



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

## **Phagozyten in der murinen *Leishmaniasis***

Charakterisierung der zellspezifischen Unterschiede des *Leishmania major* enthaltenden Kompartiments in Makrophagen und dendritischen Zellen

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften am  
Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz


Trix Twelkmeyer  
geboren am 13.06.1983 in Berlin

Shanghai, 2018



## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur unter Berücksichtigung der in der Arbeit angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen worden sind, und Angaben, die auf mündlichen Informationen beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Trix Twelkmeyer', written in a cursive style.

- Trix Twelkmeyer -

Shanghai, 23. Oktober 2018

# Inhalt

<b>Abkürzungen</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungen und Tabellen</b>	<b>XI</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>XIV</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.1. Leishmaniasis</b>	<b>1</b>
<b>2.2. Klinische Manifestationen</b>	<b>2</b>
2.2.1. Kutane <i>Leishmaniasis</i>	2
2.2.2. Mukokutane <i>Leishmaniasis</i>	3
2.2.3. Viszerale <i>Leishmaniasis</i>	3
<b>2.3. Diagnostik, Therapie und Vakzinierung</b>	<b>4</b>
<b>2.4. Angeborene Immunzellen</b>	<b>5</b>
<b>2.5. Phagozytose</b>	<b>7</b>
<b>2.6. Adaption der Phagozytose in angeborenen Immunzellen</b>	<b>10</b>
2.6.1. Makrophagen	10
2.6.2. Dendritische Zellen	10
2.6.3. Neutrophile Granulozyten	11
<b>2.7. Lebenszyklus und Immunantwort gegen <i>L. major</i></b>	<b>12</b>
<b>2.8. Angeborene Immunzellen in der <i>Leishmaniasis</i></b>	<b>16</b>
2.8.1. Neutrophile Granulozyten	16
2.8.2. Makrophagen	17
2.8.3. Dendritische Zellen	19
2.8.4. Phagosomenbiogenese und Replikation	20
<b>3. Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
<b>4.1. <i>In vivo</i> Depletion in der experimentellen <i>L. major</i> Infektion</b>	<b>24</b>
4.1.1. Depletion Lysozym M positiver Zellen im transgenen Mausmodell	24
4.1.1.1. Läsionsentwicklung und Frequenz von Immunzellen im Verlauf der Infektion	24

4.1.1.2.	Einfluss der Diphtherie Toxin Applikation auf die Frequenz angeborener Immunzellen im Gewebe	27
4.1.2.	Phagozytendepletion durch Clodronat Liposomen in C57BL/6 Mäusen	29
4.1.2.1.	Krankheitsverlauf der <i>L. major</i> Infektion unter Liposomen Einfluss	29
4.1.2.2.	Dosisdichtere Clodronat Applikation in der <i>L. major</i> Infektion	32
4.1.2.3.	Einfluss der dosisdichteren Liposomenapplikation auf die Immunantwort	36
<b>4.2.</b>	<b><i>In vitro</i> Analyse intrazellulärer Prozesse infizierter Phagozyten Zelllinien</b>	<b>38</b>
4.2.1.	Immunphänotypisierung von J774A.1 und SP37A3 Zellen	38
4.2.2.	Methodenetablierung für die Untersuchung der intrazellulären Transformation und Replikation von <i>L. major</i>	39
4.2.2.1.	Markierung von <i>L. major</i> mit verschiedenen Proliferationsfarbstoffen	39
4.2.2.2.	Vitalitätstest von <i>L. major</i> enthaltenden parasitären Vakuolen	40
4.2.2.3.	Analyse der intrazellulären Replikation durch BrdU vermitteltes Hoechst Quenching	41
4.2.3.	Methodenetablierung zur Untersuchung der Phagosomenmaturation	49
4.2.3.1.	Optimierung der Signalintensität durch Fluorochrom markierte Sekundärantikörper	49
4.2.3.2.	Fluoreszenzmarkierung von Beads	49
4.2.3.3.	Phagozytische Aktivität von SP37A3	50
4.2.4.	Methodenetablierung der Phagosomenisolation aus <i>L. major</i> infizierten J774A.1	51
4.2.4.1.	Vergleich der Phagosomenausbeute nach verschiedenen Zelllyse Methoden	51
4.2.4.2.	Einfluss von Fixierung auf die Ausbeute	52
4.2.4.3.	Simultane Inkubation von J774A.1 mit <i>L. major</i> und Beads	53
4.2.4.4.	Indirekte Fluoreszenz Markierung der phagosomalen Membran	54
4.2.4.5.	Markierung der Membran von <i>L. major</i>	55
<b>4.3.</b>	<b>Charakterisierung <i>L. major</i> enthaltender Phagosomen <i>in vitro</i></b>	<b>57</b>
4.3.1.	Intrazelluläre Proliferation von <i>L. major</i> in Zelllinien und primären Zellen	57
4.3.2.	Zelluläre und Phagosomen lokalisierte phagosomale Reifungsmarker	62

---

4.3.3.	Massenspektrometrische Analyse der PV zur Überprüfung des Isolationsprotokolls	67
4.3.3.1.	Etabliertes Protokoll zur Isolation von Phagosomen	71
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
5.1.	<i>In vivo</i> Depletion myeloider Zellen in der experimentellen <i>L. major</i> Infektion	73
5.2.	Intrazelluläre Prädestination von <i>L. major</i> in Zelllinien und primären Zellen	78
5.3.	Zelluläre und Phagosomen lokalisierte Expression phagosomaler Reifungsmarker	84
5.4.	Massenspektrometrische Analyse des Proteoms isolierter Phagosomen	88
<b>6.</b>	<b>Material</b>	<b>94</b>
6.1.	Tiere	94
6.2.	Parasiten	94
6.3.	Latex Beads	94
6.4.	Zelllinien	94
6.5.	Antikörper	95
6.5.1.	Primärantikörper	95
6.5.2.	Sekundärantikörper	95
6.5.3.	Isotypen	96
6.6.	Verwendete Kits	96
6.7.	Puffer und Verbrauchslösungen	96
6.8.	Reagenzien und Chemikalien	98
6.9.	Geräte	100
6.10.	Verbrauchsmaterialien	101
<b>7.</b>	<b>Experimentelle Methoden</b>	<b>103</b>
7.1.	Allgemeine Versuchsbedingungen und Techniken	103
7.1.1.	Bestimmung der Lebendzellzahl	103
7.2.	Arbeiten mit Zelllinien und primären Zellen	103
7.2.1.	Kultur und Generierung	103

---

7.2.1.1.	Kultivierung von J774A.1	103
7.2.1.2.	Kultivierung von SP37A3	104
7.2.1.3.	Kryokonservierung von Zelllinien	104
7.2.1.4.	Auftauen von Zelllinien	104
7.2.1.5.	Isolation primärer M $\Phi$ aus induzierten kutanen Granulomen	105
7.2.1.6.	Generierung von BMDC aus C57BL/6 Knochenmark	105
7.2.2.	<i>In vitro</i> Techniken	106
7.2.2.1.	Fixierung von Zellen	106
7.2.2.2.	Extrazelluläre Immunmarkierung	106
7.2.2.3.	Intrazelluläre Immunmarkierung	107
7.2.2.4.	Fluoreszenzmarkierung der Zellmembran	107
7.2.2.5.	Durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität	107
<b>7.3.</b>	<b>Ex vivo Arbeiten mit murinem Gewebe</b>	<b>108</b>
7.3.1.	Isolation von intradermalen Zellen	108
7.3.2.	Isolation von Zellen der peritonealen Kavität	108
7.3.3.	Isolation von Zellen lymphatischer Organe	108
7.3.4.	Isolation von Blutzellen	109
7.3.5.	Gewinnung von murinem Serum	109
7.3.6.	Bestimmung der Parasitenzahl in Ohr und Milz	109
<b>7.4.</b>	<b>Arbeiten mit <i>L. major</i></b>	<b>110</b>
7.4.1.	Kultur und Präparation	110
7.4.1.1.	Suspensionskultivierung von Promastigoten	110
7.4.1.2.	Isolation von metazyklischen Promastigoten	111
7.4.1.3.	Isolation von läsionalen Amastigoten	111
7.4.2.	<i>In vitro</i> Techniken	111
7.4.2.1.	Parasitenopsonisierung	111
7.4.2.2.	Fluoreszenzmarkierung mit Proliferationsfarbstoffen	112
7.4.2.3.	Fluoreszenzmarkierung der Membran	112
7.4.2.4.	Durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität	112
7.4.2.5.	Calcein AM Färbung	113
7.4.2.6.	Simultane Hoechst und Calcein AM Färbung	113
7.4.2.7.	BrdU Inkooperationsassay	113
<b>7.5.</b>	<b>Fluoreszenzmarkierung von Beads</b>	<b>114</b>
<b>7.6.</b>	<b>Koinkubation von Zelllinien und primären Zellen</b>	<b>114</b>
7.6.1.	<i>In vitro</i> Infektion von Zellen mit <i>L. major</i>	114

---

7.6.2.	<i>In vitro</i> Koinkubation von Zellen mit Beads	115
<b>7.7.</b>	<b>Arbeiten mit parasitären Vakuolen</b>	<b>115</b>
7.7.1.	Lyse von Zellen mittels Kapillare	115
7.7.2.	Lyse von Zellen mittels Pelett Pestler	116
7.7.3.	Lyse von Zellen mit dem Gentle MACS OctoDissociator	116
7.7.4.	Immunmarkierung der PV Membran	116
7.7.5.	Calcein AM Färbung	116
7.7.6.	Simultane Hoechst und Calcein AM Färbung	117
7.7.7.	BrdU Inkooperationsassay infizierter Zellen	117
7.7.8.	Isolation von Phagosomen	117
<b>7.8.</b>	<b>Massenspektrometrische Analyse isolierter PV</b>	<b>118</b>
<b>7.9.</b>	<b>Tierhaltung und <i>in vivo</i> Versuche</b>	<b>118</b>
7.9.1.	Murine Modelle der M $\Phi$ Depletion <i>in vivo</i>	119
7.9.2.	Intradermale Infektion von Mäusen	120
7.9.3.	Messung und Berechnung der Läsionsvolumina	120
7.9.4.	Diphtherie Toxin Applikation <i>in vivo</i>	120
7.9.5.	Liposomen Applikation <i>in vivo</i>	121
<b>7.10.</b>	<b>Durchflusszytometrische Analysen</b>	<b>121</b>
7.10.1.	Diskriminierung von angeborenen und adaptiven Immunzellen	122
7.10.2.	Bestimmung der Abnahme der Fluoreszenzintensität von <i>L. major</i>	123
7.10.3.	Bestimmung der normalisierten Fluoreszenzintensität phagosomaler Reifungsmarker	123
7.10.4.	Berechnung der Abnahme der Hoechstfärbung durch BrdU	123
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>

## Abkürzungen

-	In Abwesenheit, ohne, negativ
%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsvolumenprozent
°C	Grad Celsius
+	In Anwesenheit, mit, positiv
10x	Zehnfach
1x	Einfach, einmal
2x	Zweifach, zweimal
3x	Dreifach, dreimal
A	Area
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom
aLm	<i>Leishmania major</i> Amastigote(n)
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APC-eFluor780	Tandem Fluorchrom; gemessen im roten Laser (780 nm)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
b	Breite
BMDC	<i>Bone marrow derived dendritic cell</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	Beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
C	Komplementfaktor
ca.	Circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDC	Konventionelle / klassische dendritische Zelle
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
CL	<i>cutaneous Leishmaniasis</i> , kutane <i>Leishmaniasis</i>
Cl <sup>-</sup>	Chloridion(en)
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CMV	Cytomegalie Virus

CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CR	Komplement Rezeptor
CTFR	Cell Trace Far Red
CTV	Cell Trace Violet
Cu <sup>+</sup> , Cu <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Kupferion(en)
d	Tag(e); Dicke
d.h.	Das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
dLK	drainierende Lymphknoten
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
DTH	Hypersensitivität vom verspäteten Typ
DT	Diphtherie Toxin
DTR	Diphtherie Toxin Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al., et alii, et aliae, et alia	Und andere
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	Konstantes Fragment
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung (1 g = 9,80665 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor
GmbH	Gesellschaft mit begrenzter Haftung
gp	Glykoprotein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

gr.	Griechisch
H	Höhe; Hamster
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
i.d.	Intradermal
iDTR	induzierbarer Diphtherie Toxin Rezeptor
i.p.	Intraperitoneal
icFACS	Intrazelluläres FACS
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>in vitro</i>	Prozesse außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	Prozesse im lebenden Organismus
inf	Infiziert
iNOS	Induzierbare Stickstoff Monoxid Synthase
kDa	Kilodalton
KL	Kutane <i>Leishmaniasis</i>
KM	Knochenmark
kV	Kilovolt
L	Liter
l	Liter; Länge
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
Lamp	<i>Lysosome associated membrane protein</i>
Lipo	Liposomen
LKL	Lokale kutane <i>Leishmaniasis</i>
Lm	<i>Leishmania</i>
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharid
LysM	Lysozym M
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor
mg	Milligramm

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MKL	Mukokutane <i>Leishmaniasis</i>
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
moDC	Monozytäre dendritische Zelle
MOI	Multiplizität der Infektion
mol	Molare Stoffmenge
M $\phi$	Makrophage
n	Anzahl unabhängiger Versuche
n.d.	nicht detektiert
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nm/mL	Nanomol pro Milliliter
nMFI	Normalisierte mediane Fluoreszenz Intensität
NMS	Normales Mausserum
NO	Stickstoffoxid
NOS	reaktive Nitritspezies
NOX	NADPH Oxidase
Ø	Unstimuliert
p	p-Wert des studentischen t-Test
p.i.	Post Infektion
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pDC	Plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyan7
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PKC	Proteinkinase C
PKDL	Post Kalar-Azar dermale <i>Leishmaniasis</i>

pLM	<i>Leishmania major</i> Promastigote(n)
Prof.	Professor
PV	Parasitophore Vakuole
PW	Perm/Wash Puffer
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
RFP	Red fluorescent protein
rh	Rekombinant human
s.c.	Subkutan
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPF	Spezifisch Pathogen frei
spp.	Spezies
SSC	<i>Sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
Tc	Zytotoxische T Zellen
TCR	T Zell Rezeptor
TEA	Triethanolamin
Th	T Helferzellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
U-min	Umdrehungen pro Minute
Univ. Prof.	Universitäts-Professor
VL	Viszerale <i>Leishmaniasis</i>
Vol %	Volumenprozent
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	Zum Beispiel
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung
$\alpha$	Anti, alpha
$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\gamma$	gamma

## Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Globale Verbreitung der kutanen und viszeralen <i>Leishmaniasis</i>	2
Abb. 2	Phagozyten der Haut	5
Tab. 1	Adaptionen der Phagozytose in angeborenen Immunzellen	12
Abb. 3	Lebenszyklus von <i>L. major</i>	13
Abb. 4	Reaktionen im immunkompetenten Wirbeltier in der kutanen <i>Leishmaniasis</i>	14
Abb. 5	Einfluss der wöchentlichen Diphtherie Toxin vermittelten Depletion auf die Läsionsvolumina Niedrigdosis infizierter LysM-cre und LysM-cre/DTR Mäuse	25
Abb. 6	Einfluss der Diphtherie Toxin Applikation auf die Frequenz Gewebe assoziierter angeborener Immunzellen im Verlauf der <i>L. major</i> Infektion	26
Abb. 7	Kontrolle der Diphtherie Toxin vermittelten Depletion von angeborenen Immunzellen im Gewebe nach wiederholter Applikation	28
Abb. 8	Einfluss der Liposomen Applikation auf Läsionsvolumina, Gewicht und Überleben infizierter C57BL/6 Mäuse	30
Abb. 9	Vergleich des Einflusses der ein- und zweimaligen Liposomen Applikation pro Woche auf die Frequenz angeborener Immunzellen im Blut infizierter Tiere	31
Abb. 10	Frequenz angeborener und adaptiver Immunzellen im Gewebe infizierter, Liposomen behandelte Tiere	31
Abb. 11	Einfluss der Liposomen Applikation auf Läsionsvolumina, Gewicht und Überleben infizierter C57BL/6 Mäuse	33
Abb. 12	Einfluss der zweimaligen Liposomen Applikation pro Woche auf die Frequenz angeborener Immunzellen im Blut infizierter Tiere	34
Abb. 13	Frequenz angeborener und adaptiver Immunzellen im Gewebe infizierter, Liposomen behandelte Tiere	35
Abb. 14	Depletionseffizienz von angeborenen Immunzellen im Gewebe von C57BL/6 Mäusen nach Liposomen Applikation	37
Abb. 15	Phänotypische Charakterisierung der J774A.1 und SP37A3 Zelllinien	38

Abb. 16	Vergleich der Signalintensität verschiedener Fluoreszenz Markierungen von Promastigoten nach der intrazellulären Phase in J774A.1	40
Abb. 17	Vitalitätsfärbung metazyklischer Promastigote und Zelllysate infizierter J774A.1	41
Abb. 18	Durchführung des BrdU vermittelten Hoechst Quenchings von <i>L. major</i> Kulturen am Beispiel von Amastigoten	43
Abb. 19	Untersuchung der Replikation von <i>L. major</i> Promastigoten und Amastigoten mittels BrdU vermitteltem Hoechst Quenching	44
Abb. 20	Durchführung des BrdU vermittelten Hoechst Quenchings zum Nachweis der intrazellulären Replikation am Beispiel von Amastigoten	45
Abb. 21	Untersuchung der intrazellulären Transformation und Replikation in den Überständen <i>L. major</i> Promastigoten und Amastigoten infizierter J774A.1 mittels BrdU vermitteltem Hoechst Quenching	46
Abb. 22	Untersuchung der intrazellulären Transformation und Replikation von <i>L. major</i> Promastigoten und Amastigoten in J774A.1 mittels BrdU vermitteltem Hoechst Quenching	47
Abb. 23	Erhöhung der Signalintensität durch FITC markierte Sekundärantikörper	49
Abb. 24	Fluoreszenz Markierung von Beads für die Durchflusszytometrie	50
Abb. 25	Durchflusszytometrische Diskriminierung der Internalisierung von Amastigoten und Beads durch SP37A3	50
Abb. 26	Einfluss der Lysemethode auf die Ausbeute intakter PV	52
Abb. 27	Optimierung der PV Ausbeute durch PFA Fixierung infizierter Zellen	53
Abb. 28	Durchflusszytometrische Analyse von intakten J774A.1 und Zelllysaten nach simultaner Inkubation mit Amastigoten und Beads	54
Abb. 29	Vitalität und Phagozytose Aktivität von Membran gefärbten J774A.1	55
Abb. 30	Vergleich der PV Ausbeute zwischen Membran gefärbten und CTFR markierten Amastigoten	56
Abb. 31	<i>In vitro</i> Analyse von CFSE markierten <i>L. major</i> Promastigoten und Amastigoten PV nach der intrazellulären Phase in primären Makrophagen, BMDC und J774A.1	58

Abb. 32	Infektion von J774A.1 und SP37A3 mit CTV markierten <i>L. major</i> Promastigoten und Amastigoten.	61
Abb. 33	Durchflusszytometrische Unterscheidung der Anwesenheit phagosomaler Reifungsmarker in infizierten und nicht infizierten J774A.1 und SP37A3	63
Abb. 34	Zelluläres Vorkommen phagosomaler Reifungsmarker	64
Abb. 35	Phagosomen lokalisierte phagosomale Reifungsmarker	66
Abb. 36	Vergleich der massenspektrometrisch identifizierten Proteine durch die Optimierung des Isolationsprotokolls.	67
Abb. 37	Regulation koinzidenter und abweichender muriner und <i>L. major</i> spezifischer Proteine in der massenspektrometrischen Analyse von Amastigoten enthaltenden PV aus J774A.1 und SP37A3	69
Abb. 38	Zelluläre Lokalisation und biologische Prozesse von murinen und <i>L. major</i> spezifischen Proteinen	70
Abb. 39	Entwickeltes Protokoll zur Isolation von Phagosomen	72
Abb. 40	Durchflusszytometrische Charakterisierung von Immunzellen	122

# 1. Zusammenfassung

Im Säugetierwirt liegt der heteroxene Parasit *Leishmania major* hauptsächlich in den residenten Makrophagen (M $\Phi$ ) und dendritischen Zellen (DC) der Haut vor. Diese ontogenetisch eng verwandten myeloiden Zellen gehören zu den aktivsten Phagozyten, sind zur Antigenpräsentation fähig, unterscheiden sich aber drastisch in der Reaktion auf eine Infektion und das intrazelluläre Schicksal von *Leishmania*. M $\Phi$  werden zunächst ohne Entzündungsreaktion invadiert und bieten ideale Bedingungen für die parasitäre Transformation und Replikation. Die Aufnahme in DC hingegen führt zur Aktivierung, Migration und Initiierung der T Zell vermittelten Immunität. Dennoch sind es letztlich aktivierte M $\Phi$  die durch Nitritoxid die intrazelluläre Elimination und damit die Resolution der Infektion auslösen. Diese Phagozyten sind somit der Schlüssel für den Übergang vom progressiven Krankheitsverlauf hin zur immunologischen Kontrolle und der damit verbundenen lebenslangen Gedächtnisantwort.

*In vivo* Studien in Abwesenheit von Phagozyten leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung pathologischer Mechanismen, bisher sind diese in der *Leishmaniasis* jedoch auf die selektive Depletion verschiedener DC Subtypen und PMN beschränkt. Zielstellung des ersten Teils der Arbeit war daher die selektive Depletion von M $\Phi$  im experimentellen Modell der kutanen *Leishmaniasis*. Zunächst wurde Diphtherietoxin an Mäuse verabreicht, die einen sensitiven Rezeptor unter Kontrolle des Lysozym-M Promotors exprimieren. Als zweites System wurden Clodronat Liposomen eingesetzt. Bei wirkungsvoller M $\Phi$  Depletion reduzierte sich das Überleben der Mäuse auf wenige Tage. Erfolgte die Applikation seltener, konnte keine Reduktion erzielt werden und das Infektionsresultat war vergleichbar mit den Kontrollbehandlungen. Resultierend war daher eine Bewertung der Funktion von M $\Phi$  in der Infektion mit *L. major* mittels dieser Systeme nicht möglich.

Darüber hinaus könnten die Unterschiede zwischen M $\Phi$  und DC durch die Internalisierung, die intrazelluläre Prädestination und die molekulare Zusammensetzung der parasitophoren Vakuolen (PV) bedingt sein. Der zweite Teil der Arbeit vergleicht daher das Auftreten und die Lokalisation phagosomaler Reifungsmarker nach der Aufnahme von *L. major* und Latex Beads in repräsentative M $\Phi$  und DC Zelllinien. Gesamtzellulär zeigte die DC Linie (SP37A3) eine längere Präsenz von Lamp2 nach der Internalisierung von Amastigoten. Lokalisiert in der PV Membran hingegen wurden Regulationen weder in Abhängigkeit vom internalisierten Partikel noch vom Zelltyp offensichtlich. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Prädestination adressiert,

die Signalintensität des Proliferationsfarbstoffes wies sowohl in primären MΦ als auch in J774A.1 auf eine Replikation beider *L. major* Lebensformen hin. In primären DC und SP37A3 hingegen konnte dies nur für Amastigote gezeigt werden. Die weitere Analyse des BrdU ermittelten Hoechst Quenching kombiniert mit einer Vitalitätsfärbung konnte zudem zwischen Transformation und DNA-Replikation von *Leishmanien* in J774A.1 differenzieren.

Letztlich ist die Analyse des Proteoms der intrazellulären Nische ein idealer Ansatz Informationen über Prozesse sowohl in *L. major* als auch in der invadierten Zelle zu erhalten. Im letzten Teil der Arbeit wurde demzufolge eine durchflusszytometrische Methode zur Isolation von PV etabliert. Die MΦ und DC Linien wurden mit Amastigoten kokultiviert, anschließend fixiert und mechanisch lysiert. Die PV wurden aus dem Zelllysate durch fluoreszenzaktivierte Sortierung gewonnen, basierend auf dem Ausschluss von Debris und intakten Zellen in Kombination mit einer positiven Selektion in Bezug auf den Proliferationsfarbstoff. Erste massenspektrometrische Analysen zeigten asymmetrische Verhältnisse in den Abundanzen von parasitären und Wirtsproteinen. Diese zu reduzieren war Ziel der anschließend implementierten proliferationsunabhängigen Markierung von Amastigoten und der indirekten Markierung der PV Membran. Die ausstehenden Bestimmungen müssen die Integrität der erhaltenen Isolate bestätigen, damit dieser Ansatz zum Verständnis der Pathomechanismen beitragen und zur Identifizierung möglicher Impfstoffe verwendet werden kann.

## 2. Einleitung

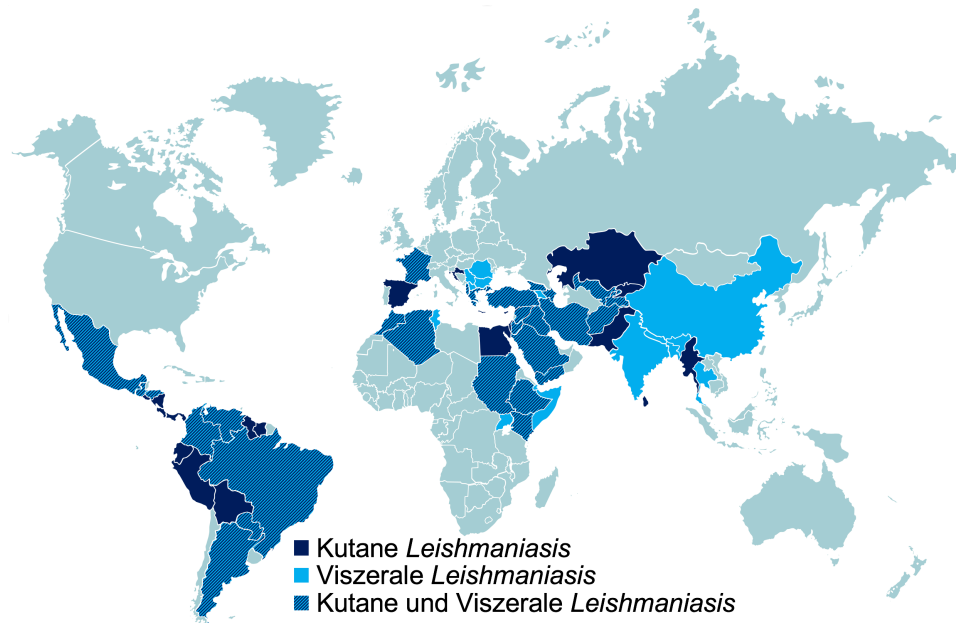
### 2.1. Leishmaniasis

Die *Leishmaniasis* ist eine vektorübertragene Infektionserkrankung, die durch geißeltragende Protozoen der Gattung *Leishmania* ausgelöst wird. Diese obligat intrazellulär lebenden Parasiten zeigen einen dimorphen Lebenszyklus mit einem Wirtswechsel zwischen der zur Familie der Schmetterlingsmücke gehörenden, weiblichen Sandmücke und einem Wirbeltierwirt. In diesen wird die infektiöse promastigote Lebensform durch den Biss der weiblichen Sandmücke übertragen. Die schnelle Aufnahme in phagozytierende Zellen ist durch das Ausbleiben klinischer Symptomatik gekennzeichnet und gewährleistet die intrazelluläre Transformation in die unbewegliche, amastigote Lebensform, die im Wirbeltierwirt persistiert und die Infektion manifestiert.

Von den über 500 bekannten Phlebotominae Arten konnten 30 als Überträger der verschiedenen *Leishmania* Subspezies identifiziert werden; die Phlebotomus Gattungen *Lutzomyia* und *Psychodopygus* sind in der „Alten“ und „Neuen“ Welt als dominierende Vektoren beschrieben. (E. von Stebut, 2017) Die Verbreitung der vektorcompetenten Sandmücken und damit auch der *Leishmaniasis* reicht von den Tropen bis in die gemäßigten Klimazonen und zählt damit zu den zehn häufigsten globalen Infektionserkrankungen. (2017) Nach aktuellen Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit eine Billion Menschen in 88 Ländern täglich dem Risiko einer Infektion ausgesetzt (Abb. 1). Trotz einer Inzidenz von bis zu 1,6 Millionen Erkrankungen und über 20.000 jährlichen Todesfällen zählt die *Leishmaniasis* zu den „neglected tropical diseases“. (2017; Alvar et al., 2012) Diese vernachlässigten Tropenerkrankungen kommen ausschließlich in Entwicklungsländern der Dritten Welt vor und stehen im Kontrast zu den tödlichen Infektionserkrankungen AIDS, Malaria und Tuberkulose. Für deren Bekämpfung deutlich mehr Entwicklungskosten und -interessen aufgewendet werden aufgrund ihrer Bedeutung auch in industrialisierten Ländern. (Yamey, 2002)

Für die Situation in Europa ist eine deutliche Zunahme zu verzeichnen (Abb. 1), mit circa 700 autochthonen Infektionen jährlich ist die *Leishmaniasis* bereits in allen mediterranen Ländern endemisch. (Dujardin et al., 2008) Ursächlich hierfür sind unter anderem klimatische Veränderungen, die eine Verbreitung des Vektors auch nach Zentraleuropa ermöglichen. (Dujardin et al., 2008) Seit 1999 werden Sandmücken auch in verschiedenen Regionen Deutschlands gefunden und eine Erhöhung der Durchschnittstemperatur um lediglich ein Grad in Regionen Österreichs würde

bereits geeignete Bedingungen für deren Vermehrung schaffen. (Aspöck et al., 2008) Die bereits gefundenen Phlebotomus Arten gelten als gesicherte Vektoren der *Leishmania* Subspezies (Naucke et al., 2008) und bisher konnten 11 Fälle autochoner Infektionen in Deutschland ermittelt werden. Zudem spielt die Einfuhr von weiterer *Leishmania* spp. eine entscheidende Rolle in der zunehmenden Prävalenz. Internationale Reistätigkeit, Migration und insbesondere die Einfuhr von infizierten Tieren erhöhen das Risiko einer Einschleppung. (Haeberlein et al., 2013)



**Abb. 1 Globale Verbreitung der kutanen und viszeralen *Leishmaniasis*.** Neuerkrankungen im Jahr 2015 weltweit (Adaptiert nach (WHO 2017))

## 2.2. Klinische Manifestationen

Von den *Leishmania* Subspezies spielen etwa 20 in der Humanpathologie eine Rolle. In Abhängigkeit von der Subspezies und dem Immunstatus des infizierten Individuums kann ein Komplex von kutanen und viszeralen Manifestationen und Schweregraden der Erkrankung ausgelöst werden. (Boecken et al., 2017) Risikogruppen für einen verschärften Krankheitsverlaufs unter Umständen mit Organbeteiligung sind insbesondere Kinder, ältere Menschen und Betroffene mit einer beeinträchtigten Immunantwort. (von Stebut, 2017a) Abhängig von der Lokalisation der vordergründigen Symptomatik werden in der Klinik die drei human relevanten Formen der *Leishmaniasis* unterschieden:

### 2.2.1. Kutane *Leishmaniasis*

Mit einer Inzidenz von 90 % ist die kutane, selbstlimitierende *Leishmaniasis* (CL) die häufigste klinische Erscheinungsform, bei der die Vermehrung von *Leishmania* auf den Inokulationsort beschränkt ist. Auslöser der Infektion sind die assoziierten

Subgenera *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum*, bzw. die dermatropen *L. infantum* Stämme. Nach einer Inkubationszeit von Wochen bis Monaten zeichnet sich die primär unkompliziert verlaufende Infektion durch die Bildung einer rötlichen Papel am Inokulationsort aus, welche im Verlauf häufig ulzeriert. Spätestens nach zwei Jahren kommt es im immunkompetenten Patienten zur spontanen, narbigen Abheilung. (von Stebut, 2017b) Aufgrund der Prädilektionsstellen an exponierten Hautarealen, dem Gesicht, den Armen und Beinen ist die entstehende Narbe häufig entstellend, (Stebut et al., 2016) geht jedoch üblicherweise mit einer Resistenz gegen die auslösende Subspezies einher. Trotz der normalerweise lokalisierten Vermehrung des Parasiten kann es insbesondere bei einer parallelen Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zu der Ausbildung disseminierter Hautläsionen unter Beteiligung der Schleimhäute kommen. Die Ausbreitung von *Leishmania* entlang der Lymphbahnen und damit eine Viszeralisierung mit Milz, Leber- und Knochenmarkbefall sind möglich. (Stebut, 2017) Durch die lebenslange Persistenz des Erregers ist zudem eine Reaktivierung der *Leishmaniasis* durch fortschreitende Pathologie der HIV Infektion oder Immunsuppression möglich. (von Stebut, 2017a)

### **2.2.2. Mukokutane *Leishmaniasis***

Die mukokutane *Leishmaniasis* (MCL) ist eine schwere Verlaufsform der CL. Assoziiert mit Gewebsuntergang beginnend am Nasenseptum, welcher im Fortschreiten der Erkrankung auf die Trachea und den Pharynx übergreift und dadurch zu Schluckstörungen und Kachexie führt. (David and Craft, 2009) Innerhalb von zwei bis zehn Jahren wird eine Dissemination der zunächst kutanen Infektionsherde des *L. brasiliensis*-Komplexes in die Schleimhäute beobachtet. Auch eine unzureichende Behandlung einer Infektion anderer Subspezies kann eine MCL auslösen (von Stebut, 2017b) und diese führt bei Betroffenen zu einer hohen Mortalitätsrate. (Murray et al., 2005)

### **2.2.3. Viszerale *Leishmaniasis***

Bei der viszeralen *Leishmaniasis* (VL) kommt es im Gegensatz zur CL und MCL zu einer systemischen Vermehrung des Parasiten, unter Beteiligung der inneren Organe. Von den drei Hauptmanifestationen stellt diese die seltenste, wenn gleich schwerste Form dar, und führt unbehandelt bis heute in 100 % der Fälle zum Tod des Betroffenen. Auslösende Erreger sind vor allem *L. infantum* innerhalb Europas und *L. donovani* in Indien und China. (von Stebut, 2017a) Die WHO berichtet von

über 300.000 jährlichen Fällen, wobei 90 % dieser in den sechs Ländern Bangladesch, Brasilien, Äthiopien, Indien, Südsudan und dem Sudan auftreten. (2017) Symptomatisch zeigen sich hohes Fieber und durch den Befall des Knochenmarks Anämien, Leukopenien und Thrombozytopenien mit den resultierenden Konsequenzen wie erhöhte Infektanfälligkeit und Blutungsneigung. (Robert-Koch-Institut, 2011) Typisch ist zudem das Auftreten von Aszites mit einhergehender Hepatosplenomegalie, die sich in einem aufgetriebenen Leib bemerkbar macht. (von Stebut, 2017a) Bei gleichzeitiger HIV Infektion kommt es zu einem fulminanten Krankheitsverlauf, häufig mit Therapieresistenzen und Rezidiven (Fernandez-Guerrero et al., 2004; Robert-Koch-Institut, 2011) und eine vermehrte HIV Replikation wird beobachtet. (von Stebut, 2017a)

### **2.3. Diagnostik, Therapie und Vakzinierung**

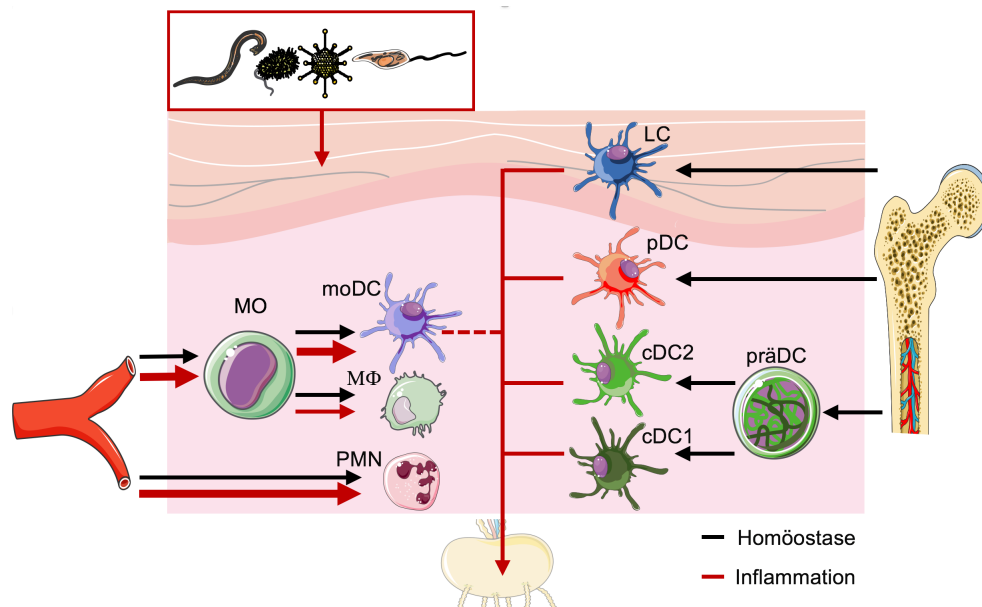
Grundsätzlich ist der therapeutische Ansatz der *Leishmaniasis* sowohl von der verursachenden Subspezies, als auch von der klinischen Manifestation abhängig. Zur Verfügung stehen sowohl lokale als auch systemische Therapien. Bei einfachen Läsionen ist die lokale Therapie vordergründig und reicht von der Exzision, über thermische Verfahren bis hin zu chemotherapeutischer Medikation. (Aronson et al., 2017) Eine systemische Therapie ist hauptsächlich bei diffuser, rezidivierender und mukokutaner Manifestation indiziert und ebenso bei einer kutanen *Leishmaniasis*, die durch einige südamerikanische Subspezies ausgelöst wurde. Zur Anwendung kommt Pentavalentes Antimon, dessen Wirkmechanismus in der Hemmung der parasitären DNA Topoisomerase I vermutet wird. Weiterhin zur Verfügung stehen liposomales Amphotericin B und Miltefosin, die die Membranintegrität von *Leishmania* stören. (Hof and Dörries, 2017) Letztere Behandlungen sind sehr wirksam, gehen jedoch mit hohen Kosten einher und werden daher in den endemischen Ländern der Dritten Welt eingesetzt. (von Stebut and Sunderkötter, 2007)

Trotz intensiver Bemühungen ist eine Vakzinierung gegen die humane *Leishmaniasis* bislang nicht möglich. Die Beobachtung, dass eine einmal durchgemachte Infektion zu einer Resistenz gegenüber der ursächlichen Subspezies führt, deutet jedoch darauf hin, dass dies grundsätzlich möglich sein sollte. Die bewusste Infektion von Personen (Leishmanization), die häufig in endemischen Ländern praktiziert wird, bietet einerseits nur den Schutz vor einer Subspezies und kann andererseits abhängig vom Immunstatus des Infizierten zu einer Viszeralisierung führen. (Sukumaran and Madhubala, 2004) Im Jahre 2011 ist für den veterinärmedizinischen Bereich eine Vakzinierung gegen *Leishmania infantum* entwickelt worden.

Die Beobachtung, dass eine Infektion des Hundes unabhängig von der auslösenden Subspezies immer zu einer Viszeralisierung führt, legt jedoch nahe, dass sich die pathologischen Mechanismen zwischen den Säugetierarten grundlegend unterscheiden. Den einzig wirkungsvollen Schutz vor einer Infektion bietet daher vorerst die Vermeidung von Sandfliegen Stichen durch Repellentien und Mückennetze.

## 2.4. Angeborene Immunzellen

Eindringende Fremdkörper sind zunächst dem unspezifischen, angeborenem Abwehrsystem ausgesetzt. Neutrophile Granulozyten (PMN), dendritische Zellen (DC), Monozyten (MO) und die aus diesen differenzierten, gewebeständigen Makrophagen ( $M\Phi$ ), sind die zellulären Komponenten dieser angeborenen Immunität (Abb. 2). Neben der Phagozytose (siehe 2.5) besteht deren Hauptaufgabe in der Antigenpräsentation gegenüber patrouillierenden Immunzellen des adaptiven Systems. Diese Fähigkeit angeborener Immunzellen ist zudem ein wichtiger Bestandteil der immunologischen Toleranz, in der mechanistisch Haupthistokompatibilitätskomplexe (Major Histocompatibility Complex, MHC) in der Zellmembran Abbauprodukte des intrazellulären Stoffwechsels gegenüber dem adaptiven Immunsystem präsentieren.



**Abb. 2 Phagozyten der Haut.** Konstitutiv in der Haut vorliegende Phagozyten und deren Ursprung im Vergleich zu den Veränderungen ausgelöst durch eine Inflammation. (Adaptiert nach (Tamoutounour et al., 2013))

$M\Phi$  erfüllen diverse Aufgaben in der Gewebemhomöostase und als Effektorzellen in der Infektion. Im gesunden Gewebe müssen die primär ortstreu  $M\Phi$  zellulären Debris und apoptotische Zellen erkennen, aufnehmen und abbauen. (Depraetere, 2000) Während der Embryonalentwicklung entstehen  $M\Phi$  aus Vorläuferzellen und persistieren gewebsständig in vielen Organen des adulten Organismus. (Ginhoux

and Guilliams, 2016)

Zirkulierende MO und PMN hingegen werden kontinuierlich im Knochenmark gebildet und im Zuge der Immunabwehr ins Gewebe rekrutiert (Abb. 2). Die kurzlebigen PMN weisen die namensgebenden Granula-Vesikel mit den darin enthaltenen antimikrobiellen und immunstimulatorischen Effektoren auf, die sie, gefördert durch Phagozytose, auch in den Extrazellularraum abgeben können. MO hingegen zeigen nur rudimentäre Granula und sind die Vorläufer von  $M\Phi$  und eines Teils der DC im Gewebe. Letztere hingegen sind eine divergente Zellfamilie, die in nahezu allen peripheren Geweben im unreifen Zustand vorliegt und zur Antigenaufnahme und Prozessierung befähigt sind. (Mayer et al., 2012) In der Homöostase sind DC in der Lage, tolerogene Signale zu vermitteln und dadurch die immunologische Toleranz zu induzieren. (Mayer et al., 2012) Klassifiziert nach ihrem Ursprung werden die DC der Haut in konventionelle DC (cDC), plasmazytoide DC (pDC), monozytäre DC (moDC) und Langerhans Zellen unterschieden (Abb. 2). Letztere sind die einzigen DC der Epidermis und bereits während der Embryonalentwicklung in die Haut einwandern. (Hoeffel et al., 2012) cDC hingegen werden kontinuierlich durch präDC aus dem Knochenmark erneuert und differenzieren in der Haut in zwei Subpopulationen (Abb. 2). Monozytäre DC (moDC) differenzieren ebenfalls aus MO des Blutes und haben damit einen gemeinsamen Vorläufer mit dermalen  $M\Phi$  (Varol et al., 2009). In Abhängigkeit von ihrem Reifungszustand zeigen moDC einen Wechsel von der hauptsächlich phagozytischen Kapazität hin zur Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem. (Steinman, 2012) pDC letztlich lösen in erster Linie eine T Zell vermittelte Immunantwort aus, können jedoch auch die Balance zwischen T Helferzellpopulationen ( $T_H$ ) beeinflussen. Die hohe Varianz zwischen den DC Subtypen wird durch die Expression charakteristischer Oberflächenmarkern reflektiert und diese wird zudem von homöostatischen, inflammatorischen oder tolerogenen Bedingungen beeinflusst. (Kamath et al., 2000) Ubiquitär führt in allen DC Subtypen der Kontakt mit Pathogenen in Kombination mit externen Gefahrensignalen („Danger Signals“) zur Maturation und Migration. Lokalisiert in den lymphoiden Organen präsentieren DC internalisierte Antigene gegenüber naiven T Zellen und modulieren die spezifische Immunreaktion. (Reis e Sousa, 2004)

## 2.5. Phagozytose

Phagozytose bezeichnet eine Form der Endozytose, die allgemein die aktive Aufnahme extrazellulärer Partikel durch Einstülpung der Plasmamembran bezeichnet und besonders in eukaryotischen Leukozyten essentieller Bestandteil der angeborenen Immunantwort ist. (Greenberg and Grinstein, 2002) Grundsätzlich kann dieser Prozess in vier Hauptschritte unterteilt werden: Erkennung der Zielstruktur, Signaltransduktion zur Aktivierung der Internalisierungs-Maschinerie, Bildung des Phagosoms und letztlich die intrazelluläre phagolysosomale Reifung mit einhergehendem Abbau der Zielstruktur. (Rosales and Uribe-Querol, 2017)

In erster Linie findet dieser phylogenetisch konservierte Abwehrmechanismus in professionellen Phagozyten statt. Die Aufnahme von mikrobiellen Pathogenen und auch apoptotischen oder nekrotischen Zellen initiiert in Phagozyten duale Funktionen. Der Effektormechanismus des angeborenen Kompartiment besteht in der intrazellulären Mortifikation von Mikroben. (Greenberg and Grinstein, 2002) Zudem werden die entstehenden Antigene in das MHC System eingeschleust und bilden damit Basis der Verständigung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. (Larsson et al., 2001)

### **Erkennung und Internalisierung der Zielstruktur**

Die mikrobiellen Aggressoren werden durch Bindung an phagozytotische Rezeptoren erkannt, die hoch konservierte Motive aus Kohlenhydraten, Glykolipiden, Proteolipiden, Glykoproteinen oder Proteinen auf Pathogenen erkennen. Zudem können diese Rezeptoren auch Opsonine des Komplements und die Immunglobuline der humoralen Immunantwort binden. (Aderem, 2002) Abhängig von dem vermittelnden Rezeptor werden intrazellulär substanziiell unterschiedliche Reaktionen ausgelöst. (Aderem, 2002) Grundsätzlich induziert die Rezeptor Ligand Interaktion intrazellulär die Polymerization und Umordnung des Zytoskeletts durch Akkumulation von filamentösem Aktin und assoziierten Proteinen. (Caron and Hall, 1998) Es kommt zur Bildung von Pseudopodien und der phagozytischen Tasche, die das Pathogen umschließt, und die Zugkräfte ins Zellinnere setzen ein. (Aderem, 2002) Organisiert werden die intrazellulären Signale vorrangig durch von Rho Guanosintriphosphatase (GTPasen) katalysierte Spaltungen einer Vielzahl beteiligter Signal- und Adaptormoleküle, Lipid-modifizierender Enzyme und Motorproteine (Caron and Hall, 1998). Weiterhin erfordert der Prozess die Rekrutierung zum Teil großer Mengen Membran an die Stelle des sich bildenden Phagosoms. Diese setzt sich aus der Zellmembran, Exozytose von Recycling-Endosomen (Greenberg and Grinstein,

2002) und zum Teil Verschmelzung des endoplasmatischen Retikulums mit der Zellmembran zusammen.

### **Phagosomale Reifung**

Direkt nach der Abschnürung setzt die Metamorphose des Phagosoms ein. (Pitt et al., 1992) Die einsetzende Veränderung der Membranbestandteile und der biochemischen Eigenschaften des Lumens werden durch Vesikeltransportvorgänge vom und hin zum Phagosom ausgelöst. (Stenmark, 2009) Sämtliche Fusionen und Transportprozesse entlang des Zytoskeletts werden durch Rab Proteine koordiniert, eine Gruppe Ras-verwandter kleiner GTPasen, die charakteristisch für den Reifegrad des Phagosoms bzw. die voranschreitende Azidifikation und hydrolytische Aktivität sind. Im ersten Schritt dieses Reifeprozesses verschmilzt das Phagosom mit frühen Endosomen in der Zellperipherie. Das entstehende frühe Phagosom ist charakterisiert durch das frühe endosomale Antigen 1 (EEA1), Rab4, Rab5 und Rab11 mit einem pH-Wert von 5,8 bis 6,4. Dieser wird durch ATP getriebene Protonenpumpen (V-ATPase) erzeugt und löst die Dissoziation von Rezeptor und Pathogen aus. Die anschließende Fusion mit azideren, späten Endosomen im Bereich des Nukleus ist durch die Rekrutierung von Rab7 und Rab9 gekennzeichnet und liefert die Ausstattung mit spät endosomalen Enzymen und den damit einhergehenden beginnenden Verdau. (Karlson and Doenecke, 2017) Letztlich wird der Reifungsprozess durch Fusion mit primären und sekundären Lysosomen vollendet und das Phagolysosom entsteht. (Flannagan et al., 2012) Die darin enthaltenen Enzyme zum Abbau aller wichtigen Makromoleküle, sind nur bei dem durch die V-ATPase erzeugten pH-Wert (4,5 bis 5) aktiv.

### **Zusammensetzung des Phagosoms**

Die Ausstattung des phagolysosomalen Lumens zeigt eine hohe Varianz zwischen den unterschiedlichen Phagozyten. (Flannagan et al., 2012) Grundsätzlich dient die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich der direkten Restriktion mikrobiellen Wachstums und schafft optimale Bedingungen für die sauren Hydrolasen und antimikrobiellen Peptide die das eingeschlossene Pathogen von essentiellen Kofaktoren abschneiden. (Jabado et al., 2000)

Ein weiteres ubiquitäres Merkmal des phagolysosomalen Lumens ist der unspezifische Angriff durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS), die zusammen die Bestandteile des oxidativen Bursts sind. Mechanistisch katalysiert die Phagozyten spezifische Enzymkomplex die Nicotinamidadenindinucleotidphosphat

Oxidase 2 (NOX2) die Bildung von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) aus Sauerstoff, diese wiederum werden von der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reduziert. In Folge eines insbesondere über den Immunglobulinrezeptor vermittelten phagozytischen Reizes kommt es zur Assemblierung von inaktiver NOX2 in der sich bildenden phagozytischen Tasche. Die anschließende Reifung induziert die Aktivierung des Komplexes. Die, insbesondere in PMN aktive Myeloperoxidase führt zudem zur Bildung von hypochloriger Säure (HOCl). (Nauseef and Borregaard, 2014) Zusammen mit Stickstoffmonoxid (NO), dem Produkt der frei im Zytoplasma vorliegenden induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) (Evans et al., 1996), stellen dies die immunrelevanten Oxidantien der angeborenen Immunabwehr dar. Die induzierten Oxidationen und daraus resultierenden Destruktionsprozesse betreffen alle biologischen Makromoleküle, wie Lipide insbesondere der Zellmembran, Proteine und DNA und verursachen toxische Zellschäden. (DeLeo et al., 1999) Die Aktivität von NOX2 hat zudem zusammen mit der V-ATPase direkte Auswirkungen auf den luminalen pH-Wert des Phagosoms. (Levin et al., 2016) Die immunrelevanten Wirkungen der RNS beruhen ebenfalls auf toxischen Effekten, zeigen jedoch auch zytostatische Wirkungen durch Inhibition von Enzymen der DNA Synthese und Induktion von Doppelstrangbrüchen. (Rath et al., 2014)

Der dritte uniforme Bestandteil der Phagosomen ist ein Arsenal unterschiedlicher antimikrobieller Proteine und Peptide, die direkt antagonistisch auf Pathogene wirken (Flannagan et al., 2009). Die Wirkungsweisen sind mannigfaltig und reichen von der Abschirmung der Pathogene von essentiellen Wachstumsfaktoren hin zur direkten Mortifikation. Die Deprivation von beispielsweise Eisen, einem essentiellen Kofaktor von Mikroben, stellt eine wirkungsvolle Inhibition des Stoffwechsels dar. Die wichtigsten direkt antimikrobiell wirkenden Proteine sind verschiedene Lysozyme, kationische antimikrobielle Peptide (CAP) und lysosomale saure Hydrolyasen. (Claus et al., 1998; Risso, 2000; Schiff et al., 1997; Zhang et al., 2010)

Letztlich wird der phagozytische Prozess mit der Resolution des Phagolysosoms beendet, ein Teil der Phagozytose, über den bisher relativ wenig bekannt ist. Sicher ist, dass nach vollständigen Abbau aller Makromoleküle zum Teil aktive Recyclingprozesse eintreten und die phagolysosomale Membran selbst abgebaut wird. (Levin et al., 2016)

## **2.6. Adaption der Phagozytose in angeborenen Immunzellen**

### **2.6.1. Makrophagen**

In der Gewebekomöostase müssen M $\Phi$  zellulären Debris und apoptotische Zellen aufnehmen und abbauen. (Depraetere, 2000) Da es sich hierbei um das Ergebnis normaler Gewebeerwicklung und Reparaturprozesse handelt, muss das phagosomale Kompartiment ruhender M $\Phi$  einen stark proteolytischen, aber trotzdem antiinflammatorischen Phänotyp aufweisen. Gekennzeichnet ist dieser unter anderem durch eine vollständige Ansäuerung des Phagolysosoms (Tab. 1). (Delamarre et al., 2006) Im Gegensatz zur Situation in aktivierten M $\Phi$  wird dieser durch Balance zwischen der Aktivität von NOX2 und dem aktiven Ionentransport ins Zytoplasma erreicht. Zudem setzt die besonders in ruhenden M $\Phi$  aktive Arginase L-Arginin in Ornithin und Harnstoff um und konkurriert damit direkt mit iNOS um das verfügbare Substrat und inhibiert dadurch den oxidativen Burst. Eine Aktivierung von M $\Phi$  und daraus resultierend auch von iNOS wird durch mikrobielle Stimuli oder Zytokine, insbesondere IFN $\gamma$  ausgelöst und initiiert eine Veränderung weiterer Aspekte der M $\Phi$  Physiologie. (Rath et al., 2014) Die RNS vermittelte Mortifikation ist damit ein Merkmal das in aktivierten M $\Phi$  beobachtet wird. (Flannagan et al., 2012) Zudem zeigen diese einen Wechsel der Degradation im Phagosom vom vollständigem Abbau hin zur Proteolyse für die Entstehung von Epitopen für das MHC System (Tab. 1). (Russell et al., 2009) Diese effizientere Antigenprozessierung wird durch die Reduktion der Proteolyse erreicht und optimiert die Entstehung und Halbwertszeit immunogener Epitope, die letztlich die Aktivierung von CD4 T Zellen vermitteln. (Delamarre et al., 2006) Auch der oxidativen Burst ist im Vergleich zu ruhenden M $\Phi$  verstärkt, (Fang, 2004; Nathan and Shiloh, 2000) um trotz der reduzierten Proteolyse die antimikrobielle Funktion zu gewährleisten. (Russell et al., 2009; VanderVen et al., 2009) Ein weiteres Merkmal der Phagozytose in M $\Phi$  ist die Verschmelzung des endoplasmatischen Retikulums mit der Zellmembran während der Bildung und Vergrößerung der Pseudopodien als wichtige Membranquelle. (Gagnon et al., 2002) Dieser Mechanismus wird auch in DC (Guermontprez et al., 2003) nicht jedoch in PMN beobachtet. (Gagnon et al., 2002)

### **2.6.2. Dendritische Zellen**

DC zeigen in Abhängigkeit von dem Subtyp und ihrem Reifungszustand unterschiedliche Anpassungen der Phagozytose. Mature DC zeichnen sich durch redu-

zierte phagozytische Aktivität und Antigeninternalisierung aus und zeigen eine veränderte Expression des MHC Kompartiments. Die Hauptaufgabe der Phagozytose in cDC liegt in der Präsentation mikrobieller Antigenen gegenüber dem adaptiven Immunsystem. Diese Phagolysosomen zeichnen sich daher durch einen vergleichsweise basischen pH-Wert aus (Tab. 1), die Proteolyse liefert dadurch ideale Epitope für die MHC vermittelten Kreuzpräsentation gegenüber zytotoxischen CD8 und CD4 T Zellen. (Mantegazza et al., 2008; Savina et al., 2006) Untersuchungen konnten zeigen, dass residente, murine cDC im direkten Vergleich zu M $\Phi$  generiert aus dem Knochenmark bei Immunglobulin vermittelter Internalisierung einen um 50% reduzierten proteolytischen Abbau in den Phagosomen aufweisen. (Russell et al., 2009) Ursächlich für diese Verschiebung ist zusammen mit anderen Regulationsmechanismen (Steinberg et al., 2007) auch die gesteigerte Aktivität der NOX2. (Mantegazza et al., 2008; Savina et al., 2006) moDC, auf der anderen Seite, zeigen ein geringeres migratorisches und T Zell stimulatorisches Potential, sind jedoch phagozytisch aktiver als cDC (Tamoutounour et al., 2013). Ein geringer Teil der moDC kann jedoch durch Antigenkontakt in der Peripherie auch einen migratorischen Phänotyp etablieren. Lokalisiert im Lymphknoten ist die stimulatorische Kapazität gegenüber CD8 T Zellen im Vergleich zu cDC jedoch um 60 % reduziert und unterbleibt für CD4 Zellen gänzlich. (Tamoutounour et al., 2013)

### **2.6.3. Neutrophile Granulozyten**

Vergleichbar mit aktivierten M $\Phi$  und DC weisen auch PMN eine Alkalisierung des Phagolysosoms auf, (Jankowski et al., 2002) die zugrunde liegenden Mechanismen in der Bildung und Maturation weichen jedoch stark ab (Nordenfelt and Tapper, 2011). Im Gegensatz zu M $\Phi$  folgt die Phagozytose in PMN nicht dem klassisch endozytotischen Weg, sondern ist durch die Verschmelzung mit bereits intrazellulär vorliegenden primären, sekundären und tertiären granulären Vesikeln charakterisiert. (Henry et al., 2004) PMN zeigen eine vergleichsweise schnelle und hohe Phagozytoserate (Henry et al., 2004; Segal et al., 1980) und Intensivierung der oxidativen Immunantwort. Intrazellulär ist diese durch die rapide Rekrutierung primärer Granula zum Phagosom gekennzeichnet. (Nordenfelt and Tapper, 2011) Die NOX2 vermittelte Akkumulation von Protonen im Phagosom verursacht eine Inhibition und reduzierte Rekrutierung der V-ATPase und der basischer pH-Wert entsteht, der letztlich den raschen Abbau von Pathogenen auslöst. (Levin et al., 2016)

Trotz der hohen Konzentration an ROS und RNS im Phagolysosom liegt die Hauptaufgabe von PMN in der effizienten Mortifikation von Mikroben mit hoher Proteolyseaktivität. (Nauseef and Borregaard, 2014) Im Gegensatz zu M $\Phi$  findet diese jedoch auch extrazellulär statt (Tab. 1). In Reaktion auf rezeptorvermittelte mikrobielle Stimuli ohne daraus resultierende Phagozytose geben PMN den zytotoxischen Inhalt ihrer Granula auch exozytotisch ab. (Sheshachalam et al., 2014) Neben einer Vielzahl an Hydrolasen, ROS und Immunmodulatoren wird bei der Degranulation auch die Myeloperoxidase freigesetzt. Die katalysierte Umsetzung von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Chloridanionen in elementares Chlor (Cl<sub>2</sub>) führt im physiologischen Milieu zur Entstehung zytotoxischer hypochlorigen Säure (HOCl). Diese verursacht die Zerstörung beispielsweise der Membran von Mikroben durch Oxidation von Makromolekülen. (Nauseef and Borregaard, 2014)

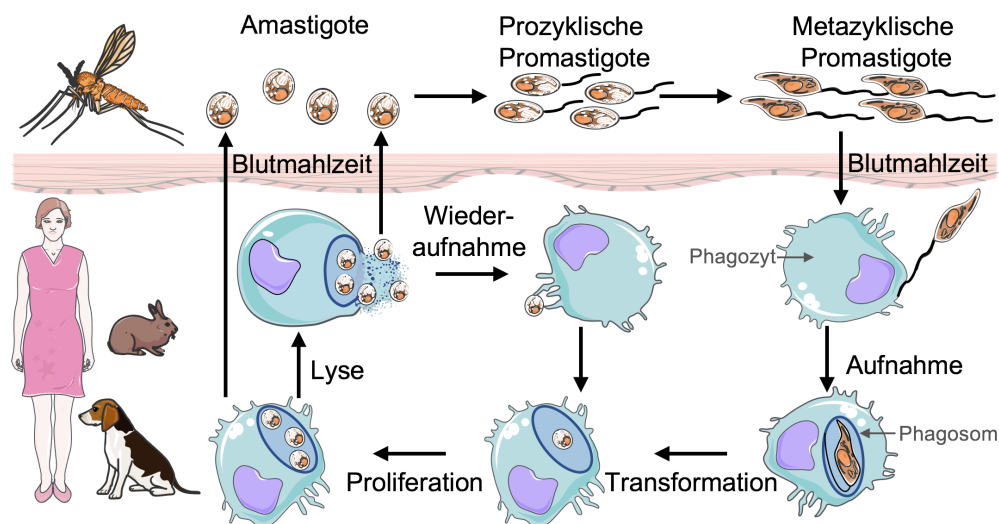
**Tab. 1** Adaptionen der Phagozytose in angeborenen Immunzellen.

