mit AK-opsonierten Amastigoten aus μ MT Mäusen infiziert waren. Die Konzentration in ihren Überständen betrug $5,1 \text{ ng/ml} \pm 1,4 \text{ ng/ml}$. Im Vergleich zur Negativkontrolle war sie um das 1,4-Fache erhöht ($3,7 \text{ ng/ml} \pm 1,5 \text{ ng/ml}$). $Fc\gamma R^{-/-}$ PMN, die mit unbehandelten Amastigoten aus μ MT Mäusen oder CF-opsonierten Amastigoten infiziert wurden, sezernierten geringere Mengen des Zytokins.

Ebenfalls geringer waren die TNF- α -Konzentrationen in den Überständen von PMN (sowohl aus C57BL/6 Mäusen als auch $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen), die mit AK-opsonierten BALB/c Amastigoten inkubierten. Dies galt zusätzlich für PMN aus C57BL/6 Mäusen, die mit AK-opsonierten μ MT Amastigoten infiziert waren. Eine statistische Signifikanz lag bei keiner der Differenzen vor. Weitere wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen TNF- α -Konzentrationen der verschiedenen Versuchsansätze gab es nicht. PMN aus C57BL/6 Mäusen, die mit unterschiedlich behandelten BALB/c Amastigoten infiziert wurden, sezernierten, im Vergleich zu den äquivalenten Versuchsansätzen mit μ MT Amastigoten, ähnliche Mengen an IL-10. Dies galt nicht für PMN aus $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen. Hier zeigte sich eine gesteigerte IL-10-Konzentration in den Überständen der PMN, die mit AK-opsonierten Amastigoten aus Balb/c Mäusen koinkubierten ($4,8 \text{ ng/ml} \pm 1,8 \text{ ng/ml}$). Der Anstieg blieb nach der Infektion von PMN aus $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen mit AK-opsonierten μ MT Amastigoten aus. Bei ihnen war die gemessene Zytokinkonzentration mit $0,5 \text{ ng/ml} \pm 0,3 \text{ ng/ml}$ sogar am geringsten.

4.1.6 Einfluss einer Antikörper-vermittelten Blockade des Phosphatidylserins auf der Oberfläche promastigoter Leishmanien auf die Infektion neutrophiler Granulozyten

In dieser Versuchsreihe galt es, die Fragen zu beantworten, ob eine Blockade des Phospholipids „Phosphatidylserin“ auf der Oberfläche promastigoter *L. major* zu einer Änderung ihrer Infektiosität führt. Des Weiteren wurde untersucht, ob dies einen immunmodulatorischen Effekt durch Veränderung des Zytokinprofils der PMN zur Folge hat. Zu diesem Zweck wurden die Parasiten mit einem AK, der spezifisch Phosphatidylserin blockiert, opsonisiert und danach mit PMN aus C57BL/6 Mäusen koinkubiert.

In Abbildung 14a,b sind die Infektionsraten und die absolute Anzahl phagozytierter Leishmanien pro PMN grafisch dargestellt. Abbildung 14c zeigt die Ergebnisse der ermittelten Zytokinkonzentrationen.

Anhand der in Abbildung 14a dargestellten Ergebnisse ließen sich geringfügige, statistisch jedoch nicht signifikante Unterschiede bezüglich der Infektionsrate der beiden Versuchsansätze feststellen. Der Anteil infizierter PMN aus C57BL/6 Mäusen, die mit Phosphatidylserin-AK beladenen Promastigoten inkubiert wurden, betrug $7,5 \% \pm 1,2 \%$. Im Vergleich dazu war die Infektionsrate von PMN, die mit unbehandelten Promastigoten inkubierten, etwas niedriger ($5,1 \% \pm 0,9 \%$).

Dasselbe galt für die Anzahl internalisierter Parasiten pro Zelle (vgl. Abb. 14b). Die Menge an Phosphatidylserin-AK beladenen Promastigoten pro Zelle betrug $1,3 \pm 0,1$. Im Vergleich hierzu betrug die Anzahl an unbehandelten Parasiten pro Zelle $1,1 \pm 0,1$.

Die in den Überständen gemessenen Konzentrationen der Zytokine IL12p40, TNF- α , IL-10 und IL-6 betragen für PMN, die mit Phosphatidylserin-AK beladenen Promastigoten infiziert wurden: $0,5 \text{ ng/ml} \pm 0,1 \text{ ng/ml}$ (IL12p40), $2,3 \text{ ng/ml} \pm 0,7 \text{ ng/ml}$ (TNF- α) und $1,7 \text{ ng/ml} \pm 1,1 \text{ ng/ml}$ (IL-10). IL-6 konnte nicht detektiert werden. Die Konzentrationen waren annähernd identisch zu den Konzentrationen der Zytokine aus der Gruppe der unbehandelten Promastigoten.

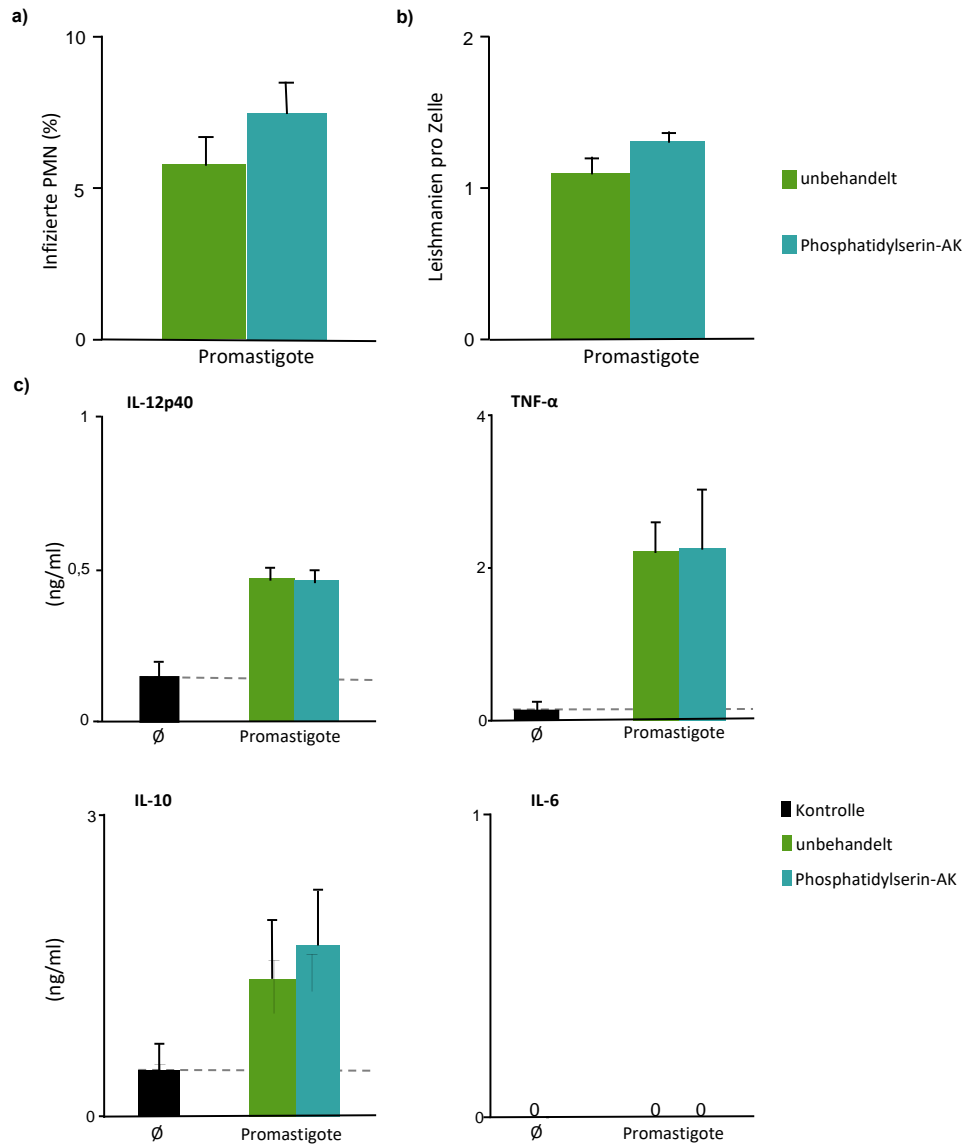


Abb. 14: Einfluss der Blockade des Phosphatidylserins an der Oberfläche promastigoter Leishmanien auf deren Infektiosität und Fähigkeit der Zytokinmodulierung bei PMN. PMN wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert ($0,5 \cdot 10^6$ PMN/500 μ l RPMI *complete*) und mit Phosphatidylserin-AK opsonisierten metazyklischen Promastigoten in einem Verhältnis von 1:3 für 18 Stunden inkubiert. Als Kontrollgruppe dienten PMN, die mit unbehandelten Parasiten infiziert wurden. Anschließend wurden die Zellen angefärbt und die Infektionsraten (a), sowie die absolute Anzahl internalisierter Promastigoten (b) ermittelt. Des Weiteren wurden die Konzentrationen der dargestellten Zytokine ermittelt (c). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (3 - 5 Tiere pro Gruppe, n = 5).

4.2 In vivo-Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *L. major*

4.2.1 Depletierende Eigenschaften des NIMP-Hybridom-Überstands

In den folgenden Infektionsversuchen sollte durch die Gabe PMN-depletierender AK die Frage geklärt werden, ob neutrophile Granulozyten in den ersten Wochen einer Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *L. major* eine protektive oder krankheitsfördernde Rolle einnehmen. Die für die folgenden Versuche verwendeten AK waren zum einen der monoklonale 7-4-AK, der sich gegen Ly-6B.2 auf der Oberfläche der PMN richtet, und der NIMP-AK aus eigener Kultur, der sich v. a. gegen murines Ly6G richtet.

Der NIMP-AK musste zuvor auf seine Fähigkeit, PMN zu depletieren, getestet werden. Mäusen wurde deshalb einmalig 200 µl NIMP-AK i. p. verabreicht und acht Stunden später 2 ml Biogel in den Nacken injiziert. Nach 24 Stunden wurden die eingewanderten Zellen aus den Biogel-Granulomen isoliert und via FACS auf das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten untersucht. Die hierfür verwendeten AK waren der Gr1-AK, der NIMP-AK und der Ly6G-AK.

Abbildung 15 ist eine repräsentative Darstellung der Ergebnisse aus insgesamt zwei Versuchen (mit jeweils 1-2 Tieren pro Gruppe). Abbildung 16 zeigt den prozentualen Anteil der Gr1, Ly6G und NIMP⁺-Zellen, die aus Kontrollmäusen bzw. mit NIMP-behandelten Mäusen isoliert wurden.

In der NIMP-behandelten Gruppe wurden im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich weniger Gr1⁺-Zellen (93,2 % ± 0,1 % *versus* 12,7 % ± 4,9 %, p-Wert: 0,0001), Ly6G⁺-Zellen (92,3 % ± 0,8 % *versus* 0,8 % ± 0,1 p-Wert: 0,0001) sowie NIMP⁺-Zellen (50,4 % ± 20,3 % *versus* 2,3 % ± 0,2 %, p-Wert: 1,2) durchflusszytometrisch detektiert (Abb. 15b). Da diese Oberflächenmoleküle vorwiegend auf PMN vorkommen, war damit die PMN-depletierende Eigenschaft des kultivierten NIMP-AK bestätigt. Er wurde anstelle des kommerziell erworbenen 7-4-AK für die folgende Versuchsreihe verwendet.

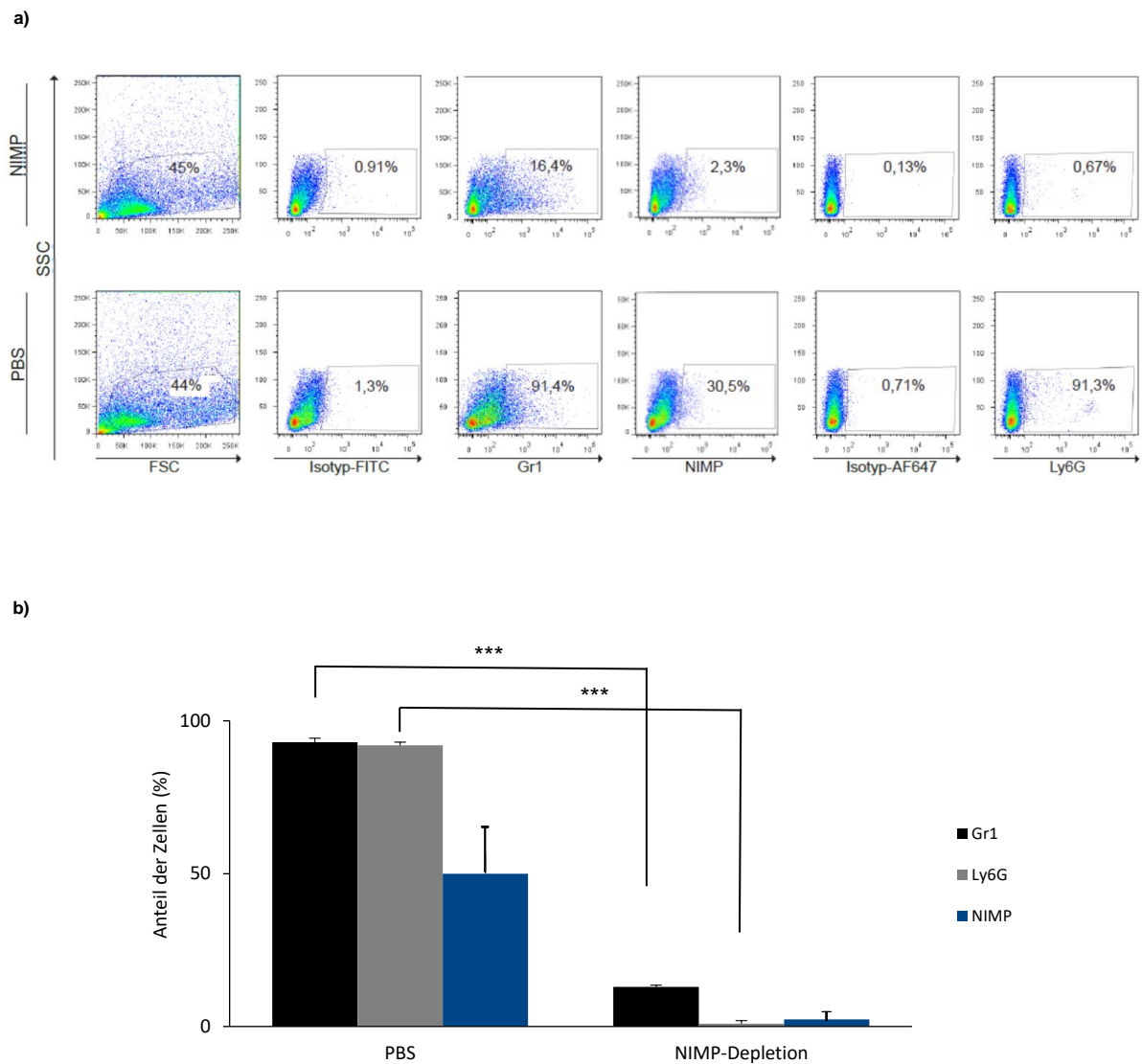


Abb. 15: Fähigkeit des NIMP-AK, PMN zu depletieren. 24 Stunden nach Injektion von 200 μ l NIMP-AK (i. p.) und 2 ml Biogel (in den Nacken der Mäuse), wurden die eingewanderten Zellen aus den Biogel-Granulomen isoliert. Die Zellen wurden mithilfe des FACS und unter Verwendung der AK Gr1, NIMP und Ly6G auf das Vorliegen von PMN untersucht. Als Kontrolle dienten Mäuse, denen PBS i. p. injiziert wurde.

a) Repräsentative DotPlot-Darstellung der isolierten Zellen aus einer Maus (n = 1).

b) Arithmetische Mittelwerte \pm SEM (n = 2, 1 - 2 Tiere pro Gruppe; *** p \leq 0,002).