	Ruhende M $\Phi$	Aktivierte M $\Phi$	DC	PMN
pH	sauer	basisch	basisch	basisch
Proteolyse	vollständig	unvollständig	unvollständig	vollständig
Immunogene Epitope	gering	verstärkt	verstärkt	vollständig
ER Rekrutierung	Ja	Ja	Ja	Nein
Oxidativer Burst	gering	verstärkt	gering	verstärkt
Exozytose von Granula	Nein	Nein	Nein	Ja

## 2.7. Lebenszyklus und Immunantwort gegen *L. major*

Die weibliche Sandmücke benötigt zur Beschleunigung der Eientwicklung Blutproteine, hierfür bevorzugen unterschiedliche Phlebotomenarten unterschiedliche Wirbeltiere (Torres-Guerrero et al., 2017) Bei der Blutmahlzeit ritzt die Sandmücke mit ihren breiten Mundwerkzeugen die Haut ein und saugt das austretende Blut mit den darin enthaltenen Amastigoten auf (Abb. 3). Die unbeweglichen, runden, 2-4  $\mu$ m großen Amastigoten gelangen in den Darm und wandeln sich dort in teilungsaktive, begeißelte prozyklische Promastigote um. Die Anheftung an das Darmepithel über

das an der Geißel lokalisierte Lipophosphoglycan (LPG) verhindert die Ausscheidung und ermöglicht die weitere Differenzierung in freischwimmende, infektiöse metazyklische Promastigote mit einer Größe von 12-25  $\mu\text{m}$ . (Dostálová and Volf, 2012) Bei der nächsten Blutmahlzeit müssen diese entgegen der Richtung des eingesaugten Bluts in den Pharynx und von dort in die Haut des Wirts gelangen. Parasitäre Chitinasen induzieren eine Störung des Schließmechanismus und es kommt zum Erbrechen der Flüssigkeit aus dem Mitteldarm und einer Übertragung von 100 bis 1000 metazyklischen Promastigote in die obere Dermis des Wirbeltierwirts (Abb. 3).

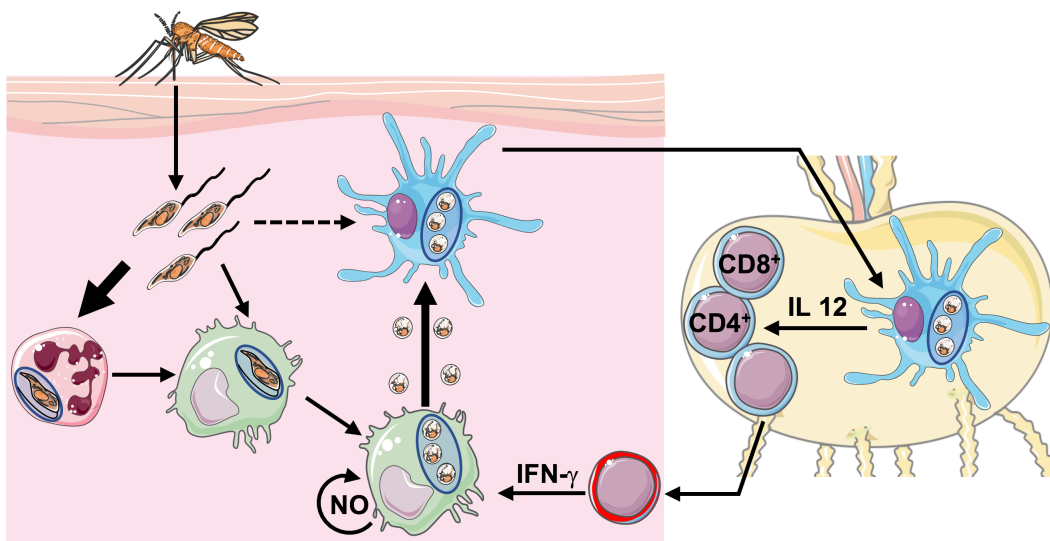


**Abb. 3 Lebenszyklus von *L. major*.** Durch die Blutmahlzeit kommt es zur Übertragung der amastigoten Form von *L. major* auf die Sandmücke. Diese transformiert im Darm in infektiöse metazyklische Promastigote. Bei der nächsten Blutmahlzeit werden diese in die obere Dermis des Wirbeltierwirts übertragen. Die Aufnahme durch residente Phagozyten, präferenziell  $\text{M}\Phi$  ermöglicht die Transformation von Promastigoten in Amastigote im Phagolysosom. Die anschließende Replikation führt letztlich zur Ruptur der Phagozyten. Freigesetzte Amastigote können erneut von Phagozyten aufgenommen oder durch die Blutmahlzeit auf neue Sandmücken übertragen werden. (adaptiert nach (Kaye and Scott, 2011))

Hier müssen die *Leishmanien* zunächst der wirtseigenen Immunabwehr in Form von Komplement, Oxidantien und hydrolytischen Enzyme entkommen und geeignete Wirtszellen für ihre Aufnahme finden. (Späth et al., 2003)

Dabei kommt der komplexen Glykokalyx auf Promastigoten, mit den Hauptbestandteilen Lipophosphoglykan (LPG) und der Zink basierten Metalloprotease (Leishmanolysin, gp63) eine besondere Rolle zu. Neben virulenten Funktionen nach Inkorporation in Phagozyten wurde gezeigt, dass extrazellulär die Hauptfunktion von LPG in der Resistenz gegenüber Hyperoxid Anionen ( $\text{O}_2^-$ ) liegt. GP63 hingegen katalysiert die Spaltung von auf der Oberfläche gebundenem Komplementfaktor 3b (C3b), das entstehende Produkt fungiert als Opsonin für die von den Komplementrezeptoren 1 und 3 (CR1, CR3) vermittelte Phagozytose, ist jedoch inaktiv für die Bildung eines lytischen Komplexes. In dieser frühen auch „stillen“ Phase, sind

hauptsächlich PMN und die bevorzugten Wirtszellen  $M\Phi$  infiziert und die Entzündungsreaktion wird aktiv unterdrückt (Abb. 4). Nach der vorrangig Komplement Rezeptor 3 (CR3) vermittelten Internalisierung in  $M\Phi$  persistieren *Leishmanien* in dieser Phase im Phagosom. Optimal an diese Bedingungen adaptiert findet dort die Transformation in Amastigote statt (Abb. 4). Als obligat intrazellulärer Parasit zeigt sich hier eine Vielzahl von Evasionsmechanismen, die die Entzündungsreaktion unterbinden, um eine unbemerkte Transformation und Replikation in  $M\Phi$  zu gewährleisten. (Haas, 2007) Die Replikation innerhalb der folgenden 4 bis 5 Wochen führt letztlich zur Ruptur der  $M\Phi$  und zur Freisetzung der Amastigoten in den Extrazellularraum der Dermis (Abb. 3 und Abb. 4).



**Abb. 4 Reaktionen im immunkompetenten Wirbeltier in der kutanen Leishmaniasis.** Die durch die Sandmücke übertragenen metazyklischen Promastigoten werden in der oberen Dermis als erstes von PMN aufgenommen, nach der Apoptose dieser kurzlebigen Zellen werden sie im Zuge der Gewebehomöostase von  $M\Phi$  internalisiert. Zudem erfolgt zeitgleich die direkte CR3 vermittelte Internalisierung von Promastigoten in  $M\Phi$ , in dieser stillen Phase der Infektion wird die Entzündungsreaktion durch *Leishmanien* aktiv supprimiert und es erfolgt die Transformation und Replikation im Phagolysosom von  $M\Phi$ . Ruptur von  $M\Phi$  durch die Raumforderung der replizierenden Amastigoten entlässt diese in den Extrazellularraum und es kommt zur  $Fc\gamma$  Rezeptor vermittelten Aufnahme durch DC. Durch intrazelluläre Amastigoten aktiviert migrieren ausgereifte DC in den drainierenden Lymphknoten und initiieren IL 12 abhängig die Proliferation *Leishmanien* spezifischer Th2 Zellen. Lokalisiert in der Dermis führt deren  $IFN\gamma$  Sekretion zur  $M\Phi$  iNOS Aktivierung. Intrazellulär entstehendes NO mortifiziert *Leishmanien* und löst die Resolution der Infektion aus. (adaptiert nach (Von Stebut, 2007))

In dieser zweiten Phase werden erstmals klinische Symptome in Form einer sich am Inokulationsort bildenden Hautläsion sichtbar und es kommt erstmals auch zu einer Infektion von in der Haut residenten DC. Diese sind deutlich susceptibler für die Infektion mit Amastigoten im Vergleich zu Promastigoten (Abb. 4). Als Mediatoren zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem ist diese Internalisierung ein wichtiger Wendepunkt im Überwinden der Infektion und wird hauptsächlich durch die Bindung von Antikörpern an den  $Fc\gamma$  Rezeptor initiiert. (Kautz-Neu et al., 2012; von Stebut, 2007) Für diese Amastigoten bindenden Antikörper wird ange-

nommen, dass sie zum konstitutiv exprimierten, natürlichen Repertoire des Immunsystems gehören. (Dominguez and Torano, 1999; Ochsenbein and Zinkernagel, 2000; Woelbing et al., 2006) Im Phagolysosom initiieren Amastigote nun effizient die Ausreifung und Emigration der DC. Phänotypische Charakteristika hierfür sind die Zunahme von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) I und II und kostimulatorischen Molekülen. (Tamoutounour et al., 2013) Lokalisiert in den benachbarten, drainierenden Lymphknoten prägen DC *Leishmania* spezifische B, CD4 und CD8 T Zellen und initiieren damit die zellvermittelte Immunität (Louis et al., 1998) (Abb. 4). Bei Infizierten konnten als Ergebnis dieser Interaktion zwei unterschiedliche Reaktionsmuster des Immunsystems beschrieben werden. Der Kontakt zwischen DC und naiven CD4 T Zellen führt zur Differenzierung in die zwei unterschiedlichen T Helferzell Subtypen 1 und 2 (Th1 und Th2). (Murphy et al., 2017) Ist bei der Interaktion von der DC sekretiertes IL-12 präsent, (von Stebut et al., 1998) verschiebt sich das Differenzierungsmuster der naiven T Zellen zugunsten der Th1 Zellen, produzieren die DC hingegen IL-4, werden bevorzugt Th2 Zellen expandiert. (Ghosh and Bandyopadhyay, 2004) Diese unterschiedliche Spezialisierung ist entscheidend verantwortlich entweder für die Kontrolle der *Leishmaniasis* oder einen progressiven Krankheitsverlauf mit den einhergehenden Komplikationen.

Am Inokulationsort in der Dermis sind Th1 Zellen verantwortlich für die zelluläre Immunantwort, ihr Zytokinmuster ist geprägt durch IL-2 und IFN $\gamma$ . M $\Phi$ , natürliche Killerzellen (NK) und zytotoxische T Zellen (CTL) werden rekrutiert und die Abwehr und Abtötung der intrazellulären Erreger wird initiiert. (Murphy et al., 2017) Hierbei spielt insbesondere die IFN $\gamma$  vermittelte Reaktion in M $\Phi$  eine Rolle, die Phagozytoseaktivität wird erhöht und iNOS wird induziert. Die resultierende Sekretion großer Mengen NO in das phagolysosomale Lumen (Zamora et al., 2000) führt letztlich zur intrazellulären Mortifikation von *Leishmania* und der Resolution der Infektion. (von Stebut, 2017b) Parallel dazu führt die Induktion von Haut residenten, natürlich regulatorischen T-Zellen (nTreg) zu einer IL-10-abhängigen Persistenz der Parasiten und einer lebenslangen Gedächtnisantwort. (Belkaid et al., 2002; Suffia et al., 2006) Wandern hingegen präferenziell Th2 Zellen aus dem Lymphknoten aus, ist das Zytokinprofil in der Dermis durch die assoziierten Mediatoren IL-4 und IL-10 geprägt. (Rogers et al., 2002) Die resultierende Immunantwort äußert sich in der B Zell vermittelten Produktion von Antikörpern, Mastzellvermehrung und -differenzierung und Phagozyten unabhängigen Reaktionen. (Banchereau and Steinman, 1998; Von Stebut, 2007) Ein progressiver Krankheitsverlauf ist assoziiert und aufgrund der

ausbleibenden Kontrolle der *Leishmanien* Vermehrung besteht das Risiko der Ausbreitung über den Inokulationsort hinaus. (Aseffa et al., 2002; Bretscher et al., 1997) Weiterhin wird dies durch die Rekrutierung von Th17 Zellen verstärkt (Lopez Kostka et al., 2009), da erhöhte IL-17A Spiegel persistierende PMN Infiltrate in progressiven Läsionen induzieren. (Ribeiro-Gomes et al., 2004; Tacchini-Cottier et al., 2000) Die meisten humanpathogenen *Leishmania spp.* sind nicht absolut spezifisch auf einen Wirbeltierwirt, daher lassen sich immunologische Studien in der Maus als Modellorganismus durchführen. Als Erreger hat sich hierbei *L. major* durchgesetzt, bei dem verschiedene Inzuchtstämme die klinischen Manifestationen der humanen *Leishmaniasis* widerspiegeln. (Hiepe et al., 2006) BALB/c Mäuse zeigen in Antwort auf eine Infektion Th2 basierte Reaktionen, resistente Stämmen wie z.B. C57BL/6 hingegen zeichnen sich durch die Th1 assoziierte Resolution aus.

Unabhängig von der im Vordergrund stehenden Th Subpopulation kommt es letztlich durch den erneuten Biss einer Sandmücke zur Aufnahme von freien oder intrazellulären Amastigoten und der Lebenszyklus von *Leishmania* ist geschlossen (Stebut et al., 2016) (Abb. 3).

## **2.8. Angeborene Immunzellen in der *Leishmaniasis***

### **2.8.1. Neutrophile Granulozyten**

Die Zerstörung des Gewebes durch die Mundwerkzeuge der Sandfliege führt zu einer verstärkten Infiltration vom PMN (van Zandbergen et al., 2002), diese wird zusätzlich durch den „*Leishmania* chemotactic factor“ (LCF) (van Zandbergen et al., 2002) und Bestandteile des Speichels der Sandmücke (Vasconcelos et al., 2014) aktiv gefördert. Resultierend aus der quantitativen Dominanz werden daher innerhalb der ersten Stunden ca. 80 bis 90 % der Promastigoten von PMN aufgenommen. (Peters et al., 2008; Peters and Sacks, 2009) Die Interaktion zwischen PMN und dem Phosphatidylserin (PS) in der Membran natürlicher Weise übertragener toter Parasiten imitiert zudem die Aufnahme apoptotischer Zellen in PMN und fördert dadurch die Phagozytose von Promastigoten ohne sekundäre stimulierende Signale auf andere Immunzellen auszulösen. (Fadok et al., 1998; Ravichandran, 2010; van Zandbergen et al., 2006; Wanderley et al., 2013) Nach der präferenziell CR3 vermittelte Aufnahme führt die Sekretion parasitärer, saurer Phosphatasen zu einer Resistenz gegenüber toxische Sauerstoffmetaboliten, inhibiert die lysosomale Fusion und den oxidativen Burst und ermöglicht es *L. major* somit, dem Verdau durch PMN zu entgehen. (al Tuwaijri et al., 1990; el-On et al., 1990; Remaley et al., 1984) Die kurzlebigen PMN zeigen nach der Aufnahme zudem eine beschleunigte

Expression apoptotischer Signalmoleküle und werden verstärkt von M $\Phi$  und DC erkannt und aufgenommen. (Ribeiro-Gomes et al., 2012) Diese Beobachtungen stützen zum einen die Hypothese apoptotischer PMN als trojanisches Pferd für die Aufnahme in M $\Phi$  (Laskay et al., 2003; van Zandbergen et al., 2004), und sind zudem eine mögliche Erklärung für die „silent Phase“ der Infektion, da diese Form der Internalisierung im Gegensatz zur direkten Aufnahme von Promastigoten zu einer antiinflammatorischen Modulation und zum Abklingen des entzündlichen Prozesses führt. (Peters and Sacks, 2009) Die im weiteren Verlauf der Infektion im Mausmodell unter anderem durch eine verzögerte Resistenzentwicklung (Ribeiro-Gomes et al., 2012) und eine limitierte Aktivierung von CD8 T Zellen durch DC gekennzeichnet ist. (Peters et al., 2008; Ribeiro-Gomes et al., 2012)

### **2.8.2. Makrophagen**

Nach 1 bis zwei Tagen beginnt die anfänglich PMN basierte Infektion in die M $\Phi$  vermittelte überzugehen. Für den Eintritt stehen CR1 und 3, Fibronektin Rezeptoren und der Fc $\gamma$ RII-B2 im Vordergrund, wobei besonders Promastigote ihre Aufnahme durch Ligation mehrerer Rezeptoren intensivieren. (Ueno and Wilson, 2012) In Abhängigkeit des Rezeptors zeigen sich ausschlaggebende Unterschiede für die intrazelluläre Prädisposition und die induzierten Immunreaktionen. Ist ursächlich der Fc $\gamma$ R involviert, wird der zytoskeletale Umbau von Rac GTPasen vermittelt und große gemeinschaftliche Vakuolen mit erhöhter NOX2 Aktivität entstehen. Im Gegensatz dazu führt die CR3 induzierte Internalisierung durch rekrutierte Rho-GTPasen zu einem eng anliegenden, individuellen Phagosom, (Ehlers, 2000) in dem die Bildung von Wasserstoffperoxid und die proinflammatorische Signalkaskade durch die Unterdrückung von IL-12 inhibiert ist. (Caron and Hall, 1998; Marth and Kelsall, 1997; Ueno and Wilson, 2012) Die Wiederaufnahme von Amastigoten hingegen erfolgt in erster Linie Fc $\gamma$ R vermittelt und induziert anti inflammatorisches IL-10. (Guy and Belosevic, 1993) Mimikry apoptotischer Zellen durch PS in der Membran von Amastigoten ist ebenfalls ein wichtiger Mechanismus für die Internalisierung in M $\Phi$ , mit einer Korrelation zwischen der Schwere des Krankheitsverlauf und der PS Dichte. (Fadok et al., 2000; Kima, 2007)

Intrazellulär lokalisiert beginnen Promastigote die parasitäre Vakuole (PV) und die Immunantwort durch mannigfaltige Mechanismen zu manipulieren. LPG vermittelt die Unterdrückung des oxidativen Bursts, (Mosser and Edelson, 1987) eine Inhibi-

tion der Assemblierung von NOX2 und den Ausschluss der V-ATP aus der phagosomalen Membran durch Destruktion von Lipid Mikrodomänen. (Lodge et al., 2006; Matheoud et al., 2013; Vinet et al., 2009) Da Promastigote im Gegensatz zu Amastigoten empfänglicher für das endosomale Milieu sind, kommt es zudem zu einer Reifungsverzögerung (Desjardins and Descoteaux, 1997), die sich im verzögerten Auftreten der späten, endosomalen Membranproteine Rab7 und Lamp1 bemerkbar macht. Amastigoten infizierte MΦ hingegen zeigen eine reduzierte Hemmung der Superanionen Produktion. (Kima, 2007)

Ein weiterer Evasionsmechanismus ist die Blockade von hydrolytischen Enzymen und antimikrobiellen Molekülen durch parasitäre Hydrolasen. (Olivier et al., 2005) Die isolierte, intrazelluläre Lokalisation von *L. major* ermöglicht es vielen Mechanismen der Immunabwehr zu entgehen, zwingt jedoch gleichzeitig dazu viele Funktionen des MΦ zu inhibieren. Regulationen finden sich sowohl auf Proteinebene als auch in der Genexpression. (Buates and Matlashewski, 2001; Olivier et al., 2005) Promastigoten infizierte MΦ beispielsweise sind resistent gegenüber einer IFN $\gamma$  vermittelten Aktivierung, verursacht zum Teil durch reduzierte Expression des Rezeptors und auch die direkte Blockade der resultierenden Signalkaskade. Zudem ist es existentiell, die Präsentation über MHC Moleküle zu hemmen, durch die inhibierte NOX2 Assemblierung, die eine niedrigeren pH-Wert und eine effizientere Proteolyse in der PV zur Folge hat, unterdrücken Promastigoten die MHC I Präsentation und T Zellaktivierung. (Matheoud et al., 2013) Ähnliche Effekte wurden auch für Amastigote gezeigt, in denen es vorrangig zu einer Suppression der IFN $\gamma$  induzierten Expression von MHC II und iNOS kommt. (Bhattacharya et al., 2011; Matte and Descoteaux, 2010) In Abhängigkeit von der Subspezies kommt es weiterhin zur Inhibition MHC relevanter Gene, (De Almeida et al., 2003; Reiner et al., 1988; Reiner et al., 1987), Interferenzen mit der Antigenbeladung (Prina et al., 1993) oder der direkten Endozytose von MHCII. (De Souza Leao et al., 1995)

Eine weitere Organisationsebene im interzellulären Informationsaustausch über den Infektionsstatus ist die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Botenstoffen. Auch dieses Wirkprinzip macht sich *L. major* zu Nutze. In der bevorzugten Wirtszelle angekommen, ist eine weitere Rekrutierung von PMN nicht mehr von Nöten und die Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  werden im Gegensatz zur frühen Phase supprimiert. (Matte et al., 2001) Das Schlüsselzytokin IL-12 hingegen wird durch einen LPG basierten Mechanismus blockiert. (Belkaid et al., 1998) Vice versa induziert *L. major* zudem verschiedene immunsupprimierende Botenstoffe. (Olivier

et al., 2005)

### 2.8.3. Dendritische Zellen

Im Gegensatz zu der intrazellulären Phase in M $\Phi$  sind die Interaktionen der *Leishmanien* Lebensformen mit DC deutlich weniger gut charakterisiert und zeigen im murinen Modell zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Ursächlich hierfür ist sicherlich auch die Inhomogenität innerhalb der DC Population, (Shortman and Liu, 2002) zudem führt das weit verbreitete Modell der Generation von DC aus dem murinen Knochenmark zur Expansion hauptsächlich heterogener myeloider Zellen, (Kima, 2007) die keine der natürlich vorkommenden DC Subtypen adäquat widerspiegeln können. (Helft et al., 2015) Weiterhin sind der Ort der Parasitenapplikation (subkutan oder intradermal) und die Dosis (Hochdosis oder Niedrigdosis) entscheidend für die Diskrepanz. Myeloide oder klassische DC (cDC) weisen im ausgereiften Zustand ebenso wie Langerhanszellen eine deutlich reduzierte Affinität für iC3b und damit für die Aufnahme von Promastigoten auf. (Preynat-Seauve et al., 2004) Die Interaktion zwischen CR3 und dem induziertem iC3b resultiert in einer reduzierten stimulatorischen und migratorischen Kapazität, da diese Bindung unter physiologischen Bedingungen die Aufnahme apoptotischer Zellen in unreife DC vermittelt. (Behrens et al., 2007) (Varga et al., 2007; Verbovetski et al., 2002) Zudem ist einen Tag nach Inokulation von *L. major* nur ein geringer Anteil der DC infiziert, (Woelbing et al., 2006) von denen die meisten durch die Aufnahme von PMN infiziert wird. (Ribeiro-Gomes et al., 2012; Ribeiro-Gomes et al., 2015) Die direkte Aufnahme von Amastigoten hingegen wird in erster Linie durch Fc $\gamma$ R und den Rezeptor für PS vermittelt. Die verschiedenen DC Subtypen zeigen auch entscheidende Differenzen in der direkten Infektion mit *L. major* Amastigoten, wobei die CD8 exprimierenden cDC am resistentesten sind. Zudem konnte eine negative Korrelation mit der Fähigkeit zur IL 12 Sekretion nachgewiesen werden. (Henri et al., 2002)

Genereller Konsensus ist derzeit, dass DC durch Aufnahme von Parasiten einen reifen Phänotyp ausbilden und in den drainierenden Lymphknoten *Leishmania* spezifische Antigene gegenüber T Zellen präsentieren. (Macatonia et al., 1995; von Stebut et al., 1998) Durch die Inhibition sowohl der Migration hautresidenter DC als auch der Rekrutierung zum entzündlichen Geschehen unterdrücken *Leishmanien* essentielle Funktionen der DC. Eine Interaktion von *L. major* Produkten mit den für die Migration ursächlichen Chemokin-Signalwegen konnte gezeigt werden. (Jebbari et al., 2002; Ponte-Sucre et al., 2001; Vicari et al., 2004) und die Unterbrechung

dieser vermittelt den Wechsel vom resistenten Phänotyp (Sato et al., 2000) hin zum progressiven Verlauf. Grundsätzlich verläuft die Präsenz von *L. major* Antigenen im Lymphknoten kinetisch in drei Intervallen (Ashok and Acha-Orbea, 2014), die initial von migratorischen LC und cDC verursacht wird. (Brewig et al., 2009) Sind diese jedoch hauptsächlich durch die Aufnahme apoptotischer PMN infiziert, unterbleibt die nachfolgende T Zell Aktivierung. (Ribeiro-Gomes et al., 2012) Die sich anschließende zweite Welle wird zusätzlich durch in Lymphknoten residente cDC getragen, die lösliche *Leishmania* Antigene aufnehmen. (Ashok and Acha-Orbea, 2014) Drei Wochen nach Infektion zeigt sich ein massiver Influx aller DC Subtypen und besonders moDC. (Leon et al., 2007) In der Dermis infiziert lösen diese in Synergie mit den kreuzpräsentierenden DC Subtypen die nötige Th1 Antwort aus. (Ashok and Acha-Orbea, 2014)

Eine weitere zentrale Funktion von allen DC Subtypen ist die Maturation, durch Inhibition dieser konnte im Niedrigdosis Modell eine Verlängerung der stillen Phase der Infektion nachgewiesen werden. Auch eine reduzierte Antigenpräsentation in Kombination mit Hemmung der IL-12 Sekretion wurde in Antwort auf eine *L. mexicana* Infektion nachgewiesen werden. (Bennett et al., 2003; Bennett et al., 2001) Auch hierbei scheint der die Internalisierung auslösende Rezeptor ursächlich zu sein, die Aufnahme von unopsonierten oder C3 opsonierten *L. amazonensis* Promastigoten erhält langfristig den unreifen DC Phänotyp. Die Internalisierung durch Fc $\gamma$ R Ligation hingegen führt zu einer rapiden Expression von kostimulatorischen, Adhäsions- und MHCII Molekülen. (Prina et al., 2004) Analoge supprimierende Mechanismen konnten jedoch für *L. major* in DC nicht gezeigt werden.

#### **2.8.4. Phagosomenbiogenese und Replikation**

Der initiale Kontakt und die Phagozytose zwischen M $\Phi$  und Promastigoten wird über die Spitze des Flagellums initiiert, an der die Ausbildung der Pseudopodien beginnt und sich in Richtung des Zellkörpers fortsetzt. (Forestier et al., 2011) An der Aufnahme sind unter anderem Interaktionspartner von Aktin im Flagellum beteiligt (Champion and Mitragotri, 2006) und das ER wird rekrutiert, um den Membranverlust auszugleichen. (Ndjamen et al., 2010) In dieser ersten Phase des Eintritts kommt es zu einer Ansäuerung, wohingegen die PV in den sich anschließenden Phasen der Biogenese refraktär gegenüber lysosomaler Fusion wird. Die zweite Phase ist durch die intrazelluläre Reorientierung der Promastigoten gekennzeich-

net, wobei das Flagellum zur Plasmamembran hin ausgerichtet wird und durch persistierende Aktivität eine Bewegung der PV zur Zellperipherie und damit entgegen der zellulären Kräfte erzeugt. Die daraus resultierende Schädigung der MΦ Membran hat eine massive Exocytose von Lysosomen zur Folge. (Forestier et al., 2011) Nach 24 bis 48 h setzt die Transformation ein und die Promastigoten verlieren, eventuell als Folge des Differenzierungsprozesses, das Flagellum. (Gluezn et al., 2010) Abhängig von der Subspezies sind die hierfür auslösenden Faktoren der Temperaturanstieg und der erniedrigte pH-Wert. Charakteristisch für die letztlich entstehenden Amastigoten ist ein distinkter metabolischer Zustand, die Aufnahme von Glucose und Aminosäuren ist erniedrigt und die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren erhöht und ermöglicht das Überleben im Nahrungsmittel armen Milieu des Phagosoms. (Saunders et al., 2014) Die effiziente Transformation initiiert zudem eine Th2 assoziierte Zytokinexpression und begünstigt damit zusätzlich die Persistenz von *L. mexicana* in MΦ. (Ali et al., 2013) Selbige wird durch den Amastigoten spezifischen Virulenzfaktor, das Kinetoplasten Membranprotein 11 (KMP-11) unterstützt, dass die IL-10 Produktion fördert und durch Stimulation der MΦ Arginaseaktivität NO reduziert. (de Mendonca et al., 2015; Matos et al., 2010) Grundsätzlich sind beide Lebensformen sind in der Lage, den Mechanismus der phagosomalen Reifung spezifisch zu steuern, ebenso konnten Subspezies basierte Unterschiede ermittelt werden. Zunächst liegen Promastigote und Amastigote einzeln in der PV von MΦ vor und induzieren je nach Subspezies im Verlauf der Teilung die Fusion zu kommunalen PV für *L. amazonensis* (Real and Mortara, 2012) oder separate PV für die sich bildenden Tochterzellen bei *L. major*. (Kima, 2007) Für die sich anschließende Teilung und das Wachstum werden Nährstoffe und zusätzliche Membran in der PV benötigt, Manipulation des sekretorischen Wegs des ER und von Lysosomen der MΦ gewährleistet dies. (Canton and Kima, 2012; Forestier et al., 2011)

Der letzte Schritt des intrazellulären Lebenszyklus im MΦ ist der Austritt der Amastigoten aus der Wirtszelle. Für *L. amazonensis* konnte ein direkter Zell zu Zell Transfer nachgewiesen werden, hierbei bildet die Donorzelle sogenannte Membran-Blebs aus, die normalerweise ein frühes Zeichen einer Apoptose sind. Diese Ausstülpungen an der Oberfläche sind reich an phagosomalen Bestandteilen und können auch Amastigote enthalten. Rezipierende MΦ nehmen diese selektiv auf und die übertragenen Amastigoten verbleiben viabel in der invadierten Zelle. (Real et al., 2014)

Bei der Reinfektion von MΦ durch Amastigote zeigt sich ebenfalls eine Vielfalt ursächlicher Rezeptoren, vordergründig sind bei dieser Lebensform jedoch der Fc $\gamma$ ,

der C3 Rezeptor und die PS vermittelte Internalisierung involviert. (de Freitas Balanco et al., 2001; Kima, 2007; Wanderley et al., 2006)

Bis heute stammen die Informationen über *Leishmania* enthaltende PV fast ausschließlich aus Studien mit M $\Phi$ . Obwohl gezeigt wurde, dass internalisierte Parasiten sich in DC ebenfalls in endozytischen Vakuolen befinden (Flohe et al., 1997; Henri et al., 2002; Prina et al., 2004), sind die endosomalen Transportwege in DC und die Remodellierung des endosomalen / lysosomalen Kompartiments in infizierten DC weitgehend unbekannt.

Einzelne Studien zeigen eine beeinträchtigte Fusionsaktivität der PV mit Lysosomen, die in unreifen DC am stärksten ausgeprägt ist und im Zuge der zellulären Ausreifung abnimmt. Diese ist zudem von der Lebensfähigkeit und dem Stadium von *L. major* abhängig. Lebende Promastigoten blockierten die Phagolysosomen Generation in unreifen BMDC nahezu vollständig, während Phagosomen mit abgetöteten Organismen eine starke Fusion mit Lysosomen zeigen. Amastigoten hingegen blockieren die fusogene Aktivität nur teilweise. Weiterhin weisen die entstehenden PV keine typische Zusammensetzung der PV Membran auf. Ein geringes Vorkommen von Rab7 scheint ein spezifischer Effekt von lebenden Promastigoten insbesondere in unreifen DC zu sein. (Körner et al., 2006) Dieses Phänomen konnte in M $\Phi$  mit der Expression von Lipophosphoglycan, dem vorherrschenden Oberflächenmolekül von Promastigoten, in Verbindung gebracht werden (Dermine et al., 2000; Desjardins and Descoteaux, 1997; Lang et al., 1994). Es wurde gezeigt, dass die Promastigoten enthaltenden Phagosomen mit niedriger fusogener Aktivität eine gestörte Rekrutierung von Rab7 aufweisen (Scianimanico et al., 1999), dies legt nahe, dass die Fusionsrestriktion in beiden Zelltypen die Differenzierung von Promastigoten in Amastigoten ermöglicht, und damit eine Anpassung an das lysosomale Kompartiment darstellt. (Körner et al., 2006)

### 3. Zielsetzung

M $\Phi$  und DC sind die relevanten Zellen des angeborenen Immunsystems in der *Leishmaniasis*. Ihre phagozytotische Internalisierung von *L. major* und die resultierenden Reaktionen entscheiden zwischen einer selbstlimitierenden Infektion oder einem progressiven Krankheitsverlauf. Dennoch sind die intrazellulären Vorgänge und die Zusammensetzung der PV insbesondere in DC weitgehend unbekannt.

Um die phago(lyso)somale Funktion besser zu verstehen, sollte das Vorkommen und die Lokalisation von phagosomalen Reifungsmarkern und die intrazelluläre Transformation und Replikation innerhalb dieser Phagozyten untersucht werden.

Weiterhin stellt die massenspektrometrische Analyse des Proteoms und damit der Gesamtheit aller Proteine der PV einen idealen Ansatz dar, um umfassende Informationen über die induzierten Prozesse sowohl in *L. major*, als auch in der Wirtszelle zu erhalten. Studien zur Analyse von Beads oder Bakterien enthaltenden PV haben gezeigt, dass eine Isolation dieser grundsätzlich möglich ist. Daher sollte eine Methode zur Isolation von Amastigoten enthaltenden PV etabliert werden.

*In vivo* Studien in der experimentellen *Leishmaniasis* unter Abwesenheit von Phagozyten leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung zugrundeliegender, pathologischer Mechanismen. Die Zielstellung der durchgeführten Versuche war es daher ein *in vivo* System zur selektiven Depletion von M $\Phi$  im murinen Modell der kutanen *Leishmaniasis* zu entwickeln und die resultierende Immunantwort zu analysieren.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. *In vivo* Depletion in der experimentellen *L. major* Infektion

#### 4.1.1. Depletion Lysozym M positiver Zellen im transgenen Mausmodell

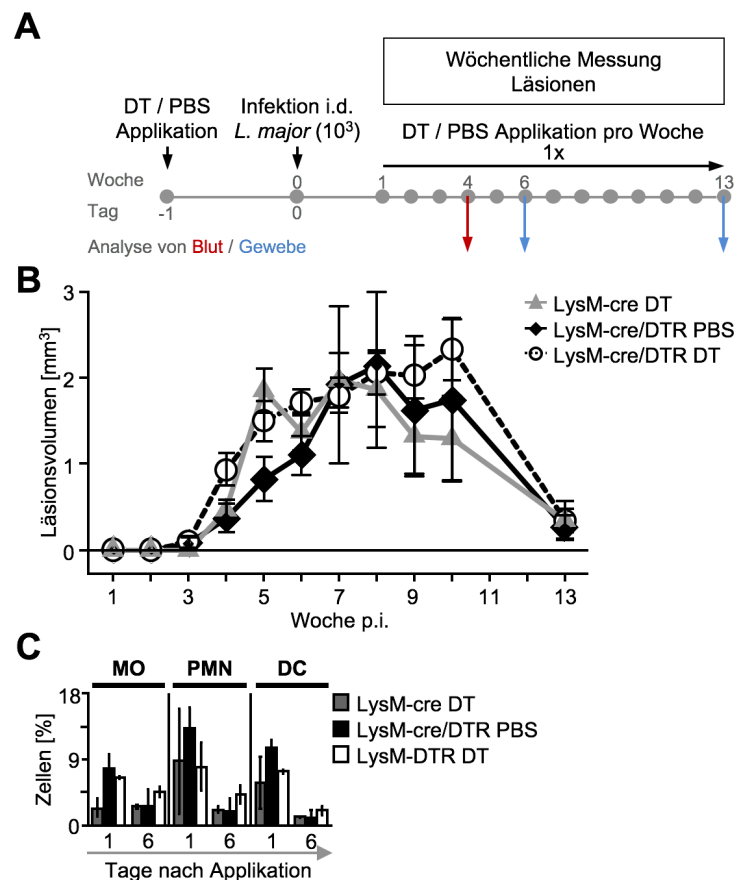
##### 4.1.1.1. Läsionsentwicklung und Frequenz von Immunzellen im Verlauf der Infektion

Um die Auswirkungen einer Depletion von M $\Phi$  und damit der primären Wirtszelle auf die Etablierung einer Infektion mit *L. major* zu untersuchen, wurden die transgenen LysM-cre/DTR Mäuse verwendet. Diese basieren auf dem C57BL/6 genetischen Hintergrund und zeigen damit ohne Applikation von DT einen selbstlimitierenden, resistenten Verlauf der kutanen *Leishmaniasis*. Um dieses nachzuweisen, wurden LysM-cre/DTR bzw. LysM-cre Mäuse intraperitoneal mit DT behandelt einen Tag vor der Infektion (Tag 0). Appliziert wurde den LysM-cre/DTR Tieren entweder PBS (200  $\mu$ l) oder DT (300 ng in 200  $\mu$ l PBS). Zudem wurden die potentiellen Auswirkungen des DT durch Behandlung von homozygoten LysM-cre Mäusen kontrolliert. Die Applikation von DT bzw. PBS erfolgte einen Tag vor der intradermalen Niedrigdosis Infektion mit  $10^3$  metazyklischen *L. major* Promastigoten und nachfolgend für eine konstante Depletion einmal wöchentlich (Abb. 5A).

Zur Dokumentation der Schwere der resultierenden Symptomatik wurden die sich bildenden Läsionen am Inokulationsort als dreidimensionales Ellipsoid wöchentlich ermittelt. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 13 Wochen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der durch *L. major* hervorgerufenen kutanen Granulome (Abb. 5B) zwischen den drei Gruppen.

Weiterhin wurden die Auswirkungen der Behandlung auf die Frequenzen der Zellen des angeborenen Kompartiments betrachtet. Hierzu wurde jeweils zwei Tieren der verschiedenen Gruppen vier Wochen nach der Infektion Blut entnommen und dieses für die durchflusszytometrische Analyse aufgearbeitet. Die Entnahme erfolgt einen und sechs Tage nach der jeweiligen Applikation. Charakterisiert durch Zelltyp spezifische Oberflächenmarker (siehe 7.4) wurde der prozentuale Anteil an MO, PMN und DC in der Gesamtpopulation bestimmt (Abb. 5C). Bei der Differenzierung der Immunzellen des erworbenen Kompartiments wurden B Zellen als CD19 exprimierende Zellen definiert, NK Zellen hingegen wurden über die Anwesenheit von NK1.1 auf der Oberfläche identifiziert (Siehe 7.10.1, Abb. 40). Die CD3 exprimierenden Zellen (Abb. 34 B) wurden anhand der CD4 und CD8 Expression unterschied-

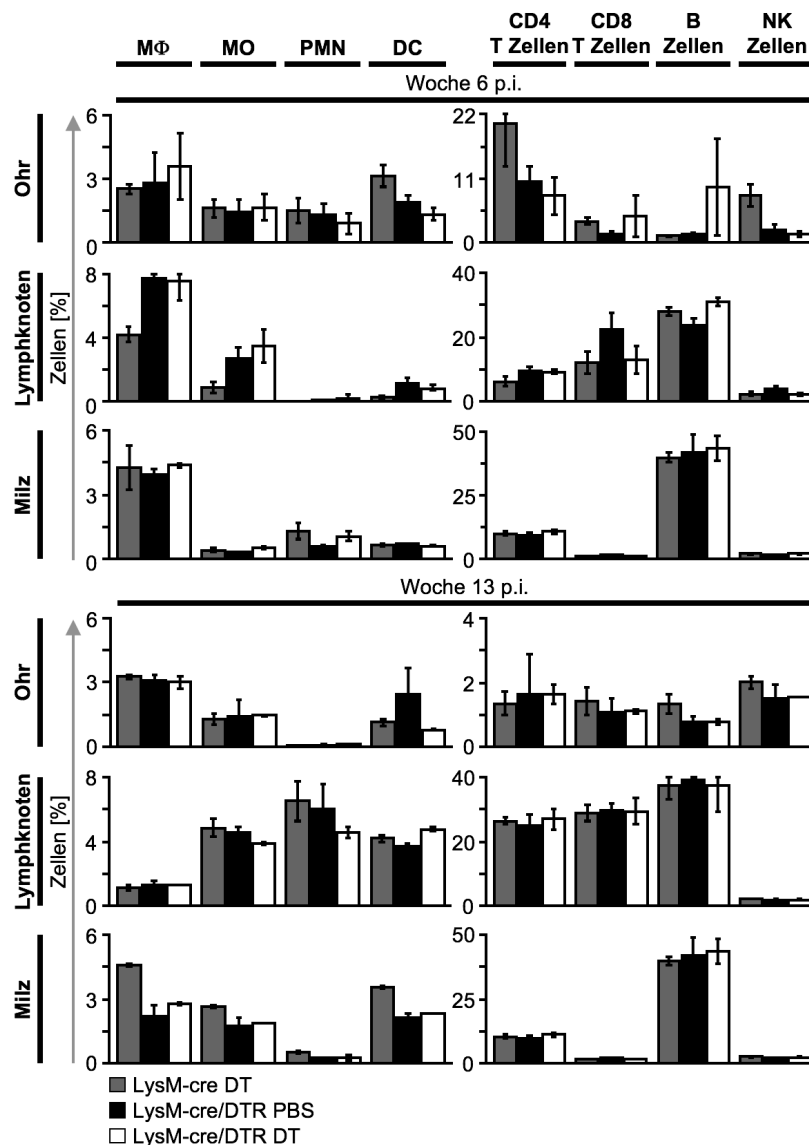
den (Abb. 40B). Im angeborenen Kompartiment wurden die CD11b tragenden Zellen anhand von Ly6G und Ly6C in Makrophagen (Ly6G<sup>-</sup>, Ly6C<sup>-</sup>), PMN (Ly6C<sup>intermediär</sup>, Ly6G<sup>hoch</sup>) und Monozyten (Ly6G<sup>negativ</sup>, Ly6C<sup>hoch</sup>) eingeteilt. Dendritische Zellen wurden als MHCII und CD11c tragend definiert (Abb. 40C). Für alle Zellpopulation wurde jeweils der prozentuale Anteil an der Gesamtheit morphologisch identifizierter Zellen angegeben.



**Abb. 5 Einfluss der wöchentlichen Diphtherie Toxin vermittelten Depletion auf die Läsionsvolumina Niedrigdosis infizierter LysM-cre und LysM-cre/DTR Mäuse.** Transgene Mäuse wurden mit 10<sup>3</sup> metazyklischen *L. major* Promastigoten in beide Ohren infiziert und 300 ng Diphtherie Toxin bzw. 200 µl PBS wurde intraperitoneal einmal wöchentlich appliziert (A). Die entstehenden Läsionen wurden über einen Zeitraum von 13 Wochen als Ellipsoid vermessen (B). (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte ±SEM, n=1 mit 4-8 Mäusen pro Gruppe) In der vierten Woche nach der Infektion wurde die Depletionseffizienz im Blut einen Tag und 6 Tage nach Applikation durchflusszytometrisch ermittelt (C). (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte ±SEM, n=1 mit 2 Mäusen pro Gruppe)

Einen Tag nach der Gabe zeigte der Vergleich zu der mit PBS behandelten LysM-cre/DTR Gruppe eine leichte, nicht signifikante Reduktion aller analysierten Zelltypen für die DT behandelten LysM-cre/DTR Tiere. Dennoch zeigten im Vergleich mit beiden LysM-cre/DTR Gruppen die homozygoten LysM-cre Tiere die niedrigsten Frequenzen an MO, PMN und DC. Sechs Tage nach Applikation hingegen war dieser leichte Depletionseffekt in der DT behandelten LysM-cre/DTR Gruppe nicht mehr nachweisbar und es kam insbesondere für den Anteil der PMN zu einem Anstieg im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Die Analyse des Blutes konnte damit

nachweisen, dass eine wirkungsvolle Depletion von MO unter Einfluss der DT Behandlung nicht stattfand.



**Abb. 6 Einfluss der Diphtherie Toxin Applikation auf die Frequenz Gewebe assoziierter angeborener Immunzellen im Verlauf der *L. major* Infektion.** Drainierende Lymphknoten, Milz und Haut an der Infektionsstelle von LysM-cre und LysM-cre/DTR Mäusen wurde sechs und dreizehn Wochen nach Infektion durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen des angeborenen und adaptiven Kompartiments sind angegeben als prozentualer Anteil an der gesamten Zellpopulation. (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=1 mit 2-4 Mäusen pro Gruppe)

Um diese Daten auch in primären lymphatischen Organen und an der Inokulationsstelle in der Haut zu betrachten und insbesondere den Anteil gewebständiger MΦ zu analysieren wurden jeweils 2 bis 4 Tiere der Gruppen 6 und 13 Wochen nach Inokulation euthanasiert und die Gewebe aufgearbeitet (Abb. 6). Sechs Wochen nach Infektion zu dem Zeitpunkt ausgeprägter klinischer Symptome in Form von Läsionen, zeigte die durchflusszytometrische Analyse der Lymphknoten einen eher stimulierenden Effekt auf die Anzahl der MΦ und MO, wohingegen Veränderungen in der Milz nicht nachgewiesen werden konnten. In der dreizehnten Woche, nach

Resolution der Infektion, waren diese Effekte in der Zusammensetzung des adaptiven Systems in der Haut rückläufig und auch der Anteil an MO in den drainierenden Lymphknoten in den DT behandelten LsyM-cre/DTR Mäusen zeigte keine Unterschiede mehr zu den beiden Kontrollgruppen. Auch in der Milz konnte kein depletierender Effekt des DT auf MO oder M $\Phi$  zu keinem der beiden Zeitpunkt nachgewiesen werden (Abb. 6).

#### **4.1.1.2. Einfluss der Diphtherie Toxin Applikation auf die Frequenz angeborener Immunzellen im Gewebe**

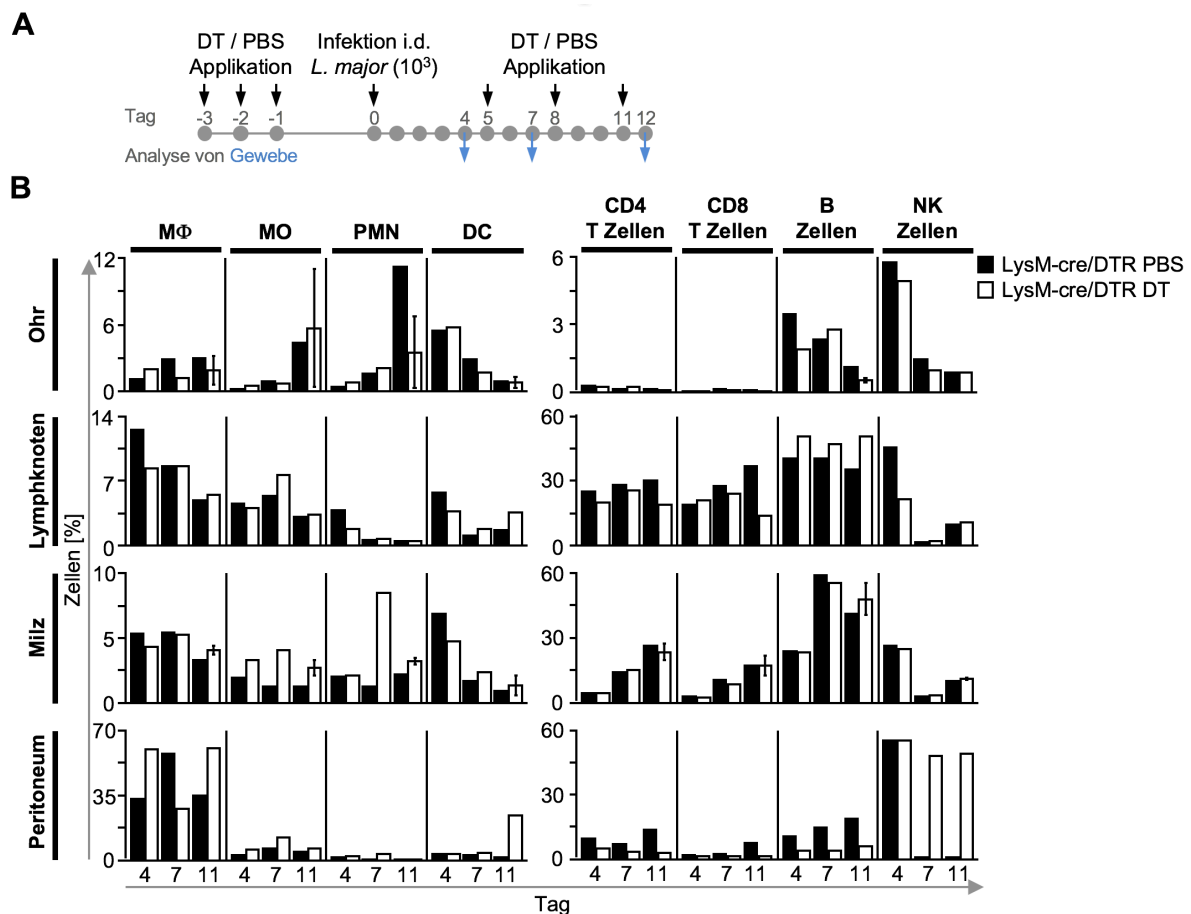
Weiterhin wurde untersucht, ob durch eine höher frequentierte Applikation von DT eine Depletion erreicht werden könnte. Die Auswirkungen von DT auf die Frequenzen der Zellen des angeborenen und adaptiven Kompartiments wurden im transgenen LsyM-cre/DTR Mausmodell erneut analysiert. Vor der Niedrigdosis Infektion mit  $10^3$  metazyklischen *L. major* Promastigoten (Tag 0) wurde den LsyM-cre/DTR Tieren an drei aufeinander folgenden Tagen entweder PBS (200  $\mu$ l) oder DT (300 ng in 200  $\mu$ l PBS) intraperitoneal appliziert. Im weiteren Verlauf erfolgte zunächst vier Tage keine Applikation und anschließend wurde die Frequenz der Behandlung auf jeden dritten Tag reduziert (Abb. 7A). Zur Beurteilung der Depletionseffizienz und der Einfluss des DT auf andere Immunzellen wurden jeweils ein bis zwei Tiere der verschiedenen Gruppen 4, 7 und 12 Tage nach Infektion euthanasiert. Diese Zeitpunkte wurden jeweils einen Tag nach der letzten Applikation gewählt. Die verschiedenen Gewebe wurden aufgearbeitet und die Zellen der Immunkompartimente (siehe 7.10) durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 7B).