4.2.2 Effekt der Neutrophilendepletion auf das frühe Granulom nach high-dose-Infektion und in Abhängigkeit des gewählten Antikörpers

Es ist bereits bekannt, dass es in Leishmanien-resistenten C57BL/6 Mäusen, im Gegensatz zu suszeptiblen Balb/c Mäusen, lediglich zu einem kurzen, etwa zweitägigen Einstrom von PMN an die Inokulationsstelle von Leishmanien kommt (Charmoy *et al.*, 2009). Dieser verkürzte Einstrom der PMN soll mit einer deutlich geringeren lokalen Entzündungsreaktion einhergehen. Um zu analysieren, inwieweit eine Depletion der PMN eine lokale Entzündungsreaktion beeinflussen kann, wurden

C57BL/6 Mäuse einmal pro Woche (7-4-AK) bzw. dreimal pro Woche (NIMP-AK) PMN-depletierende AK über dreieinhalb Wochen i. p. injiziert. Als Kontrollgruppe dienten C57BL/6 Mäuse, denen zu denselben Zeitpunkten PBS i. p. injiziert wurde. In der zweiten Woche nach Versuchsstart wurden alle Mäuse mit $2 \cdot 10^5$ promastigoten, metazyklischen Leishmanien infiziert. Die Injektion der Parasiten erfolgte intradermal in die Ohren der Tiere. Das Volumen des sich am Injektionsort bildenden Granuloms wurde wöchentlich ermittelt.

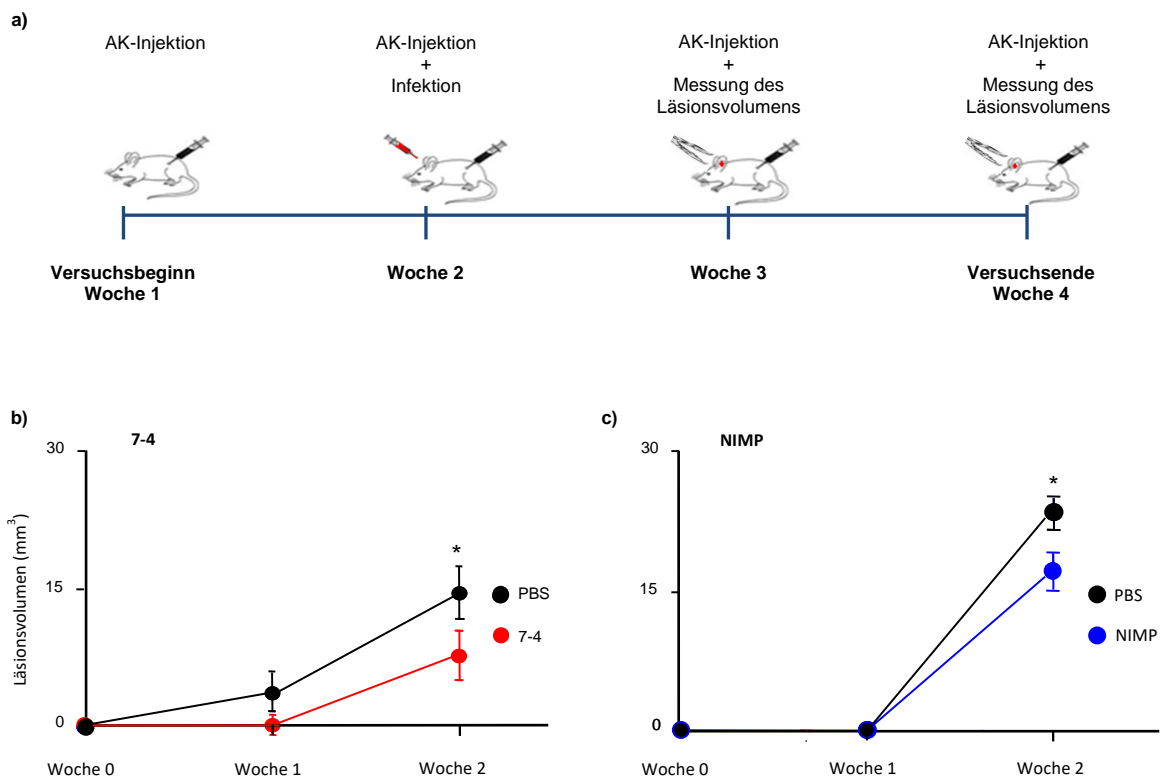


Abb. 16: Läsionsvolumina nach Hochdosisinfektion AK-behandelter und nicht-behandelter C57BL/6 Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurde über dreieinhalb Wochen einmal wöchentlich der 7-4-AK bzw. dreimal wöchentlich der NIMP-AK appliziert. In der zweiten Woche nach Versuchsbeginn wurden die Mäuse mit $2 \cdot 10^5$ Promastigoten infiziert. In den beiden darauffolgenden Wochen wurden die an der Inokulationsstelle entstandenen Läsionen als Ellipsoide gemessen. Als Kontrollgruppe dienten C57BL/6 Mäuse, denen PBS i.p. injiziert wurde.

a) Grafische Darstellung des Versuchsablaufs.

b, c) Arithmetische Mittelwerte von x -Mäusen \pm SEM (9 Mäuse (Kontrollgruppe und 7-4-Gruppe) aus zwei unabhängigen Experimenten (b); 5 Mäuse (Kontrollgruppe) bzw. 4 Mäuse (NIMP-Gruppe) aus einem Experiment (c), * $p \leq 0,05$).

Aus Abbildung 16b lässt sich erkennen, dass C57BL/6 Mäuse der 7-4-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe nach Infektion mit Promastigoten signifikant kleinere Läsionen ausbildeten ($7,9 \text{ mm}^3 \pm 1,7 \text{ mm}^3$ versus $14,6 \text{ mm}^3 \pm 1,8 \text{ mm}^3$, p-Wert: 0,01). Der gleiche Effekt wurde durch die Behandlung der Mäuse mittels NIMP-AK erzielt (Abb. 16c). Die Größenunterschiede der Läsionen der Kontrollgruppe und der AK-behandelten Gruppe waren hier jedoch erst in der zweiten Woche zu verzeichnen ($17,4 \text{ mm}^3 \pm 1,6 \text{ mm}^3$ versus $23,9 \text{ mm}^3 \pm 1,7 \text{ mm}^3$, p-Wert: 0,02).

4.2.3 Charakterisierung und Messung des prozentualen Anteils intradermaler Zellen aus infizierten Mausohren mittels Durchflusszytometrie

L. major produziert nach dem Eindringen in seinen Wirtsorganismus den LCF. Dieser lockt PMN gezielt an die Inokulationsstelle der Parasiten (van Zandbergen *et al.*, 2002). Zudem interagiert LCF mit dem Lipoxin-A4-Rezeptor der PMN, was zu einer erhöhten Überlebensrate der intrazellulären Parasiten durch Inhibierung der neutrophilen Abwehrmechanismen führt (Godson *et al.*, 2000; Wenzel *et al.*, 2009).

Untersucht werden sollte, ob sich durch die verwendeten AK (7-4 und NIMP) eine Depletion der PMN nach Infektion der Mäuse mit *Leishmania* erreichen lässt, und ob dies zu einer veränderten Zusammensetzung der Zellpopulationen an der Inokulationsstelle der Parasiten führt. Hierfür wurden die Zellen aus *Leishmania*-infizierten Mausohren nach vierwöchiger AK-Behandlung isoliert und mittels FACS charakterisiert.

Die Durchflusszytometrie der aufgereinigten intradermalen Zellen ist in Abbildung 17a,b exemplarisch als DotPlot-Diagramm und in 17c,d als Balkendiagramm aus gepoolten Daten dargestellt.

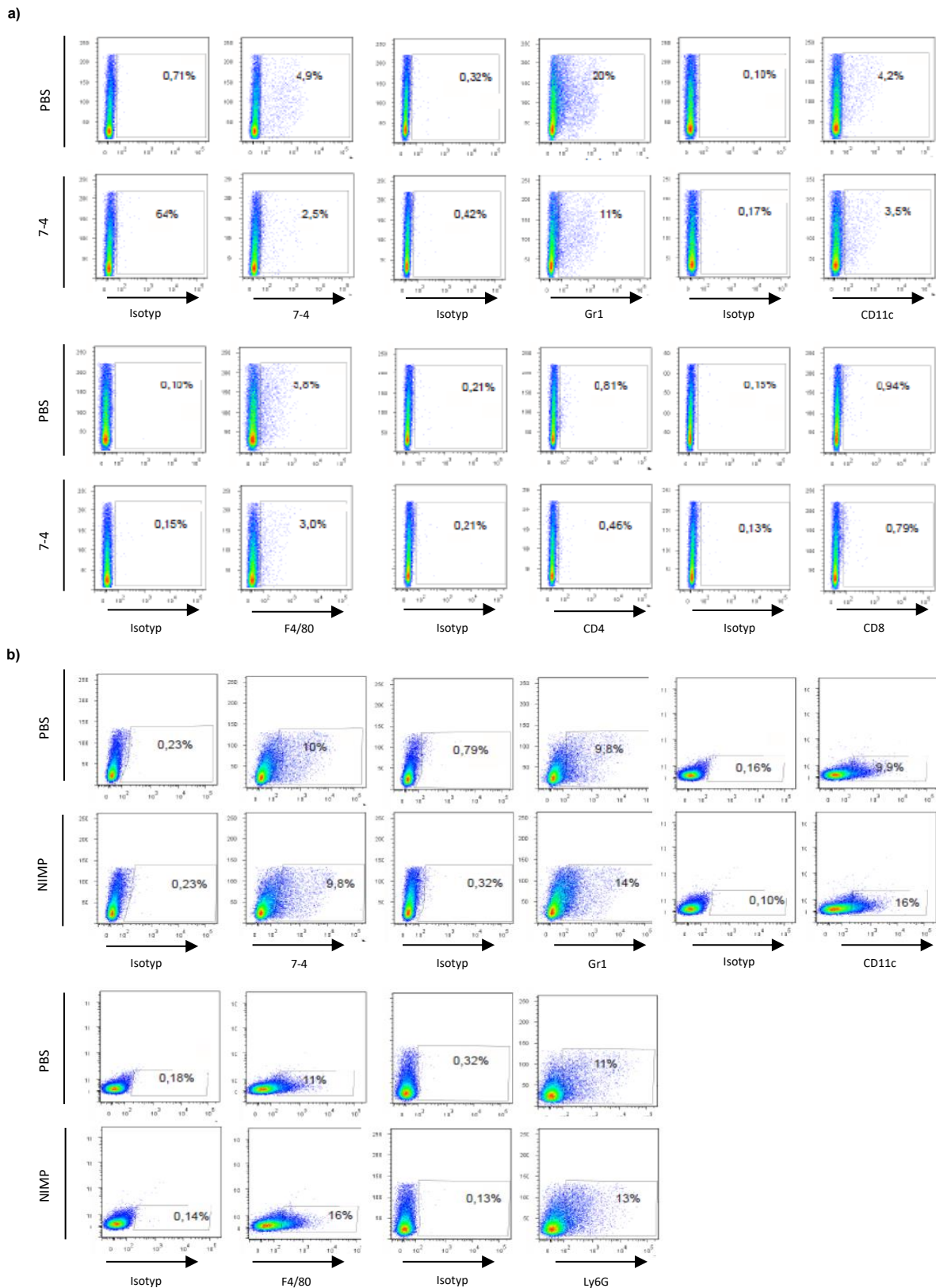


Abb. 17a/b: Charakterisierung und Messung des prozentualen Anteils intradermaler Zellen aus infizierten Mausohren – DotPlot-Darstellung der isolierten Zellen aus einer Maus mit Gating-Strategie. C57BL/6 Mäusen wurden über einen Zeitraum von dreieinhalb Wochen einmal wöchentlich 7-4-AK (a) bzw. dreimal wöchentlich NIMP-AK (b) i. p. injiziert. Nach der ersten Woche wurden die Mäuse mit 2×10^5 Promastigoten infiziert. Danach wurden sie weitere zwei Wochen mit AK behandelt. In der vierten Woche nach Versuchsbeginn wurden die Mäuse getötet und aus den Mausohren die Zellen aufgereinigt. Mittels FACS wurde der prozentuale Anteil an 7-4-, CD11c-, F4/80-, Gr1-, Ly6G-, CD8- und CD4⁺-Zellen bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten mit PBS behandelte Mäuse.

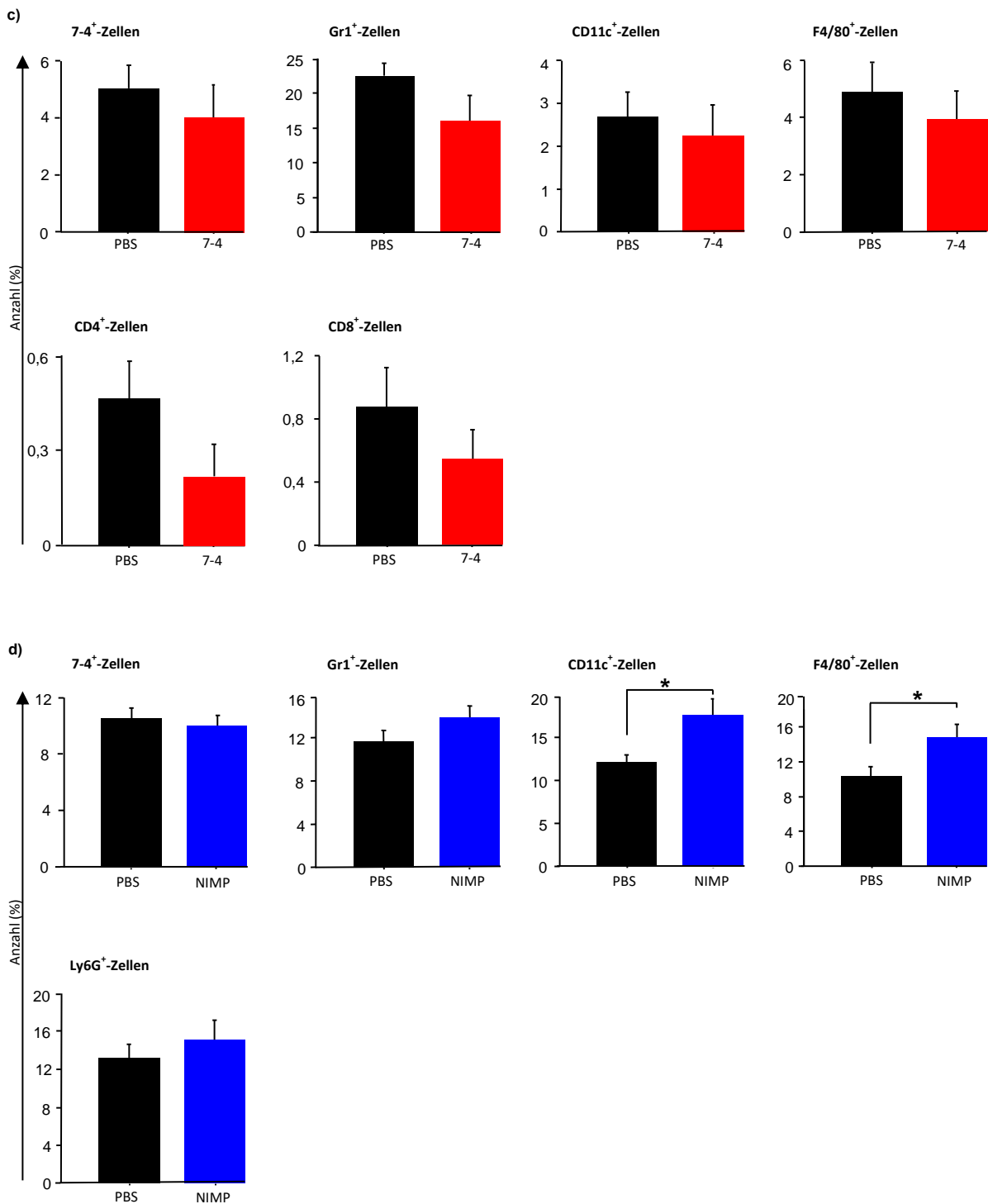


Abb. 17c/d: Charakterisierung und Messung des prozentualen Anteils intradermaler Zellen aus infizierten Mausohren - Arithmetische Mittelwerte \pm SEM. C57BL/6 Mäuse wurden über dreieinhalb Wochen einmal wöchentlich 7-4-AK bzw. dreimal wöchentlich NIMP-AK i. p. injiziert. In der zweiten Woche wurden die Mäuse mit $2 \cdot 10^5$ Promastigoten infiziert. Danach wurden sie weitere zwei Wochen mit AK behandelt. In der vierten wurden aus den Mausohren die Zellen aufgereinigt. Mittels FACS wurde der prozentuale Anteil oben genannter Zellen bestimmt. Als Kontrollgruppe dienen mit PBS behandelte Mäuse.

c, d) Arithmetische Mittelwerte von x-Mäusen \pm SEM (9 Mäuse (Kontrollgruppe und 7-4-Gruppe) aus zwei unabhängigen Experimenten (c); 5 Mäuse (Kontrollgruppe) bzw. 4 Mäuse (NIMP-Gruppe) aus einem Experiment (d), * $p \leq 0,05$).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei der 7-4-Gruppe ein prozentual geringerer Anteil aller untersuchten Zellen. Am deutlichsten spiegelte sich dieses Ergebnis bei Gr1⁺-Zellen wider. 22,5 % ± 1,9 % der Zellen aus Mäusen der PBS-Gruppe waren Gr1-positiv. Im Gegensatz hierzu waren es bei der 7-4-Gruppe nur 16,0 % ± 3,8 %. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag jedoch in keiner der untersuchten Zellpopulationen vor.

Auch in der mit dem NIMP-AK behandelten Gruppe zeigte sich eine Veränderung der Zellzusammensetzung, jedoch waren die Ergebnisse zum Teil konträr zu denen der 7-4-Gruppe.

Der prozentuale Anteil der verschiedenen Zellpopulationen bei NIMP-behandelten Mäusen war in der Regel höher als bei PBS-behandelten Mäusen. Am deutlichsten zeigte sich dieser Unterschied im Hinblick auf F4/80⁺-Zellen und CD11c⁺-Zellen. Die Differenzen zwischen der PBS-Gruppe und der NIMP-Gruppe waren in diesen Fällen statistisch signifikant (10,3 % ± 1,2 % *versus* 14,8 % ± 1,5 %; p-Wert: 0,04 bzw. 12,0 % ± 1,1 % *versus* 17,5 % ± 2,0 %; p-Wert: 0,04). Im Hinblick auf Zellen, die Oberflächenmarker von Neutrophilen trugen, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wurden in beiden Gruppen nicht detektiert. Auf eine grafische Darstellung wurde aus diesem Grund verzichtet.

4.2.4 Einfluss der 7-4- bzw. NIMP-AK-Behandlung auf die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen

Unter bestimmten Bedingungen können murine PMN MHC-II-Moleküle auf ihren Oberflächen exprimieren. Diese Fähigkeit erlaubt es ihnen, CD4⁺-T-Zellen zu primen und eine humorale Immunantwort zu induzieren (Fanger *et al.*, 1997; Radsak *et al.*, 2000; Culshaw *et al.*, 2008).

In der letzten Versuchsreihe sollte daher untersucht werden, inwieweit eine Depletion neutrophiler Granulozyten Einfluss auf das Priming von Lymphknotenzellen auf *Leishmania*-Antigene nimmt. Diesbezüglich wurden LK-Zellen aus infizierten, mit dem 7-4- bzw. dem NIMP-AK-behandelten Mäusen entnommen. Die Zellen wurden mit CFDA-SE gefärbt und mit SLA antigenspezifisch stimuliert. Als Kontrolle dienten Lymphozyten aus PBS-behandelten Mäusen. Hiernach erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung aller Zellen. Abbildung 18 zeigt den prozentualen Anteil an proliferierten CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen aus drainierenden Lymphknoten nach antigenspezifischer Restimulation mit SLA.

Im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe proliferierten Zellen aus der 7-4-Gruppe deutlich weniger. Dies galt sowohl für CD4⁺-T-Zellen als auch für CD8⁺-T-Zellen, wobei nur der Unterschied bei Ersterer signifikant war (21,0 % ± 3,4 % *versus* 7,9 % ± 2,6 %, p-Wert: 0,02).

Die beschriebene Abweichung zeigte sich bei dLK-Zellen aus Tieren nicht, denen der NIMP-AK injiziert wurde. Hier proliferierten die Zellen der NIMP-Gruppe und der PBS-Gruppe in gleichem Maße.

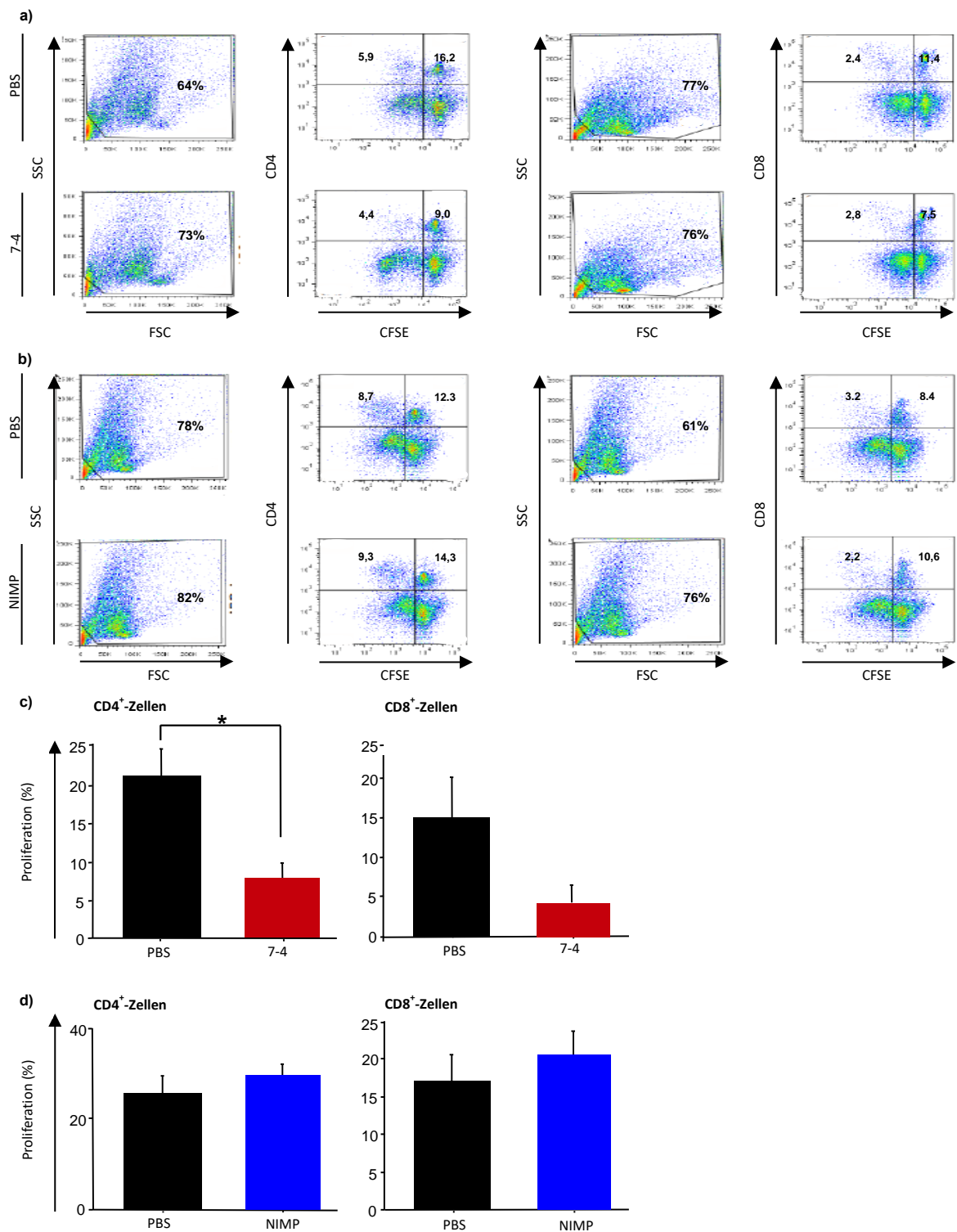


Abb. 18: Bestimmung des prozentualen Anteils der CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten aus submandibulären Lymphknoten nach Restimulation mit SLA. C57BL/6 Mäusen wurden über dreieinhalb Wochen PMN-depletierende AK (7-4 einmal wöchentlich; NIMP dreimal wöchentlich) i. p. injiziert. Zu Beginn der zweiten Woche wurden sie mit 2×10^5 metazyklischen Promastigoten infiziert. Am Ende der vierten Woche wurden sie getötet. Den Mäusen wurden die dLK entnommen. Diese wurden mit CFDA-SE gefärbt und mit SLA für fünf Tage restimuliert. Unter Verwendung der Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen bestimmt, der aus der Restimulation mit SLA und anschließender Proliferation resultierte. Als Kontrollgruppe fungierten Mäuse, deren PBS injiziert wurde.

a,b) Repräsentative DotPlot-Darstellung isolierter Zellen aus jeweils einer Maus.

c, d) Arithmetische Mittelwerte von x -Mäusen \pm SEM (5 Mäuse (Kontrollgruppe) bzw. 6 Mäuse (7-4-Gruppe) aus zwei unabhängigen Experimenten (**c**); 5 Mäuse (Kontrollgruppe) bzw. 3 Mäuse (NIMP-Gruppe) aus einem Experiment (**d**), * $p \leq 0,05$).

4.2.5 Einfluss der 7-4- bzw. NIMP-AK-Behandlung auf das Zytokinprofil antigenspezifisch restimulierter dLK-Zellen

In einem letzten Schritt sollte kontrolliert werden, ob das Zytokinprofil der dLK-Zellen durch die Depletion der PMN beeinflusst wird. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der gemessenen IL-4, IL-10 und IFN- γ -Konzentrationen in den Überständen SLA-stimulierter und nicht-stimulierter dLK-Zellen aus AK-behandelten Mäusen und Kontrollmäusen.