Im angeborenen Kompartiment zeigte sich bezüglich der M $\Phi$ , der durch DT adressierten Zielzellen, lediglich 8 Tage nach Infektion und damit nach insgesamt sieben Applikationen eine Reduktion der Frequenz am Applikationsort dem Peritoneum im Vergleich zur PBS behandelten Kontrollgruppe. Dieser Effekt war jedoch nach 4 Tagen und weiteren Behandlungen nicht mehr nachweisbar und es ergab sich eine erhöhte Frequenz.

Die Betrachtung der MO, und damit der Vorläuferzellen reifer gewebsständiger M $\Phi$ , ergab eine erhöhte Häufigkeit in nahezu allen analysierten Geweben. Für den prozentualen Anteil an PMN und DC wurden divergente Ergebnisse ermittelt, die keinen klaren Trend zeigten. Um die Integrität des Immunsystems unter DT Behandlung zu untersuchen wurden zudem die Zellen des adaptiven Kompartiments ana-

lysiert. Die DT Behandlung bewirkte eine leichte Reduzierung der CD8 T Zellfrequenzen im Lymphknoten und der B Zellen in der peritonealen Kavität zu allen betrachteten Zeitpunkten. Zudem konnte eine deutliche Stimulation der peritonealen NK Zellen ermittelt werden.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die wiederholte, höher frequentierte Applikation von DT starke Auswirkungen auf die Vitalität und den allgemeinen Gesundheitszustand der behandelten Tiere hatte und der Versuch musste am 12. Tag gemäß tier-schutzrechtlicher Vorschriften beendet werden.



**Abb. 7 Kontrolle der Diphtherie Toxin vermittelten Depletion von angeborenen Immunzellen im Gewebe nach wiederholter Applikation.** Transgenen LysM-cre/DTR Mäusen wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 300 ng Diphtherietoxin (in 200  $\mu$ l PBS) bzw. 200  $\mu$ l PBS zur Kontrolle intraperitoneal appliziert. Anschließend erfolgte 4 Tage keine Behandlung und im weiteren Verlauf wurde die Häufigkeit der Applikation auf jeden dritten Tag reduziert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde die Frequenz angeborener Immunzellen in den drainierenden Lymphknoten, der Milz, der Haut am Infektionsort und in der peritonealen Flüssigkeit durchflusszytometrisch ermittelt. (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=1 mit 1-2 Mäusen pro Gruppe)

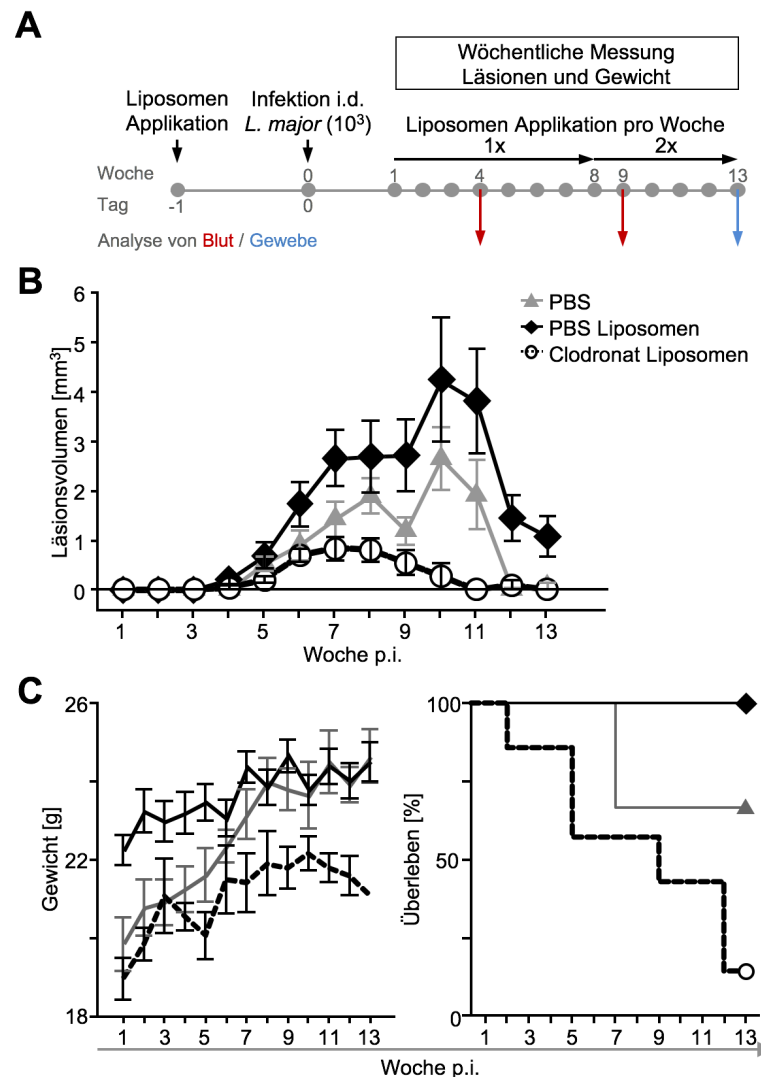
Zusammenfassend konnte durch die DT Applikation im transgenen LysM-cre/DTR Modell weder durch eine wöchentliche Applikation von DT noch durch erhöhte Applikationsfrequenz eine Reduzierung weder der MΦ noch der MO im Gewebe erreicht werden. Zudem zeigte insbesondere die wiederholte Gabe von DT schwere Auswirkungen auf den Gesundheitszustand der Mäuse.

#### **4.1.2. Phagozytendepletion durch Clodronat Liposomen in C57BL/6 Mäusen**

##### **4.1.2.1. Krankheitsverlauf der *L. major* Infektion unter Liposomen Einfluss**

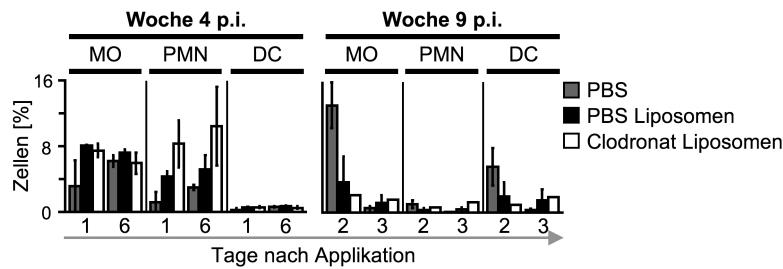
Jeweils fünf C57BL/6 Mäuse wurde intraperitoneal 200 µl Liposomen bzw. PBS appliziert. Eine Gruppe erhielt Clodronat eingeschlossen in einen Bilayer, und um Nebenwirkungen der Liposomen auszuschließen wurden zudem Liposomen mit eingeschlossenem PBS in der dritten Gruppe als Kontrolle verwendet. Die Tiere erhielten eine Injektion der jeweiligen Behandlung einen Tag vor der Niedrigdosis Infektion. Im weiteren Verlauf wurde bis zur siebten Woche eine Dosis pro Woche verabreicht. Zwischen der achten und dreizehnten Woche wurde die Gabe auf zweimal wöchentlich erhöht (Abb. 8A). Neben der Dokumentation der Symptomatik in Form von wöchentlichen Messungen der Läsionsvolumina (Abb. 8B) wurde zudem als Maß für den allgemeinen Gesundheitszustand der Tiere ebenfalls deren Gewicht wöchentlich bestimmt (Abb. 8C).

Die Entwicklung der Läsionen über die Zeit zeigte eine Verschlechterung des durch *L. major* ausgelösten Krankheitsbildes in der PBS Liposomen behandelten Gruppe sowohl im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe als auch zur Clodronat Behandlung. Diese wiederum reduzierte die Läsionsvolumina signifikant im Vergleich zur PBS Liposomengruppe. Die durch die Clodronat Behandlung verursachten Nebenwirkungen zeigten sich bereits in der Gewichtsentwicklung der Mäuse. Die beiden Kontrollgruppen wiesen einen normalen Anstieg des Gewichts in Abhängigkeit von der Zeit auf, wohingegen bei der Clodronatgruppe nur ein langsamerer Anstieg zu verzeichnen war, welcher letztlich sogar rückläufig wurde. Weiterhin konnte ein starker Einfluss des Clodronats auf die Überlebensrate der Tiere beobachtet werden. In der PBS Liposomen Gruppe überlebten alle Tiere den gesamten Beobachtungszeitraum, in der PBS Gruppe verstarb ein Tier durch die Isoflurannarkose im Zuge der wöchentlichen Vermessung der Läsionen. Die Applikation von Clodronat hingegen zeigte letale Nebenwirkungen bei 75% der Mäuse, unabhängig von der Isofluran Narkose, die jedoch nicht durch die Steigerung der Applikationsfrequenz ab der achten Woche verändert wurde (Abb. 8C). Weiterhin wurde der prozentuale Anteil von angeborenen Immunzellen unter Einfluss der Behandlungen innerhalb des Beobachtungszeitraums in der vierten und neunten Woche nach Inokulation untersucht.



**Abb. 8 Einfluss der Liposomen Applikation auf Läsionsvolumina, Gewicht und Überleben infizierter C57BL/6 Mäuse.** C57BL/6 Mäuse wurden mit  $1 \times 10^3$  metazyklischen *L. major* Promastigoten in beide Ohren infiziert und  $200 \mu\text{l}$  Liposomen wurden bis Woche 8 einmal wöchentlich und anschließend zweimal wöchentlich appliziert (A). Die entstehenden Läsionen wurden über einen Zeitraum von 13 Wochen als Ellipsoid vermessen (B). Zudem wurde das Gewicht der Mäuse und das Überleben dokumentiert (C). (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM,  $n=1$  mit 1-8 Mäusen pro Gruppe)

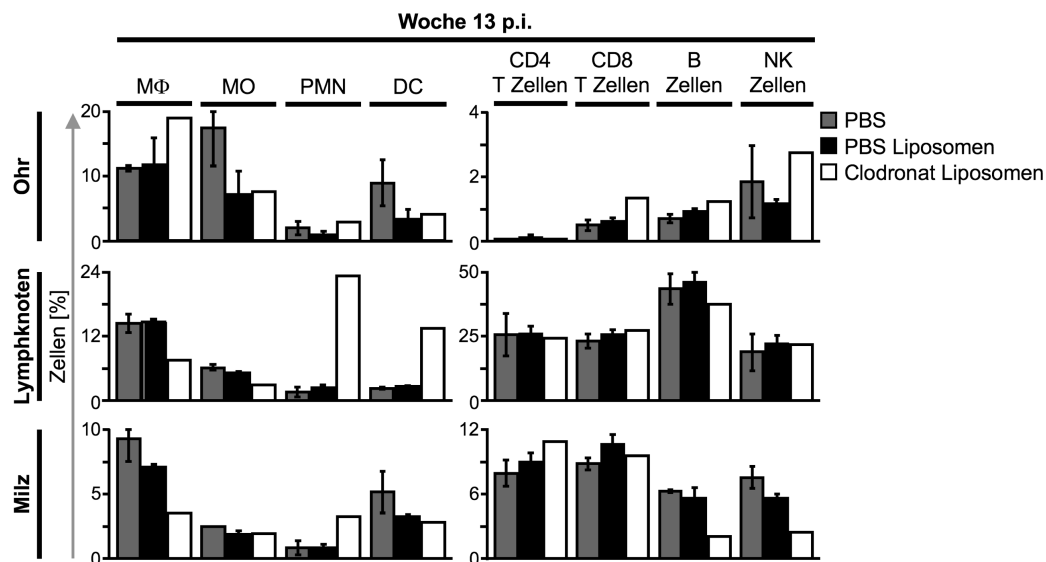
Ein bis zwei Tieren der verschiedenen Gruppen wurde hierzu Blut entnommen und dieses durchflusszytometrisch auf die Frequenz von MO, PMN und DC analysiert (Abb. 9). In der vierten Woche erfolgte die Entnahme einen und sechs Tage nach Applikation. Die Clodronatgruppe zeigte zu beiden Zeitpunkten keine Veränderungen der MO und DC, der Anteil an PMN war unabhängig von dem Zeitabstand zwischen Untersuchung und der letzten Applikation in der Clodronatgruppe erhöht. Nachdem die Applikationen in der siebten Woche auf zweimal wöchentlich erhöht wurden, erfolgte eine weitere Blutanalyse zwei bzw. drei Tage nach der Behandlung in der neunten Woche. Diese Steigerung der Applikationsfrequenz führte zu einer Liposomen vermittelten Depletion der MO und DC, die jedoch unabhängig von Clodronat war und zwei Tage anhielt. Nach drei Tagen war jedoch eine Repopularisierung beider Zelltypen zu erkennen (Abb. 9)



**Abb. 9 Vergleich des Einflusses der ein- und zweimaligen Liposomen Applikation pro Woche auf die Frequenz angeborener Immunzellen im Blut infizierter Tiere.** C57BL/6 Mäusen wurden wöchentlich bis Woche 7 und zweimal wöchentlich ab Woche 8 200  $\mu$ l Liposomen intraperitoneal appliziert. In der vierten und neunten Woche nach Infektion wurde die Depletionseffizienz im Blut einen Tag und 6 Tage bzw. zwei und drei Tage nach Applikation durchflusszytometrisch ermittelt. (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=1 mit 1-2 Mäusen pro Gruppe)

In der dreizehnten Woche nach Infektion, zu einem Zeitpunkt, an dem die entstehenden Läsionen nahezu abgeheilt waren, wurden zudem die Effekte der verschiedenen Behandlungen auf die prozentuale Verteilung von Immunzellen der verschiedenen Kompartimente des Immunsystems in den lymphatischen Organen und der Haut im Bereich des Ohres untersucht (Abb. 10).

Aufgrund der letalen Nebenwirkungen des Clodronats konnte in dieser Gruppe nur ein Tier analysiert werden. Die prozentuale Zusammensetzung der in der Haut lokalisierten Zellen zeigte eine Abnahme in der Häufigkeit von MO und DC durch die Liposomen Gabe, die unabhängig von Clodronat war. Wohingegen M $\Phi$  und CD8 T Zellen durch die Behandlung mit Clodronat eher zunahmen. Die drainierenden Lymphknoten in dieser Gruppe waren durch erhöhte PMN und DC geprägt. Lediglich in der Milz konnte der erwünschte Effekt einer effizienten M $\Phi$  Depletion nachgewiesen werden.



**Abb. 10 Frequenz angeborener und adaptiver Immunzellen im Gewebe infizierter, Liposomen behandelte Tiere.** C57BL/6 Mäusen wurde bis Woche 7 einmal wöchentlich und anschließend zweimal wöchentlich 200  $\mu$ l Liposomen intraperitoneal appliziert. Nach Abklingen der Infektion in Woche 13 wurde die prozentuale Verteilung der angeborenen und adaptiven Immunzellen in den drainierenden Lymphknoten, der Haut am Infektionsort und der Milz ermittelt. (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=1 mit 1-2 Mäusen pro Gruppe)

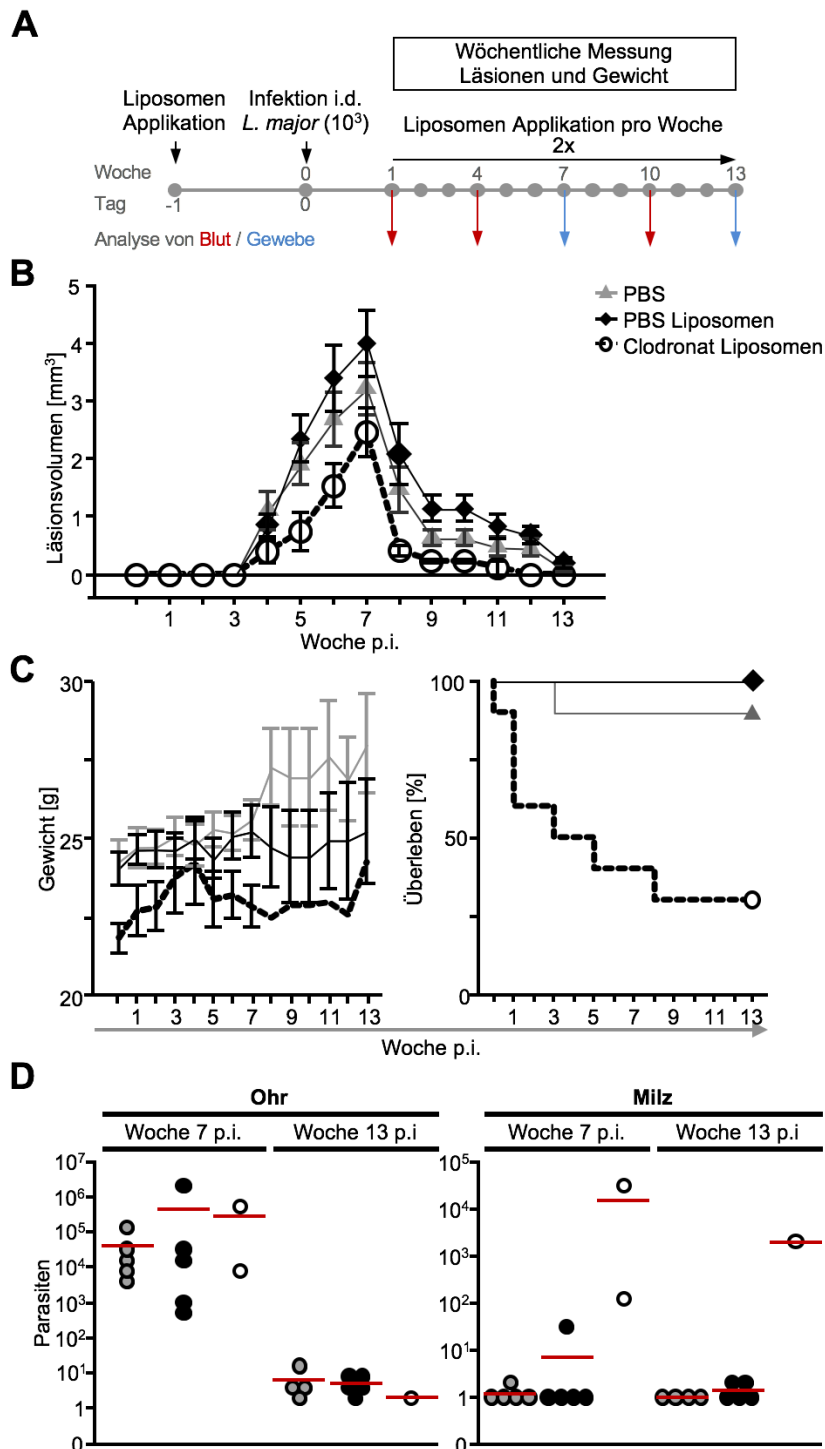
#### 4.1.2.2. Dosisdichtere Clodronat Applikation in der *L. major* Infektion

Um die Ergebnisse der Verbesserung der *L. major* induzierten Krankheitsbild durch die Gabe von Clodronat Liposomen zu sichern, und eine mögliche Steigerung dieses Effekts durch höher frequentierte Applikationen zu untersuchen, wurden wiederum jeweils 10 C57BL/6 Mäuse mit PBS, PBS Liposomen oder Clodronat Liposomen behandelt (Abb. 11A). Die erste Gabe erfolgte einen Tag vor der Niedrigdosis Infektion mit *L. major*. Über einen Zeitraum von 13 Wochen erhielten die Tiere je zwei Dosen der jeweiligen Behandlung pro Woche, die Läsionen wurden dreidimensional vermessen (Abb. 11B) und die Entwicklung der Gewichtsveränderung dokumentiert (Abb. 11C). Um das Ausmaß der Infektion mit *L. major* zu untersuchen, wurde zudem in der sechsten und dreizehnten Woche nach Infektion die Anzahl lebendender *Leishmanien* an der Inokulationsstelle und in der Milz quantifiziert (Abb. 11D).

Analog zum ersten Experiment verursachte die Clodronat Behandlung wiederum einen protektiven Effekt im Vergleich zu den Kontrollliposomen, der jedoch durch die Erhöhung der wöchentlichen Dosis unverändert blieb. Auch die verzögerte Gewichtszunahme trat wieder in Erscheinung, beides wurde jedoch durch die häufigeren Behandlungen nicht verstärkt. Bezüglich der Letalität unter Clodronat Behandlung verstarben erneut 75 % der Mäuse verstärkt zu frühen Zeitpunkten. Innerhalb der ersten drei Wochen waren bereits 50 % der Tiere verstorben. Die Parasitenzahl im Ohr, als Maß für die lokale Kontrolle der Infektion durch das Immunsystem, zeigte keine Unterschiede, weder zum Zeitpunkt der ausgeprägten Infektion 7 Wochen nach Infektion, noch nach Resolution in der 13. Woche. Im Gegensatz dazu verursachte die Clodronat Behandlung zu beiden Zeitpunkten erhöhte Parasitenlasten in der Milz. Bei fehlender lokaler Kontrolle der Parasitenreplikation am Entzündungsort kann es insbesondere bei progressivem Krankheitsverlauf zu einer Viszeralisierung von *Leishmania* kommen, diese ist durch das erhöhte Vorkommen von Parasiten in den inneren Organen gekennzeichnet und scheint durch die Behandlung mit Clodronat begünstigt zu werden. In der dreizehnten Woche nach Infektion geben die Ergebnisse jedoch nur einen Hinweis auf diese Aussage, da nur ein Tier die dauerhafte Behandlung mit Clodronat überlebte, wohingegen in der PBS Gruppe fünf Tiere und in der PBS Liposomengruppe vier Tiere für die Analyse herangezogen wurden.

Um diese Veränderungen näher zu charakterisieren, wurde das angeborene und adaptive Kompartiment im Blut behandelter Tiere im Verlauf der Infektion analysiert. Hierzu erfolgte eine Blutentnahme in der ersten, vierten und zehnten Woche nach

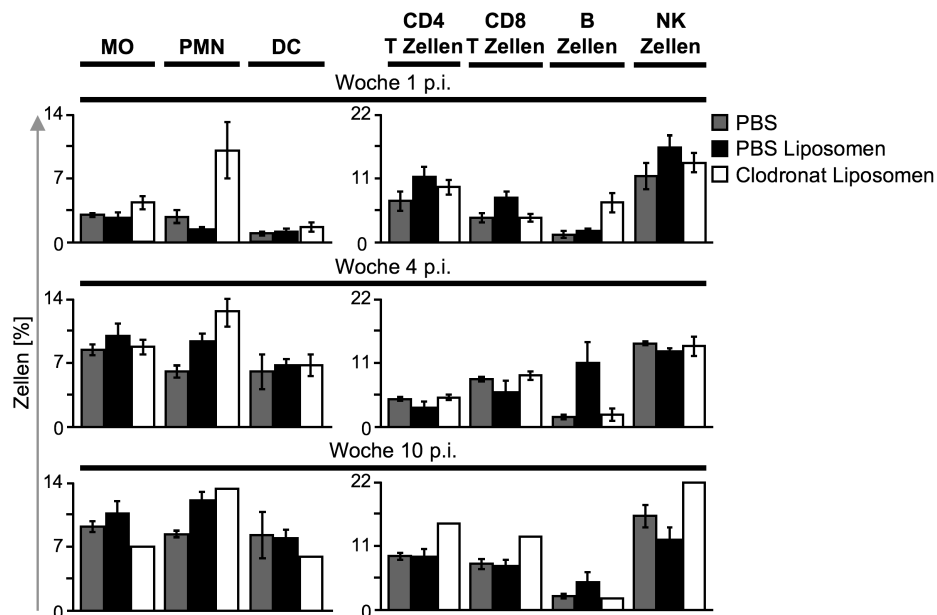
Infektion jeweils am dritten Tag nach der Applikation mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse der Zellfrequenzen (Abb. 12).



**Abb. 11 Einfluss der Liposomen Applikation auf Läsionsvolumina, Gewicht und Überleben infizierter C57BL/6 Mäuse.** Die Tiere wurden mit  $10^3$  metazyklischen *L. major* Promastigoten in beide Ohren infiziert und jeweils  $200 \mu\text{l}$  Liposomen bzw. PBS wurde zweimal wöchentlich appliziert (A). Die entstehenden Läsionen wurden über einen Zeitraum von 13 Wochen vermessen (B). Zudem wurde das Gewicht und das Überleben dokumentiert (C). 7 und 13 Wochen nach Infektion wurde die Parasitenzahl in den Ohren und der Milz mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt (D). (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM,  $n=1$  mit 1- 5 Mäusen pro Gruppe)

Es zeigte sich erneut besonders zu frühen Zeitpunkten eine Zunahme der PMN unter Clodronat Einfluss, eine Reduktion phagozytischer Zellen konnte nur in

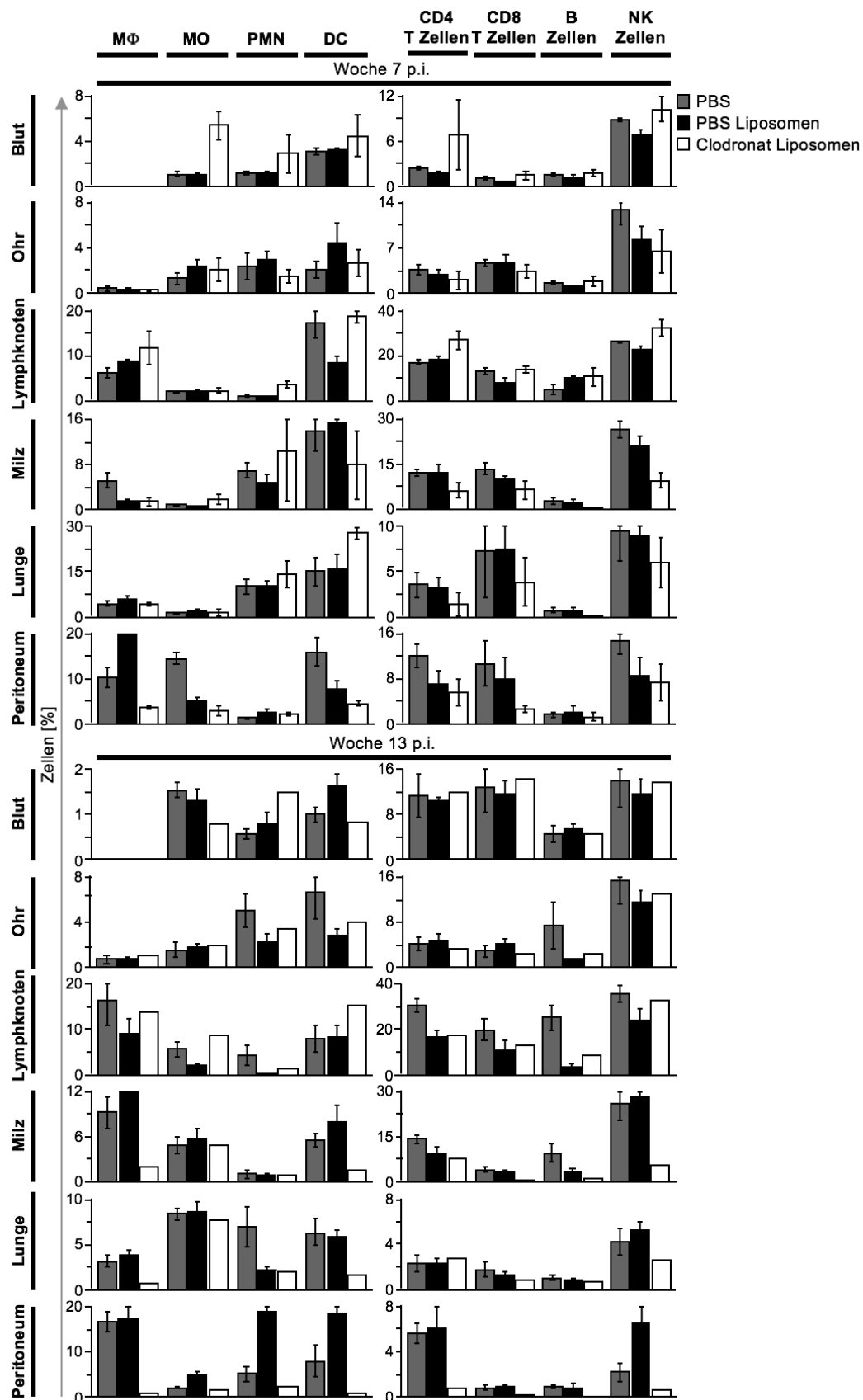
der abklingenden Infektion und damit nach langer Behandlungsdauer in der zehnten Woche beobachtet werden. Das adaptive Kompartiment unter Einfluss von Clodronat war durch eine vergleichbare Verteilung zu den Kontrollgruppen gekennzeichnet.



**Abb. 12 Einfluss der zweimaligen Liposomen Applikation pro Woche auf die Frequenz angeborener Immunzellen im Blut infizierter Tiere.** C57BL/6 Mäusen wurden zweimal wöchentlich 200 µl Liposomen intraperitoneal appliziert. In der ersten, vierten und zehnten Woche nach Infektion wurde die Depletionseffizienz im Blut drei Tage nach Applikation durchflusszytometrisch ermittelt. (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=1 mit 1- 2 Mäusen pro Gruppe)

Ergänzend wurde zu den relevanten Zeitpunkten der Infektion die Untersuchung von residenten Zellen in verschiedenen Geweben durchgeführt (Abb. 13A und B). Im entzündlichen Filtrat der Haut verursachte die Clodronat Behandlung keine schwerwiegenden Veränderungen angeborener Immunzellen. Lediglich nach Abklingen der Infektion zeigte sich eine leichte Abnahme des Anteils an PMN und DC verglichen mit den Kontrollgruppen. In Bezug auf die adaptive Immunantwort wurde eine leichte Reduktion der NK Zellen ersichtlich. Die Analyse des Blutes zeigte erhöhte PMN und MO Zahlen, die jedoch zehn Wochen nach Infektion rückläufig waren. Die Applikation von Clodronat verursachte über eine Dauer von zehn Wochen unter Einfluss der Infektion eine Reduzierung des T und B Zell Kompartiments in den Lymphknoten. Die gewebständigen Zellen der Lunge hingegen wiesen eine Divergenz zwischen den untersuchten Zeitpunkten auf. Zeigte sich in der sechsten Woche noch eine höhere Frequenz an DC und eine physiologische Zusammensetzung des verbleibenden angeborenen und adaptiven Systems, waren in der zehnten Woche die Zahlen für MΦ, PMN und DC rückläufig im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Lediglich in der peritonealen Kavität konnte eine wirksame Depletion

von M $\Phi$  zu beiden Zeitpunkten ermittelt werden.



**Abb. 13** Frequenz angeborener und adaptiver Immunzellen im Gewebe infizierter, Liposomen behandel-ter Tiere. C57BL/6 Mäusen wurde zweimal wöchentlich 200  $\mu$ l Liposomen intraperitoneal appliziert. Zum Zeitpunkt der ausgeprägten Inflammation 7 Wochen nach Infektion (A) und nach Abklingen der Infektion in Woche 14 (B) wurde die prozentuale Verteilung der angeborenen und adaptiven Immunzellen in den drainierenden Lymphknoten, der Haut am Infektionsort und der Milz, Lunge und der peritonealen Kavität ermittelt. (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=1 mit 1-2 Mäusen pro Gruppe)

Diese ging jedoch ebenfalls mit der signifikanten Reduktion aller anderen phagozytierenden Zellen einher. Zudem erschien auch das gesamte adaptive System durch die Behandlung mit Clodronat im Vergleich negativ beeinflusst zu sein.

In Bezug auf die adaptive Immunantwort wurde eine leichte Reduktion der NK Zellen ersichtlich. Die Analyse des Blutes zeigte erhöhte PMN und MO Zahlen, die jedoch zehn Wochen nach Infektion rückläufig waren. Die Applikation von Clodronat verursachte über eine Dauer von zehn Wochen unter Einfluss der Infektion eine Reduzierung des T und B Zell Kompartiments in den Lymphknoten. Die gewebsständigen Zellen der Lunge wiesen eine Divergenz zwischen den untersuchten Zeitpunkten auf. Zeigte sich in der sechsten Woche noch eine höhere Frequenz an DC und eine physiologische Zusammensetzung des verbleibenden angeborenen und adaptierten Systems, waren in der zehnten Woche die Zahlen für M $\Phi$ , PMN und DC rückläufig im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Lediglich in der peritonealen Kavität konnte eine wirksame Depletion von M $\Phi$  zu beiden Zeitpunkten ermittelt werden. Diese ging jedoch ebenfalls mit der signifikanten Reduktion aller anderen Phagozyten einher. Zudem erschien erneut auch das gesamte adaptive System durch die Behandlung mit Clodronat negativ beeinflusst zu sein.

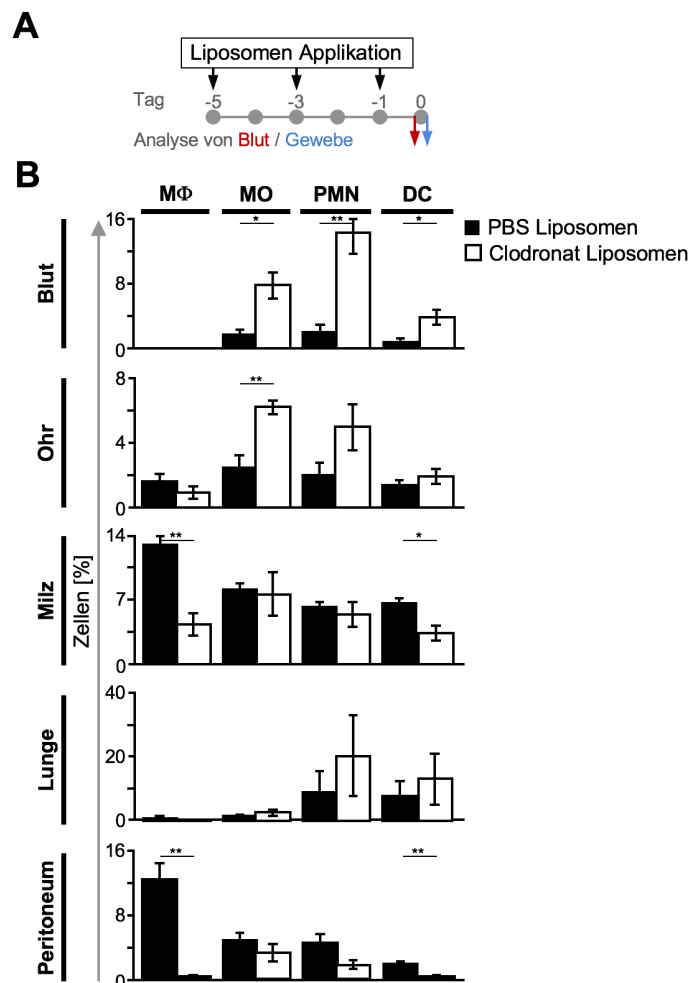
#### **4.1.2.3. Einfluss der dosisdichteren Liposomenapplikation auf die Immunantwort**

Im Weiteren wurde untersucht, ob die effiziente Depletion von M $\Phi$  durch weitere Steigerung der Applikationsfrequenz auch in den anderen Geweben erreicht werden konnte. Zudem sollten diese Versuchsbedingungen klären, ob eine wirkungsvolle Depletion in der Haut erzielt werden konnte, um eine Infektion mit *L. major* unter Ausschluss von M $\Phi$  zu ermöglichen. Hierzu wurde den Mäusen dreimal im Abstand von zwei Tagen jeweils eine Dosis Liposomen verabreicht und eine umfassende Analyse von gewebsständigen Zellen durchflusszytometrisch einen Tag nach der letzten Injektion durchgeführt. Zur Kontrolle wurden in diesem Ansatz PBS Liposomen verwendet.

Um die Auswirkungen auf M $\Phi$  besser zu analysieren, wurde neben den lymphatischen Organen auch die Lunge untersucht. Zudem wurden die Zellen in der peritonealen Kavität und damit an der Applikationsstelle bestimmt (Abb. 14). Eine wirkungsvolle Reduktion der M $\Phi$  Zahl konnte durch wiederholte Behandlungen nur in der Milz und im Peritoneum erreicht werden. Der Anteil der alveolar M $\Phi$  war grundsätzlich sehr gering und blieb unter Clodronat Einfluss unverändert im Vergleich zur

PBS Liposomen Kontrolle. Eine signifikante Reduktion der M $\Phi$  in der Haut, als Gewebe, das in der *L. major* Infektion relevant ist, konnte nicht erreicht werden. MO und die kurzlebigen PMN wurden durch die Clodronat Liposomen im Blut erhöht und zeigten auch einen Influx in die Haut, und verblieben in den anderen Geweben unverändert. Die Analyse der DC zeigte im Blut ebenfalls erhöhte Frequenzen, in der Milz hingegen wurde eine leichte Abnahme offensichtlich.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Clodronat zwar einen Einfluss auf die Frequenzen phagozytischer Zellen hat, jedoch für die M $\Phi$  Depletion insbesondere in der Haut kein geeignetes Modell ist.

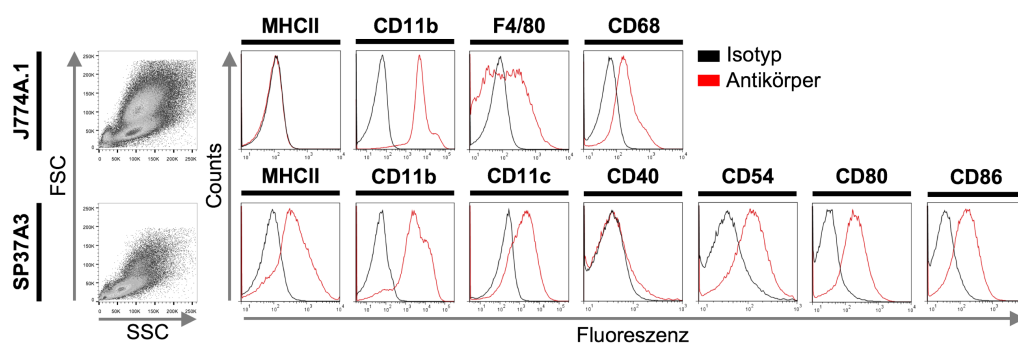


**Abb. 14 Depletionseffizienz von angeborenen Immunzellen im Gewebe von C57BL/6 Mäusen nach Liposomen Applikation.** C57BL/6 Mäusen wurden dreimal im Abstand von zwei Tagen 200  $\mu$ l Liposomen i.p. appliziert (A) und einen Tag nach der letzten Injektion die Auswirkungen auf die Frequenz angeborener Immunzellen im Gewebe durchflusszytometrisch analysiert (B). (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=1 mit 5 Mäusen pro Gruppe) (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ )

## 4.2. *In vitro* Analyse intrazellulärer Prozesse infizierter Phagozyten Zelllinien

### 4.2.1. Immunphänotypisierung von J774A.1 und SP37A3 Zellen

Um die Verfügbarkeit primärer Zellen zu umgehen und insbesondere für die Etablierung der verschiedenen Techniken wurden Zelllinien verwendet. Zur Kontrolle der phänotypischen Charakteristika beider Linien wurde zunächst eine Durchflusszytometrie basierte Analyse der für primäre M $\Phi$  bzw. DC spezifischen Oberflächenmoleküle durchgeführt (Abb. 15). Hierzu wurden die J774A.1 mittels Zellspatel aus der Kultur geerntet, die unreifen und folglich adhärennten SP37A3 wurden durch Inkubation mit PBS/EDTA vom Flaschenboden gelöst.



**Abb. 15 Phänotypische Charakterisierung der J774A.1 und SP37A3 Zelllinien.** Nach Ernte aus der Kultur gemäß der jeweiligen Bedingungen wurden die Zellen mit spezifischen Fluorochrom markierten Antikörpern gegen Zelltyp spezifische Oberflächenmoleküle von Makrophagen bzw. DC gefärbt. Die Fluoreszenzintensität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=3)

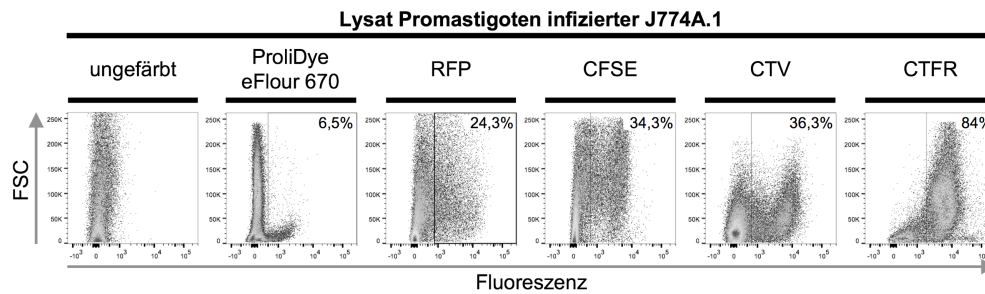
Zum einen erfolgte die Analyse der konstitutiv exprimierten Marker mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen MHCII und CD11b für beide Linien. Als M $\Phi$  spezifische Marker wurden F4/80 und CD68 verwendet, zum Vergleich mit dem DC Immunphänotyp wurde hingegen zusätzlich das Vorhandensein von CD11c analysiert. Die Zelllinien zeigten in der Analyse alle spezifischen Oberflächenmarker, lediglich eine MHCII Expression konnte für die J774A.1 nicht nachgewiesen werden, diese wird jedoch wie bereits in der Literatur beschrieben erst durch Stimulation induziert. Aufgrund der bisher wenigen Untersuchungen der SP37A3 wurden für diese noch weitere kostimulatorische Moleküle bestimmt. Die Zellen zeigten sich positiv für die in der Interaktion mit anderen Immunzellen wichtigen Proteine CD40, CD80 und CD86. Zudem konnte CD54, als Adhäsionsmolekül das zur Migration von DC beiträgt, für die SP37A3 nachgewiesen werden.

## 4.2.2. Methodenetablierung für die Untersuchung der intrazellulären Transformation und Replikation von *L. major*

### 4.2.2.1. Markierung von *L. major* mit verschiedenen Proliferationsfarbstoffen

Charakteristisch Parameter der intrazellulären Phase von *L. major* sind die Transformation der Promastigoten in Amastigote, die Replikation der Amastigoten und die Prädestination beider Lebensformen. Um diese nachweisbar zu machen, wurden verschiedene Methoden entwickelt. Für den Nachweis der intrazellulären Transformation und Replikation und zur durchflusszytometrische Wiederfindung wurde *L. major* zunächst mit verschiedenen Proliferationsfarbstoffe markiert (Abb. 16). Bei diesen handelt es sich grundsätzlich um membrangängige Farbstoffe, die intrazellulär freie Amine zytoplasmatischer Proteine kovalent binden. Diese Bindung beeinträchtigt die Zellfunktionen nicht und die Umsetzung durch zelluläre Enzyme katalysiert letztlich die Entstehung der fluoreszierenden Farbstoffe. Neben der gezielten Markierung von Zellen bieten diese Farbstoffe auch die Möglichkeit, die Zellteilung zu verfolgen. Im Zuge dieser wird der Farbstoff zu jeweils 50 % an die entstehenden Tochterzellen weitergegeben und führt bei weiteren Teilungen zu einer proportionalen Ausdünnung der Signalintensität.

Zur Verwendung kamen vier verschiedene, kommerziell erwerbliche Proliferationsfarbstoffe, das Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-ester (CFSE), Cell Trace violet (CTV), Cell Trace Far Red (CTFR) und der Prolidye eFluor 670. Zudem wurde der transgene, konstitutiv rot fluoreszierendes Protein (RFP) exprimierende, *L. major* Stamm verwendet. Um die Wiederfindung der verschiedenen Farbstoffe und die Beständigkeit der Markierung nach der intrazellulären Phase in M $\Phi$  zu untersuchen, wurden metazyklische Promastigote mit diesen markiert. Anschließend wurden J774A.1 über 18 h mit den gefärbten Promastigoten koinkubiert und das Lysat der gewaschenen Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass lediglich in 25 % der Promastigoten die RFP Expression des transgenen *L. major* Stamms in Abwesenheit des Selektionsantibiotikums (G418), welches unter normalen Kulturbedingungen zugesetzt werden muss, erhalten bleibt. Der Ansatz mit Prolidye eFluor 670 gefärbten Promastigoten zeigte lediglich eine Wiederfindung von 7 %. Nach der intrazellulären Phase in M $\Phi$  von CFSE und CTV markierten Promastigoten zeigen lediglich ca. 35 % ein positives Signal, CTFR hingegen zeigte mit 85 % positiven intrazellulären Parasiten die beste Beständigkeit der Färbung.



**Abb. 16 Vergleich der Signalintensität verschiedener Fluoreszenz Markierungen von Promastigoten nach der intrazellulären Phase in J774A.1.** J774A.1 wurden mit gefärbten oder RFP exprimierenden metazyklischen Promastigoten im Verhältnis 1:5 über einen Zeitraum von 18 h inkubiert. Die geernteten, gewaschenen Zellen wurden mit dem GentleMACS lysiert und das Zellysate wurde im Durchflusszytometer auf den Prozentsatz Fluoreszenz positiver PV untersucht. (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=2-4)

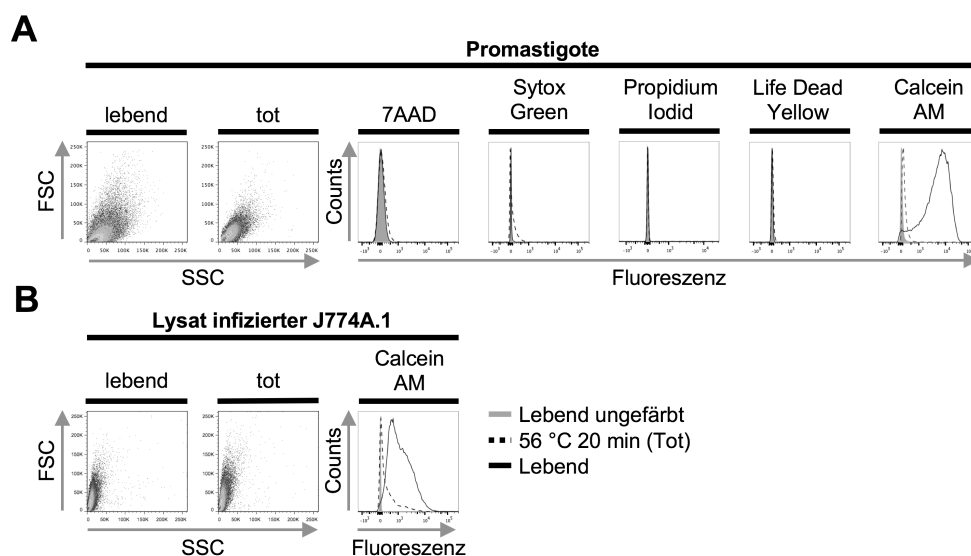
#### 4.2.2.2. Vitalitätstest von *L. major* enthaltenden parasitären Vakuolen

Um die intrazelluläre Mortifikation zu detektieren, wurde ein Nachweis für die Vitalität von *L. major* nach der intrazellulären Phase entwickelt. Hierzu wurde zunächst versucht, mehrere für Zellen etablierte Fluorochrom basierte Verfahren zur durchflusszytometrischen Diskriminierung von lebenden und toten Zellen auf promastigote *L. major* zu übertragen.

Zur Anwendung kam zum einen das Life Dead Yellow, das in geschädigten Zellen mit intra- und extrazellulären freien Aminen zu einem fluoreszierenden Produkt reagiert. In lebenden Zellen hingegen ist diese Reaktivität auf die Zelloberfläche beschränkt. Weiterhin wurden die drei DNS interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe Annexin V AF 488 Konjugat (7AAD), Sytox Green und Propidiumiodid (PI) verwendet. Bei Verlust der Membranintegrität können diese in Zellen eindringen und markieren daher selektiv tote Zellen. Das verwendete Acetoxymethylester des Calcein (Calcein AM) hingegen muss aktiv aufgenommen und intrazellulär umgewandelt werden, die Fluoreszenz entsteht damit ausschließlich in lebenden Zellen.

Um eine heterogene Population toter und lebender Promastigote zu erhalten, wurden diese ohne weitere Selektion metazyklischer Promastigote direkt aus der Kultur verwendet. Weiterhin wurden als Kontrolle Promastigote durch eine 20 min Inkubation bei 56 °C getötet und ebenfalls für die Messung aufbereitet (Abb. 17). In der anschließenden Analyse der ermittelten durchflusszytometrischen Daten wurde bewusst auf eine Größenselektion im FSC / SSC verzichtet, um auch apoptotische *L. major* mit in die Analyse einzubeziehen. Für den Vergleich der verschiedenen Farbstoffe im Potential zwischen lebenden und toten Promastigoten zu unterscheiden, wurden überlagerte Histogramme der detektierten Ereignisse in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität erstellt (Abb. 17). Die Ergebnisse zeigten keine Veränderung der Größe oder Granularität der Promastigoten durch die Färbung. Weiterhin konnte weder mittels 7AAD, PI noch Life Dead Yellow eine Unterscheidung

bezüglich der Vitalität der Promastigoten detektiert werden. Sytox Green zeigte eine leichte Färbung der getöteten Parasiten. Lediglich bei der Verwendung von Calcein AM waren zwei distinkte Populationen erkennbar und ermöglichte damit eine eindeutige Identifikation lebender Promastigote. Um weiterhin zu analysieren, ob dieser Farbstoff auch geeignet war, die Vitalität von *L. major* nach der intrazellulären Phase in Phagozyten zu untersuchen, wurden J774A.1 *in vitro* mit Promastigoten infiziert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, lysiert und das Lysat mit den enthaltenen PV einerseits direkt mit Calcein AM gefärbt und andererseits erneut eine Kontrolle mit getöteten intrazellulären Promastigoten hergestellt und diese ebenfalls markiert. Die Daten wurden entsprechend aufgearbeitet. Das Histogramm zeigte zwischen den PV mit lebenden und toten Promastigoten im Lysat ebenfalls eine gut zu unterscheidende Intensität in der Färbung. Damit ist Calcein AM geeignet für den Vitalitätsvergleich von sowohl Promastigoten als auch von *L. major* in PV.