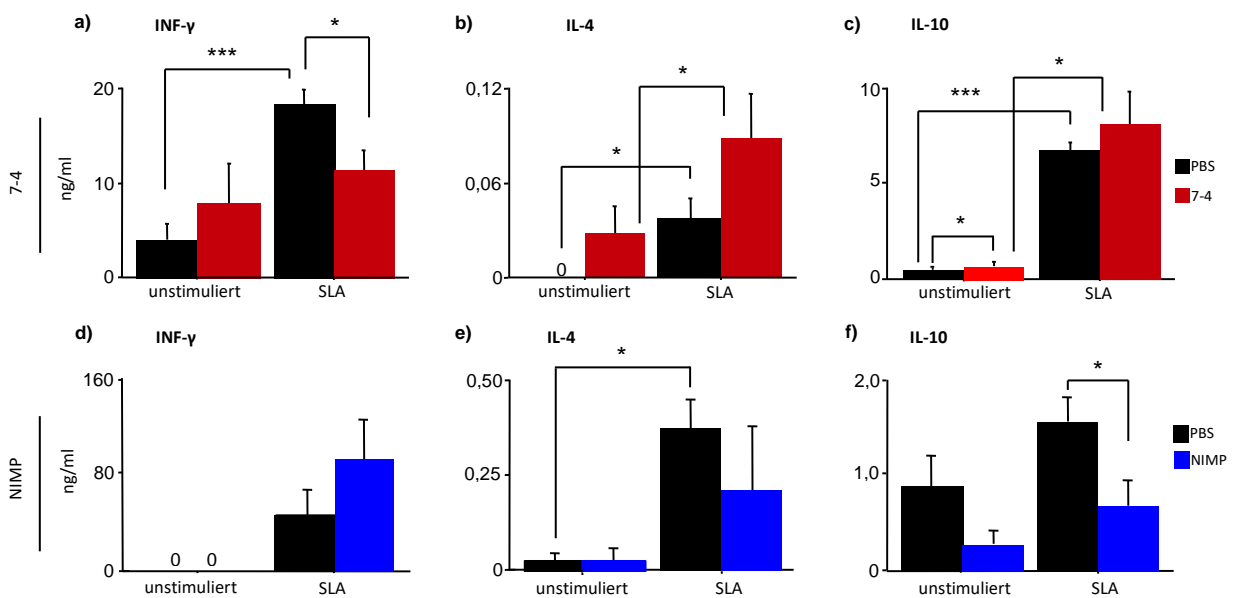


Abb. 19: Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Überständen SLA-stimulierter Zellen aus submandibulären Lymphknoten infizierter Mäuse. Infizierten, AK-behandelten C57BL/6 Mäusen wurden nach dreieinhalb Wochen die dLK entnommen. Die Zellen wurden isoliert und mit SLA stimuliert. Die sich in den Zellüberständen befindliche Zytokinkonzentration wurde nach 48 Stunden via ELISA bestimmt. Als Negativkontrolle fungierten Zellen aus PBS-behandelten Mäusen. **a - d)** Arithmetische Mittelwerte von x-Mäusen \pm SEM (5 Mäuse (Kontrollgruppe) bzw. 6 Mäuse (7-4-Gruppe) aus zwei unabhängigen Experimenten (a - c); 5 Mäuse (Kontrollgruppe) bzw. 3 Mäuse (NIMP-Gruppe) aus einem Experiment (d - f), * $p \leq 0,05$).

Die gemessenen Werte der IFN- γ -Konzentration der 7-4-Experimente sind in Abbildung 19a grafisch dargestellt. In den Überständen unstimulierter Zellen der PBS-Gruppe wurden $4,0 \text{ ng/ml} \pm 1,7 \text{ ng/ml}$ des Zytokins nachgewiesen. Im Vergleich dazu waren sie in der 7-4-Gruppe doppelt so hoch. Nach Restimulation der Zellen mittels SLA wurde in beiden Gruppen ein Anstieg der Zytokinkonzentration verzeichnet, wobei dieser in den Überständen der PBS-Gruppe deutlich ausgeprägter und statistisch signifikant war ($18,4 \text{ ng/ml} \pm 1,6 \text{ ng/ml}$, p-Wert: 0,0003). Auch die Differenz zwischen

der IFN- γ -Konzentration in den Überständen der SLA-stimulierten PBS-Gruppe im Vergleich zur SLA-stimulierten 7-4-Gruppe war signifikant. Die genauen Werte lagen bei 18,4 ng/ml \pm 1,6 ng/ml für die PBS-Gruppe und bei 11,4 ng/ml \pm 2,1 ng/ml, p-Wert: 0,03 für die 7-4-Gruppe.

In den Überständen unstimulierter dLK-Zellen wurde kein IL-4 (PBS-Gruppe) bzw. nur geringe Konzentrationen IL-4 (7-4-Gruppe) gemessen (s. Abb. 19b). Die Restimulation mit SLA führte bei beiden Zellpopulationen zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinsekretion. Die gemessenen Werte betragen für die PBS-Gruppe 0,08 ng/ml \pm 0,03 ng/ml (p-Wert: 0,04) und für die 7-4-Gruppe 0,04 ng/ml \pm 0,01 ng/ml (p-Wert: 0,05).

Ähnliches galt für die gemessene IL-10-Konzentration (vgl. Abb. 19c). Unstimulierte LK-Zellen produzierten lediglich geringe Mengen des Interleukins (0,2 ng/ml \pm 0,1 ng/ml (PBS), 0,7 ng/ml \pm 0,2 ng/ml (7-4)). Durch Stimulation mit SLA kam es bei beiden Gruppen zu einer signifikant erhöhten Sekretion (6,7 ng/ml \pm 0,4 ng/ml, p-Wert: 0,0001 (PBS)), (8,1 ng/ml \pm 1,7 ng/ml, p-Wert: 0,008 (7-4)).

Die Behandlung der Mäuse mit dem NIMP-AK zeigte im Hinblick auf die Zytokinsekretion durch dLK-Zellen gegensätzliche Ergebnisse. Unstimulierte Lymphozyten sezernierten generell nur geringe Mengen IFN- γ , IL-4 und IL-10. Eine Stimulation mit SLA führte vor allem in der NIMP-Gruppe zu einer gesteigerten IFN- γ -Sekretion (90,1 ng/ml \pm 31,8 ng/ml (NIMP) *versus* 45,0 ng/ml \pm 20,4 ng/ml (PBS), p-Wert: 0,25) (vgl. Abb. 19d).

IL-4 und IL-10 wurden nach Stimulation mit SLA sowohl durch die dLK-Zellen der PBS-Gruppe als auch die Zellen der NIMP-Gruppe vermehrt gebildet. Die Konzentration der Zytokine war jedoch in beiden Gruppen gering (Abb. 19e und 19f).

5 Diskussion

Die Leishmaniasis ist eine der häufigsten vektorübertragenen Erkrankungen weltweit. Die kutane Leishmaniasis wird durch die Spezies *L. major* hervorgerufen. Über die immunologischen Vorgänge der Wirt-Parasiten-Interaktion ist bereits Vieles bekannt, jedoch gibt es auch zu diesem Thema noch offene Fragen. Vor allem im Hinblick auf die Rolle der PMN existieren nur wenige, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Aufgrund des bestehenden Forschungsbedarfs wurde in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf die Rolle der PMN in der murinen experimentellen Leishmaniasis gelegt.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teilprojekte:

1. Die Identifikation spezifischer Rezeptoren und Oberflächenmoleküle, die für die Phagozytose von Leishmanien durch PMN von Relevanz sind.
2. Die Analyse der Bedeutung der PMN für den Krankheitsverlauf der murinen kutanen Leishmaniasis.

5.1 Infektionsversuche *in vitro*

5.1.1 Phagozytose amastigoter und promastigoter *L. major* durch PMN im Vergleich

PMN aus Mäusen des Genotyps C57BL/6 phagozytieren amastigote *L. major* wesentlich effizienter als Promastigote (Briem, 2009). Dieses von Briem im Jahr 2009 veröffentlichte Ergebnis konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Im direkten Vergleich der Daten zeigen sich jedoch große Unterschiede, was die Höhe der Infektionsraten betrifft. In der Arbeit von Briem betrug die lichtmikroskopisch ermittelte Infektionsrate der PMN, die mit CF-opsonisierten Amastigoten inkubiert wurden, durchschnittlich 80 %. Der Durchschnittswert für Promastigote lag bei 13 %. Die Ergebnisse unterscheiden sich damit deutlich zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Infektionsraten von 30 % und 4 %. Eine Erklärung der genannten Unterschiede könnten „Zählfehler“ sein, die durch die individuelle Wahrnehmung und Bewertung der mikroskopierenden Personen entstehen. Diese Fehlerquelle könnte ebenfalls begründen, weshalb die in dieser Arbeit gewonnenen Werte der Infektionsraten von CF-opsonisierten Amastigoten von Briems lichtmikroskopisch ermittelten Daten abweichen, mit Briems durchflusszytometrisch Daten jedoch konform gehen (die Infektionsraten liegen hier bei 40 %) (Briem, 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Gegensatz zu den *in vivo*-Experimenten, die von Beil bereits 1992 durchgeführt wurden. Ihre Daten belegen, dass murine PMN innerhalb von 24 Stunden promastigote *L. major* in hoher Anzahl phagozytierten (Infektionsrate: 75 %). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in *in vitro*-Experimenten mit humanen PMN. Auch sie phagozytierten promastigote *L. major* in größeren Mengen. Ergebnissen von Aga, Laufs und van Zandbergen zufolge, betragen die Infektionsraten - je nach Inkubationszeit (3 bis 48 Stunden) – 70 % bis 90 %, wobei die durchschnittliche Anzahl internalisierter Parasiten mit 2,5 angegeben wurde (Aga *et al.*, 2002; Laufs *et al.*, 2002; van Zandbergen *et al.*, 2004). Als mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wurde von Briem bereits die Interaktion des Fc γ -Rezeptors auf der Oberfläche muriner PMN mit Leishmanien-spezifischem IgG angeführt, das die Parasiten opsonisiert (Briem, 2009). Ob diese These durch die erhobenen Daten unterstützt werden kann, wird im Folgenden diskutiert.

5.1.2 Einfluss der Interaktion von Komplementfaktoren und -rezeptoren auf die Phagozytose von *L. major*

Die Rolle der Wechselwirkung zwischen CF und ihren Rezeptoren in Bezug auf eine suffiziente Phagozytose wurde schon für verschiedenste Erreger beschrieben. Auch für humane PMN konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion des Komplementrezeptors CR3 mit seinem Komplementfaktor C3bi für eine schnelle Phagozytose von amastigoten und promastigoten Leishmanien notwendig ist (Chang, 1981; Pearson und Steigbigel, 1981; Laufs *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können dies für murine PMN nicht eindeutig bestätigen. Es wurde gezeigt, dass nach Inkubation der Amastigoten mit CF diese durch PMN aus C57BL/6 Mäusen vermehrt aufgenommen wurden. Statistisch signifikant waren die Differenzen jedoch nicht. Eine mögliche Begründung hierfür könnte die Art der Anzucht der Amastigoten sein. Amastigote *L. major* wurden in suszeptiblen Balb/c Mäusen gezüchtet. Dies hatte zur Folge, dass die Parasiten zum Zeitpunkt ihrer Verwendung bereits zu einem gewissen Prozentsatz mit CF beschichtet waren. Durch die Inkubation mit NMS könnten demnach lediglich etwaige freie Bindungsstellen zusätzlich besetzt worden sein. Die Tatsache, dass sich eine leicht vermehrte Aufnahme der Parasiten zeigte, könnte ein Hinweis auf die Existenz solch freier Bindungsstellen sein. Diese könnten durch die Inkubation der Parasiten mit NMS

mit CF besetzt worden sein, was eine gesteigerte Interaktion der CR mit CF zur Folge hätte und die Aufnahme der Parasiten fördern würde.

Bezüglich der Phagozytose von promastigoten Leishmanien zeigten die *in vitro*-Infektionsexperimente dieser Arbeit keinen Unterschied zwischen unbehandelten und mit CF-opsonisierten Promastigoten. Im Gegensatz zu den Amastigoten wurden die Promastigoten in einem Kulturmedium gezüchtet. Folglich waren sie nicht mit CF opsonisiert. Erst nach Inkubation mit NMS lagerten sich CF an ihrer Oberfläche an. Durch den Vergleich der Ergebnisse der Infektionsraten ließ sich in diesem Fall sicher davon ausgehen, dass die Interaktion der CR mit CF keine Phagozytose-fördernde Rolle in Bezug auf promastigote *L. major* spielte.

5.1.3 Einfluss der Interaktion der Fcγ-Rezeptoren mit Leishmanien-spezifischem IgG auf die Phagozytose von *L. major*

FcγR werden von einer Reihe unterschiedlicher Phagozyten, wie Neutrophilen, Makrophagen und DCs, gebildet. Ihre Rolle bei der Phagozytose unterschiedlicher Mikroorganismen ist teilweise sehr gut untersucht. So ist bereits bewiesen, dass die Aufnahme von *L. major* durch DCs abhängig von der Interaktion des FcγRI und FcγRIII mit Leishmanien-spezifischem IgG ist (Woelbing *et al.*, 2006). Dies gilt ebenfalls für humane PMN. Eine effiziente Aufnahme von Promastigoten erfolgt durch sie ebenfalls serumabhängig mithilfe der FcγR (Laufs *et al.*, 2002). Murine Makrophagen phagozytieren amastigote *L. major* ebenfalls erst dann in signifikanter Anzahl, wenn die Parasiten mit Leishmanien-spezifischem IgG opsonisiert sind (Guy, Belosevic, 1993; Padigel und Farrell, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass FcγR keine wesentliche Rolle bei der Phagozytose von Amastigoten und Promastigoten durch murine PMN einnehmen. PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen, die auf ihrer Zelloberfläche keine FcγR exprimieren, phagozytierten Parasiten im gleichen Maße wie PMN aus C57BL/6 Mäusen. Die zusätzliche Inkubation der Parasiten mit IMS, d. h. eine zusätzliche Opsonisierung mit Leishmanien-spezifischem IgG, hatte hierauf ebenfalls keinen signifikanten Effekt. Des Weiteren wurde eine vergleichbare Anzahl amastigoter Leishmanien durch PMN (aus beiden Mausstämmen) aufgenommen, wenn sie aus μMT Mäusen stammen, die zu keiner Immunglobulinbildung in der Lage sind. Dies lässt den Schluss zu, dass die

Interaktion von Leishmanien-spezifischem IgG und den FcγR für eine Aufnahme der Parasiten nicht maßgeblich ist.