**Abb. 17 Vitalitätsfärbung metazyklischer Promastigote und Zelllysat infizierter J774A.1.** Zur Diskriminierung zwischen lebenden und toten metazyklischen Promastigoten wurden diese mit 7- aminoactinomycin D (7-AAD, 5  $\mu$ l), Propidiumiodid (1,5  $\mu$ M), Life Dead Yellow (1  $\mu$ l) und Calcein Acetoxymethylester (Calcein AM, 10 mM) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Promastigote wurden durch eine 20 min Inkubation bei 56 °C behandelt um einen Teil abzutöten (A). Zudem wurden J774A.1 mit metazyklischen Promastigoten für 18 h kokultiviert und mittels des Gentle MACS Dissociators lysiert. Das gewonnene Lysat wurde mit Calcein AM gefärbt und die Kontrolle bei 56 °C behandelt (B). (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=2-5)

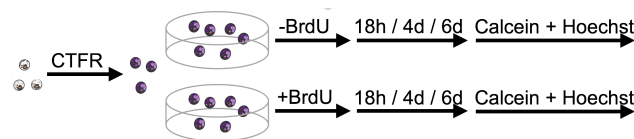
#### 4.2.2.3. Analyse der intrazellulären Replikation durch BrdU vermitteltes Hoechst Quenching

M $\Phi$  stellen geeignete Bedingungen für die Transformation von *L. major* und eine Replikation von Amastigoten ist möglich. Eigene, bisher nicht veröffentlichte Vorarbeiten legen nahe, dass diese Prozesse in DC nicht stattfinden, basierten jedoch auf der Quantifizierung intrazellulärer Parasiten in histologischen Färbungen. Die intra-

zelluläre Transformation und Replikation der *Leishmania* Lebensformen in den Phagozyten direkter zu adressieren, war Ziel der folgenden Versuche. Die Verwendung eines Proliferationsfarbstoffes gibt für intrazellulär transformierende Parasiten nur Hinweise auf eine Replikation. Die bei Promastigoten zunächst stattfindende Transformation in Amastigote geht mit einer deutlichen Reduzierung der Parasitengröße einher, und kann dadurch zu einer reduzierten Wiederfindung der verwendeten Proliferationsfarbstoffe führen. Damit kann nicht differenziert werden, ob die abnehmende Signalintensität des Proliferationsfarbstoffes durch intrazelluläre Replikation oder den Verlust an Zytoplasma verursacht wird. Um die Replikation direkt nach zu weisen, wurde die Vervielfältigung der DNS daher durch Inkubation mit 5-Brom-2'-desoxy-Uridin (BrdU), ein modifiziertes Uridin, untersucht. Werden Zellen in Anwesenheit von BrdU kultiviert, wird dieses während der DNS-Synthese anstelle von Thymidin eingebaut. DNS mit inkorporiertem BrdU, die anschließend mit DNS interkalierendem Hoechst gefärbt wird, fluoresziert schwächer, da BrdU das Fluoreszenzsignal von Hoechst quencht. (Rabinovitch, 1983)

Um die DNS Synthese von *L. major* mit dieser Methode nachzuweisen und mit der Abnahme der Signalintensität eines Proliferationsfarbstoffes zu vergleichen, wurden metazyklische Promastigote und läsionale Amastigote gewonnen und mit dem fluoreszierenden Proliferationsfarbstoff CTFR markiert (Abb. 18). Zur Überprüfung der Eignung des Hoechst Quenchings für den Nachweis der Replikation von *L. major* wurde zunächst die extrazelluläre Transformation von Amastigoten in Promastigote und die *in vitro* Replikation von Promastigoten analysiert. Um diese Transformation von Amastigoten zu induzieren, wurden diese in *Leishmanien* Medium kultiviert, eine Vorgehensweise die normalerweise genutzt wird, um eine frische Promastigotenkultur zu generieren. Innerhalb von 7 Tagen und 2 Passagen mit einer 1:5 Verdünnung entsteht normalerweise eine stabile Promastigotenkultur (siehe 7.4.1.1). In diesem Versuch diente dies der Untersuchung der Signalintensität von CTFR in Abhängigkeit von der Transformation und der Analyse des Einflusses der CTFR Färbung auf die Replikations- und Transformationskompetenz von *L. major*. Es erfolgten jeweils zwei Ansätze von CTFR gefärbten Promastigoten- und Amastigotenkulturen mit und ohne Zugabe von BrdU. Nach 18 Stunden, 4 und 6 Tagen wurden beide Lebensformen aus der Kultur geerntet (Abb. 18) und mit Hoechst (Abb. 19D) und Calcein AM (Abb. 19A) gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Durch Vergleich mit ungefärbten Parasiten wurde der zudem Prozentsatz Calcein positiver und damit lebender Parasiten bestimmt (Abb. 19C). Aus der Hoechst-

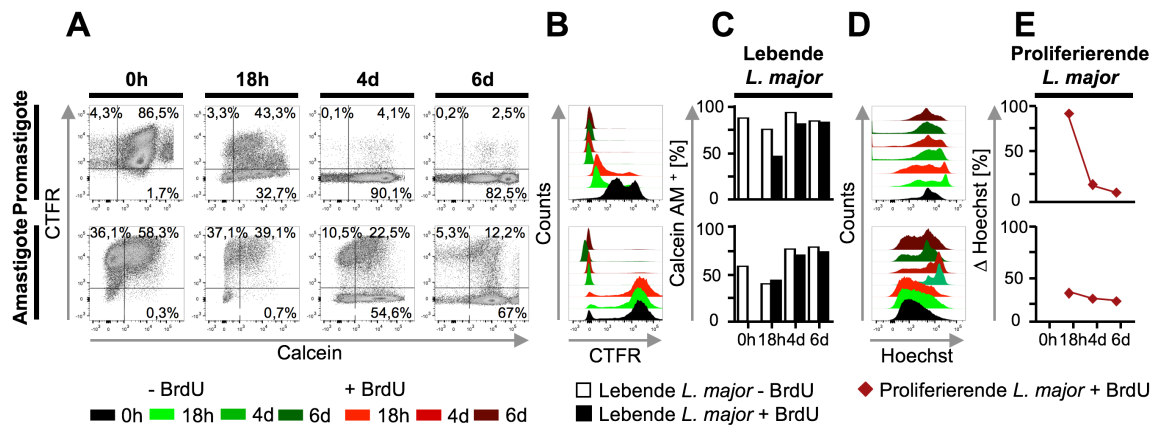
färbung der Parasiten mit und ohne BrdU wurde zunächst jeweils die mediane Signalintensität bestimmt. Der Quotient aus dieser und der Anzahl der Ereignisse ergab die mediane Signalintensität pro Parasit. Anschließend wurde diese für die Kultur mit BrdU mit der zugehörigen Kontrolle in Abwesenheit von BrdU ins Verhältnis gesetzt und dadurch der Prozentsatz proliferierender Parasiten berechnet ( $\Delta$  Hoechst) (Abb. 19E). Bei einer Proliferationsrate von 50% hat die Hälfte der Parasiten eine Zellteilung durchlaufen, bei 100 % haben alle Parasiten eine Zellteilung durchlaufen und bei 200 % fanden entsprechend bereits zwei Zellteilungen statt.



**Abb. 18 Durchführung des BrdU vermittelten Hoechst Quenchings von *L. major* Kulturen am Beispiel von Amastigoten.** Metazyklische Promastigote und läSIONALE Amastigote wurden gewonnen und mit dem fluoreszierenden Proliferationsfarbstoff CTFR markiert. Beide Lebensformen wurden jeweils mit und ohne Zugabe von BrdU kultiviert. Nach 18 Stunden, 4 und 6 Tagen wurden beide Lebensformen aus der Kultur geerntet und mit Hoechst, zum Nachweis der Replikation, und Calcein AM, zum Nachweis lebender Parasiten, gefärbt.

Die Promastigoten zeigten zu Beginn der Kultur (0h) eine Lebendzellzahl von ca. 90 % und waren nahezu vollständig mit CTFR gefärbt (Abb. 19A, B). Bereits nach 18 Stunden war in Abwesenheit von BrdU die CTFR Färbung rückläufig (Abb. 19A, B) und es zeigte sich ein leicht gesunkener Anteil lebender Promastigoten (Abb. 19C). Dieser Anteil stieg zwischen 18 Stunden und 4 Tagen leicht an und das CTFR Signal ging auf 4,2 % zurück (Abb. 19B, C). Durch den zwischen dem 4 und 6 Tag einsetzenden Mangel an Nährstoffen, da die Kultur nicht mit frischem Medium versorgt wurde, ging die Anzahl lebender Promastigoten leicht zurück und es konnte nahezu keine CTFR Färbung mehr detektiert werden (Abb. 19B, C). Die Zugabe von BrdU hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Abnahme des CTFR Signals (Abb. 19B), verursachte jedoch innerhalb der ersten 18 Stunden eine Reduktion der lebenden Promastigoten, vermutlich aufgrund der Toxizität des Einbaus von BrdU in die replizierende Promastigote (Abb. 19C). Dies korrelierte auch mit der aus der Hoechst Signalintensität (Abb. 19D) ermittelten Proliferationsrate von 90 % nach 18 Stunden (Abb. 19E). Methodisch bedingt wurden die durch BrdU getöteten und folglich lysierten Promastigoten durch die Probenaufbereitung aus der Kultur entfernt. Dies könnte die Zunahme des Anteils lebender Promastigote bei sinkender Proliferationsrate zwischen 18 Stunden und 4 Tagen (Abb. 19C, E) erklären. Im Ansatz mit BrdU zeigte sich nach 6 Tagen keine Nährstoff bedingte Abnahme der lebenden Promastigoten (Abb. 19C). Die Ergebnisse zeigten, dass für Promastigote unter

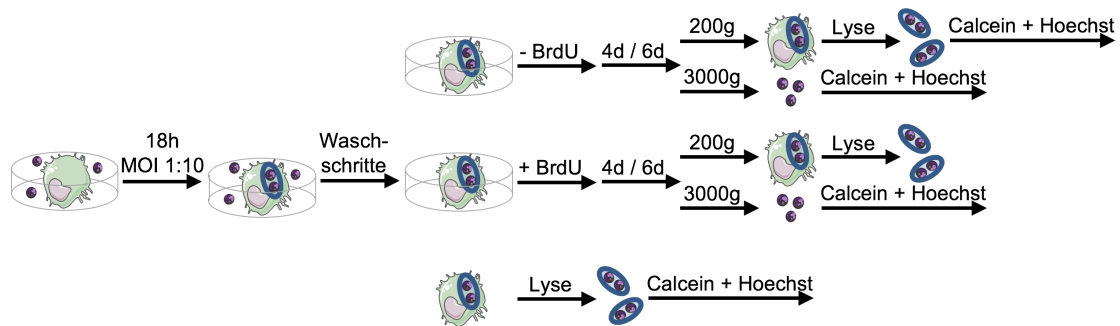
Kulturbedingungen grundsätzlich die Replikation durch den Einbau von BrdU nachgewiesen werden konnte und die Verwendung von CTFR zum Nachweis der Replikation tendenziell vergleichbare Ergebnisse mit dem Hoechst Quenching lieferte, die Replikation jedoch nach 18 Stunden bereits das Maximum erreicht hatte.



**Abb. 19 Untersuchung der Replikation von *L. major* Promastigoten und Amastigoten mittels BrdU vermitteltem Hoechst Quenching.** Metazyklische Promastigote und lässionale Amastigote wurden mit CTFR markiert und mit und ohne Zugabe von BrdU bei 27 °C gemäß den Kulturbedingungen inkubiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten (18 h, 4 d, 6 d) wurden die Parasiten aus der Kultur geerntet und mit Hoechst (D) und Calcein AM gefärbt und die Signalintensitäten am Durchflusszytometer untersucht (A (Ansätze ohne Zugabe von BrdU), B). Anhand ungefärbter *L. major* wurde der Anteil lebender Parasiten bestimmt (C). Die Signalintensitäten der Hoechstfärbung wurde als mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle berechnet und der Prozentsatz proliferierender Zellen durch Vergleich mit der korrespondierenden Kontrolle ohne BrdU berechnet ( $\Delta$  Hoechst, E). (n=1)

Bei der Betrachtung der Amastigotenkulturen mit und ohne Zugabe von BrdU hingegen war die CFTR Färbung bis zum sechsten Tag in beiden Ansätzen nachweisbar (Abb. 19A, B). Im Vergleich zu Promastigoten setzt die Replikation von Amastigoten erst nach Transformation und daher zeitverzögert ein dies wurde durch den Einbau an BrdU bestätigt (Abb. 19D). Innerhalb der ersten 18 Stunden sank zudem die Zahl lebender Amastigote in beiden Ansätzen leicht (Abb. 19C), möglicherweise da es in diesem Zeitraum zur Selektion transformationskompetenter Amastigote kommt und Amastigote, die nicht zur Transformation in der Lage sind, absterben. Bis zum vierten Tag hingegen stieg der Anteil lebender Amastigote in An- und Abwesenheit von BrdU (Abb. 19C) bei nahezu unveränderter Proliferationsrate (Abb. 19E). Diese Diskrepanz zwischen dem Verlust der CTFR Färbung und der ausbleibenden Replikation könnte durch die Zunahme an Zytoplasma im Zuge der Transformation in Promastigote verursacht sein, da dadurch mehr Esterasen für die Umsetzung von Calcein zur Verfügung. Bis zum sechsten Tag blieb sowohl die Proliferation als auch die Zahl lebenden Amastigoten weiterhin nahezu konstant unabhängig von der BrdU Zugabe (Abb. 19C), möglicherweise hatte die Expansion noch nicht einsetzt, bzw. die ausbleibende Mediumzugabe wirkte limitierend (Abb. 19C, E).

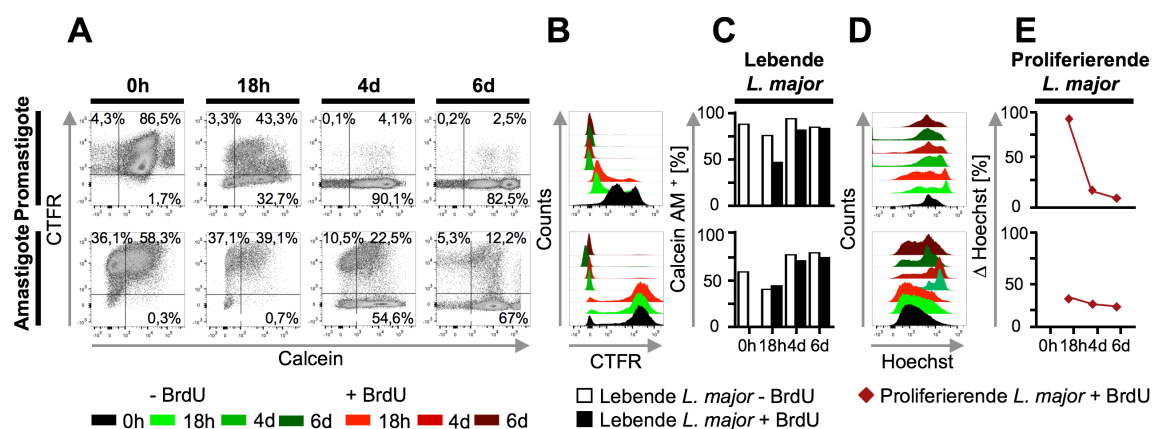
Nachdem die Ergebnisse der *in vitro* Kultivierung insbesondere der Promastigotenkultur den BrdU Assay als verlässliche Methode zum Nachweis der Parasitenreplikation bestätigen konnten, wurde im Weiteren analysiert, ob die Methode auch zum Nachweis der intrazellulären Replikation in J774A.1 geeignet ist. Hierzu wurden J774A.1 mit CTFR markierten Promastigoten oder Amastigoten für 18 Stunden ohne Zugabe von BrdU kokultiviert (Abb. 20). Anschließend wurden die nicht internalisierten Parasiten durch Waschschriffe entfernt. Ein Teil der Zellen wurde nach der Infektion direkt lysiert und das Lysat mit den enthaltenen PV mit Calcein AM und Hoechst gefärbt, um den Anteil lebender Parasiten, deren DNS Menge und die CTFR Färbung zu Beginn des Experiments zu bestimmen. Der verbleibende Teil der Zellen wurde mit oder ohne Zugabe von BrdU für 4 und 6 Tage inkubiert (Abb. 20). Die Zellen und der Kulturüberstand wurden anschließend separiert. Die durch Zentrifugation (3.000 g) aus dem Kulturüberstand gewonnenen Parasiten (Abb. 21) und das Zelllysat mit den enthaltenen PV (Abb. 22) wurden gefärbt. Diese Trennung diente dem Nachweis von Parasiten in den Kulturüberstand, die frei werden, da die J774A.1 durch Replikation der Parasiten letztlich rupturiert werden (Abb. 21). Grundsätzlich benötigt die Morphogenese intrazellulärer Promastigote *in vitro* 10 bis 20 Stunden und die resultierenden Amastigoten beginnen, in den anschließenden 24 bis 120 Stunden zu replizieren. (Tsigankov et al., 2014)



**Abb. 20 Durchführung des BrdU vermittelten Hoechst Quenchings zum Nachweis der intrazellulären Replikation am Beispiel von Amastigoten.** J774A. wurden mit CTFR markierten Promastigoten oder Amastigoten für 18 h kokultiviert. Anschließend wurden die nicht internalisierten Parasiten durch Waschschriffe entfernt. Ein Teil der Zellen wurde nach der Infektion direkt lysiert und das Lysat mit den enthaltenen PV mit Calcein AM und Hoechst gefärbt. Der verbleibende Teil der Zellen wurde mit und ohne Zugabe von BrdU für 4 und 6 Tage inkubiert. Die Zellen und der Kulturüberstand wurden geerntet. Die Zellen (200g) und die im Kulturüberstand enthaltenen Parasiten (3.000 g) wurden durch Zentrifugation aufgearbeitet. Nach der Lyse der Zellen wurden die gewonnenen PV und die Parasiten mit Calcein AM und Hoechst gefärbt.

Nach sechs Tagen war in den Überständen Amastigoten und Promastigoten infizierter J774A.1 ohne BrdU ein nahezu identischer Anteil lebender Parasiten nachweisbar (Abb. 21C). Die frei im Überstand vorliegenden Amastigoten wiesen im Gegensatz zu den Promastigoten eine geringere CTFR Intensität auf (Abb. 21A, B) und hatten auch mehr BrdU eingebaut (Abb. 21D). Die Daten sprechen dafür, dass

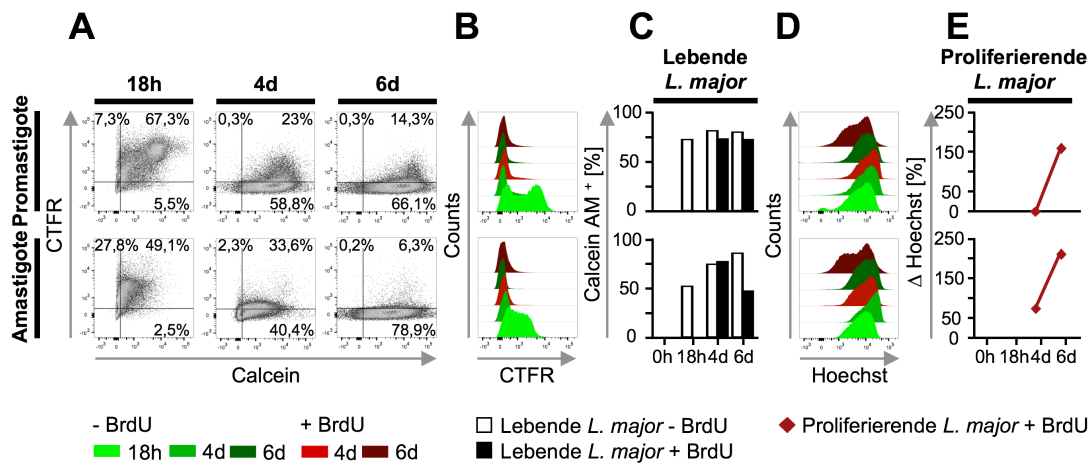
die Amastigoten intrazellulär bereits zwischen 18 Stunden und 4 Tagen replizieren (Abb. 21E) und dies zur Ruptur der J774A.1, und damit zur Entlassung der Amastigoten in die Überstände, führte. Die intrazelluläre Replikation von Promastigoten hingegen setzte erst nach 6 Tagen ein, da erst zu diesem Zeitpunkt die Hoechst Intensität abnahm (Abb. 21D) und es zu einem Anstieg proliferierender Promastigoten kommt (Abb. 21E). Die intrazelluläre Replikation der Amastigoten wurde auch durch die Beobachtung bestätigt, dass diese im Überstand vorliegend nahezu vollständig CTFR negativ sind (Abb. 21B). Um die Ruptur der Zellen direkter nachzuweisen wäre jedoch zusätzlich die Bestimmung der lebenden J774A.1 wünschenswert.



**Abb. 21 Untersuchung der intrazellulären Transformation und Replikation in den Überständen *L. major* Promastigoten und Amastigoten infizierter J774A.1 mittels BrdU vermitteltem Hoechst Quenching.** Metazyklische Promastigote und läSIONALE Amastigote wurden mit CTFR markiert und mit J774A.1 für 18 Stunden in einem Verhältnis von 10:1 kokultiviert. Anschließend wurden die freien Parasiten entfernt und die Zellen mit und ohne Zugabe von BrdU bei 37 °C für 4 und 6 Tage inkubiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen von den im Überstand befindlichen Parasiten getrennt. Diese wurden mit Hoechst (D) und Calcein AM gefärbt und die Signalintensitäten am Durchflusszytometer untersucht (A (Ansätze ohne Zugabe von BrdU), B). Anhand von ungefärbten Parasiten wurde der lebende Anteil bestimmt (C). Die Signalintensitäten der Hoechstfärbung wurde als mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle berechnet und der Prozentsatz proliferierender Zellen durch Vergleich mit der korrespondierenden Kontrolle ohne BrdU berechnet ( $\Delta$  Hoechst, E). (n=1)

Die Betrachtung des Zelllysats diente der Analyse der Replikation und Vitalität der Parasiten in den PV (Abb. 22). Die PV enthielten nach der Infektion (18 h) ca. 75 % lebende Promastigote (Abb. 22C) die ein deutliches CTFR Signal (75 %) aufwiesen (Abb. 22A, B). Unabhängig von BrdU blieb zwischen 18 Stunden und 6 Tagen der Anteil lebender Promastigote nahezu konstant (Abb. 22C) und das CTFR Signal ging auf ca. 14 % zurück (Abb. 22A). Zwischen dem 4. und 6. Tag stieg der BrdU Einbau (Abb. 22D) und damit die Proliferation (Abb. 22E) deutlich an, wohingegen das CTFR Signal lediglich um ca. 10 % abnahm (Abb. 22A). Der Vergleich der Abnahme des CTFR Signals (Abb. 22A) mit der direkten Bestimmung der Replikation durch den Einbau von BrdU (Abb. 22D) zeigte, dass es zunächst zu einer starken Abnahme des CTFR Signals kam, vermutlich bedingt durch die Transformation der

Promastigoten in die deutlich kleineren Amastigote. Erst zu den späteren Zeitpunkten konnte das abnehmende CTFR Signal auf eine Replikation zurückgeführt werden, da erst zwischen dem 4. und 6. Tag ein BrdU vermitteltes Hoechst Quenching nachgewiesen werden konnte (Abb. 22D).



**Abb. 22 Untersuchung der intrazellulären Transformation und Replikation von *L. major* Promastigoten und Amastigoten in J774A.1 mittels BrdU vermitteltem Hoechst Quenching.** Metazyklische Promastigote und lässionale Amastigote wurden mit CTFR markiert und mit J774A.1 für 18 Stunden in einem Verhältnis von 10:1 kokultiviert. Anschließend wurden die freien Parasiten entfernt und die Zellen mit und ohne Zugabe von BrdU bei 37 °C für 4 und 6 Tage inkubiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Das Lysat mit den enthaltenen PV wurde mit Hoechst (D) und Calcein AM gefärbt und die Signalintensitäten am Durchflusszytometer untersucht (A (Ansätze ohne Zugabe von BrdU), B). Anhand von ungefärbtem Lysat wurde der Anteil lebender Parasiten bestimmt (C). Die Signalintensitäten der Hoechstfärbung wurde als mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle berechnet und der Prozentsatz proliferierender Zellen durch Vergleich mit der korrespondierenden Kontrolle ohne BrdU berechnet ( $\Delta$  Hoechst, E). (n=1)

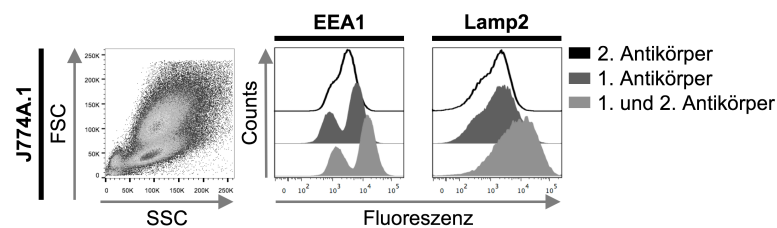
Für die intrazelluläre Proliferation von Amastigoten ergab sich nach 18 Stunden ein geringerer Anteil lebender und CTFR positiver Amastigote in den PV im Vergleich zu Promastigoten PV (Abb. 22C). Bei Amastigoten die im Vergleich zu Promastigoten intrazellulär nicht zunächst in die replikationskompetente Lebensform transformieren müssen, setzt die Replikation bereits nach 18 Stunden ein (Abb. 22E). Dies wurde durch die Abnahme des CTFR Signals (Abb. 22A, B), den Anteil lebender Amastigote in den PV in Abwesenheit von BrdU (Abb. 22C) und durch den Einbau von BrdU bestätigt (Abb. 22D). Nach vier Tagen lag die Proliferationsrate in den PV bei Amastigoten bereits 70 % höher als die von Promastigoten (Abb. 22E). Erst nach sechs Tagen begannen die Proliferationsraten sich anzunähern. Dies wird möglicherweise durch den toxischen Effekt von BrdU begründet, der in Folge die schneller replizierenden Amastigoten schneller abtötet (Abb. 22B) und sich in dem sinkenden Anteil lebender Amastigoten in den PV am sechsten Tag in Anwesenheit von BrdU zeigt (Abb. 22C). Damit konnte gezeigt werden, dass für die intrazelluläre Replikation von Amastigoten die Verwendung des Proliferationsfarbstoffes CTFR und die Analyse des BrdU Einbaus zu ähnlichen Ergebnissen führen.

Basierend auf der Annahme, dass in MΦ für Promastigoten zunächst die Transformation in Amastigote erfolgt bevor die Replikation einsetzt, konnte der BrdU Einbau die intrazelluläre Replikation für beide Lebensformen verlässlich nachweisen. Zudem ermöglichte die simultane Calcein AM Färbung die Beurteilung ob die J774A.1 in der Lage sind *L. major* intrazellulär abzutöten. Zusammengenommen ist dieser Assay daher geeignet in weiteren Versuchen J774A.1 und SP37A3 direkt bezüglich des Schicksals von *L. major* zu vergleichen.

### 4.2.3. Methodenetablierung zur Untersuchung der Phagosomenmaturation

#### 4.2.3.1. Optimierung der Signalintensität durch Fluorochrom markierte Sekundärantikörper

Die Präsenz von spezifischen Proteinen der phagosomalen Membran ist relativ gering im Verhältnis zur Gesamtheit der zellulären Proteine und ist im Verlauf der Reifung vom frühen Phagosom zum Phagolysosom alternierenden Tendenzen unterworfen. Um diese Marker in intakten Zellen durchflusszytometrisch nachweisen zu können wurde die Signalintensität der spezifischen Antikörper gegen die endosomalen Reifungsmarker EEA1 und Lamp2 durch FITC markierte Sekundärantikörper verstärkt. Hierzu erfolgte zunächst die Immunfärbung mit spezifischen Primärantikörpern und anschließend mit FITC markierten Sekundärantikörpern in J774A.1. Um die Spezifität der Sekundärantikörper zu sichern, wurde jeweils eine Kontrollfärbung nur unter Verwendung des Sekundärantikörpers durchgeführt. Sowohl für das EEA1 als auch Lamp2 zeigte sich eine Nachweisbarkeit der Färbung durch die Signalverstärkung mittels Zweitantikörper, die sich deutlich von der unspezifischen Färbung unterschied (Abb. 23). Daher wurde diese Signalverstärkung für die weiteren Versuche verwendet.

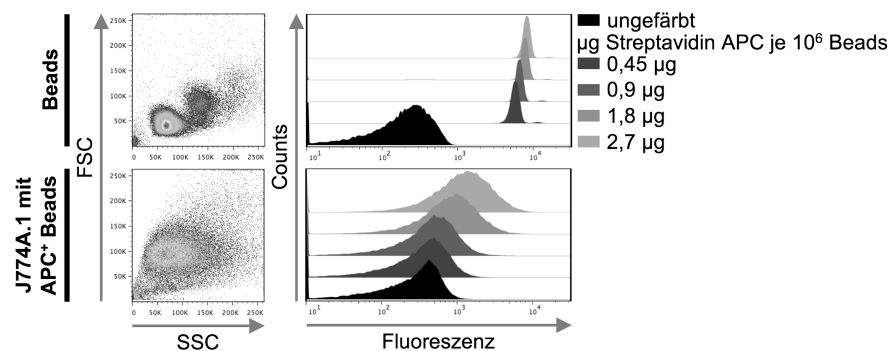


**Abb. 23 Erhöhung der Signalintensität durch FITC markierte Sekundärantikörper.** Nach Ernte aus der Kultur wurden die J774A.1 mit spezifischen Fluorochrom markierten Antikörpern gegen Lamp2 und EEA1 gefärbt. Zudem wurden korrespondierende FITC markierte Sekundärantikörper, die sich gegen den jeweiligen Isotyp des Primärantikörpers richteten, verwendet. Die Kontrolle der Spezifität des Sekundärantikörpers erfolgte durch eine Einzelfärbung. Die Fluoreszenzintensität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=2)

#### 4.2.3.2. Fluoreszenzmarkierung von Beads

Um eine Aussage über eine veränderte phagosomale Reifung von *L. major* enthaltenden PV zu treffen, musste diese mit der Maturation von Phagosomen verglichen werden, die einen Partikel enthalten, der nicht in zelluläre Prozesse eingreifen kann. Als solcher haben sich Latex oder Polystyrene Beads durchgesetzt, diese werden von allen Phagozyten aufgenommen. Ursächlich durch den durchflusszytometrischen Ansatz der geplanten Experimente mussten diese Beads zunächst markiert werden, um die Wiederfindung zu sichern. Hierzu wurden jeweils  $10^6$  biotinylierte Beads mit verschiedenen absoluten Mengen eines Streptavidin APC Konjugats markiert.

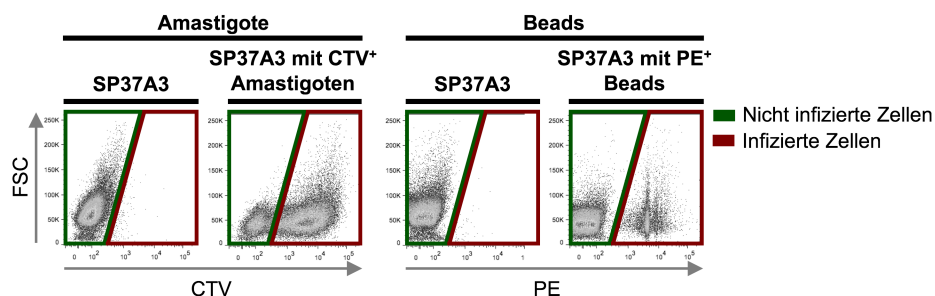
In allen verwendeten Ansätzen war eine klare Differenzierung zwischen gefärbten und ungefärbten Beads im Durchflusszytometer möglich. Weiterhin musste für die Versuche auch die Aufnahme von Beads in Phagozyten durchflusszytometrisch bestimmt werden. Dazu wurden die unter den angegebenen Bedingungen markierten Beads für 18 h mit J774A.1 inkubiert. Die gewaschenen Zellen wurden in der Analyse mit Zellen ohne Beads verglichen. Hier zeigte sich, dass 2,7  $\mu\text{g}$  des Streptavidin APC Konjugats zur Markierung von  $10^6$  Beads eingesetzt werden musste, um eine Unterscheidung in der APC Signalintensität und damit der Internalisierung zu ermöglichen (Abb. 24).



**Abb. 24 Fluoreszenz Markierung von Beads für die Durchflusszytometrie.** Jeweils  $10^6$  Beads wurden mit verschiedenen Konzentrationen Streptavidin APC unter Biotin freien Bedingungen gefärbt. Weiterhin wurden die gefärbten Beads für 18 h mit J774A.1 im Verhältnis 1:5 für 18 h inkubiert. Die Signalintensität von Beads und Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. (n=1)

#### 4.2.3.3. Phagozytische Aktivität von SP37A3

Bei den verwendeten SP37A3 handelt es sich um eine bisher noch wenig charakterisierte Zelllinie, insbesondere existieren bisher keine Untersuchungen zu ihrer phagozytischen Aktivität. Um für die vergleichenden Analysen mit M $\Phi$  diese sicher zu stellen, wurden die unreifen Zellen mit PBS/EDTA geerntet. Anschließend erfolgte eine 6 stündige Inkubation mit CTV markierten Amastigoten bzw. PE markierten Beads. Die gewaschenen Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert.



**Abb. 25 Durchflusszytometrische Diskriminierung der Internalisierung von Amastigoten und Beads durch SP37A3.** Die Zellen wurden entweder mit CTV markierten Amastigoten oder PE markierten Beads im Verhältnis 1:5 für die 6 h kultiviert. Die Fluoreszenz des jeweiligen Agens ermöglicht die Unterscheidung zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen.

Zum einen konnte eine Internalisierung sowohl von Amastigoten als auch Beads

nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte die Auswertung das eine durchflusszytometrische Diskriminierung zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen erreicht werden konnte, wodurch die getrennte Betrachtung der intrazellulären Prozesse ermöglicht wurde (Abb. 25).

#### **4.2.4. Methodenetablierung der Phagosomenisolation aus *L. major* infizierten J774A.1**

Ziel der folgenden Versuche war es eine Methode zu entwickeln, Amastigote enthaltende PV für eine massenspektrometrische Analyse zu isolieren. Grundzüge dieser Methode waren die Infektion der beiden Phagozyten Zelllinien mit Fluoreszenz markierten *L. major* Amastigoten. Die eigentliche Separation von PV aus dem Zelllysate sollte über die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung erfolgen mit einer sich anschließenden massenspektrometrischen Analyse.

##### **4.2.4.1. Vergleich der Phagosomenausbeute nach verschiedenen Zelllyse Methoden**

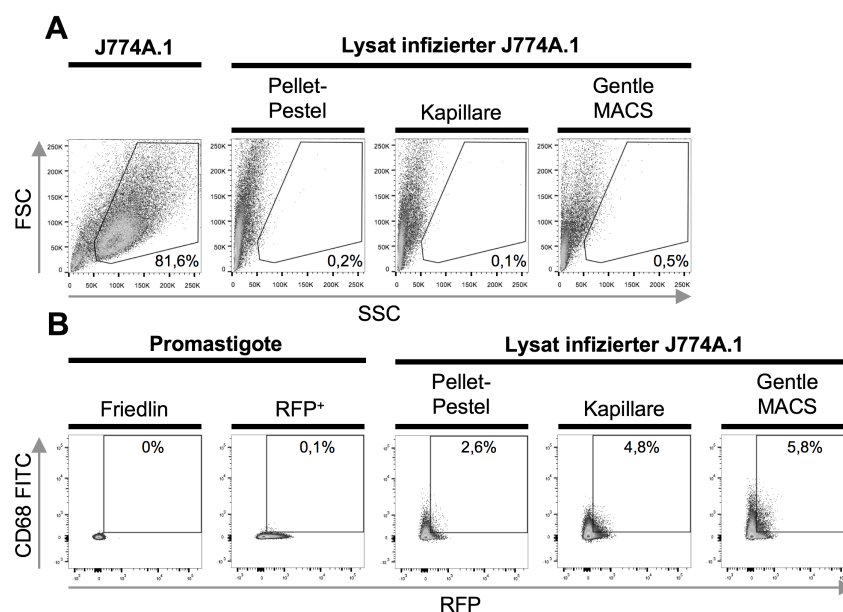
Zur Bestimmung der effizientesten und gleichzeitig schonendsten Lyse wurden drei gebräuchliche Methoden verglichen. Zunächst wurden J774A.1 über 18 h mit RFP exprimierenden Promastigoten infiziert. Nach Entfernung der nicht internalisierten Parasiten wurden die Zellen gleichmäßig auf die verschiedenen Ansätze verteilt. Zur Lyse wurde der Pellet-Pestle verwendet. Durch die schnelle motorgetriebene Rotationsbewegung des konischen Pistills werden die in der Lösung befindlichen Zellen aufgrund der Zentrifugalkraft nach außen in Richtung der Gefäßwand geschleudert und durch den Aufprall an dieser und an anderen Zellen lysiert.

Ein weiterer Ansatz war die Verwendung von zwei über eine dünne Kapillare verbundenen Spritzen. Durch wechselseitige Bewegung der Flüssigkeit mit den enthaltenen Zellen entstehen Differenzen in der Strömungsgeschwindigkeit und eine turbulente Strömung wird erzeugt. Die trudelnden Zellen werden durch Scherkräfte lysiert. Bei der letzten verwendeten Methode handelt es sich um ein halbautomatisiertes System zur Homogenisierung von Gewebe und Zellen. In Gefäßen mit integrierter Klinge rotiert diese in einem festgelegten Protokoll, bestehend aus wechselnden Drehrichtungen und Geschwindigkeiten, und homogenisiert dadurch die Probe.

Die erhaltenen Lysate wurden für den Vergleich des prozentualen Anteils lysierter Zellen der unterschiedlichen Methoden durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 26).

Der vorwärts und seitwärts gerichtete Laser wurde auf die Lagedarstellung von intakten Zellen eingestellt. Hierbei zeigten alle drei Methoden eine Lyse von mehr als 99% der Zellen. Trotz dieser vergleichbaren Effizienz zeigten die Methoden deutliche Unterschiede in der Konservierung der PV Membran. Um diese zu ermitteln, wurde in den jeweiligen Lysaten das mit der PV Membran assoziierte CD68 immunmarkiert.

Diese Analyse zeigte den höchsten Anteil an intakten PV nach der Lyse der Zellen mit dem GentleMACS System, und, da dieses auch eine gesicherte Reproduzierbarkeit der Lysebedingungen gewährleistet, wurde diese Methode für die sich anschließenden Versuche verwendet.

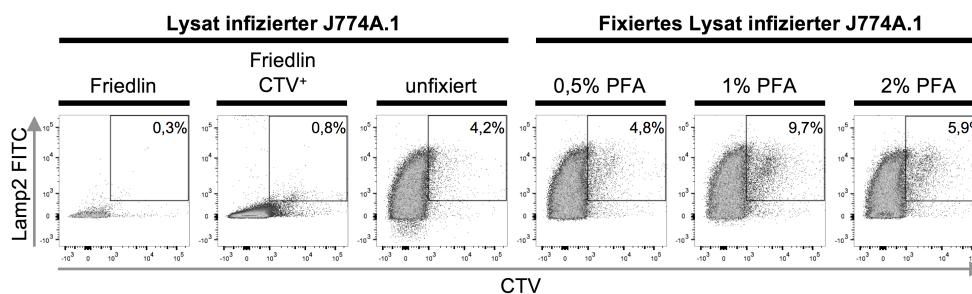


**Abb. 26 Einfluss der Lysemethode auf die Ausbeute intakter PV.** J774A.1 wurden mit RFP exprimierenden metazyklischen Promastigoten im Verhältnis 1:5 über einen Zeitraum von 18 h inkubiert. Die geernteten, gewaschenen Zellen wurden mit drei unterschiedlichen Methoden lysiert. Die infizierten Zellen wurden entweder mit einem motorgetriebenen Pelett Pestler über 30 s behandelt, durch Scherkräfte einer turbulenten Strömung innerhalb einer Kapillare oder mittels des GentleMACS OctoDissoziator Systems lysiert. Die erhaltenen Lysate wurden im Durchflusszytometer zum einen durch eine FSC / SSC basierte Fokussierung auf den Anteil intakter Zellen (A) verglichen und im Weiteren auf die Integrität der PV Membran durch Immunmarkierung von CD68 (B) analysiert. (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=2)

#### 4.2.4.2. Einfluss von Fixierung auf die Ausbeute

Ein weiterer Versuch zur Maximierung der erhaltenen PV Ausbeute war die Fixierung infizierter Zellen vor der Lyse. Um die nachfolgende massenspektrometrische Analyse des Proteoms der isolierten PV nicht durch denaturierende Fixative zu gefährden, wurde das quervernetzende, schonende PFA als Fixativ eingesetzt. Zur Bestimmung der minimal optimalen Konzentration an PFA in neutral gepufferter Salzlösung wurden J774A.1 mit CTV markierten Promastigoten infiziert. Nach der Zellernte wurden die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen an PFA für 20 min fixiert. Nach der Lyse mit dem GentleMACS wurde die Integrität der PV Membran durch Immunmarkierung von Lamp2 detektiert (Abb. 27).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte für eine PFA Konzentration von 0,5 % keine verbesserte Ausbeute im Vergleich zur unfixierten Kontrolle. Eine Konzentration von 2 % hingegen erhöhte die Ausbeute leicht, bleibt jedoch unter dem Effekt von 1 % PFA zurück, bei der sich der prozentuale Anteil intakter PV verdoppelte. Dieser abnehmende Effekt bei Erhöhung der Ausbeute könnte durch die Denaturierung des vom Lamp2 spezifischen Antikörper erkannten Epitops verursacht sein. Damit stellte die Konzentration von 1 % PFA ein für die Proteine schonendes und dennoch stabilisierendes Fixativ dar und wurde im Weiteren verwendet.



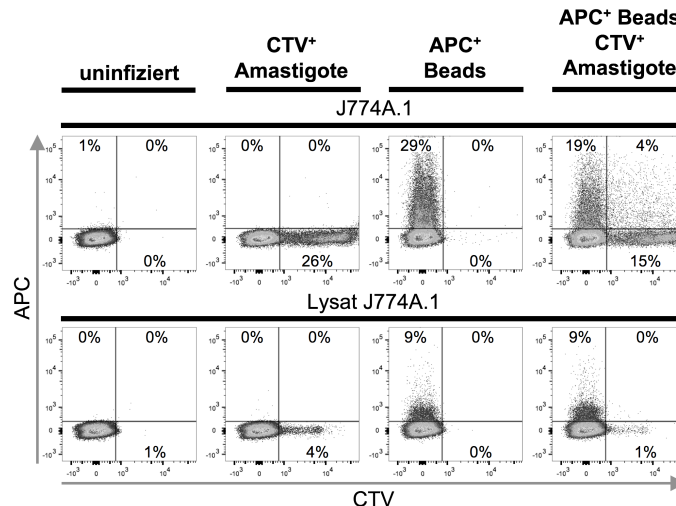
**Abb. 27 Optimierung der PV Ausbeute durch PFA Fixierung infizierter Zellen.** J774A.1 wurden mit CTV markierten metazyklischen Promastigoten im Verhältnis 1:5 über einen Zeitraum von 18 h inkubiert. Die geernteten, gewaschenen Zellen wurden vor der Lyse mit dem GentleMACS mit verschiedenen PFA Konzentrationen für 20 min bei 4 °C fixiert. Das Zelllysate wurde nach Immunmarkierung von Lamp2 im Durchflusszytometer auf den Prozentsatz intakter PV untersucht. (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=2)

#### 4.2.4.3. Simultane Inkubation von J774A.1 mit *L. major* und Beads

Da jedes biologische System ständigen Änderungen unterworfen ist, sollte die Phagozytose und sich anschließende Isolation der PV möglichst unter identischen Bedingungen für die verschiedenen Partikel stattfinden. Daher wurde untersucht inwiefern eine gleichzeitige Aufnahme von Amastigoten und Beads in die Zellen möglich ist. Um dies zu überprüfen wurden Amastigote mit CTV und Beads mit APC markiert und mit J774A.1 gleichzeitig inkubiert. Als Kontrolle wurden identische Ansätze mit jeweils nur einem der Partikel durchgeführt. Im Durchflusszytometer wurden sowohl die intakten Zellen als auch das gewonnene Lysat untersucht (Abb. 28). Bei einzelner Inkubation zeigte sich für Amastigoten eine Aufnahme von 26 %, die Beads hingegen wurden von 30 % der Zellen internalisiert. Bei gleichzeitiger Inkubation war für beide Partikel eine um 10 bis 15 % reduzierte Aufnahme erkennbar. Zudem waren nur 4 % der J774A.1 in der Lage, gleichzeitig Beads und Amastigote zu phagozytieren.

Die Analyse der Lysate zeigte deutlich, dass im Vergleich zu den einzelnen Ansätzen mit den Partikeln bei paralleler Inkubation die Ausbeute an Amastigoten enthaltenden PV um 75 % reduziert war, wohingegen die Beads enthaltenden PV nahezu identisch blieben. Weiterhin konnte keine PV ermittelt werden, die sowohl Amastigote, als auch Beads enthielt.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass im Falle einer gleichzeitigen Inkubation Beads präferentiell internalisiert wurden und die Aufnahme von Amastigoten abnahm. Zudem war nur ein geringer Teil der Zellen in Lage, sowohl Beads als auch Amastigote zu phagozytieren, diese waren zudem nicht im selben Phagosom eingeschlossen.



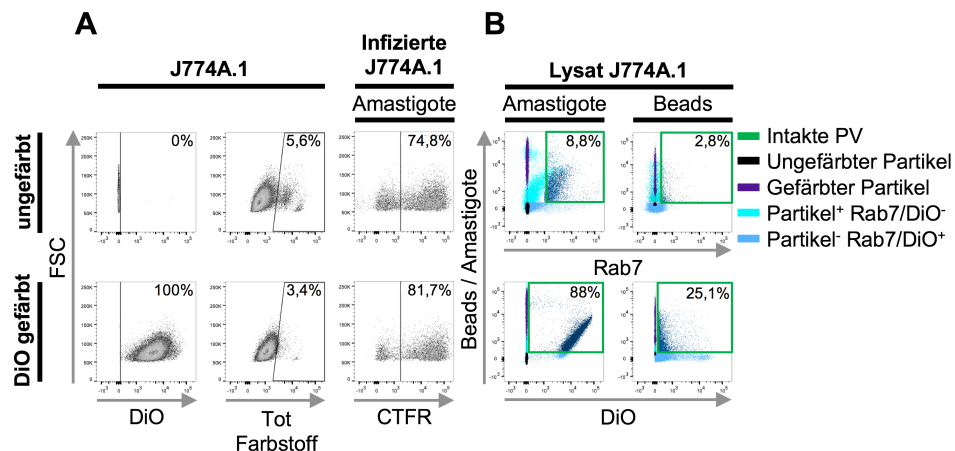
**Abb. 28** Durchflusszytometrische Analyse von intakten J774A.1 und Zellysats nach simultaner Inkubation mit Amastigoten und Beads. J774A.1 wurden mit CTV gefärbten Amastigoten und APC positiven Beads gleichzeitig über einen Zeitraum von 18 h inkubiert. Die geernteten, gewaschenen Zellen wurden mit dem GentleMACS lysiert und die intakten Zellen und das Zellysats wurden im Durchflusszytometer auf den Prozentsatz Fluoreszenz positiver Zellen und PV für die beiden Partikel untersucht. (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=4)

#### 4.2.4.4. Indirekte Fluoreszenz Markierung der phagosomalen Membran

Die Fluoreszenz basierte Selektion besonders kleiner Partikel wie im Fall der Sortierung von Amastigoten enthaltenden PV aus dem Zellysats stellt besondere technische Anforderungen an den Flusssortierer. Ursächlich durch ihre Größe zeigen die PV im vorwärts und seitwärts Streulicht im Gegensatz zu Zellen keine klar abgegrenzte Population. Diese liegen eingebettet zwischen den Organellen der lysierten Zellen. Weiterhin erschwert diese Lage auch die durch den Hüllstrom und die Vibration vermittelte Vereinzelung der Zellen in separate Tröpfchen. Dies mindert die Reinheit und Effizienz und geht mit einer reduzierten Geschwindigkeit des Sortierens einher.

Um die Bedingungen zu optimieren wurde ein zweiter Parameter für den Sortierprozess eingeführt. Neben der Fluoreszenzmarkierung von *L. major* wurde auch die phagosomale Membran markiert. Hierbei wurde der lipophile fluoreszierende Farbstoff DiO verwendet. Bei der Phagozytose werden zu internalisierende Partikel von der Zellmembran umschlossen und ins Zellinnere befördert. Daher ist es theoretisch möglich, die PV Membran durch vorhergehende Fluoreszenzmarkierung der Zellmembran indirekt zu markieren. Um dies zu überprüfen, wurde J774A.1

mit DiO gefärbt (Abb. 29). Die Toxizitätsbestimmung durch selektive Markierung toter Zellen im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle konnte ausschließen (Abb. 26A), dass die Membranfärbung einen Einfluss auf die Vitalität der J774A.1 hat. Anschließend wurden die Zellen mit CTFR markierten Amastigoten bzw. APC gefärbten Beads kokultiviert.



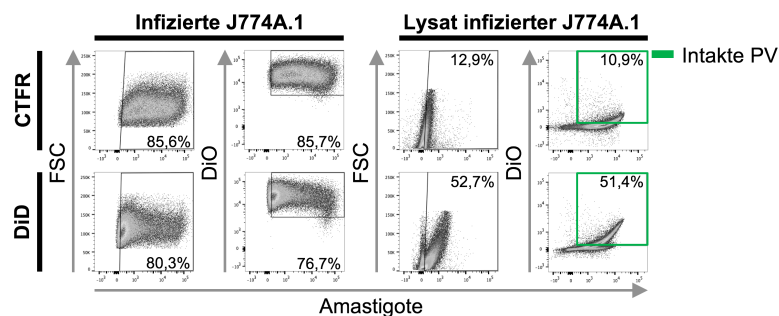
**Abb. 29 Vitalität und Phagozytose Aktivität von Membran gefärbten J774A.1.** Die Zellmembran der J774A.1 wurde mit dem lipophilen Carbocyanin Farbstoff Neuro-DiO gefärbt. Zur Bestimmung der Toxizität der Färbung wurde ein Totfarbstoff verwendet. Zusätzlich wurden die Zellen mit CTFR markierten Amastigoten (A) bzw. APC gefärbten Beads (B) im Verhältnis 1:5 für 18 h inkubiert und die Infektionsrate bestimmt (A). Die Lyse der geernteten, gewaschenen Zellen erfolgte mit dem GentleMACS, das Lysat der ungefärbten Zellen wurde zum Nachweis der PV Membran mit anti-Rab7 gefärbt. Im Durchflusszytometer wurde mittels ungefärbter und gefärbter Partikel und der Isotyp Kontrolle der Prozentsatz an intakten PV aus gefärbten und ungefärbten Zellen verglichen (B). (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=2)

Die Markierung der Membran zeigte keine Auswirkung auf die phagozytische Aktivität der J774A.1 (Abb. 29A), die Infektionsrate mit Amastigoten zwischen gefärbten (81,7 %) und ungefärbten (74,8 %) Zellen zeigte nur eine geringe Varianz. Die Zellen wurden anschließend lysiert und im Lysat der ungefärbten Probe wurde die PV Membran durch Immunmarkierung von Rab7 detektiert. Durchflusszytometrisch wurde das Lysat auf den Anteil intakter PV untersucht. Die Verwendung von DiO erhöhte die Ausbeute an Amastigoten enthaltenden PV von 9 % auf 88 % im Vergleich zur Detektion der Membran durch Immunmarkierung von Rab7 (Abb. 29B). Bei Beads enthaltenden PV war dieser Effekt deutlich weniger ausgeprägt, es zeigte sich jedoch auch hier durch DiO eine leichte Verbesserung. Damit zeigte die Markierung der Zellmembran vor der Kokultivation mit Partikeln eine verbesserte Wiederfindung der PV Membran im Vergleich zur Immunmarkierung mit Rab7. Zusätzlich könnte dieser weitere Parameter für die Sortierung der PV eine optimierte Adaption der Versuchsbedingungen auf die technischen Gegebenheiten des Flusssortierers leisten.

#### 4.2.4.5. Markierung der Membran von *L. major*

Da Proliferationsfarbstoffe entwickelt wurden, um die Zellteilung durch Reduzierung

der Signalintensität nachvollziehbar zu machen, wurde im Weiteren eine andere Fluoreszenzmarkierung von *L. major* untersucht, um auch stark proliferierende Amastigote in die massenspektrometrische Analyse einfließen zu lassen. Analog zur indirekten Markierung der Zellmembran der Phagozyten wurde daher auch für *L. major* ein Membranfarbstoff verwendet. Um das Emissionsspektrum deutlich von dem des für die Zellen verwendeten DiO zu trennen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiD verwendet. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen lipophilen Carbocyanin Farbstoff, der sich in die Membran inseriert. Für die direkte Vergleichbarkeit wurden Amastigote mit CTFR oder DiD markiert und mit DiO gefärbten J774A.1 inkubiert, anschließend wurden sowohl die intakten Zellen als auch das Zelllysat durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 30).



**Abb. 30 Vergleich der PV Ausbeute zwischen Membran gefärbten und CTFR markierten Amastigoten.** Die Zellmembran der J774A.1 wurde mit dem lipophilen Carbocyanin Farbstoff Neuro-DiO gefärbt. Amastigote wurden entweder mit CTFR markiert oder mit dem lipophilen Carbocyanin Farbstoff DiD gefärbt. Nach einer 18 stündigen Inkubation mit den Zellen im Verhältnis 1:5 wurde die Zellen und das mittels Gentle MACS gewonnene Lysat durchflusszytometrisch analysiert. (n=1)

Bezüglich der intakten Zellen ergab sich ein prozentualer Anteil infizierter Zellen für die CTFR markierten Amastigoten der 10 % höher lag im Vergleich zu DiD gefärbten. Die Wiederfindung der Amastigoten im Lysat hingegen wurde durch DiD deutlich gesteigert. Waren nach der intrazellulären Phase in J774A.1 noch 52 % der Amastigoten im Durchflusszytometer nachweisbar, konnte nur noch für 13 % der Amastigoten eine CTFR Färbung nachgewiesen werden. Diese Unterschiede ließen sich auch in der Ausbeute an PV wiederfinden, diese betrug für CTFR markierte Amastigote lediglich 11 %. Durch die Membranfärbung DiD im Vergleich ergab sich eine Steigerung um 40 %. Aufgrund dieser Steigerung sollte die DiD Färbung in den folgenden PV Isolationen eingesetzt werden.

### 4.3. Charakterisierung *L. major* enthaltender Phagosomen *in vitro*

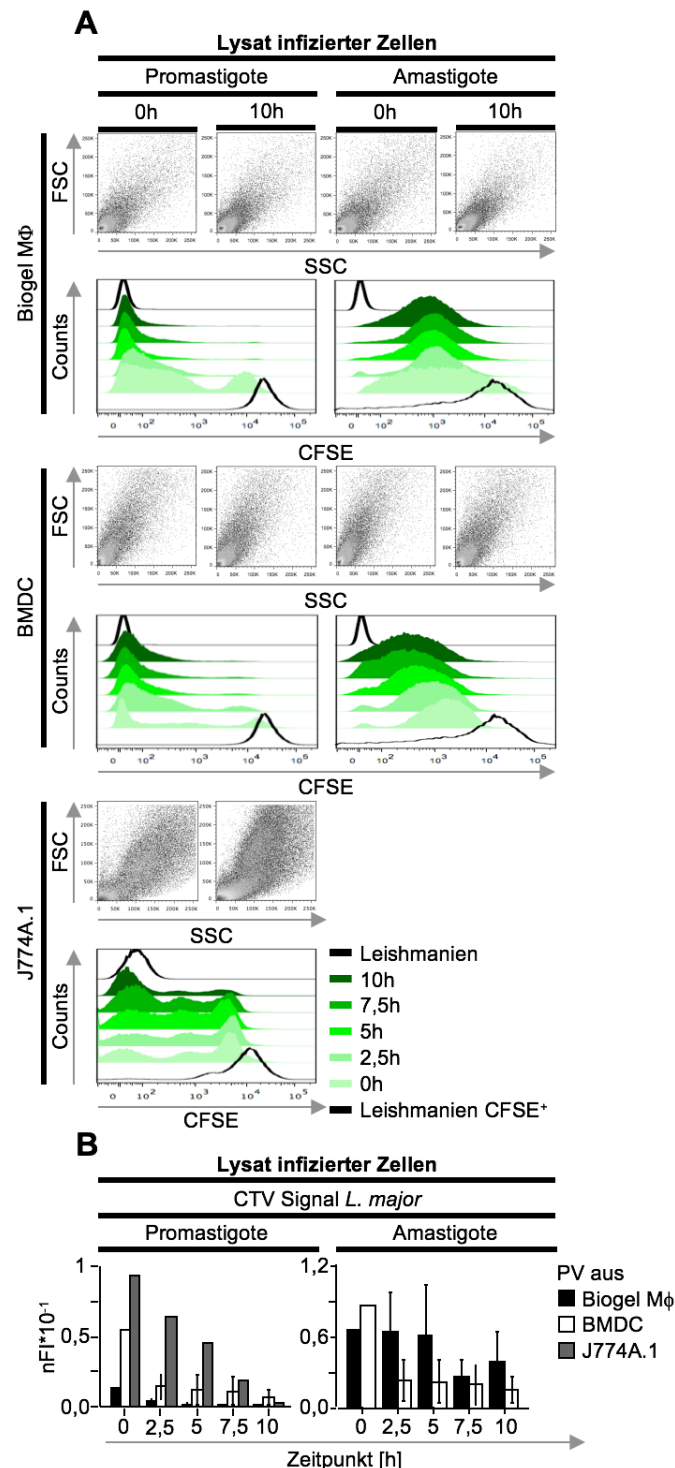
#### 4.3.1. Intrazelluläre Proliferation von *L. major* in Zelllinien und primären Zellen

Die intrazellulären Bedingungen, die *L. major* für die Transformation der promastigoten in die amastigote Lebensform benötigt, sind ein entscheidendes Charakteristikum der intrazellulären Phase von *L. major*. Diese in den beiden Phagozyten direkt zu adressieren, war Ziel der folgenden Versuche. Zudem wurden die beiden Zelllinien mit den Reaktionen in primären Zellen verglichen, um diese als geeignete Modellsysteme zu sichern (Abb. 31). Für die Isolation der primären MΦ aus C57BL/6 Mäusen wurde die Methode des Biogel induzierten kutanen Granuloms verwendet. Nach drei bis fünf Tagen finden sich vorrangig MΦ im entzündlichen Infiltrat, zu diesem Zeitpunkt wurde das Biogel entnommen und die MΦ durch Adhärenz an einer Plastikoberfläche selektioniert. Die Generierung von DC hingegen erfolgte durch Zytokin vermittelte Expansion aus dem Knochenmark (*bone marrow derived dendritic cells*, BMDC) von C57BL/6 Mäusen. Weiterhin wurden metazyklische Promastigote und läsionale Amastigote präpariert und mit dem Proliferationsfarbstoff CFSE markiert. Die *in vitro* Infektion in unabhängigen Versuchen von entweder Biogel MΦ und BMDC oder J774A.1 wurde für 12 h (0 h) durchgeführt und anschließend wurden alle adhärennten und freien Parasiten durch Waschschriffe entfernt (Angegeben als 0h in Abb. 31). Nach den weiteren Inkubationen für 2,5 h, 5 h, 7,5 h und 10 h wurden die Zellen geerntet und mittels GentleMACS lysiert. Für die Analyse der Parasiten enthaltenden PV im Durchflusszytometer wurde zum einen die Größe und Granularität betrachtet, zum anderen wurde die Fluoreszenzintensität des CFSE Signal graphisch dargestellt (Abb. 31A) und aus diesem die mediane normalisierte Fluoreszenz im Vergleich zu CFSE gefärbten Parasiten vor der Infektion berechnet (Abb. 31B).

Die Betrachtung der Morphologie der PV im vorwärts seitwärts Streulicht zeigte nur für Promastigoten enthaltende PV aus J774A.1 eine leichte Veränderung nach der zehn stündigen intrazellulären Phase. Für PV aus BMDC und Biogel MΦ konnten unabhängig von der Lebensform keine Veränderungen beobachtet werden (Abb. 31A).

Die CFSE Signalintensität Promastigoten enthaltender PV zeigte unabhängig vom Zelltyp eine starke und schnelle Abnahme, der Großteil der isolierten PV war bereits nach der Infektion (0 h) CFSE negativ (Abb. 31A). Da basierend auf der Größe und

Granularität keine eindeutige Identifikation von Parasiten enthaltenen PV möglich war enthielten die isolierten PV entweder keine Parasiten, oder diese wiesen kein CFSE Signal mehr auf. Insbesondere bei Biogel M $\Phi$  war das CFSE Signal bereits zu Beginn der Inkubation (0 h) nahezu identisch mit der ungefärbten Kontrolle (Abb. 31A).



**Abb. 31** *In vitro* Analyse von CFSE markierten *L. major* Promastigoten und Amastigoten PV nach der intrazellulären Phase in primären Makrophagen, BMDC und J774A.1. C57BL/6 Makrophagen wurden aus Biogel (Polyacrylamid Gel) induzierten kutanen Granulomen isoliert, BMDC wurden durch sechstägige Stimulation von Knochenmarkzellen mit GM-CSF und IL-4 gewonnen. In zwei unabhängigen Versuchen wurden metazyklische Promastigote und frisch isolierte läSIONALE Amastigote wurden mit CFSE markiert und für 12 h (0 h) entweder mit den primären Zellen oder den J774A.1 in einem Verhältnis von 1:5 koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Parasiten entfernt und die Zellen für die verschiedenen Zeiten inkubiert. Nach Lyse der Zellen mit dem GentleMACS wurde das Lysat durchflusszytometrisch analysiert (A). Die Signalintensitäten wurden als mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle berechnet und auf die CFSE Intensität von *L. major* vor Infektion normalisiert (nFI) (B). (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=1-2)

Grundsätzlich legte die Analyse der normalisierten Intensitäten (Abb. 31B) nahe, dass die intrazelluläre Transformation bzw. Replikation in J774A.1 im Vergleich zu Biogel MΦ ähnlich ablief, die PV aus beiden Zellen zeigten im Gegensatz zu BMDC eine lineare Abnahme des CFSE Signals über den Beobachtungszeitraum. Diese war jedoch in J774A.1 deutlich verlangsamt. Vorarbeiten konnten zeigen, dass Biogel MΦ und J774A.1 nach 12 h identische Infektionsraten (ca. 75%) aufweisen und im Schnitt ca. 2,5 Promastigoten aufgenommen haben. Daher könnte die in J774A.1 langsamere Abnahme des CFSE Signals auf Unterschiede in der intrazellulären Replikation bzw. der phagosomalen Reifung zurück zu führen sein. Isoliert aus BMDC hingegen wurde zu Beginn eine vergleichsweise höhere Signalintensität der Promastigoten enthaltenden PV beobachtet, die sprunghaft in den ersten 2,5 h abnahm und im weiteren zeitlichen Verlauf nahezu konstant blieb. Die Daten stehen in Übereinstimmung mit der vorab ermittelten Beobachtung, dass lediglich ca. 20 % der BMDC in der Lage sind Promastigoten zu internalisieren.

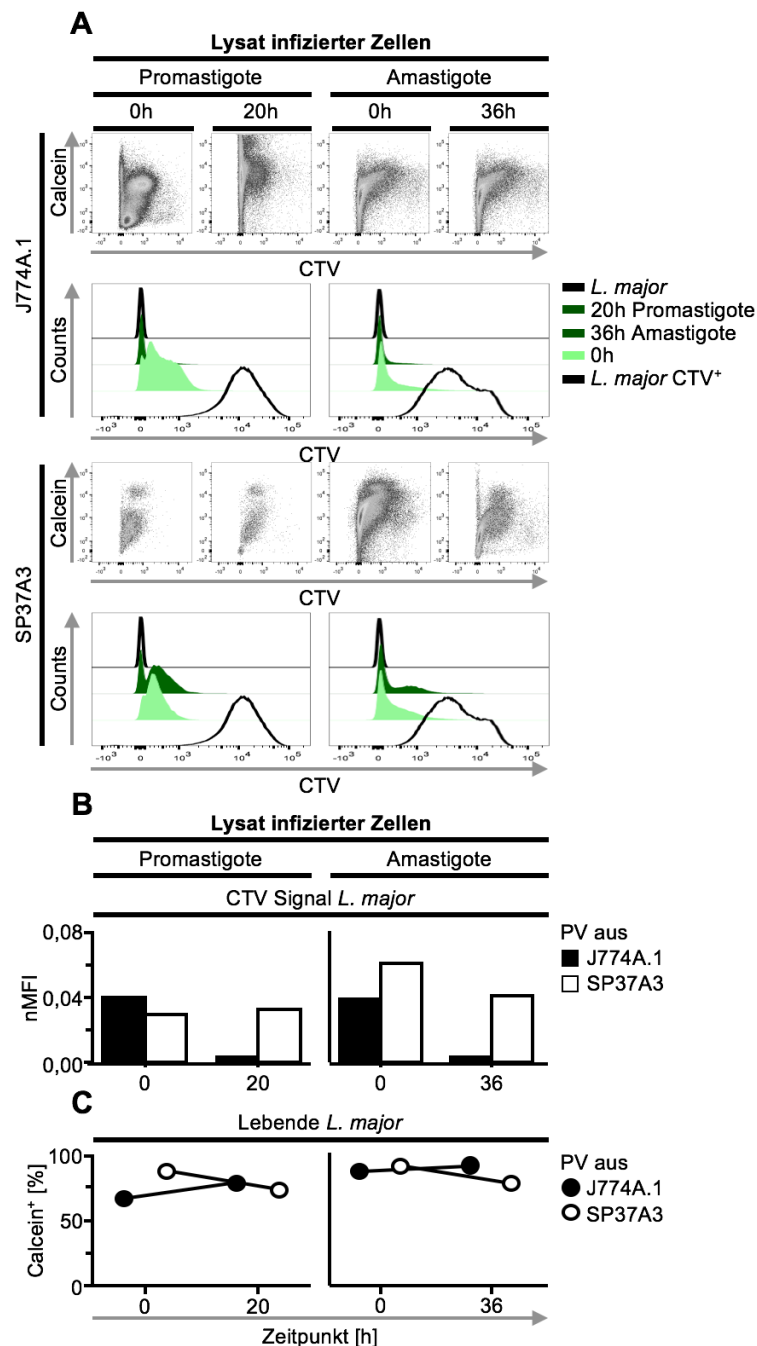
Für Amastigoten enthaltende PV sank das CFSE ebenfalls über die Zeit sowohl in Biogel MΦ als auch in BMDC. Eine sprunghafte Abnahme wurde in BMDC in den ersten 2,5 h beobachtet, wohingegen Biogel MΦ eine kontinuierliche Abnahme aufwies (Abb. 31), die im Vergleich weniger ausgeprägt war. Aufgrund der ausschließlichen Analyse des CFSE Signals können unter diesen Versuchsbedingungen jedoch keine Rückschlüsse gezogen werden ob die beobachteten Ergebnisse auf eine intrazelluläre Mortifikation oder Replikation der Parasiten verursacht wurden.

Um die intrazelluläre Mortifikation in J774A.1 und SP37A3 zu bestimmen und zudem die frühen und späten Phasen der internalisierten *L. major* Lebensformen besser zu untersuchen, wurden die Versuchsbedingungen verändert. *In vitro* benötigt die Promastigoten Morphogenese 10 bis 20 Stunden und die resultierenden Amastigoten beginnen in den anschließenden 24 bis 120 h zu replizieren. (Tsigankov et al., 2014) In diesem Ansatz wurden daher die J774A.1 und SP37A3 nur für 11 h (0 h) mit CTV markierten läSIONalen Amastigoten oder metazyklischen Promastigoten inkubiert (Abb. 32). Erneut wurden die nicht internalisierten Parasiten durch WaschschrITte entfernt und die Zellen für die indizierten Zeitpunkte inkubiert. Die Verwendung von CTV anstelle von CFSE in diesem Versuch diente der längeren Wiederfindung des Signals über die Zeit. Das Lysat Amastigoten infizierter Zellen wurde nach 36 h analysiert, das Promastigoten infizierter Zellen hingegen bereits nach 20 h. Für die Ermittlung der intrazellulären Mortifikation wurde die gewonnenen Lysate

mit den enthaltenen PV zudem mittels Calcein AM gefärbt und der prozentuale Anteil lebender *Leishmanien* in den PV durch den Vergleich mit ungefärbtem Lysat ermittelt (Abb. 32C). Die CTV Signalintensitäten wurden graphisch dargestellt (Abb. 32A) und erneut die mediane normalisierte Fluoreszenz im Vergleich zu CTV gefärbten Parasiten berechnet (Abb. 32B). Weiterhin wurde das CTV Signal in Abhängigkeit von der Calcein AM Färbung graphisch dargestellt (Abb. 32A).

Grundsätzlich wiesen auch in diesem Versuchsaufbau die gewonnenen PV bereits zu Beginn der Inkubation (0 h) unabhängig von dem Zelltyp und der internalisierten Lebensform nur ein geringes CTV Signal auf, da auch in diesem Versuchsaufbau keine eindeutige Identifikation von Parasiten enthaltenen PV möglich war. Die Betrachtung der Promastigoten enthaltenden PV aus SP37A3 zeigte einen deutlichen Rückgang des CTV Signals im Vergleich zu Promastigoten vor der intrazellulären Phase. Im weiteren Verlauf wurde jedoch keine sprunghafte Abnahme in der CTV Signalintensität nachgewiesen, diese blieb innerhalb der 20 stündigen Inkubation der Zellen nahezu konstant (Abb. 32A). Die Ergebnisse der Calcein AM Färbung zeigte jedoch eine leichte Reduzierung der lebenden Promastigoten in den PV (Abb. 32C). Vorarbeiten zur Interaktion von SP37A3 mit *L. major* konnten eine erhöhte Aufnahme von Promastigoten (40 %) gezeigt werden, die in BMDC nur reduziert (20 %) stattfindet. Zusammengenommen könnte ursächlich sein, dass die von SP37A3 aufgenommenen Promastigoten nicht effizient transformieren und es im weiteren Verlauf möglicherweise zu einer Mortifikation kommt. Promastigote aus J774A.1 auf der anderen Seite zeigten bereits nach der Infektion (0 h) eine vergleichsweise reduzierte CTV Intensität (Abb. 32A, B). In den anschließenden 20 h reduzierte sich das Signal im Vergleich zu PV aus SP37A3 beschleunigt (Abb. 32B) und verlief analog zu den Ergebnissen der Untersuchung mit CFSE markierten Promastigoten. Der leicht ansteigende Anteil lebender Promastigote innerhalb von 20 h, der in diesen Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 32C), bestätigte zudem die Annahme, dass eine effiziente Transformation mit anschließender Replikation stattfindet, dafür sprach zudem das diese Zunahme lebender Promastigote moderat war und folglich die Replikation erst einsetzte.

Amastigote enthaltende PV waren ebenfalls bereits nach der Infektion der beiden Zelllinien nahezu vollständig CTV negativ (Abb. 32A). Durch die intrazelluläre Phase in SP37A3 verlor sich das CTV Signal über die Zeit (36 h) nur leicht. Der längere Beobachtungszeitraum für diese Lebensform zeigte, dass die Abnahme der verbleibenden CTV positiven PV im Gegensatz zu PV aus J774A.1 langsamer eintrat (Abb. 32B).



**Abb. 32** Infektion von J774A.1 und SP37A3 mit CTV markierten *L. major* Promastigoten und Amastigoten. Metazyklische Promastigote und läSIONALE Amastigote wurden mit CTV markiert und für 11 h (0 h) in einem Verhältnis von 1:5 mit J774A.1 und SP37A3 koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Parasiten entfernt und die Zellen für die verschiedenen angegebenen Zeiten inkubiert. Nach Lyse der Zellen mit dem GentleMACS wurde das Lysat mit den enthaltenen PV mit Calcein AM zur Bestimmung der lebenden Parasiten gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht und die normalisierte Fluoreszenzintensität (B) des CTV Signals und der Anteil lebender Parasiten bestimmt (C). (n=1)

Möglicherweise war dies durch intrazelluläre Mortifikation der Amastigoten bedingt, da auch der Anteil lebender Parasiten in den PV über die Zeit tendenziell eher abnahm (Abb. 32C). In den J774A.1 hingegen wiesen die Amastigoten enthaltenden PV nach der Infektion ein vergleichsweise reduziertes CTV Signal auf, das nach 36 h nahezu identisch mit ungefärbten Amastigoten war. Trotz dieser starken Abnahme blieb die Zahl lebender Amastigote nahezu konstant (Abb. 31C) und legt damit

nahe, dass diese Abnahme nur zum Teil auf die intrazelluläre Replikation zurückgeführt werden kann. Zudem wurden in diesem Versuchsaufbau freie Parasiten die aus lysierten Zellen entlassen werden nicht berücksichtigt.

#### **4.3.2. Zelluläre und Phagosomen lokalisierte phagosomale Reifungsmarker**

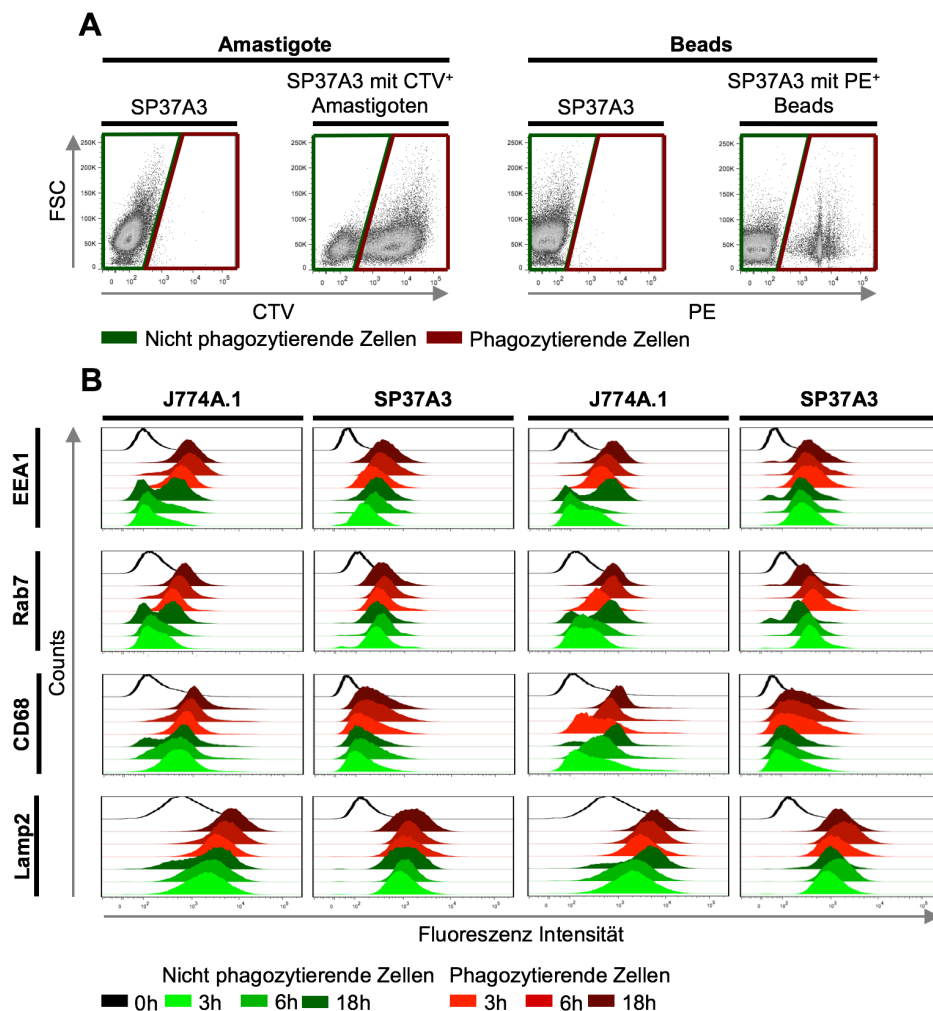
Die phagozytische Aufnahme mit der sich anschließenden Reifung vom frühen Phagosom zum Phagolysosom ist durch für jede Phase spezifische Proteine charakterisiert, die in der phagosomalen Membran eingelagert sind. In den folgenden Versuchen wurde durch Immunmarkierung von Markerproteinen die phagosomale Reifung Amastigoten enthaltender PV in DC im Vergleich zu M $\Phi$  analysiert. Um Zelltyp spezifische Unterschiede zwischen den beiden Phagozyten auszuschließen, wurden die Experimente analog unter Verwendung von Beads durchgeführt.

Die J774A.1 und SP37A3 Zelllinien wurden mit löslichen, CTV markierten Amastigoten bzw. PE markierten Beads inkubiert. Nach 3, 6 und 18 h wurde jeweils ein Teil der Zellen entnommen und die phagosomalen Reifungsmarker wurden immunmarkiert. Die Fluoreszenz der verwendeten Partikel ermöglicht die durchflusszytometrische Diskriminierung zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen (Abb. 33A). Die phagosomalen Marker in intakten Zellen konnten dadurch zu den verschiedenen Zeitpunkten separat betrachtet werden. Neben der graphischen Darstellung des Vorhandenseins (Abb. 33B) wurden auch die absoluten Werte der medianen Fluoreszenz ermittelt (Abb. 34A).

In Anwesenheit eines phagozytischen Reizes konnte in beiden Zelllinien eine Steigerung der phagosomalen Reifungsmarker im Vergleich zum basalen Niveau beobachtet werden, unabhängig vom Infektionsstatus.

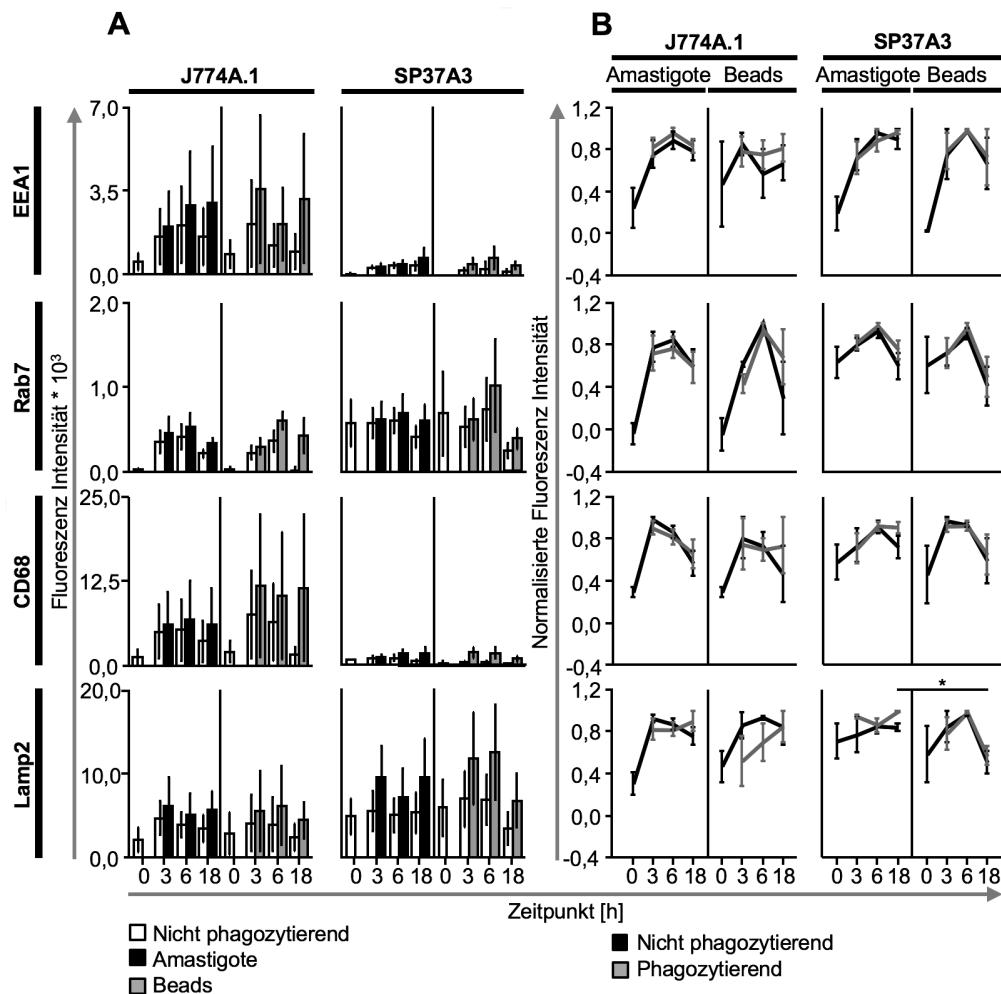
Für die absolute Fluoreszenzintensität von EEA1 zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Erhöhung in J774A.1 im Vergleich zu SP37A3 sowohl für Amastigoten als auch Beads enthaltende Zellen, die unabhängig vom Infektionsstatus war. Diese war jedoch innerhalb der unabhängigen Versuche einer starken Varianz unterworfen. In SP37A3 war zudem ein leichter Unterschied in der Kinetik von EEA1 beim Vergleich von Amastigoten und Beads enthaltenden Zellen zu beobachten. Nach 18 h stieg EEA1 in der Internalisierung von Amastigoten immer noch an, wohingegen im Falle der Beads das Maximum bereits nach 6 h erreicht war (Abb. 34A). Das späte endosomale Protein Rab7 zeigte in J774A.1 im Vergleich der internalisierten Partikel ähnliche Tendenzen. Die maximale Expression war jeweils nach 6 h erreicht

und ging bis 18 h zurück. Für die SP37A3 konnte vergleichbare Tendenz beobachtet werden, die sich auch für das EEA1 zeigte. Im weiteren Reifungsprozess wiedergespiegelt durch CD68 konnte erneut eine höhere grundsätzliche Anteil in J774A.1 beobachtet werden.



**Abb. 33 Durchflusszytometrische Unterscheidung der Anwesenheit phagosomaler Reifungsmarker in infizierten und nicht infizierten J774A.1 und SP37A3.** Die beiden Zelllinien wurden entweder mit CTV markierten Amastigoten oder PE markierten Beads im Verhältnis 1:5 für die angegebenen Zeitpunkte kultiviert. Nach der indirekten Immunmarkierung von EEA1, Rab7, CD68 und Lamp2 wurde im Durchflusszytometer über die Fluoreszenz des jeweiligen Partikels zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen unterschieden (A) und die Expression phagosomaler Marker dieser separat betrachtet (B). (Dargestellt sind repräsentative Diagramme von n=5)

Das Stadium des Phagolysosoms hingegen schien in beiden Zelllinien zwischen Amastigoten und Beads verändert zu sein. Zellen mit internalisierten Beads wiesen die maximale Expression von Lamp2 bereits nach 6 h auf, wurden jedoch Amastigote aufgenommen, blieb das Niveau über den gesamten Zeitraum nahezu konstant. Dies legt eine Manipulation der PV durch Amastigote im Stadium des Phagolysosoms nahe die jedoch unabhängig vom Zelltyp war (Abb. 34A). Dennoch konnten die Versuche weder bei dem Vergleich der beiden Zelllinien noch zwischen den verschiedenen internalisierten Partikel statistisch signifikante Unterschiede nachweisen.



**Abb. 34 Zelluläres Vorkommen phagosomaler Reifungsmarker.** J774A.1 und SP37A3 wurden mit Amastigoten und Beads für 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Verhältnis 1:10 kultiviert. Anschließend erfolgte die Immunmarkierung der phagosomalen Reifungsmarker. Die phagosomalen Marker sind zum einen als Medianwert der absoluten Fluoreszenzintensität nach Abzug der Isotyp Kontrolle dargestellt (A). Außerdem wurde die relative Intensität der Färbung innerhalb der unabhängigen Versuche bestimmt, hierbei ist eins die maximale Signalintensität innerhalb des Zeitintervalls des jeweiligen Markers bei getrennter Betrachtung infizierter und nicht infizierter Zellen. (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte ±SEM, n=5) (\* p ≤ 0,05)

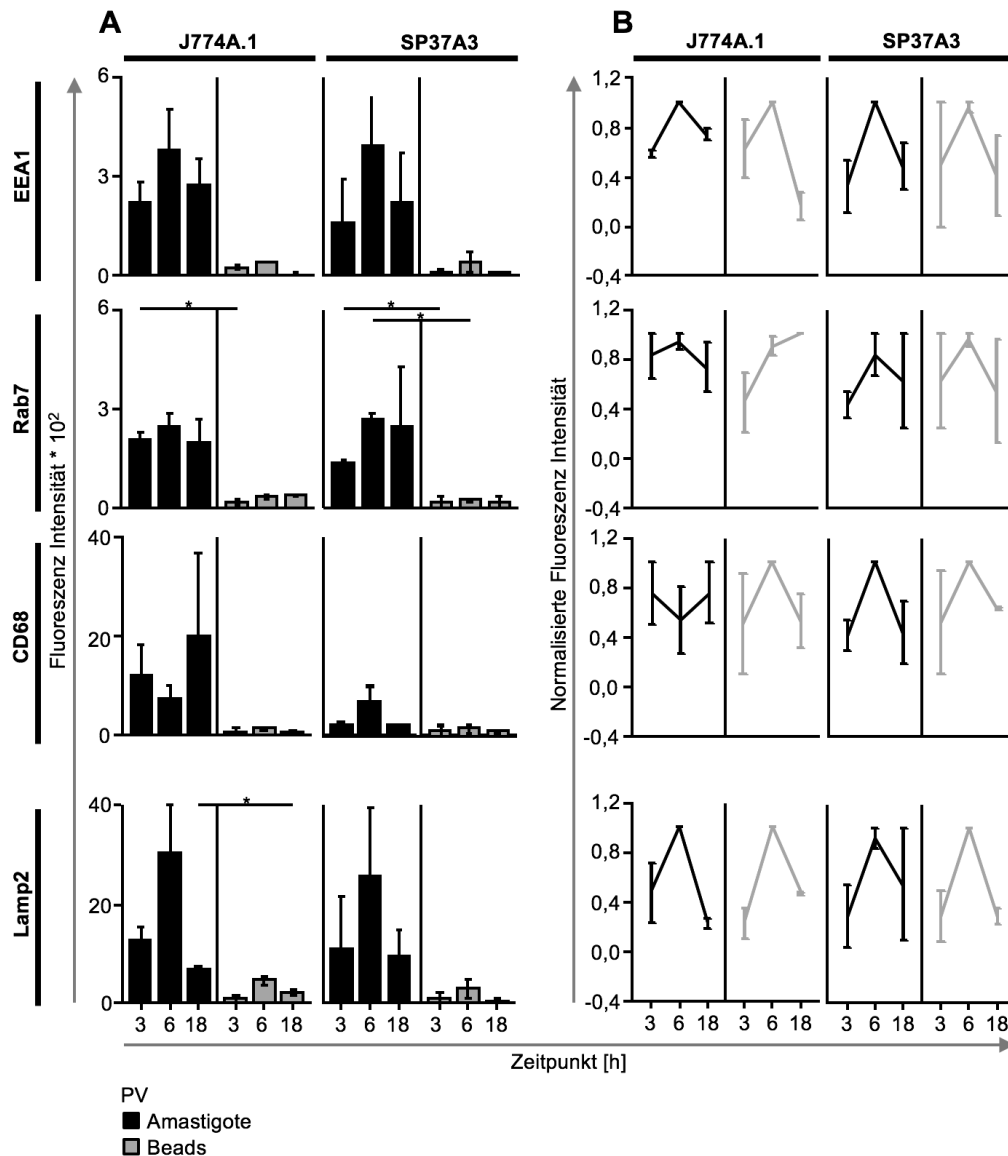
Um die Manipulation insbesondere des Phagolysosoms besser vergleichen zu können, wurden die medianen Fluoreszenzintensitäten auf das maximale Niveau der phagosomalen Marker der Zelllinien innerhalb des Zeitintervalls normalisiert (Abb. 34B). Hierzu wurden infizierte und nicht infizierte Zellen ebenfalls separat betrachtet. Diese Darstellung verdeutlichte die durch Amastigoten verursachte Verzögerung der phagosomalen Reifung in SP37A3, basierend auf der länger andauernden Präsenz von EEA1 in Amastigoten enthaltenden PV im Vergleich zu Beads. Zudem ermöglichte diese Auswertung auch einen vergleichbaren Effekt in J774A.1 beobachten zu können. Diese Tendenzen konnten jedoch nicht statistisch gesichert werden. Letztlich führten Amastigote in J774A.1 tendenziell zu einer schnelleren und kontinuierlicheren Rekrutierung von Lamp2 zur PV und bewirkten in SP37A3 eher eine verzögerte Kinetik. Während in Amastigoten enthaltenden PV nach 18 h eine Rekrutierung von Lamp2 beobachtet wurde, war diese in Beads enthaltenden

SP37A3 bereits eher rückläufig. Der Vergleich der normalisierten Expressionsniveaus zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen zeigte grundsätzlich ähnliche Tendenzen (Abb. 34B).

Um die Aussagekraft des Experiments noch weiter zu spezifizieren, wurden die infizierten immunmarkierten Zellen anschließend lysiert und erneut im Durchflusszytometer analysiert. Damit wurden die phagosomalen Marker lokalisiert in der PV Membran direkt adressiert. Die Aufarbeitung der ermittelten Daten erfolgte analog zur gesamtzellulären Auswertung (Abb. 35). Bemerkenswert war hier, dass die Niveaus aller Marker in Amastigoten PV deutlich höher waren als in Beads PV. Grundsätzlich ist jedoch auch die Ausbeute an membranumschlossenen, Beads enthaltenden PV in den voran gegangenen Experimenten stets deutlich niedriger im Vergleich zu Amastigoten PV.

Der Vergleich der phagosomalen Reifung zwischen Amastigoten und Beads enthaltenden PV zeigte bei SP37A3 keine Unterschiede zwischen den analysierten Markern, wodurch eine Manipulation dieser Marker durch Amastigote ausgeschlossen werden konnte. Bezüglich der Zelltyp spezifischen Unterschiede in Antwort auf den unspezifischen phagozytischen Reiz der Beads, ergab sich eine Veränderung im Stadium des späten Endosoms repräsentiert durch Rab7. Während in J774A.1 über 18 h Rab7 zur PV Membran rekrutiert wurde, war dies in SP37A3 bereits nach 6 h rückläufig. Die folgenden Reifungsmarker waren jedoch nicht beeinflusst. Lokalisiert in der PV Membran ließen sich für EEA1 keine Unterschiede zwischen den Zelllinien bzw. dem aufgenommenen Partikel beobachten. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Effekten, die in intakten Zellen beobachtet wurden. Dies spricht dafür, dass zwar in SP37A3 länger eine höhere EEA1 Expression stattfindet, dies jedoch nicht zur Amastigoten enthaltenden PV rekrutiert wird. In J774A.1 hingegen verursachten Amastigote in der PV Membran eine länger anhaltende Lokalisation von EEA1 und eine damit einhergehende verzögerte Reifung. Phagosomen lokalisiert zeigte sich weiterhin jedoch für Amastigoten in J774A.1 eine beschleunigte Reifung, die Rab7 Expression erreichte das Maximum bereits nach 6 h, die Membran um Beads hingegen rekrutierte nach 18 h weiterhin Rab7. Amastigote scheinen daher die Kinetik von Rab7 in Richtung des Verlaufs in SP37A3 zu manipulieren und verändern damit den Zelltyp spezifischen Unterschied zwischen J774A.1 und SP37A3. Gesamtzellulär waren die Entwicklungen jedoch für beide Partikel gleich, möglicherweise wird bei Amastigoten die Delokalisation von Rab7 aus der Membran schneller initiiert. Im Gegensatz dazu blieb jedoch CD68 für Amastigote in J774A.1 länger präsent als in der Membran um Beads. Auch diese Ergebnisse stehen im

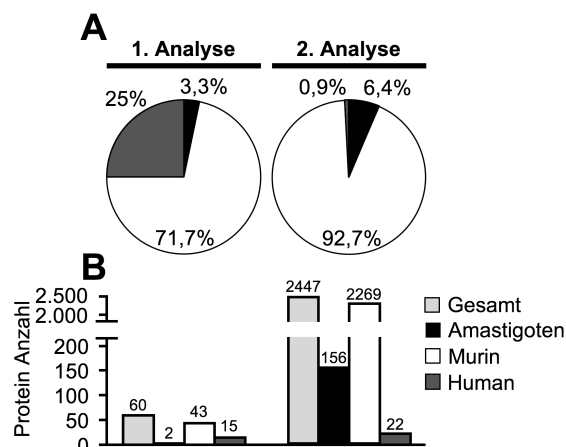
Gegensatz zur Ergebnissen der intakten Zellen. Für Lamp2 kam es nur für Beads enthaltende SP37A3 zu einer Übereinstimmung des gesamtzellulären mit dem PV lokalisierten Gehalt. In den anderen Fällen stieg die Expression in den intakten Zellen über 18 h, wohingegen diese in den PV bereits nach vier Stunden wieder abnahm.



**Abb. 35 Phagosomen lokalisierte phagosomale Reifungsmarker.** J774A.1 und SP37A3 wurden mit Amastigoten und Beads kultiviert, wie in Abb. 29 beschrieben. Nach der Immunmarkierung der phagosomalen Marker erfolgte die Lyse mit dem GentleMACS und das Lysat mit den Amastigoten bzw. Beads enthaltenden PVs wurde durchflusszytometrisch analysiert. Durch die Selektion auf CTV bzw. PE positive Partikel wurde die Expression auf phagosomaler Ebene zum einen als Medianwert der absoluten Fluoreszenzintensität nach Abzug der Isotyp Kontrolle ermittelt (A). Zum anderen wurde die relative Intensität der Färbung innerhalb der unabhängigen Versuche bestimmt, hierbei stellt eins die maximale Signalintensität innerhalb des Zeitintervalls dar (B). (Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=2) (\*  $p \leq 0,05$ )

### 4.3.3. Massenspektrometrische Analyse der PV zur Überprüfung des Isolationsprotokolls

Um die durchgeführten Optimierungen des Isolationsprotokolls für Amastigoten enthaltende PV zu überprüfen wurden, im Laufe der Methodenetablierung zwei massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden RFP exprimierende Amastigote mit insgesamt  $10^6$  J774A.1 für 18 h im Verhältnis 1:10 inkubiert. Anhaftende Partikel wurden anschließend durch zwei Waschschriffe entfernt und die Lyse der Zellen erfolgte unter Verwendung der Kapillare. Im zweiten Ansatz hingegen wurden CTV markierte Amastigote verwendet und die Zellen ( $10^6$ ) wurden nach der Infektion zudem mit einer 1 %igen PFA Lösung fixiert und mit dem GentleMacs lysiert.



**Abb. 36 Vergleich der massenspektrometrisch identifizierten Proteine durch die Optimierung des Isolationsprotokolls.** Im ersten Ansatz wurden RFP exprimierende Amastigote mit J774A.1 für 18 h im Verhältnis 1:10 inkubiert. Anhaftende Partikel wurden durch zwei Waschschriffe entfernt, die Lyse erfolgte unter Verwendung einer Kapillare. Im zweiten Ansatz hingegen wurden CTV markierte Amastigote verwendet und die Zellen wurden nach der Infektion mit einer 1 %igen PFA Lösung fixiert und mit dem GentleMacs lysiert. Das gewonnene Lysat wurde mit Benzonase behandelt und pelettiert. Die Fluoreszenz aktivierte Separation der intakten PV erfolgte im BD FACS Aria. Zum einen durch eine FSC / SSC basierte Fokussierung auf die Größe von Amastigoten, zum anderen wurden die RFP bzw. CTV positiven Partikel selektioniert. Die isolierten Amastigoten enthaltenden PV wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert und die prozentualen (A) und absoluten (B) Anteile muriner, humaner und *Leishmanien* spezifischer Proteine bestimmt. (n=1)

Das gewonnene Lysat wurde in beiden Ansätzen mit Benzonase behandelt um eine Anhaftung der PV an die DNS zu verhindern und anschließend pelettiert. Die Fluoreszenz aktivierte Separation der intakten PV erfolgte durch eine FSC / SSC basierte Fokussierung auf die Größe von Amastigoten, und die RFP bzw. CTV positiven Amastigoten wurden selektioniert. Im ersten Ansatz wurden insgesamt  $0,05 \cdot 10^6$  Amastigoten enthaltende PV massenspektrometrisch analysiert (Abb. 36). Durch die Optimierungen der Methode, die Verwendung von CTV markierten Amastigoten, dem GentleMacs zur Zellyse und der PFA Fixierung konnte die Anzahl für die Analyse zur Verfügung stehender PV im zweiten Ansatz um 10 % auf  $0,5 \cdot 10^6$  PV gesteigert werden. Diese Steigerung zeigte sich auch in der Gesamtzahl identifizierter Proteine, im ersten Ansatz konnten lediglich 60 Proteine ermittelt werden, zudem

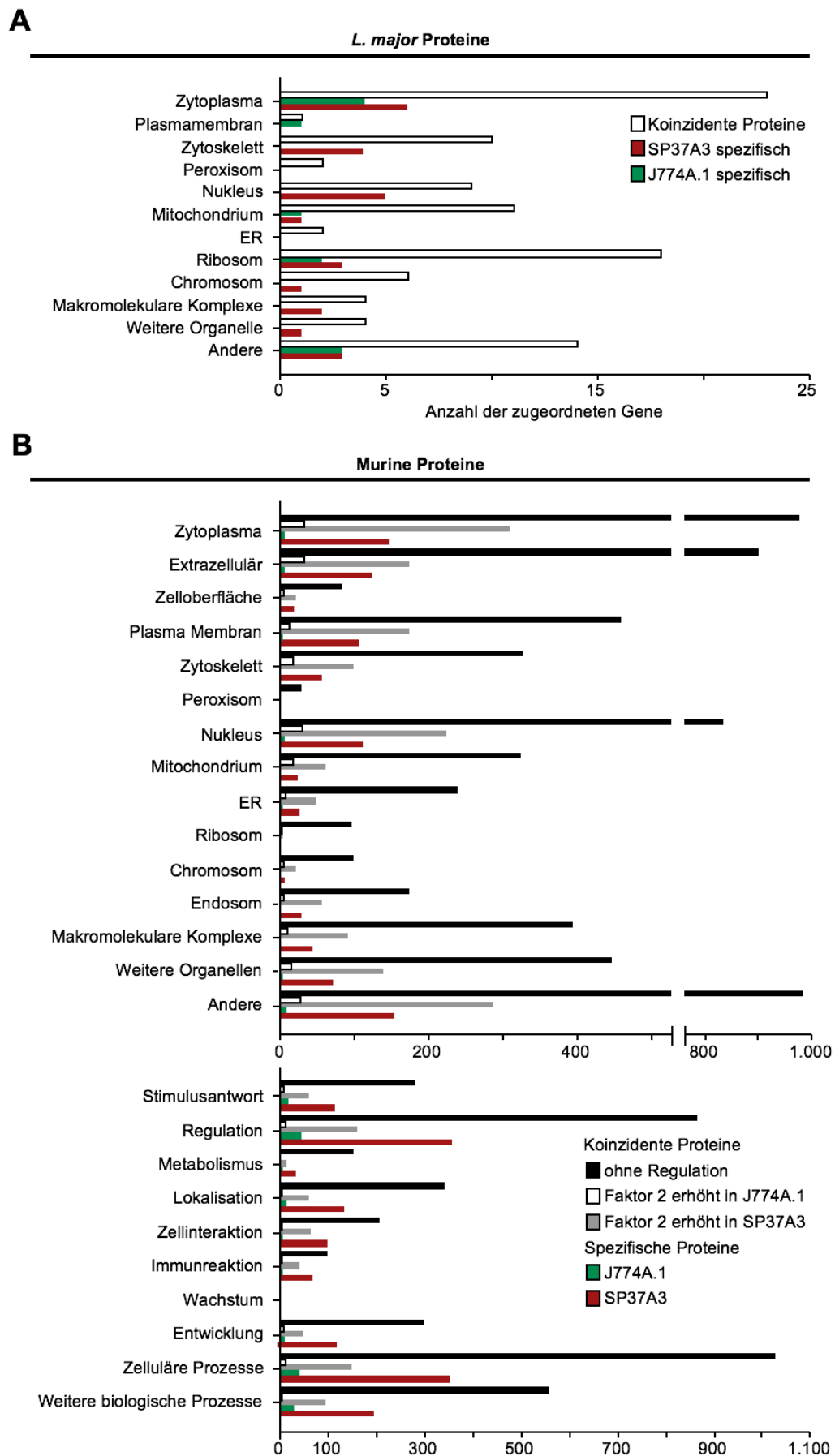
zeigte sich eine deutliche Kontamination mit humanen Keratinen (Abb. 36). Im Vergleich lieferte die zweite Analyse die eindeutige Identifikation von 1870 Proteinen und ergab damit eine Steigerung der ermittelten murinen und Amastigoten spezifischen Proteine um den Faktor 300 bzw. 60. Zudem konnte die Kontamination mit humanen Proteinen deutlich reduziert werden.

Im zweiten Ansatz wurde weiterhin überprüft, ob die Methode auch zur Gewinnung von Amastigoten enthaltenden PV aus SP37A3 geeignet ist. Hierzu wurden insgesamt  $115 \cdot 10^6$  Zellen verwendet und unter den angegebenen Bedingungen behandelt. Die 2337 hierbei massenspektrometrisch ermittelten Proteine der gewonnenen  $0,65 \cdot 10^6$  PV wurden mit den Proteinen aus J774A.1 verglichen. Hierzu wurde zunächst jeweils zwischen *L. major* und murinen Proteinen unterschieden und diese weiterhin auf das Vorkommen sowohl in SP37A3 als auch in J774A.1, bzw. die Zelltyp Spezifität analysiert (Abb. 37A, B).

Die erhöhte Gesamtanzahl detektierter Proteine in SP37A3 im Vergleich zu J774A.1 war hauptsächlich auf murine Proteine zurück zu führen, für Amastigoten Proteine zeigte sich nur eine leichte Steigerung. Die koinzidenten Proteine wurden zudem nach Regulation klassifiziert, wobei eine Erhöhung der gemessenen Proteinmenge um den Faktor 2 als spezifisch und die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien bei einem Wahrscheinlichkeitswert unter 0,05 als statistisch signifikant beurteilt wurde (Abb. 37E, F).

Gemessen an dem 8038 Proteine umfassenden Proteom von *L. major* konnten für beide Zelllinien zusammen genommen lediglich 158 Amastigoten Proteine ermittelt werden, mit einer Erhöhung für die Gewinnung der PV aus SP37A3 (Abb. 37B). Zudem entsprach der Mengenanteil Amastigoten spezifischer Proteine im Isolat gewonnen aus J774A.1 lediglich 5,6 %, für die SP37A3 war dieser mit 3,4 % noch geringer. Eine gesicherte Regulation von Amastigoten Proteinen konnte zudem nur für 2 bzw. 3 Proteine gezeigt werden (Abb. 37D, F). Hierbei handelt es sich in SP37A3 um ein nicht charakterisiertes Protein und zwei Proteine die Homologien zur schweren Kette des Dyneins und der 60s ribosomalen Untereinheit aufweisen. Im Falle der J774A.1 hingegen konnte die Inositol-3-Phosphat Synthase ermittelt werden und ein Protein mit Homologien zur Serinpeptidase. Bezüglich der murinen Proteine zeigten die SP37A3 insgesamt eine um den Faktor 1,3 höhere Anzahl identifizierter Proteine (Abb. 37A). Zudem scheint in diesen Zellen eine deutlich erhöhte Regulation statt zu finden, im Vergleich zu J774A.1 waren mengenmäßig 14-mal mehr Proteine um mindestens den Faktor 2 signifikant erhöht (Abb. 37C, E).





**Abb. 38 Zelluläre Lokalisation und biologische Prozesse von murinen und *L. major* spezifischen Proteinen.** CTV markierte Amastigote wurden mit J774A.1 bzw. SP37A3 für 18 h im Verhältnis 1:10 inkubiert. Anhaftende Amastigote wurden entfernt und die Zellen mit in 1 % PFA fixiert, die Lyse erfolgte mit dem GentleMacs. Die mit dem BD FACS Aria isolierten Amastigoten enthaltenden PV wurden massenspektrometrisch analysiert.. Die Ontologie der zugehörigen Gene identifizierter Amastigoten (A) und muriner (B) Proteine wurde mit der Uniprot Datenbank bestimmt und der zellulären Lokalisation und den biologischen Prozessen zugeordnet. (n=1)

Grundsätzlich war hierbei jedoch keine physiologische Verteilung auf alle Zellkompartimente zu beobachten, und damit legten diese Ergebnisse nahe, dass entweder keine intakten und damit vollständigen Amastigoten analysiert wurden oder das Detektionslimit erreicht wurde (Abb. 38A).

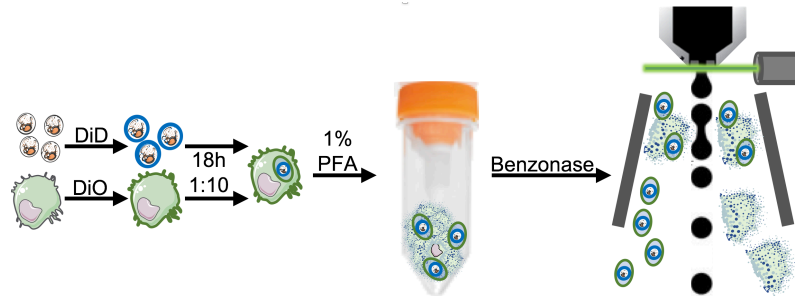
Die zelluläre Lokalisation der identifizierten murinen Protein zeigt ebenfalls eine hohe Wiederfindung zytoplasmatischer Komponenten (Abb. 38B). Weiterhin traten gehäuft Bestandteile des Nukleus auf, die für eine Kontamination der PV mit Zellkern assoziierten Proteinen spricht. Eine solche mit mitochondrialen Proteinen konnte anhand der ermittelten Daten ausgeschlossen werden. Grundsätzlich konnte jedoch ein zu erwartender hoher Anteil an endosomalen Proteinen nicht ermittelt werden. Lediglich die quantitative Dominanz von Bestandteilen der Zellmembran verifizierte die Annahme, dass ausschließlich PV isoliert wurden. Weiterhin konnten vergleichbare Tendenzen der zellulären Lokalisation zwischen den differentiell regulierten, den koinzidenten und den individuellen Proteinen zwischen SP37A3 und J774A.1 beobachtet werden.

Funktionell fand sich eine Häufung der assoziierten Gene in der Regulation für sämtliche Gruppierungen (Abb. 38B), insbesondere für die ausschließlich in J774A.1 ermittelten Proteine. Die Häufung von Komponenten assoziiert mit der Antwort auf Stimuli ist im Zusammenhang mit der Analyse von PV nachvollziehbar, jedoch war nur ein geringer Teil der identifizierten Proteine in die Immunantwort involviert

#### **4.3.3.1. Etabliertes Protokoll zur Isolation von Phagosomen**

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Optimierungen in Bezug auf die Reinheit und Ausbeute wurde das folgende Protokoll zur Isolation der Phagosomen entwickelt (Abb. 39). Die SP37A3 wurden durch PBS/EDTA gelöst, während die J774A.1 mittels Zellspatel aus der Kultur geerntet wurden. Die DiO gefärbten J774A.1 und SP37A3 wurden für 18 h mit DiD markierten Amastigoten bzw. ungefärbten Beads im Verhältnis 1:10 inkubiert. Anhaftende Partikel wurden durch Waschschriffe entfernt und die Zellen durch Zugabe einer 1 %igen PFA Lösung für 20 min bei 4 °C fixiert. Nach einem erneuten Waschschriffe wurden die Zellen in PBS mit Protease Inhibitoren aufgenommen und die Lyse erfolgte mit dem GentleMACS System. Das gewonnene Lysat wurde anschließend zum Abbau der enthaltenen Nucleinsäuren mit Benzonase behandelt um die Viskosität der Lösung zu reduzieren und die Anhaftung der PV an die DNS zu verhindern. Die Fluoreszenz aktivierte Separation

der intakten PV erfolgte im Flusssortierer. Zunächst wurde hierzu das vorwärts seitwärts gerichtete Streulicht auf die Größe von Amastigoten bzw. Beads fokussiert. Anschließend wurden die, im Falle der Amastigoten, DiD und DiO positiven Partikel und für die Beads die Membran und damit DiO positiven Beads selektioniert. Die isolierten Amastigoten bzw. Beads enthaltenden PV wurden anschließend pelettiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb. 39 Entwickeltes Protokoll zur Isolation von Phagosomen.** Die Zelllinien wurden vor der Inkubation mit DiO, die läSIONALen Amastigoten mit DiD gefärbt und die Beads verblieben. Nach der 18 stündigen Inkubation der Zellen mit den Partikeln im Verhältnis 1:10 wurden die Zellen geerntet und gewaschen. Das durch das GentleMACS gewonnene Zelllysate wurde für 20 min mit einer 1 %igen Phosphat gepufferten PFA Lösung fixiert. Anschließend wurden die Phagosomen durch Fluoreszenzbasiertes Zellsortieren vom Lysat getrennt und massenspektrometrisch analysiert.

## 5. Diskussion

### 5.1. *In vivo* Depletion myeloider Zellen in der experimentellen *L. major* Infektion

Die komplexen Wechselwirkungen zwischen *Leishmania* und den APC des Wirbeltierwirts haben fundamentale Auswirkungen auf den Verlauf der Infektion. Die beiden wichtigsten APC, M $\Phi$  und DC, spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Resistenz auf der einen Seite und der Entwicklung eines progressiven Verlaufs auf der anderen. M $\Phi$  als primäre Wirtszelle phagozytieren effizient beide *Leishmania* Lebensformen und bieten intrazellulär in ihren Phagosomen die optimalen Bedingungen für die Transformation und Replikation. Jedoch sind M $\Phi$  auch die Haupteffektorzellen, um eine effiziente Mortifikation des Parasiten zu erreichen. Diese Funktionen betonen die paradoxe Rolle von M $\Phi$  in der *Leishmaniasis*. (Liu and Uzonna, 2012)

Für die detaillierte Beschreibung der Relevanz einer Zellpopulation unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen ist ein Standardansatz deren selektive Depletion im lebenden Organismus. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Tiermodelle etabliert, die entweder durch spontane Mutationen oder durch genetische Manipulation systemische Defizite aufweisen. (Mombaerts et al., 1992; Pantelouris, 1968) Weiterhin wurden konditionale Depletionen entwickelt, in denen eine definierte Zellpopulation durch chemische oder physikalische Behandlung des Organismus zu einem beliebigen Zeitpunkt während des experimentellen Verfahrens eliminiert werden kann. (Feil et al., 1996; Kellendonk et al., 1996; Kuhn et al., 1995)

Ziel war es daher den Verlauf der experimentellen kutanen *Leishmaniasis* im Mausmodell unter Einfluss einer systemischen, selektiven Depletion von M $\Phi$  zu studieren.