5.1.4 Einfluss von Phosphatidylserin auf die Phagozytose von promastigoten Leishmanien

Promastigote tragen auf ihrer Oberfläche viele unterschiedliche Virulenzfaktoren, die sich im Laufe ihrer Metazyklogeneese strukturell verändern. Bekannte Beispiele hierfür sind das Lipophosphoglykan (Turco und Descoteaux, 1992; Beverly und Turco, 1998) und die Metallopeptidase gp63, die durch Bindung und Spaltung von CF die Lyse der Parasiten verhindert (Brittingham *et al.*, 1995, Joshi *et al.*, 1998).

Zum Zeitpunkt der höchsten Virulenz tragen ca. 50 % der Promastigoten Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche (van Zandbergen *et al.*, 2006). Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, das zum Zeitpunkt der Apoptose von der Innenseite der Zellen nach außen transloziert wird. Es dient als sogenanntes „eat-me“-Signal der Zelle (Fadok *et al.*, 1998). Zur Phagozytose befähigte Zellen registrieren dieses Signal und eliminieren die Phosphatidylserin-tragende Zelle. Im Zusammenhang mit Makrophagen ist bekannt, dass eine erhöhte Konzentration an Phosphatidylserin auf der Oberfläche von Mikroorganismen mit einer erhöhten Phagozytoserate einhergeht (Borisenko *et al.*, 2003).

PMN sind ebenfalls in der Lage, apoptotische Mikroorganismen anhand von Phosphatidylserin zu erkennen, zu binden und aufzunehmen (van Zandbergen *et al.*, 2006). Ein Teil der vorliegenden Arbeit soll deshalb die Frage beantworten, ob es durch die Blockade des Phosphatidylserins auf der Oberfläche metazyklischer Promastigoter zu einer Veränderung der Infektionsrate und einer veränderten Anzahl internalisierter Parasiten pro Zelle kommt.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung eines Phosphatidylserin-blockierenden Antikörpers zu keiner signifikanten Veränderung in der Aufnahme promastigoter Leishmanien durch PMN führte. Phosphatidylserin scheint daher auf die Phagozytose der Parasiten durch murine Neutrophile keinen fördernden Einfluss zu haben.

Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weder die Interaktion der CR mit CF noch die Interaktion der FcγR mit Leishmanien-spezifischem IgG oder das Phospholipid „Phosphatidylserin“ obligat für die Phagozytose von Leishmanien sind. In Bezug auf die Phagozytose von Amastigoten durch murine PMN ist die Stellung des CR noch nicht vollständig geklärt. Die Identifikation phagozytoserelevanter Rezeptoren bleibt demnach weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

5.1.5 Zytokinsekretion durch infizierte murine neutrophile Granulozyten

Murine PMN sind in der Lage, zahlreiche Zytokine zu produzieren, die eine proinflammatorische, antiinflammatorische oder chemokine Wirkung haben. Hierzu gehören unter anderem das IL-10 als antiinflammatorisch wirkendes Zytokin sowie IL-12, TNF-α und IL-6 als proinflammatorische Zytokine (Tecchio *et al.*, 2014). Ob Leishmanien einen Einfluss auf die Sekretion genannter Zytokine nehmen, soll im Folgenden diskutiert werden.

Interleukin-12

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es durch die alleinige Infektion von PMN mit unbehandelten *L. major* zu keiner signifikanten Veränderung in der IL-12-Sekretion kommt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten mehrerer Studien überein, die zeigen, dass die alleinige Infektion von PMN mit *Leishmania* zu keinem Anstieg der IL-12-Produktion führt (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Charmoy *et al.*, 2007; Briem, 2009). Erst durch die Zugabe von IFN-γ werden PMN aus resistenten C57BL/6 Mäusen zu einer vermehrten Produktion von IL-12 angeregt (Charmoy *et al.*, 2007).

Eine geringe, wenn auch nicht signifikante Steigerung der IL-12-Konzentration wurde jedoch nach einer Infektion von C57BL/6 PMN mit CF-opsonisierten Parasiten gemessen. In der Literatur gibt es diesbezüglich keine vergleichbaren Daten. Bezogen auf Makrophagen ist bekannt, dass die Ligation des CR3 verantwortlich für die durch *L. major* verursachte Hemmung der IL-12-Produktion ist (Ricardo-Carter *et al.*, 2013). Würde dies ebenfalls für PMN gelten, sollte folglich eine zusätzliche Opsonisierung der Parasiten mit CF eine Senkung der Konzentration zur Folge haben. Die erhöhte Zytokinkonzentration ist daher a. e. auf eine rein zufallsbedingte Verteilung der Messwerte zurückzuführen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass die IL-12-Sekretion durch Makrophagen gehemmt wird, wenn IgGs an Fc γ R binden (Berger *et al.*, 1997; Cappiello *et al.*, 2001). Des Weiteren kommt es zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nach der Aufnahme apoptotischer, Phosphatidylserin-tragender Zellen (Voll *et al.*, 1997). Mehrere Versuchsansätze dieser Arbeit zeigten, dass dies für murine PMN nach einer Infektion mit *L. major* nicht gilt.

Tumornekrosefaktor- α

Bezüglich der Sekretion von TNF- α ist bekannt, dass sowohl humane als auch murine PMN das Zytokin nach Stimulation mit LPS produzieren (Wang *et al.*, 1994; Bennouna *et al.*, 2003; Briem, 2009). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass humane PMN in ihrer TNF- α -Sekretion durch Phagozytose apoptotischer (Phosphatidylserin-tragender) Parasiten gehemmt werden (van Zandbergen *et al.*, 2006).

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass die TNF- α -Sekretion durch murine PMN nach Infektion sowohl mit Amastigoten als auch mit Promastigoten tendenziell erhöht wurde. Die zusätzliche Opsonisierung der Parasiten mit CF oder Leishmanien-spezifischen AK hatte hierauf keinen Einfluss. Eine Ausnahme bildeten PMN aus Fc γ R^{-/-} Mäusen, die mit AK-opsonisierten Amastigoten aus μ MT Mäusen infiziert wurden. Sie sezernierten die höchste Menge an TNF- α , wobei bei diesem Versuchsansatz eine hohe Standardabweichung zu verzeichnen ist. Die Daten widersprechen der aktuellen Lehrmeinung, dass Neutrophile mit LPS stimuliert werden müssen, um vermehrt TNF- α zu sezernieren. Jedoch ist zu bedenken, dass die in dieser Arbeit gemessenen Unterschiede statistisch nicht signifikant sind. Es besteht daher theoretisch die Möglichkeit, dass die Differenzen rein auf eine zufallsbedingte Verteilung der Messwerte zurückzuführen sind. Vor allem in Bezug auf die hohe TNF- α -Konzentration, die durch die PMN aus Fc γ R^{-/-} Mäusen (die mit AK-opsonisierten μ MT Amastigoten infiziert waren) sezerniert wurde, ist am ehesten von einer zufallsbedingten Verteilung auszugehen, da sich die hohe Zytokinsekretion in keinem anderen Versuchsansatz reproduzieren ließ.

Ebenfalls diskrepant sind die Ergebnisse bezüglich der Hemmung der TNF- α -Sekretion nach Phagozytose apoptotischer Parasiten. Es ist bekannt, dass sich durch die Aufnahme apoptotischer Leishmanien das Zytokinmuster der infizierten PMN verändert. TNF- α wird in verringertem Maße sezerniert, während TGF- β vermehrt ausgeschüttet wird. Diese Zytokinkonstellation führt zu einer abgeschwächten

Immunreaktion und trägt zu einem Überleben der Parasiten innerhalb der PMN bei (van Zandbergen *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass PMN die gleiche Menge an TNF- α sezernieren, wenn sie unbehandelte oder mit Phosphatidylserin-AK beladene Promastigote phagozytieren. Nach dem aktuellen Kenntnisstand müssten PMN, die unbehandelte Promastigote phagozytieren, weniger TNF- α produzieren, da auch immer ein bestimmter Prozentsatz an apoptotischen, Phosphatidylserin-positiven Parasiten mit aufgenommen wird, der das Überleben der Phosphatidylserin-negativen Parasiten sichert (van Zandbergen *et al.*, 2006). Eine Erklärung wäre, dass ein zu geringer Prozentsatz der Promastigoten apoptotisch war und damit nur ein kleiner Teil der Parasiten das Phospholipid auf ihrer Oberfläche exprimierte. Somit kam es zu keiner relevanten Hemmung der Zytokinsekretion durch Phosphatidylserin. Eine vorherige Bestimmung der Anzahl an Phosphatidylserin-tragenden Promastigoten (beispielsweise mittels FACS) ist daher in weiteren Versuchsreihen notwendig.

Interleukin-10

In Bezug auf PMN wurde bereits gezeigt, dass diese Zellen *in vitro* nur durch Hinzugabe eines zusätzlichen stimulierenden Faktors, wie beispielsweise INF- γ , vermehrt IL-10 bilden. Eine Infektion der Zellen mit Leishmanien als alleinigen Stimulus reicht hierfür nicht aus (Venuprasad *et al.*, 2002; Charmoy, M. *et al.*, 2007; Briem, 2009). Zu konträren Ergebnissen kamen jedoch Carlsen und seine Gruppe. Er konnte zeigen, dass eine Infektion von PMN aus C57BL/6 Mäusen mit amastigoten *L. amazonensis* eine erhöhte IL-10-Sekretion zur Folge hat (Carlsen *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit war nach der Infektion muriner PMN mit unbehandelten promastigoten und amastigoten *L. major* eine leicht erhöhte IL-10-Sekretion zu verzeichnen. Diese Konzentrationserhöhung war jedoch in keiner Versuchsreihe statistisch signifikant, was die Ergebnisse von Venuprasad, Charmoy und Briem unterstützt.

In Bezug auf die unterschiedlichen Oberflächenmoleküle von APC bzw. *Leishmania* im Zusammenhang mit IL-10 ist Folgendes bekannt. Eine Infektion mit *L. major* des Mausstammes J_H auf BALB/c Hintergrund – dieser ist nicht in der Lage, AK zu produzieren – verläuft nach der Injektion eines Immunsersums mit Leishmanien-spezifischem IgG deutlich fulminanter und geht mit einer signifikant erhöhten IL-10-Sekretion einher (Miles *et al.*, 2005). Bezogen auf murine Makrophagen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Opsonisierung

Amastigoter mit IgG eine Bindung an FcγR der APC ermöglicht und zusammen mit einem Co-Faktor (LPS) zu einer erhöhten IL-10-Sekretion führt (Kane und Mosser, 2001). Über die IL-10-Sekretion durch murine PMN im Hinblick auf unterschiedliche Oberflächenmoleküle ist bis dato kaum etwas bekannt.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Opsonierungen der Leishmanien mit CF oder AK sowie Blockaden des Phosphatidylserins auf der Oberfläche promastigoter Leishmanien auf die IL-10-Sekretion durch Neutrophile keinen signifikanten Einfluss haben.

Die deutliche Erhöhung der Zytokinsekretion durch PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen, die mit AK-opsonisierten Amastigoten infiziert wurden, lässt sich mit den bisherigen Kenntnissen nicht erklären - zumal sich der Anstieg der Zytokinsekretion bei PMN aus C57BL/6 Mäusen, die mit AK-opsonisierten Amastigoten infiziert wurden, nicht nachweisen lässt, und ebenfalls bei PMN aus FcγR^{-/-} Mäusen, die mit AK-opsonisierten μMT Amastigoten infiziert wurden, ausblieb. Da die beschriebene Erhöhung der IL-10-Sekretion zusätzlich keine statistische Signifikanz aufweist, ist von einer zufallsbedingten Verteilung der Messwerte auszugehen.

Interleukin-6

Studien zur Infektion mit *L. donovani* zeigen, dass infizierte IL-6^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund im Vergleich zu Wildtypmäusen einen weniger aggressiven Krankheitsverlauf aufweisen (Murray, 2008). Jedoch konnte Titus im Jahre 2001 nachweisen, dass BALB/b Mäuse, die nicht in der Lage sind, IL-6 zu bilden, weiter anfällig für eine Infektion mit *L. major* bleiben (Titus *et al.*, 2001). IL-6^{+/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund scheinen wiederum ebenso resistent gegen Leishmanien zu sein wie IL-6^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund (Moskowitz *et al.*, 1997). Die Rolle des Zytokins im Krankheitsbild der Leishmaniasis, bezogen auf PMN, ist weitestgehend ungeklärt. Unbehandelte PMN produzieren kein IL-6 (Liu *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Dissertation können dies bestätigen. Des Weiteren sezernierten in der vorliegenden Arbeit auch infizierte, murine PMN keine wesentlichen Mengen des Interleukins. Als Stimulus für die IL-6-Produktion reichen demnach Leishmanien allein nicht aus. Die zusätzliche Opsonisierung der Parasiten mit CF oder Leishmanien-spezifischem IgG sowie die Blockade des Phosphatidylserins auf der Oberfläche promastigoter Leishmanien hatte hierauf ebenfalls keinen Einfluss.

5.2 Behandlung von C57BL/6 Mäusen mit PMN-depletierenden Antikörpern

In diesem Teil der Arbeit galt das Interesse der Frage, welche Bedeutung neutrophile Granulozyten für den Verlauf der murinen, kutanen Leishmaniasis haben. Hierzu wurde die Ausprägung der nach der Infektion mit *L. major* entstandenen Läsionen bei C57BL/6 Mäusen bestimmt, die Zellzusammensetzung an der Inokulationsstelle ermittelt und der Einfluss der PMN auf das Priming von Lymphozyten untersucht.

5.2.1 Messung der Läsionsvolumina nach einer Infektion mit *L. major* in AK-behandelten und PBS-behandelten Mäusen

Zunächst galt das Interesse der Frage, welche Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf eine Minimierung der PMN in C57BL/6 Mäusen im Falle einer Infektion mit *L. major* hat. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Mäuse, denen PMN-depletierende AK vor, während und zwei Wochen nach einer Hochdosisinfektion mit *L. major* injiziert wurden, signifikant kleinere Läsionen entwickelten als die Kontrollgruppe.