Zu diesem Zweck wurden zwei Modelle untersucht. 1. Wiederholte Verabreichung von Diphtherietoxin (DT) an Mäuse, die den sensitiven DT Rezeptor höherer Primaten unter der Kontrolle des LysM-Promotors exprimieren (Goren et al., 2009), und 2. Injektion von in Liposomen eingeschlossenem Clodronat in resistente C57BL/6 Mäuse (van Rooijen, 1992)

Das theoretische Konzept des transgenen LysM-cre/DTR Modells basiert auf der Expression des sensitiven DTR exklusiv in Zellen in denen Lysozym M aktiv ist. Gemäß Literaturangaben soll bereits bei sehr geringen Dosen DT die Apoptose in M $\Phi$  und MO induziert werden. (Bennett and Clausen, 2007; Buch et al., 2005; Sauer

and Henderson, 1988; Sternberg and Hamilton, 1981)

Die Analyse des angeborenen Zellkompartiments im Gewebe und Blut im Verlauf der wöchentlichen Behandlung der LsyM-cre/DTR Mäuse mit DT und zeigte zu keinem der analysierten Zeitpunkte eine signifikante Abnahme von M $\Phi$ . Weiterhin verursachte die Verkürzung der Applikationsintervalle letale Nebenwirkungen bei den behandelten Tieren und eine effiziente Depletion konnte dennoch nicht beobachtet werden. Zudem konnte durch die DT Gabe in den transgenen Tieren kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der durch *L. major* hervorgerufenen kutanen Granulome im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet werden. Dies ist jedoch sicherlich auf die ausbleibende Depletion durch DT zurückzuführen.

Bereits die Originalpublikation (Goren et al., 2009) konnte keine effiziente Reduzierung F4/80 exprimierender Zellen im Blut durch die Injektion von DT (100 ng) an drei konsekutiven Tagen in der durchflusszytometrischen Analyse nachweisen. Lediglich in der immunhistologischen Quantifizierung der M $\Phi$  im Lebergewebe wurde diese nachgewiesen. Grundsätzlich existieren für die Einteilung myeloider Zellen in die Subpopulationen anhand der Expression von Oberflächenmoleküle kontroverse Ansichten. Definiert als CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>++</sup> Ly6G<sup>-</sup> führte eine einmalige Gabe von 40 ng/g DT hingegen 5 Tage nach Injektion zu einer signifikanten Reduktion inflammatorischer M $\Phi$  in der Haut behandelter Mäuse. (Davies et al., 2017) In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen mit dieser Konstellation an Oberflächenmolekülen hingegen als MO klassifiziert. Jedoch auch für diese Population konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den Behandlungen ermittelt werden. Ursächlich könnte diese Divergenz sowohl in dem unterschiedlichen Applikationsschema als auch in der Anzahl analysierter Tiere begründet sein.

In diesen beiden Veröffentlichungen wird eine Toxizität der systemischen DT Behandlung nicht betrachtet (Davies et al., 2017; Goren et al., 2009). Jedoch wurde bereits in anderen Modellen der DTR vermittelten konditionalen Zellablation nachgewiesen, dass systemisch mit DT behandelte transgene DTR Mäuse unerwünschte Nebenwirkungen und Mortalität entwickeln können. Eine mögliche Strategie, diese zu umgehen, ist der Einsatz von Knochenmarks Chimären, (van Blijswijk et al., 2015; Zaft et al., 2005; Zammit et al., 2005) diese Herangehensweise wäre auch in dem verwendeten LsyM-cre/DTR Modell möglich, um die Nebenwirkungen zu umgehen. Eine zu Grunde liegende Ursache für die ausbleibende Deple-

tion und die Morbität durch DT konnte aus den ermittelten Ergebnissen nicht abgeleitet werden, die analysierten Frequenzen angeborener und adaptiver Immunzellen waren vergleichbar mit den Kontrollgruppen. Studien in Tieren, die den DTR unter Kontrolle des CD11c Promotors exprimieren, konnten jedoch zeigen, dass es in DT behandelten Tieren zu einer signifikant erhöhten Menge an PMN in der Zirkulation kommt, die in einer deutlichen Azidose resultiert. (Tittel et al., 2012) Weiterhin konnte in diesem Modell die Entwicklung einer fulminanten Myokarditis, die durch massive Leukozyteninfiltration und Zerstörung des Myokards gekennzeichnet war, nachgewiesen werden. Die Mortalität war zudem unabhängig von der lokalen oder systemischen Applikation. (Mann et al., 2016) Im Gegensatz zu diesen Daten könnte für das verwendete LsyM-cre/DTR Modell die lokale Applikation von DT direkt in die Haut, und damit die Stelle der *L. major* Inokulation, zumindest eine Depletion der gewebständigen M $\Phi$  in der initialen Phase der Infektion ermöglichen und möglicherweise die mit einer systemischen Applikation einhergehenden Nebenwirkungen umgehen.

Das zweite verwendete System nutzt eine der vordergründigen Effektorfunktionen der Makrophagen die Phagozytose zu deren Eliminierung aus. Liposomen sind künstlich hergestellte Lipidvesikel, die aus konzentrischen Phospholipiddoppelschichten bestehen und wässrige Kompartimente einschließen können. Sie werden verwendet, um stark hydrophile Moleküle zu verkapseln, beispielsweise Clodronat, ein Bisphosphonat, das für diagnostische und therapeutische Zwecke entwickelt wurde. Frei gelöstes Clodronat ist nicht in der Lage die zelluläre Phospholipidmembran zu passieren. Eingeschlossen in Liposomen, werden diese theoretisch von M $\Phi$  aufgenommen und verdaut, gefolgt von der intrazellulären Freisetzung und Akkumulation von Clodronat und letztlich der Induktion der Apoptose des M $\Phi$ .

Zusammenfassend konnte weder durch die Applikation von Clodronat zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 13 Wochen noch durch die dosisdichtere Gabe eine signifikante Reduktion der M $\Phi$  der Haut erzielt werden. Unabhängig von der Applikationshäufigkeit und Dauer konnte eine effiziente Depletion lediglich in der Milz und am Applikationsort dem Peritoneum beobachtet werden. Intraperitoneal injizierte Liposomen benötigen laut Literaturangaben mehr Zeit, bevor eine wesentliche Verarmung in Leber und Milz erreicht werden kann, zudem werden auch peritoneale M $\Phi$  depletiert. (van Rooijen, 1992) Die Liposomen müssen bei dieser Applikationsroute passiv durch den Lymphfluss aus der peritonealen Kavität in den

Kreislauf gelangen. Literaturdaten konnten zeigen, dass nach zweimaliger Liposomen Injektion (10 µl je g Körpergewicht) innerhalb von 3 Tagen zu einer vollständigen MΦ Verarmung in Milz und Leber kommt. (Fraser et al., 1995) Zudem wird für eine andauernde Depletion in der Literatur empfohlen, die intraperitoneale Injektion alle 5 Tage zu wiederholen. (Fraser et al., 1995) Die theoretische Implikation der intraperitonealen Applikation ist, dass Liposomen die Milz und die Leber später erreichen und so über einen längeren Zeitraum wirken als intravenös injizierte Liposomen, dies konnte in Ratten nach einer Applikation von Clodronat Liposomen (5 µl pro g Körpergewicht) gezeigt werden. (Biewenga et al., 1995) Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen dies jedoch lediglich nach der dosisdichteren Applikation, nicht jedoch unter Einfluss der *L. major* Infektion. Insbesondere lokalisiert in der peritonealen Kavität zeigten sich auch die Nachteile der Verwendung von eingekapseltem Clodronat. Die Phagozytose als ein Mechanismus, der nicht exklusiv auf MΦ beschränkt ist, sondern eine Fähigkeit aller Zellen des angeborenen Kompartiments ist. Daher war eine Reduktion dieser Populationen besonders bei hoher Konzentration im Zuge der Verabreichung über 7 bzw. 13 Wochen der Clodronat Liposomen im Peritoneum zu erwarten. Dies steht im Kontrast zu vorhergegangenen Beobachtungen, dass weder DC noch PMN beeinflusst werden. (Claassen et al., 1990; Qian et al., 1994) Die Veränderungen des angeborenen Kompartiments könnten jedoch auch durch die Beobachtung verursacht sein, dass MΦ viele nicht-phagozytische Zellen in Bezug auf deren Entwicklung, Migration, Differenzierung beeinflussen, und besonders die wiederholte Verabreichung von Clodronat Liposomen schließlich eine Reduktion dieser MΦ Funktionen induziert. (Qian et al., 1994) Aufgrund der Unfähigkeit der Liposomen, die vaskuläre Barriere zu durchschreiten (van Rooijen et al., 1996) war weiterhin eine effiziente Depletion der MΦ in der Haut nicht zu erwarten. Dennoch scheint auch eine systemische Verabreichung keinen Einfluss auf die inflammatorische Rekrutierung zu zeigen, dies ist möglicherweise durch die erhöhte Anzahl an MO im Blut nach dreimaliger Gabe verursacht. Im Gegenteil zeigte die wiederholte dreimalige Gabe unveränderte MΦ Zahlen und erhöhte zeitgleich den Anteil an MO und PMN in der Haut. In den durchgeführten Untersuchungen zur experimentellen kutanen Infektion mit *L. major* wurde zu diesem Zeitpunkt die Infektion gesetzt. Theoretisch führt bereits die physiologische, quantitative Dominanz von PMN in der Leukozytenpopulation am Infektionsort dazu, dass innerhalb der ersten Stunden nach Inokulation ca. 80 bis 90% der Promastigoten von PMN aufgenommen werden. (Laskay et al., 2003; Peters et al., 2008; Peters and

Sacks, 2009) Wird diese Dominanz durch die Clodronat Behandlung noch verstärkt, ist davon auszugehen, dass die injizierten metazyklischen Promastigoten nahezu vollständig von PMN internalisiert werden. Weiterhin unterdrückt die Aufnahme von apoptotischen infizierten Neutrophilen durch M $\Phi$  und DC die Aktivierung und unterstützt damit das Überleben des Parasiten. (Savill et al., 2002; van Zandbergen et al., 2004) Die Abnahme der Aktivierung von DC reduziert in Folge die TH1 vermittelte Immunantwort und inhibiert die Kreuzpräsentation gegenüber CD8 T Zellen. (Ribeiro-Gomes et al., 2012; Ribeiro-Gomes et al., 2015) Zudem fördern PMN auch die CC-Chemokin-Ligand 3 (CCL3) -abhängige Rekrutierung von DC (Charmoy et al., 2010) und die Expression apoptotischer Marker stimuliert die Phagozytose durch DC. (Ribeiro-Gomes et al., 2012) Diese Mechanismen können, besonders unter Berücksichtigung des durch die Clodronatbehandlung erhöhten Anteils an DC in der Haut, zu einer lokalen Reduktion der *L. major* Proliferation führen, die die reduzierten Parasitenlasten der Haut erklären könnte. In PMN und DC sind Promastigote nicht in der Lage, effizient zu transformieren und zu replizieren. In murinen MO unterscheidet sich die Infektion zudem deutlich von den in M $\Phi$  beobachteten Reaktionen, MO reagieren mit einem starken respiratorischen Burst und damit einer frühen Parasitenbekämpfung, wohingegen M $\Phi$  hierfür zunächst durch IFN $\gamma$  aktiviert werden müssen. (Goncalves et al., 2011) Zusammengenommen könnte dies den verbesserten Krankheitsverlauf, widergespiegelt durch die signifikant kleineren Läsionen, der Clodronat Gruppe verursachen.

Im Gegensatz zu der verbesserten Symptomatik zeigten die Mäuse jedoch sowohl zum Zeitpunkt des maximalen inflammatorischen Geschehens als auch nach Resolution der Infektion erhöhte Parasitenlasten in der Milz. Ursächlich hierfür könnte neben der ausbleibenden Eindämmung am Infektionsort auch die verstärkte Parasitenaufnahme in PMN und daraus resultierend in DC sein. Die Infektion von DC resultiert in der Ausreifung der Zellen und initiiert deren Migration in die sekundären lymphatischen Organe, die Lymphknoten und auch die Milz. (Alvarez et al., 2008) Nachweislich kann *L. major* zumindest zeitweise auch in DC überleben, (Prina et al., 2004) unter unbeeinflussten Bedingungen ist lediglich 1 % der DC im Lymphknoten infiziert. (Woelbing et al., 2006) Die verstärkte Parasitenaufnahme unter Clodronat Einfluss in PMN und daraus resultierend auch in DC könnte jedoch diesen Anteil erhöhen und zu einem vermehrten und beschleunigten Transport von Parasiten in die lymphatischen Organe führen und damit ursächlich für die ver-

stärkte Viszeralisierung sein. In Folge könnte es zur Freisetzung lebender *Leishmanien* in der Milz kommen die, basierend auf der in dieser beobachteten effizienten Depletion von MΦ und den reduzierten CD4 T Zellen, nicht mortifiziert werden können und damit die systemische Kontrolle der Infektion ausbleibt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wäre zusätzlich die Analyse der Parasitenzahlen in den Lymphknoten aufschlussreich.

In Bezug auf die signifikant erhöhte Letalität in der Clodronat Liposomen Gruppe kann letztlich nur spekuliert werden. Möglicherweise ist die, vergleichbar mit der für die transgenen CD11cDTR Mäuse beobachteten, Neutrophilie und deren nachfolgende Reaktionen ursächlich. Insbesondere nach den ersten Applikationen konnte eine solche im Blut der Tiere beobachtet werden. Sicherlich sind jedoch auch die Haltungsbedingungen der Mäuse mit verantwortlich. Bei der langfristigen Behandlung werden die Tiere anfällig für Infektionen, die auch in einer spezifisch pathogen freien Haltung nicht ausgeschlossen werden können.

Abschließend muss festgestellt werden, dass die Verwendung von Clodronat Liposomen zur Depletion von MΦ in der experimentellen Infektion mit *L. major* nicht geeignet ist. Das Überleben der Mäuse wurde durch die Behandlung dramatisch reduziert, sobald eine Abnahme der MΦ erreicht wurde; wenn die Applikationen reduziert wurden, konnte keine Depletion mehr erzielt werden. Somit war aufgrund der verminderten Lebensfähigkeit der behandelten Mäuse eine aussagekräftige Beurteilung der Rolle von MΦ in der *L. major* Infektion unmöglich.

## **5.2. Intrazelluläre Prädestination von *L. major* in Zelllinien und primären Zellen**

Die Studien der intrazellulären Vorgänge in der PV und die Prädestination von *Leishmania* erforderten zunächst die Wahl eines geeigneten Modellsystems. Die *in vitro* Infektion von Phagozyten kann aufgrund der Isolation der Zellen vom verbleibenden Immunsystem nicht die komplexen Prozesse der Immunantwort widerspiegeln. Den kultivierten Zellen fehlt das Mikromillieu, das unter *in vivo* Bedingungen den Phänotyp moduliert. (Ramanan et al., 2014) Dennoch ist diese Herangehensweise die bisher effizienteste Möglichkeit, ausreichend Material für Analysen zu gewinnen. (Miura and Holmes, 2009) Prinzipiell stehen zwei verschiedene Modelle zur Verfügung, die *ex vivo* und *in vivo* Gewinnung primärer Phagozyten und die Verwendung immortalisierter Zelllinien. Insbesondere für die Entwicklung von Metho-

den sind Zelllinien ein einfach zu kultivierendes, kosteneffizientes und standardisiertes System zur Untersuchung von Wirt-Pathogen-Interaktionen, das konsistente, reproduzierbare Ergebnisse liefert. Durch die Immortalisierung sind Zelllinien jedoch weniger physiologisch relevant als primäre Zellen und zeigen signifikante Unterschiede, die immunologische Reaktionen beeinflussen. (Chingwaru et al., 2016) Die geläufigsten murinen M $\Phi$  ähnlichen Zelllinien sind die RAW264.7 und J774A.1 Zellen, wobei letztere aufgrund ihres Ursprungs den genetischen Hintergrund des suszeptiblen BALB/c Stammes aufweisen. Trotz der häufigen Verwendung dieser Linien in phagozytischen Studien ist wenig über die Vergleichbarkeit zu primären Zellen bekannt. Die Quantifizierung phagosomaler Proteine in RAW264.7 und *ex vivo* generierten M $\Phi$  aus dem Knochenmark (BMDM) legt signifikante Unterschiede in der Expression, insbesondere von Phagozytose Rezeptoren entscheidend für die Internalisierung von *Leishmania*, dar. Zudem wurden funktionelle Differenzen ermittelt, BMDM im Vergleich zeigen eine beschleunigte phagosomale Reifung repräsentiert durch die Fusion mit Endosomen und Lysosomen. (Guo et al., 2015) Für die J774A.1 hingegen konnten Transkriptom Analysen in Antwort auf eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* langsamere und weniger intensive intrazelluläre Reaktionen im Vergleich zu BMDM nachweisen. Da es sich bei *Mycobacterium tuberculosis* ebenfalls um ein die Phagozytose manipulierendes Pathogen handelt, liegt nahe, dass übereinstimmende Reaktionen auch in der *Leishmania* Infektion beobachtet werden können und J774A.1 vergleichbare, wenn auch verzögerte Reaktionen zeigen. Basierend auf dieser Annahme und der reduzierten Rezeptorexpression der RAW 264.7 wurden die J774A.1 verwendet. Die Immunphänotypisierung der J774A.1 konnte zunächst zeigen, dass weitestgehend eine vergleichbare Expression M $\Phi$  charakteristischer Oberflächenmoleküle stattfand. Im Gegensatz zu RAW 264.7 weisen diese zudem geringere Niveaus für mit anderen APC assoziierten kostimulatorischen Moleküle auf. (Chingwaru et al., 2016) Lediglich MHC war nicht nachweisbar, Literaturdaten zeigen jedoch, dass J774A.1 im Kontrast zu primären M $\Phi$  keine konstitutive Expression aufweisen, sondern diese erst durch Stimulation induziert wird. (Kalupahana et al., 2005)

Aufgrund der Heterogenität und der Komplexität von DC ist die *in vitro* Simulation dieser Zellen deutlich schwieriger. Lediglich geringe Zahlen terminal differenzierter post mitotischer DC können *in vivo* und durch die *ex vivo* Differenzierung von Monozyten und Knochenmarksvorläuferzellen gewonnen werden. Daher war insbe-

sondere für diesen Zelltyp die Verwendung einer Zelllinie essentielle Voraussetzung. Zur Verfügung standen hierbei theoretisch zwei verhältnismäßig neue Ansätze, die aufeinander basieren. Die D1 Zellen werden durch Langzeitkultivierung muriner Milzzellen unter Einfluss von Differenzierungsfaktoren (GM-CSF) gewonnen. (van Helden et al., 2008) Nachweislich verfügen diese über einen Phänotyp vergleichbar mit unreifen DC und durch *in vitro* Stimulation kann die charakteristische Reifung induziert werden. Weiterhin zeigen unreife D1 eine hohe endozytotische Kapazität, die im Verlauf der Reifung reduziert wird, präsentieren Antigenen in Abhängigkeit von MHC I und II, sekretieren ein Zytokinprofil vergleichbar mit primären DC, sind in der Lage, T Zellen effizient zu stimulieren und akquirieren einen migratorischen Phänotyp. (Pina et al., 2017; Sallusto et al., 1995; Savina et al., 2006; Singh-Jasuja et al., 2000; van Helden et al., 2008; Winzler et al., 1997) Die SP37A3 stellen eine Weiterentwicklung der D1 dar, die Generierung erfolgt ebenfalls durch Langzeitkultivierung von C57BL/6 Milzzellen. Als weiteren Differenzierungsfaktor setzten Bros et al. zusätzlich M-CSF ein und erzielten damit neben den genannten Eigenschaften zusätzlich die Kapazität zur Entwicklung eines tolerogenen Phänotyps. (Bros et al., 2007) Der durchgeführte Nachweis von DC spezifischen Oberflächenmolekülen in den SP37A3 zeigte die Expression von MHC II, CD11b, CD11c und den kostimulatorischen Molekülen CD80, CD86 und CD54. Im Zusammenhang mit *L. major* konnten voran gegangene Analysen einer Masterstudentin nachweisen, dass diese Zelllinie suszeptibel für eine Infektion mit Promastigoten und Amastigoten ist, in Antwort auf diese Infektion IL 12 sekretieren und die induzierte Ausreifung mit der vermehrten Expression von MHCII, CD86 und CD40 einhergeht und zu einer Stimulation Amastigoten spezifischer T Zellen führt. Zusammengefasst stellen die SP37A3 daher eine geeignete Alternative für die Analyse der phagozytischen Prozesse dar. Grundsätzlich muss jedoch der Unterschiedliche genetische Hintergrund der beiden Zelllinien kritisch betrachtet werden. Verschiedene Mausstämme zeigen Unterschiede gegenüber einer Infektion, die entweder in Suszeptibilität resultiert oder in der Entwicklung einer lebenslangen Resistenz gegenüber der Reinfektion mit derselben *Leishmania* Subspezies. (Reiner and Locksley, 1995; Sacks and Noben-Trauth, 2002) Primäre Phagozyten generiert aus verschiedenen Inzuchtstämmen zeigen ebenfalls erhebliche Unterschiede in der antimikrobiellen Funktion gegenüber Pathogenen (Jiang et al., 2010; van Erp et al., 2006; Wang and Deubel, 2011). Daher ist anzunehmen, dass diese Unterschiede auch in den Zelllinien auftreten. Proteom und Transkriptom Analysen konnten beispielsweise nachweisen, dass eine IFN $\gamma$  Stimulation in M $\Phi$  aus C57BL/6 im

Vergleich zu BALB/c Mäusen zu einer erhöhten Expression von Proteinen und Genen des oxidativen und antioxidativen Stress-Systems führt. Dies impliziert eine gesteigerte Resistenz der C57BL/6 M $\Phi$  gegenüber Pathogenen. (Depke et al., 2014) Um die beiden Zelllinien als geeignete Modellsysteme für die Analysen der Vorgänge in der PV und des Proteoms zu sichern, wurden diese mit primären Zellen verglichen. Für die Gewinnung von primären M $\Phi$  stehen grundsätzlich zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung. Vergleichbar mit der Gewinnung von BMDC können auch primäre M $\Phi$  durch die *ex vivo* GM-CSF Stimulation aus hämatopoetischen Vorläufern des Knochenmarks expandiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist das Biogel-induzierte Modell der Hautgranulombildung. Die subkutane Injektion von Polyacrylamidbeads führt zu einer wirksamen Rekrutierung von entzündlichen PMN und M $\Phi$  in Abhängigkeit von der Zeit. (John et al., 2013) Dieses Biogel-induzierte Entzündungsmodell ist gut geeignet für die Erzeugung großer Zahlen entzündlicher PMN oder kutanen M $\Phi$ . Die Vorteile sind vielfältig: *in vivo* Erzeugung von primären Hautzellen, einfaches und kostengünstiges Verfahren mit wenigen unerwünschten Zellen, hohe und vorhersehbare Zellausbeute und ein gut charakterisierter Phänotyp der resultierenden Zellen. (von Stebut et al., 2003) Interessanterweise sind die gewonnenen M $\Phi$ , im Gegensatz zu anderen Erzeugungsmethoden beispielsweise der Generation aus dem Knochenmark, vergleichsweise unreif und zur Phagozytose von z. B. *Leishmania* befähigt, zudem legt die *in vivo* Expansion einen physiologischeren Phänotyp nahe.

Wegen ihrer Seltenheit in Geweben wird ein großer Teil der Untersuchungen von DCs, an aus hämatopoetischen Vorläufern unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren (GM-CSF und IL4) *in vitro* differenzierten Zellen durchgeführt. (Helft et al., 2015; Sallusto and Lanzavecchia, 1994) Die resultierenden Zellen aus GM-CSF-Kulturen sind heterogen und umfassen neben DC auch Granulozyten und Makrophagen. Es wird angenommen, dass DC in den Suspensionszellen angereichert sind und CD11c und MHCII exprimieren, während Makrophagen adhärent und negativ für CD11c und MHCII sind. (Inaba et al., 1992) Üblicherweise liegt der Anteil der CD11c und MHCII positiven Zellen ohne weitere magnetische oder flusssortierte Anreicherung bei ca. 30%. Basierend auf den neuen Erkenntnissen bezüglich der Komplexität der DC Subpopulationen ist daher unklar, inwiefern GM-CSF-abgeleitete BMDC in den Rahmen der Definition von DC passen. Aktuelle Studien zeigen, dass auch die CD11c MHCII positive Population heterogen ist und mindestens zwei Subpopulationen umfasst, die aufgrund von ontogenetischen, morphologischen und

Genexpressionskriterien am ehesten den von Monozyten abgeleiteten Makrophagen und cDC zugeordnet werden können. (Guilliams and Malissen, 2015; Helft et al., 2015) Aktuell fehlt jedoch ein alternatives Protokoll zur Gewinnung von DC, dennoch sollten diese Erkenntnisse in die Interpretation der generierten Daten aus BMDC Kulturen einfließen.

Die durchgeführten Versuche zur intrazellulären Prädestination der beiden *Leishmania* Lebensformen in Phagozyten unter Verwendung von CFSE als Proliferationsfarbstoffes dienen dem Nachweis der intrazellulären Proliferation. Es konnte eine zeitabhängige Abnahme der CFSE Signalintensität Promastigoten enthaltender PV sowohl in BMDC, M $\Phi$  als auch in J774A.1 gezeigt werden. Wobei in beiden M $\Phi$  eine lineare Abnahme des CFSE Signals über die Zeit beobachtet wurde, die in den J774A.1 langsamer voranschritt im Vergleich zu den Biogel M $\Phi$ . Insbesondere bei Promastigoten ist eine Synchronisation der Infektion nicht möglich und die Zeit zwischen initialem Kontakt mit der Zelle und der Internalisierung variieren zum Teil erheblich. Daher stellen die gewonnenen PV grundsätzlich ein Mosaik unterschiedlicher Reifegrade dar. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache würde sich eine Transformation der Promastigoten in Amastigote eher durch eine lineare Abnahme des CFSE Signals äußern. Die Beobachtungen legen zudem nahe, dass in den J774A.1, vergleichbar mit den Literaturdaten der RAW264.7, eine langsamere phagosomale Reifung im Vergleich zu primären M $\Phi$  beobachtet werden kann, die in einer verzögerten Transformation in Amastigote resultiert. Eine weitere Ursache könnte auch in einer erhöhten Expression von Proteinen und Genen des oxidativen und antioxidativen Stress-Systems liegen, ausgelöst durch den genetischen BALB/c Hintergrund der J774A.1. (Depke et al., 2014) Das diese Abnahme des CFSE Signals innerhalb des Zeitraums von 22 h nach erstem Kontakt zwischen Promastigoten und Zellen eher auf die Transformation zurückzuführen ist wird auch durch die Ergebnisse der Calcein Färbung gestützt. Während die Anzahl lebender Promastigoten zwischen 11 und 20 h nur um ca. 10 % steigt geht die Intensität des in diesem Versuch verwendeten CTV fast vollständig verloren. Auch der BrdU Assay bestätigt dies, in dem eine Proliferation der Promastigoten in J774A.1 erst zwischen dem 4. und 6. Tag nachgewiesen wurde. Um die Daten weiter zu sichern und auch für die Biogel M $\Phi$  zu bestätigen, müsste der BrdU Assay mit beiden M $\Phi$  parallel durchgeführt werden und zudem das BrdU bereits während der Koinkubation von Zellen und Promastigoten zugesetzt werden. Zudem wären weitere Zeitpunkte zwischen 18 h

und 4 d hilfreich, um den genauen Zeitpunkt des Beginns der intrazellulären Proliferation zu bestimmen.

Isoliert aus BMDC hingegen wurde zu Beginn eine relativ hohe CFSE Signalintensität der PV beobachtet, die sprunghaft in den ersten 2,5 h abnahm und im weiteren zeitlichen Verlauf nahezu konstant blieb. Ursächlich könnte dies in noch adhärennten Promastigoten liegen die nicht effizient entfernt wurden und während der folgenden Inkubationszeit die Bindung an die Zelle verlieren ohne internalisiert zu werden. Diese Annahme wird unter anderem durch frühere histologische Beobachtungen gestützt das BMDC nur eine sehr geringe Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit Promastigoten aufweisen (Woelbing et al., 2006). Für die SP37A3 hingegen wird auch eine Aufnahme von Promastigoten beobachtet. Unterstützend zeigten die Ergebnisse der Calcein AM Färbung eine Reduzierung der lebenden Promastigoten in den PV, wobei das CTV Signal konstant blieb. Zusammengenommen impliziert dies, dass die von SP37A3 aufgenommenen Promastigoten nicht effizient transformieren, sondern abgetötet werden. Auslösend für die unterschiedliche Suszeptibilität der BMDC und SP37A3 gegenüber einer Infektion mit Promastigoten könnte auch in ihrem Phänotyp liegen. GM-CSF abgeleitete BMDC können aufgrund von ontogenetischen, morphologischen und Genexpressionskriterien am ehesten den cDC zugeordnet werden. (Guilliams and Malissen, 2015; Helft et al., 2015) Die Hauptaufgabe der Phagozytose in cDC liegt in der Präsentation mikrobieller Antigene gegenüber dem adaptiven Immunsystem, die limitierte Proteolyse liefert Epitope idealer Größe insbesondere im Kontext der MHC vermittelten Kreuzpräsentation gegenüber CD8 zytotoxischen und CD4 T Zellen. (Mantegazza et al., 2008; Savina et al., 2006) Zudem zeichnen sich diese durch eine reduzierte phagozytische Aktivität und Antigeninternalisierung aus. Monozytäre DC (moDC) hingegen differenzieren aus MO, und werden in Folge einer Inflammation aus dem Blut rekrutiert, weisen ein vergleichsweise geringes migratorisches und T Zell stimulatorisches Potential auf, sind jedoch phagozytisch und proteolytisch aktiver als cDC (Tamoutounour et al., 2013). Die SP37A3 werden durch Langzeitkultivierung muriner C57BL/6 Milzzellen unter Einfluss von Differenzierungsfaktoren gewonnen (Bros et al., 2007), daher sind übereinstimmende Reaktionen eher mit den moDC zu erwarten. Um diese Theorie unterstützend zu analysieren, sollte ein BrdU Assay zudem mit BMDC und SP37A3 durchgeführt werden. Zudem sollte die proteolytische Aktivität der beiden DC Modelle analysiert werden. Hierzu könnten die beiden Zelltypen mit IgG-beschichteten Beads, die mit dem fluorogenen Proteasesubstrat

DQ Green BSA derivatisiert sind, inkubiert werden, die Protease katalysierte Hydrolyse im Phagosom hebt das Quenching des Fluoreszenzsignals des DQ Green BSA auf und lässt dadurch Rückschlüsse auf die proteolytische Kapazität zu. Um weiterhin zu bestätigen, dass die sprunghafte Abnahme in der CFSE Signalintensität von *L. major* in BMDC durch adhärenzte Promastigote verursacht wird, wäre weiterhin eine Markierung der Zellmembran möglich. Diese bietet die Möglichkeit internalisierte Promastigote von anhaftenden zu diskriminieren.

Für Amastigoten enthaltende PV aus BMDC und Biogel MΦ sank das CFSE ebenfalls über die Zeit. Eine sprunghafte Abnahme wurde auch hier in BMDC in den ersten 2,5 h beobachtet, wohingegen Biogel MΦ einen kontinuierlichen Verlauf aufwies. Ursächlich hierfür könnten ebenfalls anhaftende Amastigote sein, jedoch auch die intrazelluläre Mortifikation, die in BMDC stattfinden sollte, wäre eine mögliche Erklärung, da eine Infektion mit Amastigoten im Vergleich zu Promastigoten zeitlich deutlich gleichförmiger verläuft. Zudem ist die Aufnahme von Amastigoten in BMDC durch histologische *in vitro* Untersuchungen gesichert (Woelbing et al., 2006) und eine leichte Abnahme der lebenden *Leishmanien* konnte auch durch die Calcein AM Färbung nachgewiesen werden. In diesem Ansatz zeigte sich jedoch in den SP37A3 auch eine langsame Abnahme des CTV Signals. Um eine Replikation der Amastigoten in der Zelllinie auszuschließen, sollte ebenfalls ein BrdU Assay durchgeführt werden, um diese Zelllinie als geeignetes Modellsystem zu bestätigen. Der langsame kontinuierliche Verlauf in Biogel MΦ hingegen spricht eher für eine zeitlich koordinierte Ausdünnung des CFSE und damit für die intrazelluläre Replikation. Nachgewiesen durch die Calcein AM Färbung stieg in den J774A.1 auch der Anteil lebender Amastigote. Dieser Anstieg war jedoch nicht proportional zur Ausdünnung des CFSE Signals. Die Daten des BrdU Assays legen nahe, dass nach 4 d bereits ca. 60 % der Parasiten proliferiert haben, daher konnte nicht direkt ein Zusammenhang der Proliferation mit der Abnahme des Signals des Proliferationsfarbstoffes nachgewiesen werden.

### **5.3. Zelluläre und Phagosomen lokalisierte Expression phagosomaler Reifungsmarker**

Die durchgeführten Experimente konnten bestätigen, dass die SP37A3 einen unreifen myeloiden DC Phänotyp aufweisen, und bieten daher die Möglichkeit, die Diversität von BMDC zu umgehen. (Bros et al., 2007)

In bislang unveröffentlichten Analysen wurden J774A.1 oder SP37A3 mit *L. major*

inkubiert und an DiffQuick-gefärbten Zytospins die Infektionsraten bestimmt. Die SP37A3 zeigten sich nach 18 h effizienter in der Internalisierung beider Lebensformen im Vergleich zu BMDC, mit Frequenzen Amastigoten infizierter Zellen von ca. 70 %, die damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für J774A.1 und Biogel M $\Phi$  waren. BMDC hingegen zeigen zu diesem Zeitpunkt lediglich zu ca. 20 % eine Aufnahme von Amastigoten. Dennoch waren die SP37A3 auch suszeptibel für eine Infektion mit Promastigoten mit vergleichbaren Infektionsraten (ca. 60 %), ein Befund der in BMDC nicht beobachtet werden kann. (Woelbing et al., 2006) Daher erschien die Verwendung von Amastigoten für die durchgeführten Analysen der phagosomalen Reifung in den Zelllinien bessere Rückschlüsse auf die physiologischen Reaktionen von M $\Phi$  und DC zu ermöglichen.

Um die phago(lyso)somalen Funktionen in Amastigoten enthaltenden PV besser zu verstehen, wurde die zeitlich koordinierte Rekrutierung und Lokalisierung von phagosomalen Reifungsmarkern innerhalb der beiden Phagozyten Linien analysiert. Um zudem die Abhängigkeit der phagosomale Reifung vom internalisierten Partikel zu untersuchen, wurden die Reifungsmarker nach der Amastigoten Aufnahme mit der Internalisierung von Beads verglichen.

Bezüglich der Abundanz von EEA1 und CD68 zeigten sich zellspezifische Unterschiede zwischen J774A.1 und SP37A3, basierend auf länger andauernden Präsenzen in SP37A3. Dieser war jedoch unabhängig sowohl von der Aufnahme der Zellen als auch vom internalisierten Partikel. EEA1 ist ein Effektormolekül, dass die Reifung in späte Phagosomen durch die Anhaftung an spezifische Proteine vermittelt (Huotari and Helenius, 2011), CD68 hingegen ist mit der lysosomalen Membran assoziiert und gehört zur Familie der Scavenger Rezeptoren. (Kurushima et al., 2000) Trotz der Unterschiede in der Anwesenheit beider Marker scheint der Reifungsprozess in SP37A3 nicht beeinflusst zu sein, da trotz der niedrigen Niveaus an EEA1 und CD68 letztlich in beiden Zelllinien die Marker für späte Endosomen und Lysosomen rekrutiert werden. Diese Ergebnisse legen damit nahe, dass die Funktionen von CD68 und EEA1 in SP37A3 durch andere Moleküle kompensiert werden und stehen analog zu den Referenzen, dass die an das endosomale Kompartiment angepassten Amastigoten keine LPG vermittelte Verzögerung der Reifung des Phagosoms in M $\Phi$  auslösen. (Desjardins and Descoteaux, 1997)

In SP37A3 waren zudem leichte zeitliche Unterschiede in den Niveaus der phagosomalen Markern zwischen Amastigoten und Beads enthaltenden Zellen zu be-

obachten. Für die untersuchten phagosomalen Marker zeigte sich eine längere Verweildauer in Amastigoten infizierten Zellen. Dies legt eine Amastigoten induzierte Verzögerung der phagosomalen Reifung nahe. Diese steht in Einklang mit den Literaturangaben zur teilweise beeinträchtigten Fusionsaktivität von Amastigoten enthaltenden PV mit Lysosomen in unreifen BMDC. (Körner et al., 2006) Es ist jedoch kritisch zu bewerten, dass im Falle der Infektion mit Amastigoten keine mit der Internalisierung von Beads vergleichbare synchronisierte Infektion erzielt werden kann. Dadurch ist nicht vollständig gewährleistet, dass die Abundanzen der phagosomalem Marker direkte Rückschlüsse auf die benötigte Zeitspanne der Reifung zulassen. Um diese Nachteile zu kompensieren, müssten für beide Zelllinien Untersuchungen durchgeführt werden zum direkten Vergleich der Geschwindigkeit der Internalisierung von Amastigoten und Beads. Durch den Einbezug einer solchen Geschwindigkeitskonstante in die Auswertung der Signalintensitäten der phagosomalen Reifungsmarker wäre eine Vergleichbarkeit zwischen den Partikeln sichergestellt.

Die weiterhin durchgeführte Analyse isolierter PV diente dem Nachweis der phagosomalen Marker lokalisiert in der PV Membran. Die Präsenz dieser Marker in intakten Zellen ermöglicht nur eine Aussage über den Einfluss der Parasiten auf die Proteinexpression. Die Bestimmung in isolierten PV hingegen untersucht direkt die Rekrutierung in die das Pathogen umschließende Membran. Diese Herangehensweise zeigte grundsätzlich ein höheres Vorhandensein aller untersuchten Marker in den Amastigoten enthaltenden PV im Vergleich zu Beads, unabhängig von der Phagozytenzelllinie. Dieser Umstand ist sicherlich zum einen Folge der unterschiedlichen Größe der internalisierten Partikel. Insbesondere Rab7 vermittelt direkt den Transport des phagosomalen Vesikels entlang des Mikrotubulinnetzwerkes durch Bindung an Motorproteine (Bucci et al., 2000), daher liegt es nahe, dass der effiziente Transport eines größeren Cargos die Bindung an verhältnismäßig mehr Motorproteine benötigt. Zum anderen konnte die Entwicklung der Methode zur Isolation von Phagosomen deutlich nachweisen, dass die Integrität der phagosomalen Membran im Zuge der Lyse der Zellen in Amastigoten enthaltenden PV deutlich besser konserviert ist. Daher ist davon auszugehen, dass der quantitative Unterschied zwischen den Partikeln auf eine schlechtere Konservierung der Membran bei der Gewinnung Beads enthaltender PV zurückzuführen ist.

Die in intakten, Amastigoten infizierten SP37A3 beobachtete längere Präsenz der phagosomalen Marker konnte in der lokalisierten Betrachtung nicht bestätigt werden. In der PV Membran der SP37A3 war der zeitliche Verlauf des Auftretens aller

Marker vergleichbar zwischen Amastigoten und Beads. Möglicherweise induzieren Amastigote in SP37A3 die Proteinexpression, führen jedoch nicht zur Rekrutierung in die sie enthaltenden Organellen. Der direkte Vergleich Beads enthaltender PV zwischen den SP37A3 und den J774A.1 legte die länger andauernde und verstärkte Präsenz von Rab7 in J774A.1 nahe. Diese könnte zu der beobachteten vergleichsweise höheren proteolytischen Kapazität von M $\Phi$  beitragen, (Delamarre et al., 2006) da Rab7 als Schlüsselregulator für den späten endolysosomal Transport fungiert und die endosomale Migration durch verschiedene Protein-Protein-Interaktionskaskaden reguliert. Dieser Unterschied scheint jedoch keine Auswirkungen auf die Reifung der PV zu haben, die sich anschließenden Markerproteine des lysosomal Stadiums zeigten keine Veränderung. Lokalisiert in der Membran um Amastigote hingegen zeigte Rab7 einen vergleichbaren Verlauf zwischen J774A.1 und SP37A3. In *L. amazonensis* konnten Courret et al. in BMM nach LPS Stimulation EEA1 zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines 48 h Intervalls kaum EEA1 und Rab7 in Parasiten enthaltenden Kompartimenten nachweisen, ungeachtet des parasitären Stadiums das zur Infektion verwendet wurde (Courret et al., 2002). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Arbeit keine zeitlich synchronisierte Infektion durchgeführt wurde und somit die betrachteten PV ein Mosaik verschiedener Reifungsstadien darstellen.

Zusammenfassend scheint die PV Reifung durch internalisierte Amastigote trotz der Unterschiede in der *in vivo* beobachteten Antwort auf eine Infektion zwischen DC und M $\Phi$  zeitlich nicht unterschiedlich zu verlaufen. Grundsätzlich sind die gewählten experimentellen Zeitpunkte jedoch kritisch zu betrachten. Nach drei Stunden ist die Phagosomenbildung insbesondere bei der Aufnahme von Beads bereits beendet. Um die Unterschiede zwischen den Phagozyten und in Abhängigkeit des aufgenommenen Partikels besser zu adressieren, sollten frühere Zeitpunkte gewählt werden. Für die Rekrutierungskinetik von EEA1 würden sehr frühe Zeitpunkte (5-15 min) und für Rab7 und LAMP2 spätere Zeitpunkten (15-30 min) gesichertere Rückschlüsse zulassen.

Zudem ermöglicht die Bestimmung der Assoziation der untersuchten Proteine in der komplexen Organelle des Phagosoms keine Hinweise auf die funktionellen Eigenschaften in Bezug auf die antimikrobielle Kapazität und Antigenprozessierung, die das Verständnis von DC- und Makrophagenfunktionen während der Infektion aufklären könnten.

## 5.4. Massenspektrometrische Analyse des Proteoms isolierter Phagosomen

Die Bildung von abgegrenzten membranösen Kompartimenten, den Phagosomen, zum Einschluss von Pathogenen initiiert die angeborene Immunantwort und führt zur Prozessierung und Präsentation von pathogenen Antigenen für das adaptive Kompartiment. Intrazellulär ist dieser Prozess durch Rekrutierung einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen und kontinuierliche Modifikation von Membranlipiden gekennzeichnet, die letztlich das abbauende antimikrobielle Phagolysosom entstehen lassen. (Desjardins et al., 1994; Fairn and Grinstein, 2012; Lim et al., 2017) Wechselwirkungen und Störungen dieses Abwehrmechanismus konnten für zahlreiche intrazelluläre Pathogene nachgewiesen werden. In jüngster Zeit wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um Erreger und deren intrazelluläre Kompartimente zu isolieren, anzureichern und ihre Zusammensetzung zu analysieren. Entsprechend beschäftigt im Vergleich zu eukaryotischen Parasiten die Mehrheit dieser Studien mit Proteom von bakteriellen Vakuolen. Die am intensivsten untersuchten intrazellulären Nischen sind assoziiert mit Legionellen, Mykobakterien, Salmonellen und Chlamydien. (Herweg et al., 2015; Hoffmann et al., 2012; Hoffmann et al., 2018; Li et al., 2010; Singh et al., 2018; Urwyler et al., 2010) Eine große Herausforderung dieser Analyse von Pathogen-Wirt-Interaktion ist das begrenzte Material, darüber hinaus sind die bakteriellen Proteine mengenmäßig den Wirtsproteinen deutlich unterlegen, welche zudem nicht zwingend am Infektionsprozess beteiligt sind. (Herweg et al., 2015) Die Schwierigkeit besteht daher darin, (Hartlova et al., 2011) mit potenziell sehr asymmetrischen Verhältnissen in den Proteinabundanz entweder die Wirtsproteine oder pathogenen Virulenzfaktoren einzeln oder gleichzeitig zu erfassen. (Schmidt and Volker, 2011) Diese Probleme können nur mit Methoden gelöst werden, die sensitiv und dynamisch sind. (Semini and Aebischer, 2017) Massenspektrometrische Analysen der Gesamtheit phagosomaler Proteine in Bead haltigen PV haben die Eignung dieser Methode belegt (Li et al., 2010; Rogers and Foster, 2008) und die Identifizierung neuer Komponenten in MΦ und DC ermöglicht. (Duclos et al., 2011)

Bisherige proteomische Analysen von *Leishmania* konzentrieren sich auf die Veränderungen parasitärer Proteine. Vergleichende Untersuchungen zwischen Therapie resistenten und suszeptiblen Subspezies (Biyani et al., 2011), zum *in vitro* Einfluss toxischer ROS und RNS (Dea-Ayuela et al., 2009; Sardar et al., 2013) und das zwischen den beiden Lebensformen veränderte Proteom und Transkriptom wurden

bereits vielfach adressiert. (Brotherton et al., 2010; McNicoll et al., 2006; Paape et al., 2010; Tsigankov et al., 2013) Auch neue Ansätze der Regulation in Antwort auf das intrazelluläre Habitat in ruhenden und IFN $\gamma$  stimulierten M $\Phi$  sind auf die Identifikation *Leishmania* spezifischer Proteine limitiert. (Lamour et al., 2012) Die durch *Leishmania* induzierten Veränderungen der Wirtszelle und im speziellen die Zusammensetzung der PV sind bisher jedoch wenig untersucht. Die verschiedenen Isolationsprotokolle für bakteriell infizierte Zellen implizieren jedoch, dass die Separation auch für *L. major* möglich ist. Besondere Herausforderungen hierbei sind zum einen die asynchrone Infektion und zum anderen das daraus resultierende Mosaik unterschiedlichster Reifungsgrade der PV. Grundsätzlich haben sich für die Isolation von PV drei verschiedene Ansätze, und Kombinationen aus diesen, durchgesetzt: die Affinitätsaufreinigung mittels spezifischer Antikörper zum Teil gekoppelt an magnetische Beads, die subzelluläre Fraktionierung durch Dichtegradientenzentrifugation und die Fluoreszenz aktivierte durchflusszytometrische Separation. (Herweg et al., 2015) Die Verwendung spezifischer Antikörper gegen Wirtszellmarker assoziiert mit der PV Membran, beispielsweise dem ER lokalisierten Calnexin, isoliert zuverlässig endosomale Kompartimente. Hierbei ist jedoch eine Diskriminierung zwischen Pathogen enthaltenden und frühen endosomalen Vesikeln nicht möglich. Zudem wurde für *Leishmania* im speziellen gezeigt, dass im Zuge der Maturation der PV und der Transformation in Amastigote Calnexin von der Membran delokalisiert und somit nur Promastigoten enthaltende PV gewonnen werden können. (Kima and Dunn, 2005) Sukrosegradienten Zentrifugation hingegen trennen die Bestandteile von Zelllysaten abhängig von der Dichte. Hierin zeigen sich bereits die Nachteile dieser Methode, prinzipiell werden nicht nur Pathogene enthaltende PV angereichert, sondern gleichzeitig kommt es zur Akkumulation von Organellen mit einer ähnlichen Dichte, beispielsweise Mitochondrien. (Li et al., 2010) Die in dieser Arbeit entwickelte Methode auf Basis des Flusssortierers sollte die Nachteile der genannten Ansätze kompensieren.

Zunächst ermöglichte die Fluoreszenz basierte Markierung von *Leishmania* die Diskriminierung zwischen PV und endosomalen Vesikeln und reduzierte die Verunreinigung mit Organellen der Wirtszellen. Der letztlich verwendete Membranfarbstoff bietet im Gegensatz zu den zunächst verwendeten Proliferationsfarbstoffen einerseits den Vorteil der verbesserten Wiederfindung von *Leishmania* in den PV. Zudem findet durch diesen keine Selektion bezüglich der Replikationskompetenz von *L. major* in den PV statt. Durch Transformation und Replikation bedingte Ausdünnung

des Proliferationsfarbstoffes würde durch die anschließende Sortierung zu einer Anreicherung früher Reifungsstadien und PV mit bereits toten *Leishmanien* führen. Dennoch müsste zur Kontrolle der Interferenzen des Farbstoffes mit dem Amastigoten Proteom in den MS Analysen in weiteren Analysen ein Vergleich mit ungefärbten Amastigoten durchgeführt werden.

Selbiges gilt auch für den zur Markierung der Membran der Zelllinien verwendeten Farbstoff. Neben der Optimierung der technischen Bedingungen für den Sortiermechanismus ermöglichte diese Markierung der Phagozytenmembran die Unterscheidung zwischen adhärennten Amastigoten und in PV lokalisierten. Dadurch könnte die indirekte Markierung der PV Membran weiterhin in der massenspektrometrischen Analyse eine Aussage über die absolute Quantität der detektierten Amastigoten spezifischen Proteine zulassen. Bezüglich der Amastigoten enthaltenen PV konnte durch diese Markierung eine deutliche Anreicherung dieser im Lysat erreicht werden, für Beads nach der intrazellulären Phase war jedoch nur eine geringe Verbesserung zu beobachten. Dies könnte in der fehlenden Interaktion und der daraus resultierenden Bindung der PV Membran an die Beads begründet sein. Dennoch wäre es auch möglich das Proteom Amastigoten enthaltender PV mit Literaturdaten zu vergleichen. Hierbei sollte beachtet werden, dass die Internalisierung von Beads synchronisiert abläuft und daher die isolierten PV bei der gewählten Koinkubationszeit von 18 h sich allesamt im lysosomalen Stadium befinden, hingegen die Amastigoten PV eher ein Mosaik verschiedener Reifungsstadien sind und daher die direkte Vergleichbarkeit nicht gewährleistet werden kann.

Weiterhin sollte bezüglich der Koinkubationszeit eine Verlängerung bzw. die Isolation zu verschiedenen Zeitpunkten in Erwägung gezogen werden. Die Analyse des BrdU vermittelten Hoechst Quenchings konnte 4 d nach erstem Kontakt eine effiziente Replikation von Amastigoten in J774A.1 nachweisen. Ein zusätzlicher Zeitpunkt für die Isolation könnte daher zwischen frühen Manipulationen und Bedingungen in der PV unterscheiden die für die Replikation nötig sind.

Die eingeführte Fixierung der infizierten Zellen weiterhin steigerte nicht nur die Ausbeute intakter PV durch Stabilisation zellulärer Strukturen, sondern verhindert auch Zellstress und Temperatur bedingte Veränderungen. Im Verlauf der Präparation und besonders während der Lyse mit dem GentleMACS System konnte keine kontinuierliche Kühlung der Probe aufrecht gehalten werden und es kam zu einer deutlichen Erhöhung der Temperatur. Eine Hitzeschockantwort verursacht massive Umbauprozesse in der Wirtszelle und zudem kann ohne Kühlung eine weitere Maturation der PV stattfinden (Donati et al., 1991). Das verwendete PFA als Fixativ ist

durch seine chemische Wirkung in der Quervernetzung von Membranproteinen in der Lage die dazwischenliegende Membran zu stabilisieren und hat nur einen geringeren Einfluss auf die Proteinstruktur. Massenspektrometrische Analysen konnten die Wiederfindung von Proteine intakter Zellen unabhängig von der Fixierung nachweisen.

Für die Integrität der PV und insbesondere der phagosomalen Membran ist die Lyse der infizierten Zellen ein kritischer Schritt. Einerseits könnten die PV bei zu intensiver Lyse durch die entstehenden Kräfte geschädigt werden, andererseits reduziert eine ineffiziente Lyse die maximal erreichbare Ausbeute. Die Wahl des GentleMACS Systems zeigte nicht nur die höchste Konservierung der phagosomalen Membran, das halbautomatisierte Verfahren stellte zudem eine Standardisierung des Isolationsprotokolls dar. Die Verwendung dieses Systems in der Bestimmung der Parasitenlasten in Ohr und Milz gewährleistet weiterhin, dass diese Behandlung keine Auswirkungen auf die Vitalität der Amastigoten hat.

Die sich anschließenden Zentrifugationsschritte des Zellysats und der Abbau der zellulären Nukleinsäuren verursachten die Anreicherung und Vereinzelung der PV. Da der Transport phagosomaler Vesikel entlang des Aktinskeletts erfolgt, wäre auch eine Behandlung des Lysat mit Cytochalasin D möglich. Dieses Mycotoxin ist ein potenter Inhibitor der Aktinpolymeration und kann diese Mikrofilamente auch abbauen. (May et al., 1998) Abhängig von der zugrundeliegenden Fragestellung könnte der Einsatz zudem die Trennung von Membran und mit den Aktinfilamenten assoziierten Proteinen für eine selektive Analyse ermöglichen.