Um dieses Ergebnis diskutieren zu können, muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Depletion der PMN sowohl mit dem 7-4-AK als auch mit dem NIMP-AK nicht einwandfrei funktioniert hat (s. u.). Die Thesen, die im Folgenden aufgestellt werden, gehen von der Annahme aus, dass die Depletion zumindest zeitweise gelang.

Die generelle Zunahme des Läsionsvolumens lässt sich, wie bereits von Lopez Kostka beschrieben, primär durch eine akute Entzündungsreaktion erklären (Lopez Kostka *et al.*, 2009). Sie wird durch die frühe Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und deren Sekretion bestimmter proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α , gefördert und aufrechterhalten (McFarlane *et al.*, 2008). Da die Immigration von Neutrophilen an der Inokulationsstelle der PMN-depletierten Tiere in dieser Arbeit zum Großteil ausblieb, kam es demnach zu keiner signifikanten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Die Folge war eine abgeschwächte Entzündungsreaktion, die mit der Ausbildung kleinerer Granulome einherging.

Welche zellulären Vorgänge an der Inokulationsstelle der Parasiten abliefen, lässt sich nur vermuten. Wahrscheinlich kam es zunächst zu einer unkontrollierten Vermehrung der Leishmanien in ebenfalls an die Inokulationsstelle eingewanderten Makrophagen.

Dies würde mit den Ergebnissen von Ribeiro-Gomes konform gehen. Sie konnte zeigen, dass es durch die Koinkubation toter Neutrophiler und infizierter Makrophagen aus C57BL/6 Mäusen zu einer TNF-a-abhängigen Eliminierung der intrazellulären Parasiten kommt. Des Weiteren führte eine Injektion toter Neutrophiler zu einer Verringerung der Parasitenlast in C57BL/6 Mäusen (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnten sich folglich – aufgrund der Depletion der PMN – die Parasiten massiv vermehren.

Zu konträren Ergebnissen kamen unter anderem Tacchini-Cottier (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000) und Chen (Chen *et al.*, 2005). Sie ermittelten die Läsionsgrößen von mit *L. major* infizierten, resistenten Mäusen, deren PMN vor der Infektion einmalig mithilfe des AK NIMP-R14 bzw. RB6-8C5 depletiert wurden. Die PMN-depletierten Tiere entwickelten innerhalb der ersten 21 Tage größere Läsionen und wiesen eine höhere Parasitenlast auf als die unbehandelten Tiere. Jedoch heilten bei beiden Gruppen die Läsionen nach acht Wochen aus (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000).

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten mit den unterschiedlichen Versuchsansätzen zusammenhängen. Wie bereits erwähnt, wurden in der vorliegenden Arbeit die Neutrophilen über die gesamte Versuchsdauer depletiert. Bei Chen und Tacchini-Cottier hingegen wurde der Zustrom der PMN an die Inokulationsstelle der Parasiten durch die einmalige AK-Gabe, die ein Tag bzw. sechs Stunden vor der Infektion erfolgte, nur wenige Tage verhindert. In dieser Zeit konnten die Parasiten ungehindert proliferieren (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Es könnte daher zu einer zwar verzögerten, aufgrund der hohen Parasitenlast jedoch verstärkten PMN-Einwanderung und damit zu einer erhöhten Entzündungsreaktion gekommen sein. Da auch in dieser Arbeit von einer erhöhten Parasitenlast auszugehen ist (s. o.), PMN jedoch über den gesamten Versuchszeitraum hinweg depletiert wurden, fand der verstärkte Neutrophilen-Einstrom nicht statt. Eine ausgeprägte Entzündungsreaktion blieb demnach aus.

Des Weiteren wurden in den unterschiedlichen Versuchsansätzen unterschiedliche AK verwendet, die alle die Eigenschaft besitzen – neben Neutrophilen – weitere Zellpopulationen zu depletieren. RB6-8C5 richtet sich beispielsweise sowohl gegen murines Ly6G als auch gegen Ly6C. Eine Behandlung der Mäuse mit diesem AK führt zu einer ausgeprägten Neutropenie, die bis zu fünf Tage anhält (Lewinsohn *et al.*, 1987; Fleming *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1993). Ly6C kommt jedoch auch auf der Oberfläche

von Monozyten und Subpopulationen von Lymphozyten vor, sodass diese Zellreihen ebenfalls beeinflusst werden (Jutila *et al.*, 1988; Walunas *et al.*, 1995; Daley *et al.*, 2007). Der NIMP-AK erkennt murines Ly6G und führt nach Verabreichung zu einer fast vollständigen Depletion der PMN für max. drei Tage (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Charmoy *et al.*, 2011; Gillis *et al.*, 2016). Einige Studien zeigen jedoch, dass es nach Verwendung des AK ebenfalls zu einer deutlich reduzierten Anzahl Monozyten im peripheren Blut kommt (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2014; Gillis *et al.*, 2016; Beutier *et al.*, 2016). Der AK 7-4 richtet sich gegen das Antigen Ly6B.2 und depletiert sowohl Neutrophile als auch Monozyten (Rosas *et al.*, 2010). Hier zeigt sich, dass die Ergebnisse auch aufgrund zusätzlicher Depletionen anderer Zellpopulation entstehen könnten.

Wie bereits erwähnt, setzen diese Vermutungen bzw. Erklärungsansätze für die erhaltenen Ergebnisse voraus, dass die Depletion der PMN nur punktuell scheiterte. Dies muss in weiteren Experimenten überprüft werden, da es sich für den Fall, dass die PMN gar nicht depletiert wurden, um rein AK-spezifische Effekte handeln könnte, die aktuell jedoch nicht näher erklärt werden können.

5.2.2 Bestimmung der Zellzusammensetzung an der Inokulationsstelle der Leishmanien

W. J. Beil hat bereits 1992 via Elektronenmikroskopie die Zusammensetzung der Zellen an der Inokulationsstelle der Leishmanien bis zwölf Tage nach der Infektion untersucht. Sie konnte zeigen, dass in resistenten C57BL/6 Mäusen nach knapp zwei Wochen vor allem Makrophagen das Zellbild bestimmten. Aber auch eosinophile Granulozyten waren zu 30 % nachweisbar. Lymphozyten kamen nur im geringen Maße vor (5 %). Neutrophile Granulozyten wurden nicht beschrieben (Beil *et al.*, 1992).

Y. Belkaid zeigte unter Verwendung der Durchflusszytometrie, dass vier Wochen nach einer *low-dose*-Infektion von C57BL/6 Mäusen wenige Makrophagen und dendritische Zellen an der Inokulationsstelle das Zellbild bestimmten. Parallel zu einer massiven Erhöhung der Parasitenlast in Woche Fünf kam es zu einem deutlichen Anstieg der Makrophagen, Eosinophilen, und Neutrophilen (Belkaid *et al.*, 2000).

Die beschriebene Zusammensetzung des Zellinfiltrates in beiden Arbeiten ist ähnlich zu der in der hier vorliegenden Arbeit. Die regelmäßige Injektion des 7-4-AK in C57BL/6 Mäuse hatte hierauf keinen signifikanten Einfluss. Daraus folgt zunächst, dass die Depletion der PMN nicht einwandfrei funktionierte. Bei einer erfolgreichen Depletion hätten 7-4⁺-Zellen und Gr1⁺-Zellen nicht bzw. zumindest signifikant weniger detektiert werden müssen. Es zeigten sich diesbezüglich jedoch lediglich Tendenzen. Fraglich ist nun, ob die Depletion der PMN während des gesamten Versuches nicht funktionierte, oder ob dies lediglich punktuell nicht gelang. Die geringere Anzahl der F4/80⁺-Zellen (die vor allem Makrophagen repräsentieren) und CD11c⁺-Zellen (die vor allem DCs darstellen) könnte ein Hinweis dafür sein, dass die PMN zumindest zeitweise depletiert wurden. Warum das so ist, lässt sich mit den Ergebnissen von Cassatella, Sapini und Chen erklären. Sie konnten zeigen, dass Neutrophile durch die Sekretion von bestimmten Chemokinen und Zytokinen antigenpräsentierende Zellen rekrutieren und aktivieren können (Cassatella, 1999; Scapini *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). Aufgrund der reduzierten PMN-Anzahl fällt dieser Effekt deutlich geringer aus, was die geringere Anzahl an Makrophagen und DCs erklären würde. Letztlich ist jedoch zu beachten, dass in der Kontrollgruppe ebenfalls nur wenig F4/80- und CD11c⁺-Zellen angefärbt werden konnten. Daher ist die zuvor getroffene These rein spekulativ.

Die Ergebnisse der mit NIMP behandelten Mäuse zeigen, dass auch für diesen Fall die Depletion der PMN – aufgrund der im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlich hohen Prozentzahl an 7-4, Gr1- und Ly6G⁺-Zellen – nicht funktionierte. Eine Aussage, ob dies für die gesamte Versuchsdauer gilt, oder nur vereinzelt nicht funktionierte, ist nicht möglich. Interessanterweise zeigt sich bei der AK-behandelten Gruppe eine signifikante Zunahme der F4/80- und CD11c⁺-Zellen. Dieses Ergebnis spricht eher dafür, dass die Depletion während des gesamten Experiments nicht funktionierte, da – wie bereits für den 7-4-AK diskutiert – beide Zellreihen eher im geringeren Maße hätten vorkommen müssen. Ob dieses Ergebnis ggf. AK-spezifischen Effekten geschuldet ist, bleibt zu prüfen.

5.2.3 Spielen neutrophile Granulozyten beim Priming der Lymphozyten eine Rolle?

Von Neutrophilen war lange Zeit lediglich bekannt, dass sie eingedrungene Erreger phagozytieren und eliminieren können. Weitere Studien konnten zeigen, dass sie darüber hinaus eine große Anzahl verschiedener Stoffe sezernieren, die u. a. als Chemokine für verschiedene Zellen, wie Makrophagen, DCs oder T-Lymphozyten, fungieren (Cassatella, 1999; Scapini *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). Hinzukommend sezernieren sie unter speziellen Bedingungen IL-12, das für die Entwicklung einer protektiven Th1-Zell-vermittelten Immunantwort verantwortlich ist (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass PMN nicht nur MHC-I-Moleküle, sondern ebenfalls (unter bestimmten Bedingungen) MHC-II-Moleküle exprimieren. Damit sind sie potenziell in der Lage, Antigene sowohl CD8⁺-T-Zellen als auch CD4⁺-T-Zellen gegenüber zu präsentieren (Culshaw *et al.*, 2008) und stellen eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem dar.

In dieser Arbeit wurde nun der Frage nachgegangen, ob neutrophile Granulozyten beim Priming der Lymphozyten eine Rolle spielen. Mittels SLA restimulierte Lymphozyten aus infizierten, 7-4-behandelten Mäusen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringere T-Zell-Proliferationsraten. Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor genannten Daten der *in vitro*-Experimente von Culshaw und lässt vermuten, dass PMN nicht nur MHC-I- und MHC-II-Komplexe ausbilden, sondern auch CD4 bzw. CD8⁺-T-Zellen aktivieren können.

Zu beachten ist jedoch, dass die Depletion der PMN nicht zuverlässig funktionierte. Das Ausmaß konnte jedoch nicht ermittelt werden (s. Abschnitt 5.2.2). Es sind daher neue Versuchsreihen notwendig, in denen die Depletion der PMN zweifelsfrei funktioniert, um die Ergebnisse zu bestätigen.

Ein widersprüchliches Ergebnis zeigte sich bei der Restimulation von LK-Zellen aus Mäusen, die mit dem NIMP-AK behandelt wurden. Eine Erklärung hierfür ist, dass, wie bereits mehrfach erwähnt, die Depletion der PMN nicht funktionierte. Die Auswirkung einer PMN-Depletion kam in diesem Fall nicht zum Tragen. Des Weiteren zeigte sich in den vorherigen Experimenten dieser Arbeit eine erhöhte Anzahl Makrophagen und DCs an der Parasiteninokulationsstelle NIMP-behandelter Tiere. Diese APC bilden das Oberflächenmolekül MHC-II aus und präsentieren CD4⁺-T-Zellen die prozessierten Antigene. Sie sind damit ein wichtiger Faktor in der Ausbildung einer Th1- bzw. Th2-

Zell-vermittelten Immunantwort und verantwortlich für das Priming der T-Zellen. Es ist daher nicht überraschend, dass ein Priming der T-Zellen stattgefunden hat und die T-Zellen der NIMP-Gruppe nach erneutem Antigenkontakt sogar leicht verstärkt proliferierten.

5.2.4 Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die Zytokinsekretion von Lymphozyten

Bestimmte Zytokine sind für die Ausbildung einer Th1- bzw. Th2-vermittelten Immunantwort von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde die Konzentration der Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- γ in den Überständen von dLK-Zellen aus infizierten Mäusen bestimmt, um den Einfluss der PMN auf die Ausbildung einer Th1- bzw. Th2-Immunantwort zu ermitteln.

Das führende Zytokin in den Überständen der dLK-Zellen aus infizierten Kontrollmäusen der 7-4-Versuchsreihe war IFN- γ . IL-10 und IL-4 waren kaum detektierbar. Diese Zytokinkonstellation geht mit den bisherigen Ergebnissen konform, dass in C57BL/6 Mäusen nach einer Infektion mit *L. major* eine protektive Th1-dominierende Immunantwort induziert wird (Sacks und Noben-Trauth, 2002; McFarlane *et al.*, 2008).

Nach Restimulation der Lymphozyten mit SLA zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg aller drei Zytokinkonzentrationen. Dabei erhöhte sich die IL-10-Konzentration um das 33-Fache der Ausgangskonzentration. Die IFN- γ -Konzentration stieg hingegen nur um das 4,6-Fache an, blieb aber aufgrund der höheren Ausgangskonzentration trotzdem das Zytokin mit der höchsten Konzentration. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die verwendeten Lymphozyten auf Leishmanienantigene geprägt waren und nach erneutem Antigenkontakt wieder mit einem Th1-spezifischen Zytokinprofil reagierten. Der gleichzeitig deutlich erhöhte Anstieg der IL-10-Konzentration bestätigt die Ergebnisse von Daftarian, dass proinflammatorische Zytokine zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-10 führen, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern (Daftarian *et al.*, 1996, Couper *et al.*, 2008).