Letztlich die Separation der PV im Flusssortierer konnte durch den zweiten Parameter der markierten Zellmembran der Phagozyten optimiert werden. Grundsätzlich konnten Analysen anderer Gruppen eine Ruptur der PV zeigen. Entstehende Scherkräfte bei der Bildung der für die Separation nötigen Tropfen im Flusssortierer sind hauptsächlich verantwortlich für die Zerstörung der Membranintegrität. In Folge werden die Bestandteile des phagosomalen Lumens und Teile der Membran in die Lösung entlassen. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse von Semini et al. bestätigt. (Semini and Aebischer, 2017) Zudem könnte die Separation im Flusssortierer auch eine Ruptur der Amastigoten zu bewirken. Die Ergebnisse der zweiten massenspektrometrischen Analyse konnten lediglich 158 des über 8000 Proteine umfassenden Proteoms von *L. major* identifizieren, auch der Mengenanteil Amastigoten spezifischer Proteine unterstützt diese Annahme. In den beiden verwendeten Zelllinien konnten lediglich 3,4 bzw. 5,6 % der Proteine Amastigoten zugeordnet

werden. Bisher veröffentlichte proteomische Studien wurden entweder mit *L. donovani* oder *L. infantum* durchgeführt, wahrscheinlich aufgrund der medizinischen Bedeutung der resultierenden viszeralen Formen. (Veras and Bezerra de Menezes, 2016) Studien dieser axenischen Amastigoten in der die zweidimensionale Gelelektrophorese als Proteintrennmethode vor der Massenspektrometrie eingesetzt wurde, konnten ~2000 Proteinspots nachweisen. (Bente et al., 2003; El Fakhry et al., 2002) Die in dieser Arbeit ermittelte Anzahl parasitärer Proteine betrug damit weniger als 10 % dieser Werte. Zudem ist das Verhältnis der detektierten Proteine deutlich zugunsten der Phagozyten verschoben, obgleich die parasitären Proteine theoretisch den höheren Anteil der Isolate ausmachen müssten. Die ermittelte Anzahl muriner Proteine und insbesondere deren zelluläre Lokalisation spricht weiterhin für die Anreicherung unerwünschter Kontaminationen im Zuge der Isolation. Insbesondere wurde eine deutliche Anreicherung nukleärer und Chromosomen assoziierter Proteine offensichtlich. Theoretisch ist aufgrund der komplexen Wechselwirkung von Phagosomen mit anderen Organellen im Zytoplasma ist eine Isolation von Phagosomen nie ideal, da die vollständige Separation von anderen Organellen nicht erreicht werden kann, laut Rogers et al. (Rogers and Foster, 2007) Da die meisten, wenn nicht sogar alle Proteine, außer den pathogenen aus der Plasmamembran, anderen endozytischen Organellen und wahrscheinlich auch dem ER stammen, ist es schwierig, Phagosomenproteine von denen in verunreinigenden Organellen, Zytoskeletten und anderen Membranfragmenten zu unterscheiden. (Li, 2011; Li et al., 2010)

Im entwickelten Protokoll schließt sich an den Sortierprozess ein Zentrifugationsschritt an, dadurch ist davon auszugehen, dass bei angenommener Ruptur insbesondere die Proteine des phagosomalen Lumens aus der Analyse ausgeschlossen werden. Grundsätzlich könnte diese mögliche Zerstörung der PV jedoch auch zur weiteren physikalischen Separation genutzt werden. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass bei zusätzlicher langsamer Zentrifugation eine Anreicherung von Amastigoten in der Suspension erreicht werden konnte. (Paape et al., 2010; Paape et al., 2008) Durch Proteinpräzipitation und differentielle Zentrifugation der resultierenden Überstände könnte zudem eine weitere Differenzierung in die Proteine des Lumen und Membranproteine erfolgen. (Semini and Aebischer, 2017)

Die sich anschließende Gel freie Flüssigchromatographie Massenspektrometrie – Kopplung stellt ebenfalls besondere Anforderungen an die Aufarbeitung der Proben. Trotz der durch die LC verbesserte Sensitivität müssen detektierbare Proteine in

einer Konzentration zwischen 10 und 20 Femtomol und damit einer ungefähren Anzahl von  $10^{10}$  Kopien vorliegen. Bedingt durch die subzelluläre Lokalisation wäre jedoch der Nachweis von Proteinen nötig die nur in ca. 100 Kopien im Phagosom vorliegen, da diese bereits funktionell aktiv sein können. Rechnerisch ergibt sich damit eine Anzahl an PV nach der Sortierung von  $10^8$  bis  $10^9$ . (Semini and Aebischer, 2017) Diese hohe Zahl wurde auch durch die Beobachtung gestützt, dass eine Immunmarkierung der charakteristischen phagosomalen Marker Lamp2 und EEA1 lediglich durch Verwendung von FITC gekoppelten Sekundärantikörpern möglich war. Unter Berücksichtigung des Anteils Amastigoten enthaltender PV im Lysat (ca. 60%) und der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit der Sortierung bedeutet dies Laufzeiten des Gerätes von bis zu 50 Stunden zur Gewinnung einer Probe. Aktuell ist dies besonders unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen Ansätze der beiden verschiedenen Phagozytenzelllinien jeweils mit Amastigoten und Beads limitierend für die Analyse der Gesamtheit des *L. major* Proteom und der PV Membran. (Semini and Aebischer, 2017)

Zusammengenommen konnte der Vergleich der beiden massenspektrometrischen Analysen eine deutliche Steigerung der prozentualen Ausbeute isolierter PV durch die Optimierungen bezüglich des Fluoreszenzfarbstoffes, der Lysemethode und dem Einsatz des Fixativs nachweisen. Weitere Analysen unter Verwendung der Membranfärbungen von Amastigoten und Zellen müssten nachweisen, ob diese Maßnahmen den Ertrag zusätzlich erhöhen können und ob die entwickelte Methode reproduzierbare Ergebnisse liefert.

## 6. Material

### 6.1. Tiere

C57BL/6 Mäuse Janvier Labs, Saint-Berthevin  
 BALB/c Mäuse Cedex, Frankreich  
 LysM-cre Mäuse, LysM-cre/DTR Mäuse Ari Waisman  
 Institut für Molekulare Medizin Mainz  
 Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität  
 Mainz  
 iDTR Björn E. Clausen  
 Institut für Molekulare Medizin Mainz  
 Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität  
 Mainz

### 6.2. Parasiten

*Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friedlin)  
*Leishmania major* RFP<sup>+</sup> (Friedlin V1-RFP) David L. Sacks  
 National Institute of Allergy & Infectious Disease  
 National Institute of Health  
 USA

### 6.3. Latex Beads

Biotin Microspheres 2,0 µm Durchmesser Polyscience, Warrington, USA

### 6.4. Zelllinien

SP37A3 Merck, Darmstadt  
 X63 Klon Brigitta Stockinger,  
 Division of Molecular Immunology  
 MRC National Institute for Molecular Research  
 London  
 J774A.1 Astrid Schmieder  
 Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg  
 Klinik für Dermatologie  
 Venerologie und Allergologie  
 Mannheim

## 6.5. Antikörper

### 6.5.1. Primärantikörper

Anti-Maus CD11b PE-Cy7, Klon M1/70	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD11c APC, Klon N418	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD11c FITC und PE, Klon HL3	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD16/CD32 (Fc-Rezeptor III/II), Klon 2.4G2	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD19 FITC, Klon eBio1DB	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD3e eFluor450, Klon 145-2C11	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD3e FITC, Klon 145-2C11	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD3e PE, Klon eBio500A2	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD4 APC-Cy7, Klon GK1.5	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD4 APC, Klon GK1.5	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD4 FITC, Klon L3T4 GK1.5	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD40 FITC, Klon HM40-3	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD54 FITC, Klon 3E2	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD68 AF488, Klon FA-11	Biologend, San Diego
Anti-Maus CD80 FITC, Klon 16-10A1	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD86 FITC, Klon B7-2 (GL1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD8a APC, Klon 53-6.7	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD8a PE-Cy7, Klon 53-6.7	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus CD8a PerCp-Cy5.5, Klon 53-6.7	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus EEA1 FITC, Klon 3C10	MBL, Woburn
Anti-Maus F4/80 FITC, Klon BM8	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus F4/80 PerCP-Cy5.5, Klon BM8	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus gdTCR PE, Klon eBioGL3	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus Lamp2 FITC, Klon ABL-93	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus Ly6C PE, Klon HK1.4	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus Ly6G APC-Cy7, Klon RB6-8C5	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus MHC II eFluor450, Klon M5/114.15.2	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus NK1.1 APC, Klon PK136	eBioscience, Frankfurt
Anti-Maus Rab7 FITC, polyclonal	Biorbyt, San Francisco

### 6.5.2. Sekundärantikörper

F(ab') <sub>2</sub> Anti-Kaninchen IgG, FITC	Biorbyt, San Francisco
Ratte Anti-Maus IgG2a Heavy Chain, FITC	MBL, Woburn

Ziege Anti-Ratte Ig, FITC

BD Pharmingen, Heidelberg

### 6.5.3. Isotypen

Armenischer Hamster IgG APC, Klon eBio299AM

eBioscience, Frankfurt

Armenischer Hamster IgG PE, polyclonal

eBioscience, Frankfurt

Armenischer Hamster IgG1 FITC, Klon HTK888

BD Pharmingen, Heidelberg

Ratte IgG1 APC, Klon eBRG

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG1 PE, Klon eBRG1

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG2a APC, Klon eBR2a

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG2a FITC, Klon eBR2a

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG2a PE-Cy7, Klon eBR2a

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG2a PerCp-Cy5.5, Klon eBR2a

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG2b APC-Cy7, Klon RTK4530

BD Pharmingen, Heidelberg

Ratte IgG2b APC, Klon eB149/10H5

eBioscience, Frankfurt

Ratte IgG2b eFluor 450, Klon M5/114.15.2

Biolegend, San Diego

Ratte IgG2b FITC, Klon RTK4530

BD Pharmingen, Heidelberg

Ratte IgG2b PE, Klon RTK4530

BD Pharmingen, Heidelberg

Syrischer Hamster IgG APC, Klon eBio299

eBioscience, Frankfurt

Syrischer Hamster IgG eFluor 450

eBioscience, Frankfurt

### 6.6. Verwendete Kits

LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit

Invitrogen, Karlsruhe

Fixation/Permeabilization Set

eBioscience, Frankfurt

### 6.7. Puffer und Verbrauchslösungen

Bindungspuffer Beads

1% (w/v) biotinfreies BSA

in PBS

Calcein AM

100mM

in DMSO

FACS Puffer

2% (v/v) FCS

0,01% (v/v) Natriumazid 10%ig

in PBS

pH 7,3

Ficoll-Lösung, 20%ig	20% (w/v) Ficoll in Aqua dest.
Ficoll-Lösung, 10%ig	20%iges Ficoll in DMEM im Verhältnis 1:1
HEPES	1 M HEPES pH 7,4 in sterilem PBS
Kollagenase-Medium	100 U/ml / 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin 0,1% (w/v) Kollagenase A in DMEM
Liberase-Medium	500 U/ml / 500 µg/ml Penicilin / Streptomycin 0,4 mg Liberase / ml in RPMI-1640
<i>Leishmania</i> -Medium	70% (v/v) Medium-199 (1x) 20% (v/v) FCS 4% (v/v) 1 M HEPES 2,8% (v/v) M199 (10x) 1% (v/v) 10 mM Adenin 100 U/ml / 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin 0,2% (v/v) Hemin, 0,25%ig
MΦ -Medium	DMEM 1% Penicillin/Streptomycin 10% FCS
Paraformaldehyd (PFA), 2%ig	4% (w/v) Paraformaldehyd, pH 7,2 1:1 in sterilem PBS
Permeabilisierungspuffer (1x)	Permeabilisierungspuffer (10X) In Aqua dest.
PBS/Glukose/EDTA-Puffer	0,2% (w/v) Glukose 2 mM EDTA in sterilem PBS pH 6,5
PBS (10x)	1,38 M NaCl 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS (1x; Gebrauchslösung)	10x PBS in Aqua bidest. Im Verhältnis 1:10 pH 7,3 autoklaviert

RPMI complete-Medium (RPMIc)	5% (v/v) FCS 100 U/ml / 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin 1% (v/v) 1 M HEPES 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren 0,1% (v/v) 50 mM β-Mercaptoethanol in RPMI-1640
Schneiders Medium	10% (v/v) FCS 2% (v/v) Urin (human) 2% (v/v) 200 mM L-Glutamin 100 U/ml / 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin 0,5% (v/v) 1 M HEPES in Schneiders Drosophila Medium

## 6.8. Reagenzien und Chemikalien

ACK-Lyse Puffer	BioWhittaker/Cambrex BioScience, Verviers, Belgien
Adenin (10mM)	Carl Roth, Karlsruhe
Annexin V Alexa Fluor 488 Konjugat	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Benzonase Nuclease, > 90%	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BrdU	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calcein AM	Invitrogen, Karlsruhe
CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
CFDA SE Cell Tracer Kit (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
Collagenase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-(+)Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Diff-Quick Stain Kit	Dade Behring, Düringen, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DiD	PromoCell, Heidelberg
Diphtherie Toxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol 70%ig (v/v), vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Clean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg

FACS Flow Sheath Fluid	BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Rinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg
Ficoll PM 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fixable Viability Stain 510	BD Pharmingen, Heidelberg
Fixierungspuffer (für intrazelluläres FACS)	eBioscience, Frankfurt
FixPerm-Kit	eBioscience, Frankfurt
Fluoromount G, with DAPI	eBioscience, Frankfurt
Forene (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden
Fötale Kälber Serum (FCS Gold Charg. A15110-0254)	GE Healthcare Life Sciences, München
Geneticin (G-418)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glukose (D-(+)-Glukose), p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Green-fluorescent Cytoplasmic Membrane Staining Kit	Promocell, Heidelberg
Helipur H plus N	B. Braun, Melsungen
Hemin (Chlorid) 98%	Carl Roth, Karlsruhe
Hemin, bovine 90%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES, Pufferan, ≥99,5%	Carl Roth, Karlsruhe
Hoechst 33342 (10mg/ml)	Promocell, Heidelberg
ic-Fixierungspuffer	eBioscience, Frankfurt
Immersionsöl	VWR International GmbH, Darmstadt
Kompensationsbeads OneComp eBeads	eBioscience, Frankfurt
L-Glutamin, 200 mM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Liberase TL	Roche Diagnostics, Mannheim
Lipopolysaccharid (Endkonz. 100 ng/mL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Liposomen	Clodronate Liposomes, Harlem
Live/Dead Fixable Yellow	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
M199 Medium (10x)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
M199 Medium (1x)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ), Lösung, 50 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat; (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O)	Carl Roth, Karlsruhe
Neuro DiO	PromoCell, Heidelberg
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10000 µg/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
Permeabilisierungspuffer 10x	eBioscience, Frankfurt
Phosphorsäure, 85%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Prolidye eFluor670	eBioscience, Frankfurt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rekombinantes humanes M-CSF (rh M-CSF; 50 ng/ml)	R&D Systems, Wiesbaden
rekombinantes murines GM-CSF (10 ng/µL in PBS)	PeproTech, Offenbach
rekombinantes murines IL-4 (10 ng/µL in PBS)	PeproTech, Offenbach
Roti-Block 10x	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Lonza, Basel, Schweiz
RPMI 1640 mit 2g/l NaHCO <sub>3</sub> , ohne L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schneiders Drosophila Medium	BioWhittaker/Cambrex Bioscience
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin APC, 0,2mg/ml	eBioscience, Frankfurt
Streptavidin eFluor 450, 0,2mg/ml	eBioscience, Frankfurt
Streptavidin PE, 0,5mg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg
Triethanolamin (TEA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Acetat	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan blau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α-D(+)-Glukose Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol, 50 mM	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol, 99% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe

## 6.9. Geräte

CO <sub>2</sub> -Inkubator	Memmert, Schwabach
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
Durchflusszytometer LSR II	BD Pharmingen, Heidelberg
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Flusssortierer FACSAria II	BD Pharmingen, Heidelberg
Handdispenser, Handy Step	VWR/Merck, Darmstadt
Magnetrührer IKA RCT classic	VWR/Merck, Darmstadt
Mehrkanalpipette, Biohit, 30-300 µL	Sartorius, Göttingen

Mehrkanalpipette, Biohit, 5-100 µL	Sartorius, Göttingen
Microplate Reader ELx808	BioTEK Instruments, Bad Friedrichshall
Mikroskop Dialux	Leitz, Wetzlar
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Neubauerzählkammer	VWR/Merck, Darmstadt
Pellet-Pestle	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
pH211 Mikroprozessor-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reagenzglasschüttler Reax Top	Heidolph Instruments, Schweiz
Schieblehre, digital, 150 mm	Rheinwerkzeuge, Mainz
Sterilbank HeraSafe	Thermo, Kendro Laboratories, Langenselbold
Varioklav, Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Waage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius, Göttingen
Waage MC1 LC2200P	Sartorius, Göttingen
Wasserbad TW2	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Fresco 17, Heraeus	Thermo, Kendro Laboratories, Langenselbold
Zentrifuge Multifuge 3 L-R, Heraeus	Thermo, Kendro Laboratories, Langenselbold
Zytospinzentrifuge Cellspin II	Tharma, Waldsolms

## 6.10. Verbrauchsmaterialien

Bottle-Top Filter, 0,2 µm	Biochrome, Berlin
Dispenser Tips, 0,5 mL	VWR/Merck, Darmstadt
Dispenser Tips, 12,5 mL	VWR/Merck, Darmstadt
Dispenser Tips, 25 mL	VWR/Merck, Darmstadt
Finntips 300, 5-300 µL	Thermo Lab, VWR Darmstadt
Handschuhe, Sempermed S	Apotheke, Universitätsmedizin
Kryoröhrchen, 1,8 mL	Sarstedt, Nürnberg
Leukosilk Gewebepflaster	Apotheke, Universitätsmedizin
MaxiSorp, Nunc-Immuno Platten, 96-well	Nunc, Brand, Wertheim
Microlance 3, Kanüle, 23G 1 1/4 - Nr. 4	BD Pharmingen, Heidelberg
Microlance 3, Kanüle, 26G 1/2	BD Pharmingen, Heidelberg
Parafilm M Laboratory Film	Pechiney Plastic, Chicago, (USA)
Petrischalen groß	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen klein	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen D200, Diamond, 2-200 µL	Gilson, Villiers de Bel, Frankreich
Pipettenspitzen, 0,1-10 µL	Carl Roth, Karlsruhe

Pipettenspitzen, 10-200 µL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 200-1000 µL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Polystyrene Reaktionsgefäße, Rundboden, 5 mL	BD Pharmingen, Heidelberg
Reaktionsgefäße, 0,5 mL	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße, 2,0 mL	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße, Protein low-bind tubes, 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipette, 10 mL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipette, 25 mL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Spritze Discardit II, 5 mL	BD Pharmingen, Heidelberg
Spritze Discardit II, 10 mL	BD Pharmingen, Heidelberg
Spritze Discardit II, 20 mL	BD Pharmingen, Heidelberg
Spritze Injekt, 2 mL	B. Braun, Melsungen
Spritze Injekt-F Tuberkulin, 0,01-1 mL	B. Braun, Melsungen
Spritze Omnican F 30G, 0,01-1 mL	B. Braun, Melsungen
Ständer für Reaktionsgefäße	VWR/Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen plus Filter, 75 cm <sup>2</sup>	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen ohne Filter, 25 cm <sup>2</sup>	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen mit Filter, 25 cm <sup>2</sup>	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 24-well, Flachboden	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 6-well, Flachboden	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 96-well, Flachboden	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 96-well, Rundboden	BD Pharmingen, Heidelberg
Zellkulturplatte, 96-well, Rundboden	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellsiebe, 70 µm Filter	BD Pharmingen, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen

## 7. Experimentelle Methoden

### 7.1. Allgemeine Versuchsbedingungen und Techniken

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Versuche unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die angesetzten Puffer und Medien wurden mit Hilfe von Filtern, mit einer Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert, und bei 4 °C gelagert. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte grundsätzlich bei 200 g für 8 min mit einer Temperatur von 4 °C. Für *L. major* beider Lebensformen wurde hingegen eine Geschwindigkeit von 3.000 g verwendet.

#### 7.1.1. Bestimmung der Lebendzellzahl

Unter Verwendung einer Neubauerzählkammer (100 µm Tiefe und 0,0025 mm<sup>2</sup> Fläche pro Kleinstquadrat) wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Hierfür wurde das Zellelett im gewünschten Volumen aufgenommen und entsprechend der erwarteten Zellzahl 1:10 oder 1:100 mit einer Trypanblaulösung verdünnt. Zur Bestimmung der Zellzahl von Promastigoten wurden diese zur Immobilisierung in 2 % PFA in PBS verdünnt. Durch Auszählung der nicht gefärbten Zellen wurde die Lebendzellzahl über folgende Formel berechnet:

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

### 7.2. Arbeiten mit Zelllinien und primären Zellen

#### 7.2.1. Kultur und Generierung

##### 7.2.1.1. Kultivierung von J774A.1

Als Modellsystem für die Prozesse in murinen MΦ können die J774A.1 verwendet werden, eine murine MΦ bzw. MO Linie die bereits im Jahre 1968 das erste Mal beschrieben wurde (Ralph et al., 1976) und phänotypische und morphologische Charakteristika von MΦ aufweist. Ursächlich durch den genetischen Hintergrund ist anzunehmen, dass diese die Reaktionen in suszeptiblen BALB/c MΦ widerspiegeln. Aufgrund der frühen ersten Beschreibung dieser Zellen und der Expression der Phagozytose relevanter Rezeptoren ist diese Linie eine der am häufigsten genutzten Modellsysteme für die Untersuchung der Prozesse in murinen MΦ.

Die semiadhärenten J774A.1 wurden je nach Zellzahl in 25 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Erreichen des konfluenten Monolayers wurde das verbrauchte MΦ Medium entfernt und die Zellen mittels Zellspatel in 4 ml frischem Medium vom Boden gelöst. Je nach Bedarf wurden die Zellen gleichmäßig in jeweils

10 ml Medium auf zwei oder drei Flaschen verteilt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Erhaltungskultur erfolgte das Passagieren der Zellen zwei bis dreimal wöchentlich.

#### **7.2.1.2. Kultivierung von SP37A3**

Die SP37A3 Zellen hingegen sind eine DC ähnliche Zelllinie, die erstmals im Jahr 2007 beschrieben wurde (Bros et al., 2007). Im Gegensatz zu den J774A.1 basieren diese auf dem resistenten C57BL/6 Hintergrund und sind durch die DC spezifische Ausreifung in Antwort auf stimulatorische Reize gekennzeichnet die sich unter anderem im Verlust der Adhärenz bemerkbar macht.

Die unreifen SP37A3 wachsen adhärent am Flaschenboden, zur Erhaltung des inaktiven Zustands wurde dem Grundmedium (RPMIc) in der Erhaltungskultur 0,5 ng/ml GM-CSF haltiger Überstand eines X63 Klons und als Wachstumsfaktor 50 ng/ml rh M-CSF zugesetzt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich erneuert. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. In der Erhaltungskultur wurden die Zellen einmal wöchentlich passagiert, um die Zahl reifer, im Überstand vorliegender Zellen zu reduzieren. Hierfür wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen für 2 min bei 37 °C mit warmen PBS mit 2 mM EDTA inkubiert. Die gelösten Zellen wurden mit RPMIc gewaschen, die Zellzahl bestimmt und in 10 ml für eine 75 cm<sup>2</sup>, bzw. 5 ml Kulturmedium für eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät.

#### **7.2.1.3. Kryokonservierung von Zelllinien**

Für die dauerhafte Konservierung der J774A.1 wurden diese in einer Konzentration von 2-4x10<sup>6</sup> Zellen pro ml im jeweiligen Kulturmedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit DMSO in einer Endkonzentration von 5 % für die J774A.1 und 7,5 % für die SP37A3 versetzt und in einem Kryoeinfriergerät auf -80 °C gekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

#### **7.2.1.4. Auftauen von Zelllinien**

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in 50 ml des jeweiligen Kulturmediums überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml kaltem Kulturmedium gewaschen und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Für die SP37A3 erfolgte dreimal ein Wechsel des Mediums im Abstand von zwei Stunden

### 7.2.1.5. Isolation primärer M $\Phi$ aus induzierten kutanen Granulomen

C57BL/6 Mäusen wurden subkutan 1-2 ml nicht phagozytierbares Biogel, ein Polyacrylamid Gel, in den Nacken appliziert. Dieser unspezifische Entzündungsreiz rekrutiert angeborene Immunzellen an den Entzündungsort. Nach 3-5 Tagen weist das Entzündungsinfiltrat die höchste Anzahl an M $\Phi$  auf. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Biogel geerntet. Hierfür wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und die Injektionsstelle mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und die Haut eröffnet. Das Biogel wurde mit einer 10 ml Messpipette entnommen und in steriles PBS überführt. Die Trennung von Zellen und Biogel erfolgte durch die Verwendung eines 70  $\mu$ m Zellsiebes. Durch 3-4 stündige Adhärenz an einer Plastikpetrieschale bei 37 °C in 10 ml M $\Phi$  Medium in einer Konzentration von 15-20x10<sup>6</sup> Zellen pro ml wurden die M $\Phi$  von den anderen Immunzellen getrennt. Nach Entfernung der Überstände wurden die adhärennten Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit einer kalten PBS/Glukose Lösung durch 30-minütige Inkubation auf Eis von der Schale gelöst. Anschließend wurde die Schale zweimal mit PBS gespült und mit der Zellsuspension vereinigt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellzahl bestimmt.

### 7.2.1.6. Generierung von BMDC aus C57BL/6 Knochenmark

Die C57BL/6 Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> euthanasiert, anschließend wurden die Hinterläufe mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und Femur und Tibia entnommen. Die Knochen wurden sorgfältig vom umliegenden Gewebe befreit und desinfiziert. In einer 10 cm Petrieschale wurden 10 ml einer 1:1 Mischung aus PBS und RPMIc vorgelegt und das Knochenmark mit Hilfe einer 5 ml Spritze mit Kanüle aus den Knochen gespült. Die Zellen wurden sorgfältig resuspendiert und über ein 70  $\mu$ m Zellsieb in ein Falcon überführt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und für 3 min im Verhältnis 1:1 mit ACK Puffer zur Lyse der Erythrozyten versetzt. Die Reaktion wurde mit 20 ml PBS gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Zellzahl bestimmt und 4x10<sup>7</sup> Zellen in 20 ml RPMI in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Die Differenzierung zu unreifen DC wurde durch die Zugabe von rm GM-CSF (10 ng/ml) und rm IL-4 (10 ng/ml) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erreicht. Nach zwei Tagen wurde das Medium der adhärennten Zellen abgenommen und durch 15 ml RPMIc mit rm GM-CSF und rm IL-4 ersetzt. Am vierten Tag nach Isolation wurden weitere 5 ml RPMIc mit Differenzierungsfaktoren zu den mittlerweile in Suspension vorliegenden Zellen gegeben. Sechs Tage nach Isolation wurden die differenzierten BMDC aus der Flasche entnommen und gewaschen. Anschließend

wurde die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Konzentration in RPMIc eingestellt.

## **7.2.2. *In vitro* Techniken**

### **7.2.2.1. Fixierung von Zellen**

Fixierungen dienen grundsätzlich der Stabilisierung zellulärer Strukturen und damit der Konservierung. Zudem bieten diese den Vorteil, dass in nachfolgenden Verarbeitungsschritten eine mögliche Veränderung der PV oder der Zellen durch zellulären Stress verhindert wird, da Fixative zytotoxisch sind. Bei chemischen Fixativen werden zwei zu Grunde liegende Prinzipien unterschieden, die Denaturierung oder Quervernetzung in der Probe enthaltener Proteine. Alkoholische Reagenzien wie Methanol oder Ethanol führen zur Koagulation durch Wasserverdrängung, wobei Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden und die Tertiärstruktur von Proteinen zerstört wird. Im Gegensatz zu dieser Denaturierung stellen Fixative wie Paraformaldehyd (PFA), die direkt an Proteine binden und diese dadurch quervernetzen eine schonendere Form der Fixierung dar. Die Sekundärstruktur bleibt hierbei weitestgehend erhalten. (Lang, 2017)

Um die nachfolgende massenspektrometrische Analyse des Proteoms der isolierten PV nicht zu gefährden wurde PFA als Fixativ eingesetzt. Zur Bestimmung der minimal optimalen Konzentration an PFA in neutral gepufferter Lösung (PBS) zu bestimmen wurden J774A.1 mit CTV markierten Promastigoten für 18 h in einem 1:5 Verhältnis infiziert. Nach der Zellernte und zwei Waschschritten wurden die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen PFA (0,5; 1; und 2 %) für 20 min bei 4 °C fixiert. Nach der Lyse mit dem GentleMACS wurde die Integrität der PV Membran durch Immunmarkierung von Lamp2 im Durchflusszytometer detektiert.

### **7.2.2.2. Extrazelluläre Immunmarkierung**

Für die Markierung spezifischer Moleküle auf der Zelloberfläche, wurden zwischen  $10^7$  und  $10^5$  Zellen in einer 96 Well Rundbodenplatte vorgelegt und mit geeigneter Geschwindigkeit für 5 min pelettiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch 5-minütige Inkubation mit 10 µl FcγR-Blockierungsantikörper (Fc Block; 10 µg/ml FACS- Puffer) bei 4 °C im Dunkeln blockiert. Anschließend wurden 10 µl der jeweiligen Fluorochrom konjugierten Antikörper zu den Zellen gegeben und für 20 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Die ungebundenen Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit 300 µl PBS entfernt und die Zellen anschließend in 1 %iger PFA Lösung für 20 min bei 4 °C fixiert. Die Messung erfolgte in einem Volumen von

100 µl am BD LSRII.

### **7.2.2.3. Intrazelluläre Immunmarkierung**

Für die Färbung der PV Membran in intakten Zellen mussten diese zunächst permeabilisiert werden um die intrazellulären Moleküle für die Fluorochrom konjugierten Antikörper zugänglich zu machen. Hierfür wurden die  $10^5$  bis  $10^7$  Zellen in eine 96 Well Rundbodenplatte gegeben und durch zwei Waschschrte in Permeabilisierungspuffer gewaschen, bei 450 g für 5 min. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen und mit 100 µl 2 %igem PFA in PBS versetzt. Nach der 20-minütigen Fixierung wurden das Fixativ durch zwei weitere Waschschrte entfernt und die unspezifischen Bindungsstellen mit 10 µl Blockierungspuffer (10 µg/ml Fc Block und Roti-Block 1:10 in Permeabilisierungspuffer) blockiert. Die spezifische Färbung erfolgte durch Zugabe von 10µl des Antikörpers und 20-minütige Inkubation im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Für den Nachweis von Lamp2, EEA1 und Rab7 wurde die Signalintensität zudem durch Fluorochrom gekoppelte Sekundärantikörper verstärkt. Diese erfolgte analog der beschriebenen Vorgehensweise bei identischer Verdünnung von Primär und Sekundärantikörper. Letztlich wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und am BD LSRII analysiert.

### **7.2.2.4. Fluoreszenzmarkierung der Zellmembran**

Vor der Inkubation mit *L. major* bzw. Beads für die Phagosomenisolation wurde die Zellmembran der J774A.1 und SP37A3 mit dem lipophilen grün fluoreszierenden Carbocyanin Farbstoff NeuroDiO markiert. Als lipophiles Carbocyanin ist dieses in der Lage sich in biologische Membranen einzulagern ohne die physiologischen Funktionen der Zelle zu verändern, zudem zeichnet sich diese Färbung durch eine lange Wiederfindung aus. Dadurch erfolgte die indirekte Markierung der PV Membran für die sich anschließende Fluoreszenz Aktivierte Zell Sortierung. Hierzu wurden die Zellen in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen je ml im entsprechenden Medium aufgenommen. Nach der Zugabe von 5 µl des Farbstoffes wurden die Zellen für 20 min bei 37 °C inkubiert und zweimal mit Medium gewaschen.

### **7.2.2.5. Durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität**

Für die durchflusszytometrische Diskriminierung zwischen toten und lebenden Promastigoten wurden diese aus der Kultur entnommen und durch zweimalige

Zentrifugation bei 200 g für 8 min von unerwünschten Bestandteilen (Debris) getrennt. Anschließend wurde eine Konzentration von  $10 \times 10^6$  Promastigoten je ml in PBS eingestellt und von dieser Lösung jeweils 100  $\mu$ l in eine 96 Well Rundbodenplatte überführt. Nach der Zugabe von 5  $\mu$ l des Annexin V AF 488 Konjugat, bzw. 1  $\mu$ l Life/Dead Yellow erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei RT im Dunkeln. Der ungebundene Farbstoff wurde durch zwei Waschschriffe mit PBS entfernt. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung wurde eine weitere Probe der Promastigotenkultur mit Propidiumiodid (PI) (1  $\mu$ g/ml) versetzt. Der prozentuale Anteil toter Zellen einer Zellpopulation lässt sich mit Hilfe der verwendeten Farbstoffe ermitteln, die die perforierte Membran nekrotischer Zellen durchdringen und in die, im Falle von Annexin V und PI, in die DNA interkalieren.

### **7.3. Ex vivo Arbeiten mit murinem Gewebe**

#### **7.3.1. Isolation von intradermalen Zellen**

Nach der Infektion mit metazyklischen Promastigoten wurden die Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten mittels CO<sub>2</sub> getötet, die Ohren desinfiziert und abgetrennt. In einer 6-well Zellkulturplatte wurde je Well 1,5 ml Liberase Medium vorgelegt. Die beiden Hautschichten wurden in Höhe des Knorpels voneinander getrennt und mit der Dermis nach unten auf das vorgelegte Medium gelegt. Nach 2 stündigem enzymatischen Verdau bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Gewebe in ein Gentle MACS M-Tube mit 1 ml RPMI überführt. Nach der Dissoziation des Gewebes (siehe 7.4.1.3) wurde die Zellsuspension und das verbliebene Medium aus der 6-well Platte über ein 70  $\mu$ m Zellsieb gegeben und die Zellen pelettiert.

#### **7.3.2. Isolation von Zellen der peritonealen Kavität**

Nach der Euthanasie der infizierten Mäuse zu den indizierten Zeitpunkten durch CO<sub>2</sub>, wurde die Haut über der Bauchdecke entfernt und mittels einer Spritze mit Kanüle 2-3 ml kaltes PBS in die Bauchhöhle appliziert. Nach Massage der Bauchhöhle wurde das PBS mit den darin enthaltenen Zellen mit einer Spritze mit Kanüle entnommen, pelettiert und die Zellzahl bestimmt.

#### **7.3.3. Isolation von Zellen lymphatischer Organe**

Nach der Euthanasie der infizierten Mäuse zu den indizierten Zeitpunkten durch CO<sub>2</sub>, wurde die desinfizierte Haut entfernt. Die Entfernung der drainierenden, in die-

sem Falle submandibulären Lymphknoten, der Milz und Lunge erfolgte mittels sterilisiertem Präparationsbesteck. Die entnommenen Organe wurden anschließend in PBS überführt. Die Zellen wurde mit einem Spritzenstempel in einem 70 µm Zellsieb aus dem Gewebeverband gelöst und das Sieb zweimal mit 5 ml kaltem PBS gespült. Anschließend wurden die isolierten Zellen zentrifugiert und quantifiziert.

#### **7.3.4. Isolation von Blutzellen**

Für die Kontrolle der Auswirkung verschiedener Behandlungen auf die zellulären Frequenzen im Blut, wurde den Mäusen zu den indizierten Zeitpunkten Blut entnommen. Hierzu wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und die Mandibularvene im venösen Wangengeflecht mittels Blutlanzette punktiert. Das austretende Blut wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen, in dem zuvor 50 µl einer 1,8 mg/ml EDTA in PBS Lösung vorgelegt wurde. Nach der Blutentnahme wurde die Probe durch Invertieren gemischt, um die Koagulation zu verhindern. Durch Zugabe von 500 µl PBS und 500 µl ACK-Lyse Puffer wurden, innerhalb einer 3-minütigen Inkubation bei RT, die Erythrozyten lysiert. Nach Zentrifugation wurde die Lyse wiederholt. Die Proben wurden bis zur Immunmarkierung für die Durchflusszytometrie bei 4°C gelagert.

#### **7.3.5. Gewinnung von murinem Serum**

Zur Gewinnung des Serums nicht infizierter BALB/c Mäuse (Normalserum, NMS) wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet. Das Herz wurde freigelegt und das Blut mit einer 1 ml Spritze zügig entnommen. Anschließend wurde das Blut für 30 bis 60 min bei RT koaguliert. Die Abtrennung koagulierter Erythrozyten erfolgte durch zweimalige Zentrifugation für 30 min bei 800 g. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **7.3.6. Bestimmung der Parasitenzahl in Ohr und Milz**

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Behandlungen auf die Parasitenzahlen infizierter Tiere am Infektionsort und auf das Ausmaß der Viszeralisierung zu beurteilen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Infektion die Anzahl an *Leishmanien* in der Haut und der Milz bestimmt. Die Haut von mittels CO<sub>2</sub> euthanasierten Tieren wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Ohren und Milz mit sterilisiertem Präparationsbesteck entnommen. Die Hautschichten der Ohren wurden im Bereich des Knorpels getrennt und mit der dermalen Seite nach unten in 1,5

ml Kollagenase Medium gelegt. Der Gewebeverband wurde für 2 h bei 37 °C enzymatisch verdaut und anschließend die beiden Ohrhälften in ein GentleMACS M-Tube mit 1 ml RPMIc überführt. Nach mechanischer Zerkleinerung des Gewebes (siehe 7.4.1.3) wurde die Suspension und das in der 6-well Platte verbliebene Medium über ein 70 µm Zellsieb in ein Falcon überführt. Nach 8-minütiger Zentrifugation bei 200 g zur Abtrennung nicht lysierter Zellen wurden die im Überstand verbliebenen *Leishmanien* bei 3.000 g pelettiert. Nach Resuspension in 1 ml Schneiders Medium wurden 100 µl dieser Suspension in einer 1:1 Verdünnungsreihe vereinzelt. Hierfür wurde in einer 96 Well Zellkulturplatte je Well 100 µl Schneiders Medium vorgelegt und die erhaltene Parasitensuspension jeweils im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Der Gewebsverband der Milzen wurde mechanisch durch ein Zellsieb (siehe 7.3.3) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 2,5 ml PBS aufgenommen und 500 µl dieser Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 60 sekündige Behandlung der Zellen mit einem motorbetriebenen Pelett Pestler. Anschließend wurden die frei gewordenen *Leishmanien* bei 3.000 g für 8 min pelettiert und in 100 µl Schneiders Medium gelöst. Diese Suspension wurde in das erste Well gegeben und wie oben beschrieben verdünnt.

Nach der Umwandlung von der amastigoten in die promastigote Lebensform durch eine Inkubation der Platten bei 27°C unter Ausschluss von Sauerstoff für 6-9 Tage, wurde mikroskopisch das Well mit der letzten lebenden *Leishmanie* bestimmt. Unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungsfaktoren für Ohr und Milz wurde die Gesamtzahl der Parasiten im Gewebe berechnet.

## **7.4. Arbeiten mit *L. major***

### **7.4.1. Kultur und Präparation**

#### **7.4.1.1. Suspensionskultivierung von Promastigoten**

Die *L. major* Promastigoten wurden in *Leishmanien* Medium in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen unter anaeroben Bedingungen bei 27 °C kultiviert. Zur Erhaltung der exponentiellen Vermehrungsphase wurden die Promastigoten alle zwei Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Für die Generierung einer neuen Promastigotenkultur wurden 10-20x10<sup>6</sup> frisch isolierte läsionale Amastigote aus Ohren infizierter Mäuse (siehe 7.4.1.3) in 5 ml *Leishmanien* Medium überführt. Nach 2-3 Passagen mit einer 1:3 bzw. 1:5 Verdünnung erfolgte die weitere Kultur unter den genannten Bedingungen.

#### 7.4.1.2. Isolation von metazyklischen Promastigoten

Für die *in vivo* und *in vitro* Infektion wurden Promastigote im infektiösen metazyklischen Stadium verwendet. Deren Anteil in der Flüssigkultur nach 6 bis 9 Tagen Kulturdauer am höchsten ist. 10 ml der entsprechenden Kultur wurden 1:1 mit DMEM versetzt und zweimal für 8 min bei 200 g zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Promastigoten wurden für 8 min bei 3.000 g pelletiert und in 2 ml DMEM resuspendiert und anschließend auf einen zweiphasigen Gradienten aus jeweils 2 ml 10 und 20 %igem Ficoll geschichtet. (Belkaid et al., 1998) Die metazyklischen Promastigoten reichern sich nach 15-minütiger Zentrifugation bei 2.000 g und RT ohne Bremse in der obersten und 2/3 der zweiten Phase an. Nach zwei weiteren Waschschritten dieser beiden Phasen bei 3.000 g wurde die Lebendzellzahl der langen, schlanken Promastigoten in 4 %igem PFA bestimmt.

#### 7.4.1.3. Isolation von läSIONALen Amastigoten

Zur Gewinnung der obligat intrazellulären Form von *L. major* wurden BALB/c Mäuse mit  $2 \times 10^5$  metazyklischen Promastigoten in beide Ohren i.d. infiziert. Nach 4-6 Wochen wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> euthanasiert, die Ohren desinfiziert und an der Basis abgetrennt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Gewebe in PBS/Glukose/EDTA-Puffer gelagert. Mittels zweier Pinzetten wurden die beiden Hautschichten unterhalb der Dermis geteilt und in ein GentleMACS C-Tube mit 5 ml Puffer überführt. Die Dissoziation des Gewebes und Lyse der Amastigoten enthaltenden Zellen erfolgte im GentleMACS OctoDissociator mit folgendem Rotationen:

Start: 700 rpm für 5 s, -200 rpm für 1 s  
3x Zyklus: 900 rpm für 5 s, -900 rpm für 1 s, 200 rpm für 5 s, -600 rpm für 1 s  
2x Zyklus: 1.800 rpm für 5 s, -600 rpm für 1s, 2.200 rpm für 5 s, -800 rpm für 1 s  
Ende: 2.400 rpm für 5 s, -1.000 rpm für 1 s, 2.000 rpm für 5 s

Die Parasitensuspension wurde über ein 70 µm Zellsieb in ein Falcon überführt und dass Tube mit 5 ml Puffer gespült. Nach zweimaligem Waschen mit DMEM wurde die Anzahl der Amastigoten in Trypanblau bestimmt.

### 7.4.2. *In vitro* Techniken

#### 7.4.2.1. Parasitenopsonisierung

Um die Infektionsrate bei der *in vitro* Infektion von Phagozyten zu steigern, wurden

Promastigote und Amastigote mit NMS opsonisiert. Die enthaltenen Immunglobuline und Komplementfaktoren binden hierbei an die Parasitenmembran und ermöglichen dadurch die Rezeptor vermittelte Phagozytose über den CR3 und Fc $\gamma$ R. Hierzu wurden die isolierten Parasiten in 1 ml DMEM aufgenommen, mit 5 % (v/v) NMS versetzt und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Parasiten zweimal mit DMEM gewaschen und bis zur Verwendung innerhalb von einer Stunde nach Opsonisierung bei 4 °C gelagert.

#### 7.4.2.2. Fluoreszenzmarkierung mit Proliferationsfarbstoffen

Zum Nachweis der intrazellulären Transformation und Replikation bzw. der durchflusszytometrischen Analyse wurden die beiden *L. major* Lebensformen mit verschiedenen fluoreszierenden Proliferationsfarbstoffen markiert. Die Färbung erfolgte jeweils vor der Opsonisierung in warmem PBS. Für die Färbung wurden  $100 \times 10^6$  Parasiten pro ml vorgelegt und die folgenden Molaritäten der Farbstoffe hinzugegeben:

CTV und CTFR	5 $\mu$ M
CFSE	1 $\mu$ M
Prolidye eFluor670	10 $\mu$ M

Die Lösungen wurden für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, anschließend wurde die Reaktion mit M $\Phi$  Medium unterbrochen. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min bei RT wurden die Parasiten zweimal mit PBS gewaschen.

#### 7.4.2.3. Fluoreszenzmarkierung der Membran

Für die Phagosomenisolation wurde die Membran der Amastigoten mit dem lipophilen rot fluoreszierenden Carbocyanin Farbstoff DiD markiert. Hierzu wurden diese in einer Konzentration von  $100 \times 10^6$  Zellen je ml in DMEM aufgenommen. Nach der Zugabe von 10  $\mu$ l je ml Parasitenlösung des Farbstoffes wurden die Parasiten für 30 min bei 37 °C inkubiert und zweimal für 8 min bei 3.000 g mit Medium gewaschen.

#### 7.4.2.4. Durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität

Für die durchflusszytometrische Diskriminierung von toten Promastigoten wurden diese aus der Kultur entnommen und durch zweimalige Zentrifugation bei 200 g für 8 min von unerwünschten Bestandteilen (Debris) getrennt. Anschließend wurde eine Konzentration von  $10 \times 10^6$  Promastigoten je ml in PBS eingestellt und von die-

ser Lösung jeweils 100 µl in eine 96 Well Rundbodenplatte überführt. Nach der Zugabe von 5 µl des Annexin V AF 488 Konjugat, bzw. 1 µl Life/Dead Yellow erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei RT im Dunkeln. Der ungebundene Farbstoff wurde durch zwei Waschschriffe mit PBS entfernt. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung wurde eine weitere Probe der Promastigotenkultur mit Propidiumiodid (PI) (1 µg/ml) versetzt. Der prozentuale Anteil toter Zellen einer Zellpopulation lässt sich mit Hilfe der verwendeten Farbstoffe ermitteln, die die perforierte Membran nekrotischer Zellen durchdringen und in die, im Falle von Annexin V und PI, in die DNA interkalieren.

#### **7.4.2.5. Calcein AM Färbung**

Die Bestimmung des prozentualen Anteils lebender *L. major* bei den beiden Lebensformen erfolgte über den Umsatz von Calcein AM. Hierfür wurden die Parasiten in einem Volumen von 45 µl PBS in einer 96 well Rundbodenplatte aufgenommen und mit 5 µl einer 100 mM Calcein AM Lösung versetzt. Die Färbung erfolgte im Dunkeln bei RT für 30 min. Anschließend wurden die Parasiten zweimal mit PBS gewaschen und die Färbung für 20 min mit 1 % PFA in PBS bei RT fixiert. Nach einem erneuten Waschschriff wurden die Parasiten in 100 µl PBS am BD LSRII analysiert.

#### **7.4.2.6. Simultane Hoechst und Calcein AM Färbung**

Zum gleichzeitigen Nachweis von DNA und der Vitalität von *L. major* wurde die Parasiten oder das gewonnen Zelllysat in einem Volumen von 45 µl PBS aufgenommen und in eine 96 Well Rundbodenplatte überführt. Zu diesen wurden 5 µl einer 100 mM Calcein AM Lösung zum Erreichen der Färbekonzentration von 10 µM hinzugegeben und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 50 µl einer 10 mg/ml Hoechst Lösung hinzugefügt und für weitere 20 min unter den genannten Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene Substrat durch zweimaliges Waschen bei 3.000 g mit PBS entfernt. Durch 20 min Inkubation mit 1 % PFA in PBS wurden die Parasiten fixiert und erneut gewaschen. Die Detektion der Färbung erfolgte in einem Volumen von 100 µl am BD LSRII.

#### **7.4.2.7. BrdU Inkooperationsassay**

Zur Bestimmung des Anteils an replizierenden und vitalen Parasiten wurden metazyklische Promastigote und läSIONALE Amastigote gewonnen und mit CTFR mar-

kiert (siehe 7.4.2.2). Anschließend wurden  $10 \times 10^6$  Promastigote bzw.  $20 \times 10^6$  Amastigote in einem Volumen von 10 ml *Leishmanien* Medium jeweils mit und ohne Zugabe von 0,1 mM BrdU in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gegeben und unter Ausschluss von Sauerstoff für 18 h, 4 d und 6 d inkubiert. Die Parasiten wurden nach der Inkubation zweimal mit PBS bei 3.000 g für 8 min gewaschen und mit Calcein AM und Hoechst unter den angegebenen Bedingungen (siehe 7.4.2.6) gefärbt.

## 7.5. Fluoreszenzmarkierung von Beads

Die Biotin-konjugierten Polystyrene Beads wurden für die durchflusszytometrischen Analysen mit verschiedenen Streptavidin gekoppelten Fluorochromen markiert. Zur Berechnung der Konzentration an Beads pro ml wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Beads}/\text{ml} = \frac{6 \times W \times 10^{12}}{\rho \times \pi \times \varphi^3}$$

$$\varphi = \text{Durchmesser in } \mu\text{m}$$

$$W = \text{Gramm Polymer pro ml}$$

$$\rho = \text{Dichte des Polymers in g pro ml, } 1,05 \text{ g/ml für Polystyren}$$

$$\text{Beads}/\text{ml} = \frac{6 \times 0,0125 \text{ g} \times 10^{12}}{1,05 \text{ g/ml} \times \pi \times (2 \mu\text{m})^3} = 2842 \times 10^6 \text{ Beads}/\text{ml}$$

Die gewünschte Zahl an Beads wurde entnommen, in 1 ml Bindungspuffer gegeben und zweimal mit 1 ml Bindungspuffer für 5 min bei 10.000 g gewaschen. Anschließend wurde das entsprechende Volumen für 2,7 µg des Streptavidin Fluorochrom Konjugates je  $10^6$  Beads hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die Beads zweimal unter den genannten Bedingungen mit Bindungspuffer gewaschen.

## 7.6. Koinkubation von Zelllinien und primären Zellen

### 7.6.1. *In vitro* Infektion von Zellen mit *L. major*

Für die *in vitro* Infektion von J774A.1 und SP37A3 und von Biogel MΦ und BMDC mit den verschiedenen *L. major* Lebensformen wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml verdünnt. Die Koinkubation mit *L. major* erfolgte in unbeschichteten Petrischalen. Für eine 5 cm Petrischale wurden 5 ml bzw. für eine 10 cm Schale 10 ml der entsprechenden Zellsuspension vorgelegt. Die verschiedenen opsonisierten Lebensformen wurden in einem 1:5 oder 1:10 Verhältnis zu den Zellen gegeben. Bei der Infektion von SP37A3

wurde RPMIc mit M-CSF ohne Zugabe von GM-CSF verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für die jeweils angegebenen Zeiten. Anschließend wurden die Zellen gemäß den Angaben zu den Kulturbedingungen (siehe 7.2.1.1, 7.2.1.2) aus den Schalen geerntet. Nicht phagozytierte *Leishmanien* wurden durch zweimaliges Waschen der Zellen mit kaltem PBS entfernt und die Zellsuspensionen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### **7.6.2. In vitro Koinkubation von Zellen mit Beads**

Analog zur Infektion mit *L. major* (siehe 7.6.1) wurden die Zellen in unbeschichteten Petrischalen vorgelegt. Für die Verhältnisse von Zellen zu Beads von 1:5 oder 1:10 wurde das jeweilige Volumen an Fluorochrom markierten Beads berechnet (siehe 7.5) und zu den Zellen pipettiert. Nach der Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zu den gewünschten Zeitpunkten wurden die Zelllinien und primären Zellen gemäß den Kulturbedingungen (siehe 7.2.1.1, 7.2.1.2) geerntet und durch zweimaliges Waschen mit PBS von freien Beads getrennt.

## **7.7. Arbeiten mit parasitären Vakuolen**

### **7.7.1. Lyse von Zellen mittels Kapillare**

J774A.1 wurden mit RFP exprimierenden metazyklischen Promastigoten im Verhältnis 1:5 über einen Zeitraum von 18 h inkubiert. Die geernteten, gewaschenen Zellen wurden durch Scherkräfte einer turbulenten Strömung innerhalb einer Kapillare lysiert. Hierzu wurden die Zellen in einer Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen je ml PBS aufgenommen und in eine 5 ml Spritze überführt. Diese wurde über einen Luer-Lock mit einer Kapillare mit einem Durchmesser von 0,3 mm und einer Länge von 10 cm verbunden. Nach Anschluss einer weiteren 5 ml Spritze am anderen Ende wurde die Zellsuspension bis zum Erreichen einer mikroskopisch kontrollierten Lyseeffizienz von 70-80 % durch die Kapillare bewegt. Die im Lysat erhaltene DNA wurde durch eine 5-minütige Inkubation mit 50.000 U Benzonase bei 37 °C verdaut. Das Enzym wurde durch zwei Waschriffe bei 3.000 g für 8 min in PBS aus dem Lysat entfernt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer zum einen durch eine FSC / SSC basierte Fokussierung auf den Anteil intakter Zellen und zum anderen wurde die Integrität der PV Membran durch Immunmarkierung von CD68 analysiert.

### 7.7.2. Lyse von Zellen mittels Pelett Pestler

Der Zellaufschluss infizierter J774A.1 (siehe 7.6.1) erfolgte durch 30 sekundige Behandlung der Zellen mit einem motorbetriebenen Pelett Pestler. Anschließend wurden die frei gewordenen *Leishmanien* bei 3.000 g für 8 min pelettiert und die gewonnenen PV (siehe 7.7.3) weiter behandelt.

### 7.7.3. Lyse von Zellen mit dem Gentle MACS OctoDissociator

Nach Koinkubation der verschiedenen Zellen mit *L. major* bzw. Beads wurden die gewaschenen Zellen lysiert um die intrazellulären PV zu gewinnen. Für die durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung der PV Membran und die Phagosomenisolation wurden die in PBS gelösten Zellen zunächst 1:1 mit einer 2 %igen PFA Lösung versetzt und für 20 min bei 4 °C fixiert und das Fixativ durch zweimaliges waschen mit PBS entfernt. Zur Bestimmung der lebenden Parasiten in den gewonnenen PV verblieben die Zellen vor der Lyse unfixiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml PBS aufgenommen und in ein Gentle MACS C-Tube überführt. Im GentleMACS OctoDissociator wurden das Zellysat gemäß folgendem Protokoll hergestellt:

4x Zyklus:            600 rpm für 5 s, 800 rpm für 1 s, 1100 rpm für 1 s, 1.300 rpm für 1 s, 1.600 rpm für 1 s, 1.800 rpm für 1 s, 2.100 rpm für 1 s, -1.800 rpm für 1 s, 2.100 rpm für 5 s, -1.800 rpm für 1 s, 2.100 rpm für 8 s, -1.800 rpm für 1 s, 2.100 rpm für 10 s, -1.800 rpm für 1 s, 2.100 rpm für 8 s

Durch einen 5-minütigen Nucleinsäure Verdau bei 37°C des Lysats mit 50.000 U Benzonase wurde das Anhaften der PV an die DNA verhindert. Das Enzym wurde durch zwei Waschrritte bei 3.000 g für 8 min in PBS aus dem Lysat entfernt.

### 7.7.4. Immunmarkierung der PV Membran

Für die Markierung spezifischer Moleküle der PV Membran im Zellysat wurden das Lysat von  $10^7$  bis  $10^5$  Zellen gemäß dem in 7.2.2.3 beschriebenen Protokoll behandelt.

### 7.7.5. Calcein AM Färbung

Die Bestimmung des prozentualen Anteils lebender *L. major* im Lysat infizierter Zellen erfolgte über den Umsatz von Calcein AM gemäß dem in 7.4.2.5 beschriebenen Protokoll.

### 7.7.6. Simultane Hoechst und Calcein AM Färbung

Der gleichzeitige Nachweis von DNA und der Vitalität von *L. major* im gewonnenen Zelllysat wurde gemäß dem in 7.4.2.6 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

### 7.7.7. BrdU Inkooperationsassay infizierter Zellen

J774A.1 wurden mit metazyklischen Promastigoten bzw. läSIONalen Amastigoten, welche zuvor mit CTFR markiert wurden (siehe 7.4.2.2) im Verhältnis 1:10 für 18h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und nicht phagozytierte Parasiten durch zwei WaschschrITte mit PBS entfernt. Ein Drittel der Zellen wurde mit dem GentleMACS wie beschrieben lysiert und das Lysat mit Hoechst und Calcein AM für die durchflusszytometrische Messung am BD LSRII markiert. Die verbliebenen Zellen wurden in MΦ Medium erneut ausgesät und mit bzw. ohne Zugabe von 0,1 mM BrdU für 4 und 6 d inkubiert. Die infizierten Zellen wurden zu den genannten Zeitpunkten aus der Kultur entnommen und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Gewinnung der frei in der Kultur vorliegenden Parasiten wurde alle erzeugten Überstände vereinigt und die Parasiten bei 3.000 g pelettiert. Die Aufarbeitung und Markierung des Lysat und der Überstände zu den verschiedenen Zeitpunkten erfolgte wie beschrieben.

### 7.7.8. Isolation von Phagosomen

Die Neuro-DiO gefärbten J774A.1 und SP37A3 wurden für 18 h mit DiD markierten Amastigoten bzw. ungefärbten Beads im Verhältnis 1:10 in 10 ml des jeweiligen Kulturmediums in einer großen Petrieschale inkubiert. Die SP37A3 wurden durch Zugabe von warmen PBS/EDTA für zwei Minuten bei 37 °C von Schalenboden gelöst, während die J774A.1 mittels Zellspatel geerntet wurden. Anhaftende Partikel wurden durch zwei WaschschrITte mit PBS entfernt und die Zellen durch Zugabe einer 1 %igen PFA Lösung für 20min fixiert. Nach einem erneuten WaschschrITt wurden die Zellen in PBS mit Proteaseinhibitor (Complete Mini) aufgenommen und die Lyse erfolgte mit dem GentleMACS. Das gewonnene Lysat wurde mit Benzonase behandelt und pelettiert. Die Konzentration der Lösung wurde mit Complete Mini in PBS am BD LSRII auf eine Eventzahl von 15.000 pro Sekunde bei hoher Flussrate eingestellt. Die Fluoreszenz aktivierte Separation der intakten PV erfolgte im BD FACS Aria in einer 100 µm Küvette. Zum einen durch eine FSC / SSC basierte Fokussierung auf die Größe von Amastigoten und Beads. Zum anderen wurden die, im Falle der Amastigoten, DiD und Neuro-DiO doppelt positiven Partikel,

sowie die Membran und damit Neuro-DiO positiven Beads selektioniert. Die isolierten Amastigoten bzw. Beads enthaltenden PV wurden anschließend in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 400 g für 10 min zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert

### **7.8. Massenspektrometrische Analyse isolierter PV**

Die isolierten PV wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Tenzer (Core Facility für Massenspektrometrie, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) massenspektrometrisch analysiert.

Die bereitgestellte TOP3 Quantifizierung der detektierten Proteine wurde zur weiteren Analyse verwendet. Zunächst wurden hierzu die Proteine selektioniert die in mindestens der Hälfte der Messwiederholungen nachgewiesen werden konnten. Anhand der identifizierten Spezies wurden die Proteine in Amastigoten spezifischen, humanen und murinen Ursprungs klassifiziert und die jeweiligen prozentualen Anteile an der Gesamtheit ermittelt. Für die vergleichende Analyse der Proteine in Amastigoten enthaltenden PV zwischen J774A.1 und SP37A.3 wurden diese zudem unterschieden in koinzidente und Zelltyp spezifische. Zur grafischen Darstellung dieser vergleichenden Analyse wurden die Venn Diagramme mit Venny 2.1.0 erstellt. (Collazos, 2018) Zum Nachweis einer individuellen Regulation der in beiden Zelllinien ermittelten Proteine wurden die jeweils detektierten Proteinnengen verglichen. Als spezifischer Unterschied im Vergleich beider Zelltypen, wurde hierbei eine Erhöhung der Proteinmenge um den Faktor 2 ( $\geq 2$ ) und ein statistisch gesicherter Unterschied, ermittelt durch den gepaarten t-Test (p-Wert  $< 0,05$ ), definiert. Die Ontologie der zugehörigen Gene wurde mit der STRAP (*Software Tool for Rapid Annotation of Proteins*) Software ermittelt.

### **7.9. Tierhaltung und *in vivo* Versuche**

Die Mäuse aus sämtlichen tierexperimentellen Versuchen wurden durch Personal des *Translational Animal Research Center (TARC)* der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in SPF-zertifizierten Räumlichkeiten versorgt. Die Tierversuche wurden in den Räumen der *TARC* gemäß geltendem Tierschutzgesetz des Landes Rheinland-Pfalz durchgeführt.

### 7.9.1. Murine Modelle der M $\Phi$ Depletion *in vivo*

Für die Untersuchung der Auswirkung einer M $\Phi$  Depletion kann das cre/loxP System verwendet werden. Die Erkennungssequenz der cre (cyclization recombination) Rekombinase sind zwei loxP Stellen, vor und hinter einer zu entfernenden DNA Sequenz. Die transgenen LysM-cre Mäuse zeichnen sich durch die Expression der cre Rekombinase unter Kontrolle des Lysozym M (LysM) Promotors aus deren Expression damit auf myeloide Zellen, speziell M $\Phi$  und Granulozyten, begrenzt ist. (Cross and Renkawitz, 1990) Neben der konstitutiven Expression (Bonifer et al., 1994; Cross et al., 1988) korreliert diese zudem mit der Reifung der Zellen und wird, bei der Differenzierung der myeloiden Vorläuferzelle in reife M $\Phi$ , (Keshav et al., 1991) progressiv aktiviert. Um eine induzierbare Depletion von M $\Phi$  zu ermöglichen können die LysM-cre Mäuse mit geflochten Diphtherie Toxin Rezeptor (iDTR) Mäusen (Buch et al., 2005) verpaart werden. In diesen transgenen iDTR Tieren ist eine Stoppkassette vor dem Gen für den DTR höherer Primaten von loxP flankiert. Nach endozytotischer Internalisierung des Toxin-Rezeptorkomplexes kommt es letztlich zur Apoptoseinduktion. (Collier, 1975) Der in diesem Mausstamm inserierte DTR hat im Vergleich zu dem endogenen murinen DTR eine  $10^3 - 10^5$  fach höhere Bindungsaffinität gegenüber dem Diphtherie Toxin (DT). (Bennett and Clausen, 2007) Die Expression des DTR wird unter die Kontrolle des Promotors für LysM gestellt und dieser wird zusätzlich zum endogenen DTR exprimiert. (Sauer and Henderson, 1988; Sternberg and Hamilton, 1981) Vorteile dieses Systems sind zum einen die induzierbare, temporäre Depletion von Zellen durch DT Applikation und das durch Apoptoseinduktion verursachte Ausbleiben der Inflammation. (Bennett and Clausen, 2007)

Eine weitere Strategie zur *in vivo* Depletion von M $\Phi$  ist die Eliminierung durch die Applikation von Clodronat. Frei vorliegend ist dieses nicht in der Lage die Zellmembran zu durchdringen, durch Einschluss in einen Phosphobilayer kann es gezielt zur Adressierung phagozytierenden Zellen verwendet werden. Im Zuge der endosomalen Reifung der endozytotisch aufgenommenen Liposomen wird deren Bilayer durch die Präsenz von Phospholipasen zerstört und das enthaltene Clodronat wird in die Zielzelle entlassen. (van Rooijen et al., 1996) Die Akkumulation von Clodronat im Zytoplasma führt zur enzymatischen Konvertierung in ein nicht hydrolysierbares ATP Analogon. Lokalisiert im Mitochondrium wird dadurch eine Porenbildung mit einhergehender Polarisierung der Membran ausgelöst. Der Ausstrom molekularer Signale ins Zytoplasma induziert letztlich die Apoptose der Zelle. (Frith et al., 1997;

Lehenkari et al., 2002) Dieser Wirkmechanismus macht die gezielte Adressierung von MΦ durch ihre hohe phagozytische Aktivität möglich ohne einen Einfluss auf nicht phagozytierende Zellen zu haben.

### 7.9.2. Intradermale Infektion von Mäusen

Für die *in vivo* Experimente bzw. die Gewinnung intradermaler Amastigote aus dem Gewebe wurden C57BL/6 bzw. BALB/c Mäuse intradermal in beide Ohren mit metazyklischen Promastigoten infiziert. Die für die *in vivo* Versuche injizierte Niedrigdosis von  $10^3$  Parasiten orientierte sich hierbei an der, unter physiologischen Bedingungen, von der Sandmücke übertragenen Parasitenzahl. Zur Gewinnung von Amastigoten aus BALB/c hingegen erfolgte die Infektion mit  $2 \times 10^5$  Parasiten je Ohr nach dem Hochdosis-Modell. In beiden Fällen wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und die Ohren mit Leukosilk an einem Zwangsröhrchen fixiert. Die gewünschte Parasitenzahl wurde durch Injektion von 10 µl der entsprechenden Konzentration in DMEM i.d. appliziert.

### 7.9.3. Messung und Berechnung der Läsionsvolumina

Als Maß für die Schwere des Krankheitsverlaufes der Infektion mit *L. major* wurde in wöchentlichen Abständen die Größe der sich entwickelnden Granulome in drei Dimensionen gemessen. Die Mäuse wurden hierzu mit Isofluran narkotisiert und Länge (l), Breite (b) und Dicke (d) der Läsion mit einer digitalen Schieblehre vermessen. Die Berechnung des Läsionsvolumens als Ellipsoid erfolgte entsprechend folgender Formel:

$$\text{Läsionsvolumen}[mm^3] = l/2 \times b/2 \times d/2 \times 3/4 \times \pi$$

Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 13 Wochen, dies stellt den kritischen Zeitpunkt im experimentellen Modell der kutanen *Leishmaniasis* dar an dem bei den resistenten C57BL/6 Mäusen für gewöhnlich die Resolution der Infektion eingetreten ist.

### 7.9.4. Diphtherie Toxin Applikation *in vivo*

Die Depletion LysM positiver Zellen in Mäusen wurde durch die Applikation von Diphtherie Toxin (DT) erreicht. Hierzu wurde eine Lösung mit 1,5 ng/µl DT in PBS hergestellt und von dieser 200µl intraperitoneal appliziert, um eine Dosis von 300ng pro Maus und Injektion zu erzielen.

### 7.9.5. Liposomen Applikation *in vivo*

Zur Depletion von Phagozyten und im speziellen M $\Phi$  wurde den Mäusen 200  $\mu$ l in Liposomen eingeschlossenes Clodronat intraperitoneal appliziert, um die Spezifität der Behandlung zu kontrollieren wurden jeweils 200  $\mu$ l PBS bzw. in Liposomen eingeschlossenes PBS verwendet.

### 7.10. Durchflusszytometrische Analysen

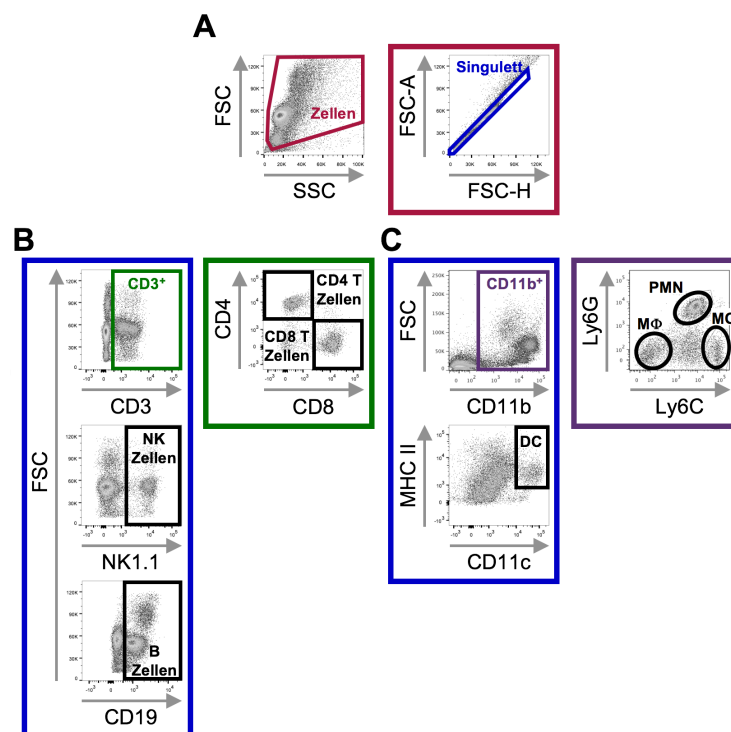
Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einzelner Zellen in einer Zellsuspension und basiert auf der Emission optischer Signale nach Anregung durch einen fokussierten Laserstrahl. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen in der Durchflusszelle vereinzelt und passieren dann fokussierte Laserstrahlen. Das von den Zellen emittierte Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird an Photomultipliern detektiert und ist charakteristisch für verschiedene Parameter der Zellen. Grundsätzlich werden zwei verschiedene Technologien in der Durchflusszytometrie unterschieden, die sogenannten Analysatoren ermöglichen lediglich die Detektion der verschiedenen Parameter der Zellen, wohin gegen beim Fluoreszenz-Aktivierten-Zell-Sortieren (FACS) über einen elektrostatischen Polarisationsmechanismus Zellen mit den gewünschten Eigenschaften aus der Zellsuspension isoliert werden können. In beiden Ansätzen ist das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und wird durch das Volumen, bzw. die relative Größe der gemessenen Zelle beeinflusst. Als weiterer morphologischer Parameter dient das emittierte Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC), welches die Brechung des Lichtes im rechten Winkel darstellt und von der Granularität der Zelle abhängig ist. Neben der morphologischen Charakterisierung ermöglicht die Durchflusszytometrie auch die Messung von emittierten Fluoreszenzsignalen direkt oder indirekt, in oder auf die Zellen aufgebracht Flurochrome. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren erlaubt den parallelen Einsatz mehrerer Farbstoffe und erhöht damit die Informationsdichte innerhalb der Messung.

Die am BD LSRII ermittelten durchflusszytometrischen Daten wurden mit der FlowJo Version 10 und Version 7 analysiert. Zunächst erfolgte bei sämtlichen Analysen ein FSC / SSC basierter morphologischer Ausschluss des Debris (Abb. 40A), anschließend wurden für die weitere Analyse die Einzelzellen selektioniert. Diese zeigen ein linear proportionales Verhältnis zwischen der Fläche und der Höhe des

Spannungspulses des Vorwärtsstreulichts (Abb. 40A). Für die Auswertung des Ly-sats aus Partikel enthaltenden Zellen wurde auf die Diskriminierung von Dubletten verzichtet um die im Phagosom replizierenden *L. major* mit einzubeziehen.

### 7.10.1. Diskriminierung von angeborenen und adaptiven Immunzellen

Bei der Differenzierung der Immunzellen des erworbenen Kompartiments wurden B Zellen als CD19 exprimierende Zellen definiert, NK Zellen hingegen wurden über die Anwesenheit von NK1.1 auf der Oberfläche identifiziert. (Abb. 40B) Die CD3 exprimierenden Zellen (Abb. 40B) wurden anhand der CD4 und CD8 Expression in die beiden Subpopulationen der T Helferzellen unterschieden und die  $\gamma\delta$ T Zellen wurden über den für diese spezifischen T Zellrezeptor ermittelt. (Abb. 40B) Im angeborenen Kompartiment wurden zunächst alle CD11b tragenden Zellen vorselektioniert. (Abb. 40C) Durch Betrachtung des Vorhandenseins von Ly6G und Ly6C innerhalb dieser Population wurden diese in Makrophagen (Ly6G und Ly6C negativ), PMN (intermediäre Expression von Ly6C, hohe Expression an Ly6G) und Monozyten (Ly6G negativ, hohe Expression von Ly6C) eingeteilt. Dendritische Zellen wurden über die gleichzeitige Expression von MHCII und CD11c definiert. (Abb. 40C) Für alle Zellpopulation wurde jeweils der prozentuale Anteil an den morphologisch identifizierten Zellen angegeben.



**Abb. 40 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Immunzellen.** Gemäß ihrer Expression spezifischer Oberflächenmarker wurden die gewonnenen Zellen (A) der verschiedenen Gewebe als Zellen des adaptiven (B) und angeborenen (C) Kompartiments identifiziert.

### 7.10.2. Bestimmung der Abnahme der Fluoreszenzintensität von *L. major*

Zur Bestimmung der Abnahme der Signale der verschiedenen Proliferationsfarbstoffe nach der intrazellulären Phase von *L. major* wurde die mediane Fluoreszenzintensität und auf die Intensität der Färbung von *L. major* vor Infektion normalisiert.

$$nFI = \frac{MFI \text{ } L. \text{ major vor Infektion}}{MFI \text{ Zeitwerts}}$$

### 7.10.3. Bestimmung der normalisierten Fluoreszenzintensität phagosomaler Reifungsmarker

Die Expression phagosomaler Marker ist als Median der absoluten Fluoreszenzintensität nach Abzug der Isotyp Kontrolle berechnet. Außerdem wurde die relative Intensität der Färbung innerhalb der unabhängigen Versuche gemäß folgender Formel kalkuliert, hierbei ist 1 die maximale Signalintensität innerhalb des Zeitintervalls des jeweiligen Markers bei getrennter Betrachtung infizierter und nicht infizierter Zellen.

$$nFI = \frac{\text{Maximaler MFI aller Zeitwerte} - \text{MFI des zugehörigen Isotyps}}{\text{MFI des Zeitwerts} - \text{MFI des zugehörigen Isotyps}}$$

### 7.10.4. Berechnung der Abnahme der Hoechstfärbung durch BrdU

Die Signalintensitäten der Hoechst Färbung wurden als mediane Fluoreszenzintensität bestimmt. Der Prozentsatz proliferierender Zellen wurde durch Vergleich mit der korrespondierenden Kontrolle ohne BrdU gemäß folgender Formel berechnet.

$$nFI = 100 - \frac{100}{MFI \text{ Zeitwert}_{\text{mit BrdU}} \times MFI \text{ Zeitwert}_{\text{ohne BrdU}}}$$

## 8. Literaturverzeichnis

**WHO | Leishmaniasis.** In WHO (World Health Organization) (2017).

**al Tuwaijri, A.S., al Mofleh, I.A., and Mahmoud, A.A. (1990).** Effect of *Leishmania major* on human polymorphonuclear leucocyte function *in vitro*. *J Med Microbiol* 32, 189-193.

**Ali, K.S., Rees, R.C., Terrell-Nield, C., and Ali, S.A. (2013).** Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol* 35, 441-456.

**Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., and den Boer, M. (2012).** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671.

**Alvarez, D., Vollmann, E.H., and von Andrian, U.H. (2008).** Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. *Immunity* 29, 325.

**Aronson, N., Herwaldt, B.L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E., Ephros, M., Jeronimo, S., and Magill, A. (2017).** Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH)\*. *Am J Trop Med Hyg* 96, 24-45.

**Aseffa, A., Gummy, A., Launois, P., MacDonald, H.R., Louis, J.A., and Tacchini-Cottier, F. (2002).** The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 169, 3232-3241.

**Ashok, D., and Acha-Orbea, H. (2014).** Timing is everything: dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 30, 499-507.

**Aspöck, H., Gerersdorfer, T., Formayer, H., and Walochnik, J. (2008).** Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wien Klin Wochenschr* 120, 24-29.

**Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998).** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

**Behrens, E.M., Sriram, U., Shivers, D.K., Gallucci, M., Ma, Z., Finkel, T.H., and Gallucci, S. (2007).** Complement receptor 3 ligation of dendritic cells suppresses their stimulatory capacity. *J Immunol* 178, 6268-6279.

**Belkaid, Y., Butcher, B., and 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., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. (2002).** CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.

**Bennett, C.L., and Clausen, B.E. (2007).** DC ablation in mice: promises, pitfalls, and challenges. *Trends Immunol* 28, 525-531.

**Bennett, C.L., Colledge, L., Richards, H.E., Reay, P.A., Blackburn, C.C., and Aebischer, T. (2003).** Uncompromised generation of a specific H-2DM-dependent peptide-MHC class II complex from exogenous antigen in *Leishmania mexicana*-infected dendritic cells. *Eur J Immunol* 33, 3504-3513.

**Bennett, C.L., Misslitz, A., Colledge, L., Aebischer, T., and Blackburn, C.C. (2001).** Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* 31, 876-883.

**Bente, M., Harder, S., Wiesgigl, M., Heukeshoven, J., Gelhaus, C., Krause, E., Clos, J., and Bruchhaus, I. (2003).** Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3, 1811-1829.

- Bhattacharya, P., Gupta, G., Majumder, S., Adhikari, A., Banerjee, S., Halder, K., Majumdar, S.B., Ghosh, M., Chaudhuri, S., Roy, S., et al. (2011).** Arabinosylated lipoarabinomannan skews Th2 phenotype towards Th1 during Leishmania infection by chromatin modification: involvement of MAPK signaling. *PLoS One* 6, e24141.
- Biewenga, J., van der Ende, M.B., Krist, L.F., Borst, A., Ghufron, M., and van Rooijen, N. (1995).** Macrophage depletion in the rat after intraperitoneal administration of liposome-encapsulated clodronate: depletion kinetics and accelerated repopulation of peritoneal and omental macrophages by administration of Freund's adjuvant. *Cell Tissue Res* 280, 189-196.
- Biyani, N., Singh, A.K., Mandal, S., Chawla, B., and Madhubala, R. (2011).** Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of Leishmania donovani. *Mol Biochem Parasitol* 179, 91-99.
- Boecken, G., CordBogdan, Christian, Weitzel, T., Andreas, Löbermann, M., von Stebut, E., Schunk, M., Gerd, Grobusch, M., Bialek, R., Gundel, Fleischer, B., et al. (2017).** Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 9, 1-51.
- Bonifer, C., Bosch, F.X., Faust, N., Schuhmann, A., and Sippel, A.E. (1994).** Evolution of gene regulation as revealed by differential regulation of the chicken lysozyme transgene and the endogenous mouse lysozyme gene in mouse macrophages. *Eur J Biochem* 226, 227-235.
- Bretscher, P.A., Ogunremi, O., and Menon, J.N. (1997).** Distinct immunological states in murine cutaneous leishmaniasis by immunising with different amounts of antigen: the generation of beneficial, potentially harmful, harmful and potentially extremely harmful states. *Behring Inst Mitt*, 153-159.
- Brewig, N., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Veit, A., Bickert, T., Fleischer, B., Mostbock, S., and Ritter, U. (2009).** Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J Immunol* 182, 774-783.
- Bros, M., Jahrling, F., Renzing, A., Wiechmann, N., Dang, N.A., Sutter, A., Ross, R., Knop, J., Sudowe, S., and Reske-Kunz, A.B. (2007).** A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. *Blood* 109, 3820-3829.
- Brotherton, M.C., Racine, G., Foucher, A.L., Drummel-Smith, J., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2010).** Analysis of stage-specific expression of basic proteins in Leishmania infantum. *J Proteome Res* 9, 3842-3853.
- Buates, S., and Matlashewski, G. (2001).** General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection. *J Immunol* 166, 3416-3422.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., and van Deurs, B. (2000).** Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11, 467-480.
- Buch, T., Heppner, F.L., Tertilt, C., Heinen, T.J., Kremer, M., Wunderlich, F.T., Jung, S., and Waisman, A. (2005).** A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2, 419-426.
- Canton, J., and Kima, P.E. (2012).** Interactions of pathogen-containing compartments with the secretory pathway. *Cell Microbiol* 14, 1676-1686.
- Caron, E., and Hall, A. (1998).** Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
- Champion, J.A., and Mitragotri, S. (2006).** Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4930-4934.
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A.E., and Tacchini-Cottier, F. (2010).** Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog* 6, e1000755.

- Chingwaru, W., Glashoff, R.H., Vidmar, J., Kapewangolo, P., and Sampson, S.L. (2016).** Mammalian cell cultures as models for Mycobacterium tuberculosis-human immunodeficiency virus (HIV) interaction studies: A review. *Asian Pac J Trop Med* 9, 832-838.
- Claassen, I., Van Rooijen, N., and Claassen, E. (1990).** A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogeneous cell populations *in vitro*, using the liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* 134, 153-161.
- Claus, V., Jahraus, A., Tjelle, T., Berg, T., Kirschke, H., Faulstich, H., and Griffiths, G. (1998).** Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem* 273, 9842-9851.
- Collazos, J.C.O. (2018).** Venny 2.1.0.
- Collier, R.J. (1975).** Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* 39, 54-85.
- Courret, N., Frehel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., and Antoine, J.C. (2002).** Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci* 115, 2303-2316.
- Cross, M., Mangelsdorf, I., Wedel, A., and Renkawitz, R. (1988).** Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6232-6236.
- Cross, M., and Renkawitz, R. (1990).** Repetitive sequence involvement in the duplication and divergence of mouse lysozyme genes. *EMBO J* 9, 1283-1288.
- David, C.V., and Craft, N. (2009).** Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 22, 491-502.
- Davies, M.L., Parekh, N.J., Kaminsky, L.W., Soni, C., Reider, I.E., Krouse, T.E., Fischer, M.A., van Rooijen, N., Rahman, Z.S.M., and Norbury, C.C. (2017).** A systemic macrophage response is required to contain a peripheral poxvirus infection. *PLoS Pathog* 13, e1006435.
- de Almeida, M.C., Cardoso, S.A., and Barral-Netto, M. (2003).** Leishmania (Leishmania) chagasi infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* 33, 153-162.
- de Freitas Balanco, J.M., Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., and Barcinski, M.A. (2001).** Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 11, 1870-1873.
- de Mendonca, S.C., Cysne-Finkelstein, L., and Matos, D.C. (2015).** Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in Leishmania. *Front Immunol* 6, 524.
- de Souza Leao, S., Lang, T., Prina, E., Hellio, R., and Antoine, J.C. (1995).** Intracellular Leishmania amazonensis amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 108 ( Pt 10), 3219-3231.
- Dea-Ayuela, M.A., Ordonez-Gutierrez, L., and Bolas-Fernandez, F. (2009).** Changes in the proteome and infectivity of Leishmania infantum induced by *in vitro* exposure to a nitric oxide donor. *Int J Med Microbiol* 299, 221-232.
- Delamarre, L., Couture, R., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2006).** Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J Exp Med* 203, 2049-2055.
- de Leo, F.R., Allen, L.A., Apicella, M., and Nauseef, W.M. (1999).** NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol* 163, 6732-6740.
- Depke, M., Breitbach, K., Dinh Hoang Dang, K., Brinkmann, L., Salazar, M.G., Dhople, V.M., Bast, A., Steil, L., Schmidt, F., Steinmetz, I., et al. (2014).** Bone marrow-derived macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice fundamentally differ in their respiratory chain complex proteins, lysosomal enzymes and components of antioxidant stress systems. *J Proteomics* 103, 72-86.

- Depraetere, V. (2000).** "Eat me" signals of apoptotic bodies. *Nat Cell Biol* 2, E104.
- Dermine, J.F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A., and Desjardins, M. (2000).** Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* 2, 115-126.
- Desjardins, M., and Descoteaux, A. (1997).** Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. *J Exp Med* 185, 2061-2068.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., and Griffiths, G. (1994).** Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124, 677-688.
- Dominguez, M., and Torano, A. (1999).** Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of Leishmania infection. *J Exp Med* 189, 25-35.
- Donati, Y.R., Kantengwa, S., and Polla, B.S. (1991).** Phagocytosis and heat shock response in human monocytes-macrophages. *Pathobiology* 59, 156-161.
- Dostálová, A., and Volf, P. (2012).** Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors* 5, 276.
- Duclos, S., Clavarino, G., Rousserie, G., Goyette, G., Boulais, J., Camossetto, V., Gatti, E., LaBoisiere, S., Pierre, P., and Desjardins, M. (2011).** The endosomal proteome of macrophage and dendritic cells. *Proteomics* 11, 854-864.
- Dujardin, J.C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y., and Boelaert, M. (2008).** Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 14, 1013-1018.
- Ehlers, M.R. (2000).** CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* 2, 289-294.
- el Fakhry, Y., Ouellette, M., and Papadopoulou, B. (2002).** A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in Leishmania infantum. *Proteomics* 2, 1007-1017.
- el-On, J., Zvillich, M., and Sarov, I. (1990).** Leishmania major: inhibition of the chemiluminescent response of human polymorphonuclear leukocytes by promastigotes and their excreted factors. *Parasite Immunol* 12, 285-295.
- Evans, T.G., Reed, S.S., and Hibbs, J.B., Jr. (1996).** Nitric oxide production in murine leishmaniasis: correlation of progressive infection with increasing systemic synthesis of nitric oxide. *Am J Trop Med Hyg* 54, 486-489.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998).** Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000).** A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90.
- Fairn, G.D., and Grinstein, S. (2012).** How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* 33, 397-405.
- Fang, F.C. (2004).** Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2, 820-832.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996).** Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-10890.
- Fernandez-Guerrero, M.L., Robles, P., Rivas, P., Mojer, F., Muniz, G., and de Gorgolas, M. (2004).** Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop* 90, 11-16.

**Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009).** Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 7, 355-366.

**Flannagan, R.S., Jaumouille, V., and Grinstein, S. (2012).** The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7, 61-98.

**Flohe, S., Lang, T., and Moll, H. (1997).** Synthesis, stability, and subcellular distribution of major histocompatibility complex class II molecules in Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infect Immun* 65, 3444-3450.

**Forestier, C.L., Machu, C., Loussert, C., Pescher, P., and Spath, G.F. (2011).** Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host Microbe* 9, 319-330.

**Fraser, C.C., Chen, B.P., Webb, S., van Rooijen, N., and Kraal, G. (1995).** Circulation of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient mice after Cl2MDP-liposome-mediated macrophage depletion. *Blood* 86, 183-192.

**Frith, J.C., Monkkonen, J., Blackburn, G.M., Russell, R.G., and Rogers, M.J. (1997).** Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells *in vitro*. *J Bone Miner Res* 12, 1358-1367.

**Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J., and Desjardins, M. (2002).** Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131.

**Ghosh, M., and Bandyopadhyay, S. (2004).** Interaction of *Leishmania* parasites with dendritic cells and its functional consequences. *Immunobiology* 209, 173-177.

**Ginhoux, F., and Guillems, M. (2016).** Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439-449.

**Gluezn, E., Ginger, M.L., and McKean, P.G. (2010).** Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr Opin Microbiol* 13, 473-479.

**Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A., and Mosser, D.M. (2011).** Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 208, 1253-1265.

**Goren, I., Allmann, N., Yogev, N., Schurmann, C., Linke, A., Holdener, M., Waisman, A., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2009).** A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol* 175, 132-147.

**Greenberg, S., and Grinstein, S. (2002).** Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 136-145.

**Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003).** ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.

**Guillems, M., and Malissen, B. (2015).** A Death Notice for In-Vitro-Generated GM-CSF Dendritic Cells? *Immunity* 42, 988-990.

**Guo, M., Hartlova, A., Dill, B.D., Prescott, A.R., Gierlinski, M., and Trost, M. (2015).** High-resolution quantitative proteome analysis reveals substantial differences between phagosomes of RAW 264.7 and bone marrow derived macrophages. *Proteomics* 15, 3169-3174.

**Guy, R.A., and Belosevic, M. (1993).** Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun* 61, 1553-1558.

Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* 8, 311-330.

- Haeberlein, S., Fischer, D., Thomas, S.M., Schleicher, U., Beierkuhnlein, C., and Bogdan, C. (2013).** First Assessment for the Presence of Phlebotomine Vectors in Bavaria, Southern Germany, by Combined Distribution Modeling and Field Surveys. *PLoS One* 8.
- Hartlova, A., Krocova, Z., Cervený, L., and Stulik, J. (2011).** A proteomic view of the host-pathogen interaction: The host perspective. *Proteomics* 11, 3212-3220.
- Helft, J., Bottcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B.U., Goubau, D., and Reis e Sousa, C. (2015).** GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 42, 1197-1211.
- Henri, S., Curtis, J., Hochrein, H., Vremec, D., Shortman, K., and Handman, E. (2002).** Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun* 70, 3874-3880.
- Henry, R.M., Hoppe, A.D., Joshi, N., and Swanson, J.A. (2004).** The uniformity of phagosome maturation in macrophages. *J Cell Biol* 164, 185-194.
- Herweg, J.A., Hansmeier, N., Otto, A., Geffken, A.C., Subbarayal, P., Prusty, B.K., Becher, D., Hensel, M., Schaible, U.E., Rudel, T., et al. (2015).** Purification and proteomics of pathogen-modified vacuoles and membranes. *Front Cell Infect Microbiol* 5, 48.
- Hiepe, T., Lucius, R., and Gootstein, B. (2006).** Allgemeine Parasitologie, Vol 1. Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 209, 1167-1181.
- Hof, H., and Dörries, R. (2017).** *Medizinische Mikrobiologie*, Vol 6. (Thieme).
- Hoffmann, C., Finsel, I., and Hilbi, H. (2012).** Purification of pathogen vacuoles from Legionella-infected phagocytes. *J Vis Exp* 64, 4118.
- Hoffmann, E., Machelart, A., Song, O.R., and Brodin, P. (2018).** Proteomics of Mycobacterium Infection: Moving towards a Better Understanding of Pathogen-Driven Immunomodulation. *Front Immunol* 9, 86.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011).** Endosome maturation. *Embo j* 30, 3481-3500.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992).** Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176, 1693-1702.
- Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S., and Gros, P. (2000).** Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med* 192, 1237-1248.
- Jankowski, A., Scott, C.C., and Grinstein, S. (2002).** Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *J Biol Chem* 277, 6059-6066.
- Jebbari, H., Stagg, A.J., Davidson, R.N., and Knight, S.C. (2002).** *Leishmania major* promastigotes inhibit dendritic cell motility *in vitro*. *Infect Immun* 70, 1023-1026.
- Jiang, X., Shen, C., Yu, H., Karunakaran, K.P., and Brunham, R.C. (2010).** Differences in innate immune responses correlate with differences in murine susceptibility to *Chlamydia muridarum* pulmonary infection. *Immunology* 129, 556-566.
- John, D., Fischer, M.R., von Stebut, E. (2013).** Model for generation of large numbers of primary, inflammatory skin-derived neutrophils, and macrophages. *Methods Mol Biol* 961, 403-410.
- Kalupahana, R.S., Mastroeni, P., Maskell, D., and Blacklaws, B.A. (2005).** Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunology* 115, 462-472.

- Kamath, A.T., Pooley, J., O'Keeffe, M.A., Vremec, D., Zhan, Y., Lew, A.M., D'Amico, A., Wu, L., Tough, D.F., and Shortman, K. (2000).** The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol* 165, 6762-6770.
- Karlson, P., and Doenecke, D. (2017).** *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*.
- Kautz-Neu, K., Schwonberg, K., Fischer, M.R., Schermann, A.I., von Stebut, E. (2012).** Dendritic cells in Leishmania major infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Med Microbiol Immunol* 201, 581-592.
- Kaye, P., and Scott, P. (2011).** Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9, 604-615.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A.P., Angrand, P.O., Stewart, F., and Schutz, G. (1996).** Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res* 24, 1404-1411.
- Keshav, S., Chung, P., Milon, G., and Gordon, S. (1991).** Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med* 174, 1049-1058.
- Kima, P.E. (2007).** The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol* 37, 1087-1096.
- Kima, P.E., and Dunn, W. (2005).** Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate Leishmania parasitophorous vacuoles. *Microb Pathog* 38, 139-145.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995).** Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- Kurushima, H., Ramprasad, M., Kondratenko, N., Foster, D.M., Quehenberger, O., and Steinberg, D. (2000).** Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 67, 104-108.
- Körner, U., Fuss, V., Steigerwald, J., and Moll, H. (2006).** Biogenesis of Leishmania major-Harboring Vacuoles in Murine Dendritic Cells. *Infect Immun* 74, 1305-1312.
- Lamour, S., Choi, B.S., Keun, H.C., Müller, I., and Saric, J. (2012).** Metabolic Characterization of Leishmania major Infection in Activated and Nonactivated Macrophages. *J Proteome Res* 11, 4211-4222.
- Lang, G. (2017).** Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. In (*SpringerLink*), 39-65.
- Lang, T., Hellio, R., Kaye, P.M., and Antoine, J.C. (1994).** Leishmania donovani-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci* 107 (Pt 8), 2137-2150.
- Larsson, M., Fonteneau, J.F., and Bhardwaj, N. (2001).** Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol* 22, 141-148.
- 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.
- Lehenkari, P.P., Kellinsalmi, M., Napankangas, J.P., Ylitalo, K.V., Monkkonen, J., Rogers, M.J., Azhayev, A., Vaananen, H.K., and Hassinen, I.E. (2002).** Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol* 61, 1255-1262.
- Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007).** Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 26, 519-531.

- Levin, R., Grinstein, S., and Canton, J. (2016).** The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol Rev* 273, 156-179.
- Li, Q. (2011).** Phagosome proteomics: a powerful tool to assess bacteria-mediated immunomodulation. *Bioeng Bugs* 2, 194-198.
- Li, Q., Jagannath, C., Rao, P.K., Singh, C.R., and Lostumbo, G. (2010).** Analysis of phagosomal proteomes: From latex-bead to bacterial phagosomes. *Proteomics* 10, 4098-4116.
- Lim, J.J., Grinstein, S., and Roth, Z. (2017).** Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 191.
- Liu, D., and Uzonna, J.E. (2012).** The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol* 2.
- Lodge, R., Diallo, T.O., and Descoteaux, A. (2006).** Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol* 8, 1922-1931.
- Lopez Kostka, S., Dinges, S., Griewank, K., Iwakura, Y., Udey, M.C., von Stebut, E. (2009).** IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 182, 3039-3046.
- Louis, J., Himmelrich, H., Parra-Lopez, C., Tacchini-Cottier, F., and Launois, P. (1998).** Regulation of protective immunity against Leishmania major in mice. *Curr Opin Immunol* 10, 459-464.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995).** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154, 5071-5079.
- Mann, L., Kochupurakkal, N., Martin, C., Verjans, E., Klingberg, A., Sody, S., Kraus, A., Dalimot, J., Bergmuller, E., Jung, S., et al. (2016).** CD11c.DTR mice develop a fatal fulminant myocarditis after local or systemic treatment with diphtheria toxin. *Eur J Immunol* 46, 2028-2042.
- Mantegazza, A.R., Savina, A., Vermeulen, M., Perez, L., Geffner, J., Hermine, O., Rosenzweig, S.D., Faure, F., and Amigorena, S. (2008).** NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* 112, 4712-4722.
- Marth, T., and Kelsall, B.L. (1997).** Regulation of Interleukin-12 by Complement Receptor 3 Signaling. *J Exp Med* 185, 1987-1995.
- Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M.T., Hong, W.J., Olivier, M., Gagnon, E., Desjardins, M., and Descoteaux, A. (2013).** Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe* 14, 15-25.
- Matos, D.C., Faccioli, L.A., Cysne-Finkelstein, L., Luca, P.M., Corte-Real, S., Armoa, G.R., Lemes, E.M., Decote-Ricardo, D., and Mendonca, S.C. (2010).** Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of Leishmania amazonensis and its surface expression increases during metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105, 341-347.
- Matte, C., and Descoteaux, A. (2010).** Leishmania donovani amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5. *Infect Immun* 78, 3736-3743.
- Matte, C., Maion, G., Mourad, W., and Olivier, M. (2001).** Leishmania donovani-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol* 23, 177-184.
- May, J.A., Ratan, H., Glenn, J.R., Losche, W., Spangenberg, P., and Heptinstall, S. (1998).** GPIIb-IIIa antagonists cause rapid disaggregation of platelets pre-treated with cytochalasin D. Evidence that the stability of platelet aggregates depends on normal cytoskeletal assembly. *Platelets* 9, 227-232.
- Mayer, C.T., Berod, L., and Sparwasser, T. (2012).** Layers of dendritic cell-mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity. *Front Immunol* 3, 183.

- McNicoll, F.,** Drummelsmith, J., Muller, M., Madore, E., Boilard, N., Ouellette, M., and Papadopoulos, B. (2006). A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 6, 3567-3581.
- Miura, T.A.,** and Holmes, K.V. (2009). Host-pathogen interactions during coronavirus infection of primary alveolar epithelial cells. *J Leukoc Biol* 86, 1145-1151.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.
- Mosser, D.M.,** and Edelson, P.J. (1987). The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 327, 329-331.
- Murphy, K.,** Weaver, C., and al., e. (2017). *Janeway's Immunobiology*, 9th edition, 9 edn.
- Murray, H.W.,** Berman, J.D., Davies, C.R., and Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- Nathan, C.,** and Shiloh, M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8841-8848.
- Naucke, T.J.,** Menn, B., D, M., and Lorentz, S. (2008). Sandflies and leishmaniasis in Germany | SpringerLink. *Parasitol Res* 103 Suppl 1, 65-68.
- Nauseef, W.M.,** and Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nat Immunol* 15, 602-611.
- Ndjamen, B.,** Kang, B.H., Hatsuzawa, K., and Kima, P.E. (2010). *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. *Cell Microbiol* 12, 1480-1494.
- Nordenfelt, P.,** and Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* 90, 271-284.
- Ochsenbein, A.F.,** and Zinkernagel, R.M. (2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 21, 624-630.
- Olivier, M.,** Gregory, D.J., and Forget, G. (2005). Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. In *Clin Microbiol Rev*, pp. 293-305.
- Paape, D.,** Barrios-Llerena, M.E., Le Bihan, T., Mackay, L., and Aebischer, T. (2010). Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 169, 108-114.
- Paape, D.,** Lippuner, C., Schmid, M., Ackermann, R., Barrios-Llerena, M.E., Zimny-Arndt, U., Brinkmann, V., Arndt, B., Pleissner, K.P., Jungblut, P.R., et al. (2008). Transgenic, fluorescent *Leishmania mexicana* allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. *Mol Cell Proteomics* 7, 1688-1701.
- Pantelouris, E.M. (1968).** Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370-371.
- Peters, N.C.,** Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., and Sacks, D. (2008). *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-974.
- Peters, N.C.,** and Sacks, D.L. (2009). The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* 11, 1290-1296.
- Pina, D.G.,** Stechmann, B., Shnyrov, V.L., Cabanié, L., Haicheur, N., Tartour, E., and Ludger, J. (2017). Correlation between Shiga toxin B-subunit stability and antigen crosspresentation: A mutational analysis. *FEBS Letters* 582, 185-189.
- Pitt, A.,** Mayorga, L.S., Stahl, P.D., and Schwartz, A.L. (1992). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest* 90, 1978-83.

- Ponte-Sucre, A., Heise, D., and Moll, H. (2001).** Leishmania major lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. *Immunology* 104, 462-467.
- Preynat-Seaube, O., Villiers, C.L., Jourdan, G., Richard, M.J., Plumas, J., Favier, A., Marche, P.N., and Favrot, M.C. (2004).** An interaction between CD16 and CR3 enhances iC3b binding to CR3 but is lost during differentiation of monocytes into dendritic cells. *Eur J Immunol* 34, 147-155.
- Prina, E., Abdi, S.Z., Lebastard, M., Perret, E., Winter, N., and Antoine, J.C. (2004).** Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci* 117, 315-325.
- Prina, E., Jouanne, C., de Souza Lao, S., Szabo, A., Guillet, J.G., and Antoine, J.C. (1993).** Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol* 151, 2050-2061.
- Qian, Q., Jutila, M.A., Van Rooijen, N., and Cutler, J.E. (1994).** Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* 152, 5000-5008.
- Rabinovitch, P.S. (1983).** Regulation of human fibroblast growth rate by both noncycling cell fraction transition probability is shown by growth in 5-bromodeoxyuridine followed by Hoechst 33258 flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2951-2955.
- Ralph, P., Moore, M.A., and Nilsson, K. (1976).** Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* 143, 1528-1533.
- Ramanan, V., Scull, M.A., Sheahan, T.P., Rice, C.M., and Bhatia, S.N. (2014).** New Methods in Tissue Engineering: Improved Models for Viral Infection. *Annu Rev Virol* 1, 475-499.
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014).** Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* 5.
- Ravichandran, K.S. (2010).** Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. In *J Exp Med*, pp. 1807-1817.
- Real, F., Florentino, P.T.V., Reis, L.C., Ramos-Sanchez, E.M., Veras, P.S.T., Goto, H., and Mortara, R.A. (2014).** Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cell Microbiol* 16, 1549-1564.
- Real, F., and Mortara, R.A. (2012).** The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1518.
- Reiner, N.E., Ng, W., Ma, T., and McMaster, W.R. (1988).** Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4330-4334.
- Reiner, N.E., Ng, W., and McMaster, W.R. (1987).** Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* 138, 1926-1932.
- Reiner, S.L., and Locksley, R.M. (1995).** The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13, 151-177.
- Reis e Sousa, C. (2004).** Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16, 21-25.
- Remaley, A.T., Kuhns, D.B., Basford, R.E., Glew, R.H., and Kaplan, S.S. (1984).** Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production. *J Biol Chem* 259, 11173-11175.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Otero, A.C., Gomes, N.A., Moniz-De-Souza, M.C., Cysne-Finkelstein, L., Arnoldt, 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., Peters, N.C., Debrabant, A., and Sacks, D.L. (2012).** Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog* 8, e1002536.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Romano, A., Lee, S., Roffe, E., Peters, N.C., Debrabant, A., and Sacks, D. (2015).** Apoptotic cell clearance of Leishmania major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8(+) T-cell priming *in vitro* by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death Dis* 6, 2018.
- Risso, A. (2000).** Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* 68, 785-792.
- Robert-Koch-Institut (2011).** Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten - RKI (*Robert Koch-Institut*).
- Rogers, K.A., DeKrey, G.K., Mbow, M.L., Gillespie, R.D., Brodskyn, C.I., and Titus, R.G. (2002).** Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. *FEMS Microbiol Lett* 209, 1-7.
- Rogers, L.D., and Foster, L.J. (2007).** The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18520-18525.
- Rogers, L.D., and Foster, L.J. (2008).** Contributions of proteomics to understanding phagosome maturation. *Cell Microbiol* 10, 1405-1412.
- Rosales, C., and Uribe-Querol, E. (2017).** Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Bio-med Res Int* 2017.
- Russell, D.G., Vanderven, B.C., Glennie, S., Mwandumba, H., and Heyderman, R.S. (2009).** The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. In *Nat Rev Immunol* (England), 594-600.
- Sacks, D., and Noben-Trauth, N. (2002).** The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nat Rev Immunol* 2, 845-858.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995).** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994).** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sardar, A.H., Kumar, S., Kumar, A., Purkait, B., Das, S., Sen, A., Kumar, M., Sinha, K.K., Singh, D., Equbal, A., et al. (2013).** Proteome changes associated with Leishmania donovani promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. *J Proteomics* 81, 185-199.
- Sato, N., Ahuja, S.K., Quinones, M., KostECKI, V., Reddick, R.L., Melby, P.C., Kuziel, W.A., and Ahuja, S.S. (2000).** CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the Leishmania major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J Exp Med* 192, 205-218.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988).** Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170.
- Saunders, E.C., Ng, W.W., Kloehn, J., Chambers, J.M., Ng, M., and McConville, M.J. (2014).** Induction of a Stringent Metabolic Response in Intracellular Stages of Leishmania mexicana Leads to Increased Dependence on Mitochondrial Metabolism. *PLoS Pathog* 10
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002).** A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2, 965-975.

- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guernonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Dumenil, A.M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006).** NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205-218.
- Schiff, D.E., Kline, L., Soldau, K., Lee, J.D., Pugin, J., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J. (1997).** Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 62, 786-794.
- Schmidt, F., and Volker, U. (2011).** Proteome analysis of host-pathogen interactions: Investigation of pathogen responses to the host cell environment. *Proteomics* 11, 3203-3211.
- Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.F., Meresse, S., Descoteaux, A., and Desjardins, M. (1999).** Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* 1, 19-32.
- Segal, A.W., Dorling, J., and Coade, S. (1980).** Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. *J Cell Biol* 85, 42-59.
- Semini, G., and Aebischer, T. (2017).** Phagosome proteomics to study *Leishmania*'s intracellular niche in macrophages. *Int J Med Microbiol*, 1438-4221
- Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., and Eitzen, G. (2014).** Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils. *Front Immunol* 5.
- Shortman, K., and Liu, Y.J. (2002).** Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.
- Singh, V., Schwerk, P., and Tedin, K. (2018).** Rapid Isolation of intact *Salmonella*-containing vacuoles using paramagnetic nanoparticles. *Gut Pathog* 10, 33.
- Singh-Jasuja, H., Toes, R.E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S.P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H.G., Arnold-Schild, D., et al. (2000).** Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med* 191, 1965-1974.
- Späth, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2003).** The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *In Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 9536-9541.
- Steinberg, B.E., Huynh, K.K., and Grinstein, S. (2007).** Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences. *Biochem Soc Trans* 35, 1083-1087.
- Steinman, R.M. (2012).** Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30, 1-22.
- Stenmark, H. (2009).** Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-525.
- Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981).** Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150, 467-486.
- Suffia, I.J., Reckling, S.K., Piccirillo, C.A., Goldszmid, R.S., and Belkaid, Y. (2006).** Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* 203, 777-788.
- Sukumaran, B., and Madhubala, R. (2004).** Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Curr Mol Med* 4, 667-679.
- 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.

- Tamoutounour, S.**, Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925-938.
- Tittel, A.P.**, Heuser, C., Ohliger, C., Llanto, C., Yona, S., Hammerling, G.J., Engel, D.R., Garbi, N., and Kurts, C. (2012). Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. *Nat Methods* 9, 385-390.
- Torres-Guerrero, E.**, Quintanilla-Cedillo, M.R., Ruiz-Esmenjaud, J., and Arenas, R. (2017). *Leishmaniasis: a review*. F1000Res 6.
- Tsigankov, P.**, Gherardini, P.F., Helmer-Citterich, M., Spath, G.F., Myler, P.J., and Zilberstein, D. (2014). Regulation dynamics of Leishmania differentiation: deconvoluting signals and identifying phosphorylation trends. *Mol Cell Proteomics* 13, 1787-1799.
- Tsigankov, P.**, Gherardini, P.F., Helmer-Citterich, M., Spath, G.F., and Zilberstein, D. (2013). Phosphoproteomic analysis of differentiating Leishmania parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. *J Proteome Res* 12, 3405-3412.
- Ueno, N.**, and Wilson, M.E. (2012). Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol* 28, 335-344.
- Urwyler, S.**, Finsel, I., Ragaz, C., and Hilbi, H. (2010). Isolation of Legionella-containing vacuoles by immuno-magnetic separation. *Curr Protoc Cell Biol Chapter* 3, Unit 3.34.
- van Blijswijk, J.**, Schraml, B.U., Rogers, N.C., Whitney, P.G., Zelenay, S., Acton, S.E., and Sousa, C. (2015). Altered lymph node composition in diphtheria toxin receptor-based mouse models to ablate dendritic cells. *J Immunol* 194, 307-315.
- van Erp, K.**, Dach, K., Koch, I., Heesemann, J., and Hoffmann, R. (2006). Role of strain differences on host resistance and the transcriptional response of macrophages to infection with Yersinia enterocolitica. *Physiol Genomics* 25, 75-84.
- van Helden, S.F.**, van Leeuwen, F.N., and Figdor, C.G. (2008). Human and murine model cell lines for dendritic cell biology evaluated. *Immunol Lett* 117, 191-197.
- van Rooijen, N.** (1992). Liposome-mediated elimination of macrophages. *Research in Immunology* 143, 215-219.
- van Rooijen, N.**, Sanders, A., and van den Berg, T.K. (1996). Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 193, 93-99.
- van Zandbergen, G.**, Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Müller, A., Hölscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., et al. (2006). Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 13837-13842.
- van Zandbergen, G.**, Hermann, N., Laufs, H., Solbach, W., and 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, 4177-4184.
- van Zandbergen, G.**, Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J Immunol* 173, 6521-6525.
- VanderVen, B.C.**, Yates, R.M., and Russell, D.G. (2009). Intrapagosomal measurement of the magnitude and duration of the oxidative burst. *Traffic* 10, 372-378.
- Varga, G.**, Balkow, S., Wild, M.K., Stadtbaeumer, A., Krummen, M., Rothoef, T., Higuchi, T., Beissert, S., Wethmar, K., Scharffetter-Kochanek, K., et al. (2007). Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. *Blood* 109, 661-669.

- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009).** Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.
- Vasconcelos, C.O., Coêlho, Z.C.B., Chaves Cde, S., Teixeira, C.R., Pompeu, M.M.L., and Teixeira, M.J. (2014).** Distinct cellular migration induced by *Leishmania infantum* chagasi and salivary from *Lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, pp. 21-27.
- Veras, P.S.T., and Bezerra de Menezes, J.P. (2016).** Using Proteomics to Understand How *Leishmania* Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. *Int J Mol Sci* 17.
- Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O., and Mevorach, D. (2002).** Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* 196, 1553-1561.
- Vicari, A.P., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Chiodoni, C., Vaure, C., Ait-Yahia, S., Dercamp, C., Matsos, F., Reynard, O., Taverne, C., et al. (2004).** *In vivo* manipulation of dendritic cell migration and activation to elicit antitumour immunity. *Novartis Found Symp* 256, 241-254; discussion 254-269.
- Vinet, A.F., Fukuda, M., Turco, S.J., and Descoteaux, A. (2009).** The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog* 5
- von Stebut, E. (2007).** Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol* 16, 340-346.
- von Stebut, E. (2007).** Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* 17, 115-122.
- von Stebut, E. (2017).** *Reisedermatosen*.
- von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D.L., and 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., Metz, M., Milon, G., Knop, J., and Maurer, M. (2003).** Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha /beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. *Blood* 101, 210-215.
- von Stebut, E., and Sunderkötter, C. (2007).** Cutaneous leishmaniasis. *Hautarzt* 58, 445-458; quiz 459.
- von Stebut, E., Sunderkötter, C (2017).** Kutane Leishmaniasis | SpringerLink.
- Wanderley, J.L., Moreira, M.E., Benjamin, A., Bonomo, A.C., and Barcinski, M.A. (2006).** Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* 176, 1834-1839.
- von Stebut, E., Bogdan, C. (2017).** Kutane Leishmaniasis als Reisedermatose | SpringerLink.
- von Stebut, E. (2017).** Leishmaniasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 13, 191-201.
- von Stebut, E., Boecken, G., Sunderkötter, C., and Bogdan, C. (2016).** Importierte Dermatose: Kutane Leishmaniasis. *Dtsch Arztebl* 2016; 113(15).
- Wanderley, J.L., Thorpe, P.E., Barcinski, M.A., and Soong, L. (2013).** Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates *in vivo* infection and dendritic cell function. *Parasite Immunol* 35, 109-119.
- Wang, K., and Deubel, V. (2011).** Mice with Different Susceptibility to Japanese Encephalitis Virus Infection Show Selective Neutralizing Antibody Response and Myeloid Cell Infectivity. *PLoS One* 6.

**Winzler**, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V.S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 185, 317-328.

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

**Yamey**, G. (2002). The world's most neglected diseases. *BMJ* 325, 176-177.

**Zaft**, T., Sapoznikov, A., Krauthgamer, R., Littman, D.R., and Jung, S. (2005). CD11c<sup>high</sup> dendritic cell ablation impairs lymphopenia-driven proliferation of naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 175, 6428-6435.

**Zammit**, D.J., Cauley, L.S., Pham, Q.M., and Lefrancois, L. (2005). Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity* 22, 561-570.

**Zamora**, R., Vodovotz, Y., and Billiar, T.R. (2000). Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6, 347-373.

**Zhang**, Y., Lu, W., and Hong, M. (2010). The membrane-bound structure and topology of a human alpha-defensin indicate a dimer pore mechanism for membrane disruption. *Biochemistry* 49, 9770-9782.