Die Zytokinkonstellation in Überständen von Mäusen der 7-4-Gruppe war vor der Restimulation der Lymphozyten mit SLA ähnlich der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis unterstützt die bisherigen Erkenntnisse, dass die PMN für die Ausbildung einer Th1-vermittelten Immunantwort nicht obligat zu sein scheinen (Lima *et al.*, 1998; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005).

Nach Restimulation der Zellen mit SLA zeigten sich jedoch Unterschiede. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe wurde durch dLK-Zellen aus 7-4-behandelten Mäusen signifikant weniger INF- γ freigesetzt. Die Sezernierung von IL-4 und IL-10 war wiederum signifikant erhöht. Diese Zytokinkonstellation spricht nicht mehr eindeutig für eine Th1-dominierende Immunantwort. Demnach scheinen PMN – wie bereits erwähnt – für die primäre Ausbildung einer Th1-vermittelten Immunantwort nicht notwendig zu sein, wirken aber offensichtlich unterstützend bei deren Ausbildung nach erneutem Parasitenkontakt.

Da in dieser Arbeit die strikte Depletion der PMN über die gesamte Versuchsdauer nicht erfolgte und die Anzahl an Versuchen und Tieren gering ist, müssen die Ergebnisse jedoch kritisch bewertet werden. Weitere Versuche mit einer gesicherten Depletion der PMN über die gesamte Versuchsdauer sind sicher notwendig.

Konträre Ergebnisse zur 7-4-Gruppe zeigten sich in der Versuchsreihe, in der der NIMP-AK verwendet wurde. Lymphozyten aus infizierten PBS-Mäusen sezernierten ebenso wie LK-Zellen aus NIMP-Mäusen kein INF- γ und nur geringste Mengen IL-4 und IL-10. Nach Restimulation der Zellen mit SLA wurden in beiden Gruppen hohe Mengen an INF- γ gemessen.

Da in beiden Gruppen nach SLA-Stimulation INF- γ das führende Zytokin ist, während sich die antiinflammatorischen Zytokine nur in geringen Konzentrationen nachweisen lassen, spricht dies für eine Th1-Zell-vermittelte Immunantwort, die nach erneutem Antigenkontakt in beiden Gruppen induziert wurde. Eine Interpretation der Ergebnisse in die Richtung, dass die PMN keinen Einfluss auf die Immunantwort nach Restimulation haben, ist jedoch nicht zulässig, da – wie bereits erwähnt – die PMN-Depletion nicht zuverlässig funktionierte.

Zusammenfassung

Abschließend lässt sich festhalten, dass aufgrund der unzuverlässigen PMN-Depletion keine eindeutige Aussage über die Funktion der PMN im Krankheitsverlauf der Leishmaniasis möglich ist. Das Thema bleibt demnach weiter Bestandteil der künftigen Forschung.

6 Zusammenfassung

Die Rolle der murinen PMN innerhalb der Leishmaniasis ist noch nicht vollständig geklärt. Insbesondere bezüglich der immunologischen Vorgänge der Wirts-Parasiten-Interaktion auf zellulärer Ebene gibt es noch ungeklärte Fragen.

Ein Teilprojekt dieser Arbeit umfasste daher die Identifikation spezifischer, für die Phagozytose von Leishmanien relevanter Oberflächenmoleküle auf Parasiten und neutrophilen Granulozyten in *in vitro*-Untersuchungen.

FcγR und CR konnten im Wesentlichen als Phagozytose-relevante Rezeptoren ausgeschlossen werden. Das auf apoptotischen Zellen und Mikroorganismen vorkommende Phosphatidylserin stellte ebenfalls kein relevantes Oberflächenmolekül bei der Internalisierung von Leishmanien durch PMN dar. Eine Ausnahme bildete die Interaktion der CR mit CF bei der Phagozytose von Amastigoten durch murine PMN. Da die verwendeten Amastigoten jedoch durch die Anzucht in Balb/c Mäusen bereits mit CF opsonisiert waren, war keine sichere Aussage über den Stellenwert der CR bei der Phagozytose amastigoter Leishmanien möglich.

Um die Bedeutung der CR in diesem Zusammenhang genauer zu erforschen, wäre eine Option die Verwendung von CR-knockout-Mäusen (Rooyackers und Stokes, 2005), deren Zellen diese Moleküle auf ihrer Oberfläche nicht ausbilden. Ein anderer Ansatz wäre, amastigote Leishmanien in speziellen Medien zu kultivieren, die frei von CF sind. In beiden Fällen könnte keine CF-CR-Interaktion stattfinden.

Das zweite Teilprojekt dieser Arbeit befasste sich mit der Frage, ob und ggf. welche Rolle PMN innerhalb der murinen kutanen Leishmaniasis *in vivo* besitzen. Hier zeigte sich anhand der Zusammensetzung der Wirtszellen an der Inokulationsstelle der Parasiten, dass eine Depletion sowohl mit 7-4-AK als auch mit dem NIMP-AK nicht einwandfrei funktionierte. Die Ergebnisse waren daher alle nur eingeschränkt verwertbar.

AK-behandelte Mäuse bildeten kleinere Läsionen aus als die Kontrollgruppe. Aufgrund der signifikanten Unterschiede wurde gefolgert, dass die PMN teilweise depletiert wurden und dadurch die Ausbildung einer Entzündungsreaktion verringert wurde.

In weiteren Versuchsreihen zeigte sich, dass der Gebrauch der oben genannten AK Veränderungen der Zellzusammensetzung an der Inokulationsstelle der Leishmanien zur Folge hatte. In der 7-4-Gruppe waren tendenziell alle Zellreihen weniger nachweisbar als in der Kontrollgruppe. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Depletion der PMN zumindest teilweise funktionierte und dadurch die Sekretion bestimmter Chemokine ausblieb, die APC an den Infektionsherd locken. Durch im Anschluss durchgeführte Restimulationsexperimente mit SLA gab es Hinweise, dass die PMN für die Ausbildung einer primären Th1-vermittelten Immunantwort zwar nicht obligat sind, aber unterstützend bei deren Ausbildung nach erneutem Parasitenkontakt wirken.

Nach der Behandlung der Mäuse mit dem NIMP-AK zeigten sich in den verschiedenen Versuchsreihen teilweise entgegengesetzte Ergebnisse. Es wurde vermutet, dass beide AK unterschiedlich zuverlässig (wenn auch beide nicht 100 %ig) PMN depletieren. Darüber hinaus könnte es sich hierbei zusätzlich um antikörperspezifische Effekte gehandelt haben, da beispielsweise beide AK nicht ausschließlich PMN depletieren.

Ein Ansatzpunkt zum besseren Verständnis der Rolle der Neutrophilen im Rahmen der Leishmaniasis ist die Verwendung des *low-dose*-Leishmanien-Infektionsmodells. Hierbei wird den Mäusen eine physiologische Dosis Parasiten injiziert. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass es durch die reduzierte Parasitenanzahl, im Vergleich zum Hochdosismodell, zu veränderten, dem humanen Krankheitsbild ähnlicheren Ergebnissen kommt. Wichtig ist es, im Zusammenhang mit der vorliegenden Fragestellung, eine Beeinflussung von anderen Zellreihen möglichst zu verhindern. Die Verwendung des 1A8-AK wäre gegebenenfalls eine sinnvolle Alternative, da er sich nur gegen murines Ly6G richtet und ausschließlich Neutrophile depletieren soll (Fleming *et al.*, 1993; Daley *et al.*, 2008). Allerdings werden von diesem AK sehr hohe Dosen gebraucht und die Depletion hält nicht lange an (Daley *et al.*, 2008; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012).

Abschließend lässt sich sagen, dass die genaue Funktion der PMN innerhalb der Leishmaniasis weiterhin nicht vollständig verstanden wurde und ein spannendes Thema der aktuellen Forschung bleibt.

7 Literaturverzeichnis

- Aga E, Katschinski D. M., van Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Müller K., Solbach W., Laskay T. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology*; vol. 169, no. 2, pp. 898–905, 2002
- Altmeyer P., (2018) “Leishmaniasis (Übersicht)” <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/leishmaniasis-ubersicht-2253>; 07.07.2018
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T. and Courret, N., (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.*; 6: 392-401
- Arens R. und Schoenberger S.P.; Plasticity in programming of effector and memory CD8+ T-cell formation (2010); *Immunol Rev*. 2010 May; 235(1): 190–205.
- Awasthi, A., Mathur, R. K. and Saha, B., (2004) Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.*, 119: 238-58
- Bates, P. A., (1994) The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.*; 79: 215-8
- Beil, W. J., Meinardus-Hager, G., Neugebauer, D. C., Sorg, C. J. (1992) Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice.; *Leukoc Biol*; 52(2):135-42
- Belkaid, Y., Butcher, B., Sacks, D. L. (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur. J. Immunol.*; 28: 1389 – 1400
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., and 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 - 977
- Belkaid, Y., von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C. and Sacks, D., (2002) CD8T Cells Are Required for Primary Immunity in C57BL/6 Mice Following Low-Dose, Intradermal Challenge with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*; 168: 3992– 4000
- Beutier H, Gillis CM, Iannascoli B., Godon O, England P, Sibilano R, et al. (2016) IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol*. (2017) 139:269–80 e267. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.028.
- Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J., and Denkers, E. Y. (2003) Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol*. 171: 6052 - 6058

- Ben-Sasson, S. Z., Le Gros, G., Conrad, D. H., Finkelman, F. D. and Paul, W. E., (1990) Cross-linking Fc receptors stimulate splenic non-B, non-T cells to secrete interleukin 4 and other lymphokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87: 1421-5
- Berger S, Chandra R, Ballo H, Hildenbrand R, Stutte HJ. (1997) Immune complexes are potent inhibitors of interleukin-12 secretion by human monocytes. *Eur J Immunol*. 1997; 27:2994–3000
- Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Röllinghoff, M. and Moll, H., (1993) Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis*, ; 167 : 418-25
- Blos, M., Schleicher, U., Soares Rocha, F. J., Meissner, U., Rollinghoff, M., and Bogdan, C. (2003) Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur.J.Immunol*. 33: 1224 - 1234.
- Bogdan, C. and Rollinghoff, M. (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol.Today*. 15: 22 - 28
- Borisenko, GG., Matsura, T., Liu, S.X., Tyurin, V.A., Jianfei, J., Serinkan, F.B., Kagan, V.E., (2003) Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys*.; 1;413(1):41-52
- Briem S. (2009) Die Rolle der Neutrophilen Granulozyten in der kutanen Leishmaniasis unter Berücksichtigung der Interaktion mit MΦ und DC, Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Hautklinik
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A., (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria *Science* ; 5; 303(5663):1532-5
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *The Journal of Immunology* 155(6):3102-11
- Cappiello MG, Sutterwala FS, Trinchieri G, Mosser DM, Ma X. (2001) Suppression of Macrophage IL-12 Transcription Following Fcγ Receptor Ligation. *Journal of Immunology*. 2001 1;166(7):4498-506
- Carlsen E. D, Hay C, Henard C. A, Popov V, Garg N. J, Soong L. (2013) *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect. Immun*. 2013 Nov;81(11):3966-74. doi: 10.1128/IAI.00770-13. Epub 2013 Aug 5
- Carlsen E. D., Liang Y., Shelite T. R, Walker D. H., Melby P. C., Soong L. (2015) Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis *The Journal of Translational Immunology* doi:10.1111/cei.12674

- Cassatella M. A., (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.*;73:369-509
- Chan K. P., (1981) Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg.*; 30(2):322-33
- Charmoy M., Auderset, F., Allenbach, C., and Tacchini-Cottier, F., (2009) The Prominent Role of Neutrophils during the Initial Phatthe involvmentse of Infection by Leishmania Parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010:719361. doi: 10.1155/2010/719361. Epub 2009 Oct 25
- Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C., Monnat, K., Breton, M., Ronet, C., Launois, P., and Tacchini-Cottier, F. (2007) Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol*; 82(2):288-99
- Charmoy M, Milon G, Tacchini-Cottier F. (2011) Role of neutrophils in the early shaping of the Leishmania major specific immune response in experimental murine cutaneous Leishmaniasis. In: Tacchini-Cottier F, van Zandbergen G, editors. *Neutrophils in Infectious Diseases*. Sharjah: Bentham Science Publishers Ltd; (2011). p. 49–58.
- Chen, L., Z. H. Zhang, T. Watanabe, T. Yamashita, T. Kobayakawa, A. Kaneko, H. Fujiwara, and F. Sendo. (2005). The involvement of neutrophils in the resistance to Leishmania major infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol. Int.*; 54:109–118
- Coffman R.L., B.W. Seymour, D. A. Leberman, D. D. Hiraki, J. A. Christiansen, B. Shrader, H.M. Cherwinski, H. F. Savelkoul, F. D. Finkelman, M.W. Bond, and et al., (1988) The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol; Rev*, 102: 5-28
- Couper K.N, Blount D.G., Riley E.M., (2008) IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.*; 180:5771-5777
- Daftarian P. M., Kumar A, Kryworuchko M., Diaz-Mitoma F. (1996) IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factoralpha. *J Immunol* 157: 12-20
- Daley J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., Albina, J.E., (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol.*; 83(1):64-70
- Dedet J.P., Pratlong, F., Lanotte, G. and Ravel, C., (1999) Cutaneous leishmaniasis. The parasite. *Clin Dermatol.*; 261-8
- Esmann L., Christian Idel, Arup Sarkar, Lars Hellberg, Martina Behnen, Sonja Möller, Ger van Zandbergen, Matthias Klinger, Jörg Köhl, Uta Bussmeyer, Werner Solbach, Tamás Laskay Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells (2010); *J Immunol.* 2010 Jan 1;184(1):391-400. doi: 10.4049/jimmunol.0900564.
- Ethuin F, Gérard B, Benna J. E, Boutten A, Gougereot-Pocidallo M. A., Jacob L, Chollet-Martin S. (2004) Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab Invest.* 2004 Oct;84(10):1363-71

- Fadok V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., Henson, P. M., (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.*, 5, 551–562
- Farrar J., Hotez, P., Junghanss, T., Gagandeep, K., Laloo, D., White, N., Manson, P. (Eds.), (2014). *Manson's tropical diseases*. Page 63, picture 47.6; 23. ed. Elsevier Saunders Edinburgh
- Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol.* (1993) 151:2399–408.
- Gillis CM, Jonsson F, Mancardi DA, Tu N, Beutier H, Van Rooijen N, et al. (2016): Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice. *J Allergy Clin Immunol.* (2017) 139:1253–65 e1214. 10.1016/j.jaci.2016.06.058
- Godson C., Mitchell, S., Harvey, K., Petasis, N. A., Hogg, N., Brady, H. R. (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol.*; 164 (4), 1663-1667
- Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 6748–53.
- Guy R. A., Belosevic M. (1993): Comparison of receptors required for entry *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun.* 1993 Apr, 61(4) 1553-1558
- Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L., & Locksley, R. M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*; 169, 59-72
- Hepburn N. C. (2000). Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.*; 25: 363 – 370
- Herath S., Kropf, P., Müller, I. (2003) 9 Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunol.*; 25(11-12):559-67
- Hermoso T., Z. Fishelson, S. I. Becker, K. Hirschberg, and C. L. Jaffe. (1991). Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *Embo J* 10:4061-7
- Huber M., Timms, E., Mak, T.W., Röllinghoff, M., Lohoff, M.. (1998) Effective and long lasting immunity against the parasite *L. major* in Cd8-deficient mice.; *Infect Immun.*; 66(8):3968-70
- Janeway C. A, Travers P, Walport M, Shlomchik M.J. (2002) *Immunologie*. 5. Aufl., 367– 405, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- Jensen J, Warner T, Balish E (1993). Resistance of SCID mice to *Candida albicans* administered intravenously or colonizing the gut: role of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *J Infect Dis.* (1993) 167:912–9. 10.1093/infdis/167.4.912
- Jude E., Uzonna, K. L., Scott, J. and P., (2004) Low Dose *Leishmania major* Promotes a Transient T Helper Cell Type 2 Response That Is Down-regulated by Interferon γ -producing CD8+ T Cells. *J Exp Med.*; 199(11): 1559–1566
- Jutila MA, Kroese FG, Jutila KL, Stall AM, Fiering S, Herzenberg LA, et al. (1988): Ly-6C is a monocyte/macrophage and endothelial cell differentiation antigen regulated by interferon-gamma. *Eur J Immunol.* (1988) 18:1819–26. 10.1002/eji.1830181125
- Kane M. M., Mosser D. M. (2001) The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001 Jan 15;166(2):1141-7
- Kitamura D., Roes, J., Kuhn, R., Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature*; 350 423 – 426
- Kuhlman M., Joiner K., Ezekowitz R. A., (1989) The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med.* 169 (5), 1733-1745
- Laskay T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2003) Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.*; 11: 210 - 214
- Laufs H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W., and Laskay, T. (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect.Immun.*; 70: 826 - 835
- Launois P., Tacchini-Cottier, F., Parra-Lopez, C., Louis, J. A. (1998). Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. *Int. Rev. Immunol.*; 17: 157 - 180
- Lewinsohn DM, Bargatze RF, Butcher EC (1987). Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol.* (1987) 138:4313–21.
- Lezzi G, Fröhlich A, Ernst B, Ampenberger F, Saeland S, Glaichenhaus N, Kopf M (2006). Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection. *J Immunol* 177: 1250-1256.
- Lima G. M., Vallochi, A. L., Silva, U. R., Bevilacqua, E. M., Kiffer, M. M., and Abrahamsohn, I. A. (1998) The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol.Lett.*; 64: 145 - 151
- Liu J, Li X, Yue Y, Li J, He T, He Y. (2005) The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell Mol Immunol.* 2005 Dec;2(6):455-60
- Lloyd A. R. and Oppenheim, J. J. (1992) Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol.Today.*; 13: 169 – 172

- Locksley RM, Heinzel FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD (1988). Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect Immun* 56: 336-342.
- Lopez Kostka S., Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. (2009) IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):3039-46. doi: 10.4049/jimmunol.0713598
- Lyons A. B. & Parish, C. R. (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.*; 171, 131-137
- Magill A.J., Grögl, M., Gasser, R.A. Jr, Sun, W., Oster, C.N., (1993) Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm.; *N Engl J Med*; 19:328
- Magombedze G., Reddy P. B. J., Eda S., Ganusov V. (2013) Cellular and population plasticity of helper CD4+ T cell responses *Front. Physiol.*, 16 August 2013 <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00206>
- Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11:519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>
- Maurer M., Lopez Kostka S., Siebenhaar F., Moelle K., Metz M., Knop J., von Stebut E., (2006) Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections, *FASEB J.* 20, 2460–2467
- McFarlane E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K. C., Alexander, J., and Tacchini-Cottier, F., (2008) Neutrophils Contribute to Development of a Protective Immune Response during Onset of Infection with *Leishmania donovani* *Infect Immun.*; 76(2): 532–541
- Melief CJ. (2003) Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol.*; 33(10):2645-54
- Miles S. A., Conrad S.M., Alves R. G., Jeronimo S.M., Mosser D. M.(2005) A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med.* 2005 Mar 7;201(5):747-54
- Moll, H. (1995). *The immune functions of epidermal Langerhans cells.* Springer Verlag
- Moll H, Fuchs H, Blank C, Röllinghoff M (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 23:1595-1601.
- Moskowitz N.H., Brown, D.R., Reiner, S.L., (1997). Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. *Infection and Immunity* 65, 2448–2450
- Muller I., P. Kropf, J. A. Louis, G. Milon., (1994) Expansion of γ interferon-producing CD8⁺ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect. Immun.*; 62: 2575

- Müller I., Pedrazzini, T., Kropf, P., Louis, J., Milon, G., (1991) Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *Int Immunol*; 3(6):587-97
- Müller K., van Zandbergen G., Hansen B., Laufs H., Jahnke N., Solbach W., Laskay T. (2001) Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 190, 73-76
- Murray H. W. (2008) Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun.* 2008 Sep; 76(9):4088-91. doi: 10.1128/IAI.00490-08. Epub 2008 Jun 23
- Nathan C., (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 6 (3), 173-182 2006
- Ngoka J. M., Mutinga, M. J., (1978) Visceral Leishmaniasis in Kenya: The onset of an epidemic outbreak in the Machakos District of Kenya.; *E Afr Med J*; 55(7): 329-331
- Padigel U. M., Farrell J. P., (2005) Control of Infection with *Leishmania major* in Susceptible BALB/c Mice Lacking the Common γ -Chain for FcR Is Associated with Reduced Production of IL-10 and TGF- β by Parasitized Cells *J Immunol* May 15, 2005,174(10) 6340-6345
- Peters N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain R.N., Sacks D., (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*; 321, 970-974
- Power C. A., D. J. Church, A. Meyer, S. Alouani, A. E. I. Proudfoot, I. Clark-Lewis, S. Sozzani, A. Mantovani, and T. N. C. Wells. (1997). Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP3 α from lung dendritic cells. *J Exp Med* 186:825-35
- Reiner S. L. and Locksley, R. M., (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu.Rev. Immunol.*; 13: 151 - 177
- Ribeiro-Gomes F.L., Otero, A.C., Gomes, N.A., Moniz-De-Souza, M.C., Cysne-Finkelstein, Arnholdt, A.C., Calich, V.L., Coutinho, S.G. Lopes, M.F. and DosReis G.A. (2004) Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J. Immunol.*; 172:4454–4462.
- Ribeiro-Gomes F.L., Moniz-de-Souza M.C., Alexandre-Moreira M.S., Dias W.B., Lopes M.F., Nunes M.P., Lungarella G., DosReis G.A. (2007) Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol.* 179 (6), 3988-3994
- Ribeiro-Gomes FL, Roma EH, Carneiro MB, Doria NA, Sacks DL, Peters NC. (2014) Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. *Infect Immun*; 82:2713–27.

Ricardo-Carter C., Favila M., Polando R. E., Cotton R. N., Bogard Horner K., Condon D., Ballhorn W., Whitcomb J. P., Yadav M., Geister R. L., Schorey J. S., McDowell M. A. (2013) Leishmania major inhibits IL-12 in macrophages by signalling through CR3 (CD11b/CD18) and down-regulation of ETS-mediated transcription. *Parasite Immunol.* 2013 Dec;35(12):409-20. doi: 10.1111/pim.12049.

Rincon M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. and Flavell, R. A. (1997) Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med.*; 185: 461-9

Ritter U., Frischknecht, F., van Zandbergen G., (2009) Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? *Trends Parasitol.* ; 25 (11), 505-510

Rooyackers A.W. J., Stokes R.W: (2005): Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of Mycobacterium tuberculosis but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages *Microb Pathog.* 2005 Sep;39(3):57-67. doi: 10.1016/j.micpath.2005.05.001.

Rosas M, Thomas B., Stacey M., Gordon S., Taylor P. R. (2010): The myeloid 7/4-antigen defines recently generated inflammatory macrophages and is synonymous with Ly-6B J *Leukoc Biol.* 2010 Jul;88(1):169-80. doi: 10.1189/jlb.0809548. Epub 2010 Apr 16.

Ruiz J.H., Becker, I., (2007) CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis, *Parasite Immunol.*; 29(12):671-8

Sabroe I., Jones, E.C., Usher, L.R., Whyte, M.K.B., Dower, S.K., (2002) Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: A critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol.*; 168, 4701–4710

Sacks D. and Kamhawi, S., (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.*; 55: 453-83

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

Scapini P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M.A., (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. 2000, *Immunol Rev*; 177:195-203

Scott P., Natovitz, P., Coffman, R. L., Pearce, E., & Sher, A. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp.Med.*; 168, 1675-1684

Seder R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W. E., (1993) Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN γ production and diminish interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90: 10188-92

Seder R. A., Paul, W. E., Dvorak, A. M., Sharkis, S. J., Kagey-Sobotka, A., Niv, Y., Finkelman, F. D., Barbieri, S. A., Galli, S. J. and Plaut, M., (1991) Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 2835-9

Segal A. W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.*; 23, 197-223

Smith J. A., (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc Biol.*;56, 672–686

Sousa L.M., Carneiro M.B., Resende M.E. et al. (2014) Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol*; 36:13–31.

Swain S. L., Weinberg, A. D., English, M. and Huston, G. (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.*; 145: 3796-3806

Tacchini-Cottier F., Zweifel, C., Belkaid, Y., Mukankundiye, C., Vasei, M., Launois, P., Milon, G., and Louis, J. A., (2000) An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J.Immunol.*; 165: 2628 – 2636

Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F., Cassatella M.A. (2018) Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the “dark side of the moon” *European Journal of Clinical Investigation* 17 May 2018 <https://doi.org/10.1111/eci.12952>

Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M.A. (2014), Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Front Immunol.*; 2014; 5: 508

Teixeira C.R., Teixeira M.J., Gomes R.B., Santos C.S., Andrade B.B., Raffaele-Netto I.,Silva J.S., Guglielmotti A., Miranda J.C., Barral A., Brodskyn C., Barral-Netto M. (2005) Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol.* 175 (12), 8346-8353

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. *Infection and Immunity* 69, 5189–5192

Vanloubbeeck Y., and Jones, D.E., (2004) The immunology of *Leishmania* infection and the implication for vaccine development. *Ann N Y Ac Sci.* ; 1026: p. 267-272

van Zandbergen G., Bollinger A., Wenzel A., Kamhawi S., Voll R., Klinger M., Müller A., Hölscher C., Herrmann M., Sacks D., Solbach W., Laskay T. (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *PNAS*; 103, 13837-13842

van Zandbergen G., Hermann N., Laufs H., Solbach W., Laskay T. (2002) *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun.*; 70 (8), 4177-4184

- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., et al., (2004) "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages." *Journal of Immunology*; vol. 173, no. 11, pp. 6521–6525
- Venuprasad K., Banerjee, P. P., Chattopadhyay, S., Sharma, S., Pal, S., Parab, P. B., Mitra, D., and Saha, B. (2002) Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of *Leishmania* growth. *J. Immunol.*; 169: 920 – 928
- 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 – 1552
- von Stebut E, Belkaid Y, Nguyen BV, Cushing M, Sacks DL, Udey MC (2000). *Leishmania* major-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous *Leishmaniasis*. *Eur J Immunol* 30: 3498-3506
- von Stebut E., Metz M., Milon G., Knop J., Maurer M. (2003) Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1 α/β released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNF α
- von Stebut, E. & Udey, M. C. (2004) Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania* major. *Microbes. Infect.*, 6, 1102-1109
- von Stebut E (2007). Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol* 16: 340-346.
- Voll R. E., Herrmann M., Roth E. A., Stach C., Kalden J. R., Girkontaite I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*; 390 (6658), 350-351
- Walunas TL, Bruce DS, Dustin L, Loh DY, Bluestone JA. (1995): Ly-6C is a marker of memory CD8+ T cells. *J Immunol.* (1995) 155:1873–83.
- Wang P., Wu, P., Anthes, J. C., Siegel, M. I., Egan, R. W., and Billah, M. M. (1994) Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood*; 83: 2678 - 2683
- Wenzel A., van Zandbergen, G., (2009) Lipoxin A4 receptor dependent *leishmania* infection. *Autoimmunity*; 42 (4), 331-333
- Witko-Sarsat V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.*; 80: 617 – 653
- Woelbing F., Kostka, S. L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A. P., Knop, J., Udey, M. C., and Von Stebut, E. (2006) Uptake of *Leishmania* major by dendritic cells is mediated by Fc γ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J. Exp. Med.*; 203: 177 - 188

World Health Organization (WHO), Homepage, www.who.int/en/, Stand 2019

Yamane H., T. Kato, and Nariuchi, H., (1999) Effective stimulation for IL-12 p35 mRNA accumulation and bioactive IL-12 production of antigen-presenting cells interacted with Th cells. *J. Immunol.*; 162: 6433-41

8 Danksagung

9 Lebenslauf

