

**Vakzinierung gegen die murine kutane Leishmaniose
mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen**

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

vorgelegt von
Katharina Kronenberg

Mainz, Oktober 2006

Stand der Rechtschreibung: Juli 2006

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	1
1.	Zusammenfassung	7
2.	Einleitung	8
2.1.	Leishmaniose	8
2.2.	Der Lebenszyklus von <i>Leishmania major</i>	9
2.3.	Die experimentelle murine kutane Leishmaniose	11
2.3.1.	Das immunologische Th1/Th2-Konzept	11
2.3.2.	Infektionsmodelle	13
2.3.3.	Ablauf einer <i>low dose</i> Infektion mit <i>Leishmania major</i> in resistenten C57BL/6 Mäusen	13
2.3.4.	Die Bedeutung dendritischer Zellen in resistenten C57BL/6 Mäusen	14
2.3.5.	Die Rolle von dendritischen Zellen in empfindlichen BALB/c Mäusen	15
2.3.6.	Die Rolle von CD8 ⁺ T-Zellen in der murinen kutanen Leishmaniose	16
2.4.	Entwicklung eines Leishmaniose-Impfstoffes	16
2.4.1.	Anforderungen an einen <i>Leishmania</i> -Impfstoff	17
2.4.2.	„ <i>Leishmanization</i> “ - Vakzinierung mit lebenden Parasiten	17
2.4.3.	Vakzinierung mit rekombinanten Proteinen	18
2.4.3.1.	LACK (<i>Leishmania</i> homologue of receptors for activated C kinase)	19
2.4.4.	DC-basierte Vakzinierungen	20
2.4.5.	Adjuvanzien	21
2.5.	TAT-Fusionsproteine	21
2.5.1.	TAT-vermittelte Proteintransduktion	21
2.5.2.	Vakzinierung mit TAT-Fusionsprotein transduzierten dendritischen Zellen	22
2.6.	Ziele der Arbeit	23
3.	Ergebnisse	25
3.1.	Untersuchungen zu stammesspezifischen Unterschieden in BALB/c und C57BL/6 Mäusen nach <i>high dose</i> Infektion mit <i>Leishmania major</i>	25

3.1.1.	Charakterisierung des inflammatorischen Infiltrates in der Läsion und in den drainierenden Lymphknoten	25
3.1.2.	Charakterisierung rekrutierter dendritischer Zellen	29
3.1.2.1.	Analyse des Infektionsstatus rekrutierter dendritischer Zellen	29
3.1.2.2.	Charakterisierung des Aktivierungsstatus rekrutierter dendritischer Zellen	30
3.1.3.	Analyse der T-Zell-Proliferation in den drainierenden Lymphknoten	33
3.2.	Transduktion von dendritischen Zellen mit TAT-LACK Fusionsproteinen	35
3.2.1.	Aufreinigung von TAT-LACK und LACK	35
3.2.2.	Phänotyp transduzierter dendritischer Zellen	36
3.2.3.	IL-12 Produktion transduzierter dendritischer Zellen	38
3.3.	Vakzinierung von genetisch empfindlichen BALB/c Mäusen mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen	39
3.3.1.	Austestung von CpG 1826 als Adjuvanz	40
3.3.2.	Austestung der DC-Vakzinierung im <i>low</i> und <i>high dose</i> Infektionsmodell	41
3.3.3.	Quantifizierung der läSIONalen Parasitenlasten	42
3.3.4.	Bestimmung der Zytokinprofile in den drainierenden Lymphknoten	44
3.4.	Vakzinierung von genetisch resistenten C57BL/6 Mäusen mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen	45
3.4.1.	Austestung der DC-Vakzinierung im <i>low</i> und <i>high dose</i> Infektionsmodell	45
3.4.2.	Quantifizierung der läSIONalen Parasitenlasten	47
3.4.3.	Bestimmung der Zytokinprofile in den drainierenden Lymphknoten	47
3.5.	<i>In vitro</i> Restimulierungsexperimente zur Charakterisierung der durch DC+TAT-LACK induzierten T-Zellen	49
3.5.1.	Quantifizierung der T-Zell-Proliferation	49
3.5.2.	Analyse der T-Zell-Proliferation nach Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen	50
3.5.3.	<i>In vitro</i> Restimulierung <i>Leishmania</i> -spezifischer T-Zellen mittels TAT-LACK transduzierter dendritischer Zellen	52

3.5.3.1.	Bestimmung des optimalen Verhältnisses von dendritischen Zellen und T-Zellen in der Co-Kultur	53
3.5.3.2.	Analyse der T-Zell-Proliferation nach <i>in vitro</i> Restimulation mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen	55
3.5.3.3.	Analyse der Zytokinprofile von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Restimulation mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen	56
3.6.	Depletionsexperimente	58
3.6.1.	Optimierung des Depletionsprotokoll	58
3.6.2.	Depletion von T-Zellen zum Zeitpunkt der DC-Vakzination in BALB/c Mäusen	59
3.7.	Vakzination mit dendritischen Zellen aus IL-12p40 defizienten Mäusen	61
3.8.	Direkte, proteinbasierte Vakzination mit TAT-LACK Fusionsproteinen	63
3.8.1.	Austestung von CpG 1826 als Adjuvanz	63
3.8.2.	Optimierung des proteinbasierten Vakzinationsprotokoll	65
3.8.3.	Quantifizierung der Aktivierung und Auswanderung von Langerhans-Zellen nach proteinbasierter Vakzination mit TAT-LACK Fusionsproteinen	66
4.	Diskussion	69
4.1.	Stammesspezifische Unterschiede in BALB/c und C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit <i>Leishmania major</i>	69
4.2.	Transduktion von BMDC mit TAT-LACK Fusionsproteinen	73
4.3.	Vakzination von BALB/c und C57BL/6 Mäusen mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen	75
4.4.	<i>In vitro</i> Restimulationsexperimente	81
4.5.	Depletionsexperimente	84
4.6.	Direkte, proteinbasierte Vakzination mit TAT-LACK Fusionsproteinen	87
4.7.	Ausblick	89

5.	Methoden	90
5.1.	Infektionsbiologische Methoden	90
5.1.1.	Kultivierung von promastigoten Leishmanien	90
5.1.2.	Isolierung metazyklischer Leishmanien	90
5.1.3.	Isolierung von amastigoten Leishmanien	91
5.1.4.	Herstellung von SLA (<i>soluble leishmania antigen</i>)	92
5.1.5.	Intradermale Infektion im Ohr	92
5.1.6.	Subkutane Infektion im Fuß	92
5.1.7.	Messung der Läsionsvolumina	92
5.1.8.	Bestimmung der läsionalen Parasitenlast	93
5.1.9.	Infektion von dendritischen Zellen mit Amastigoten	94
5.2.	Immunologische Methoden	94
5.2.1.	<i>Enzym-linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA)	94
5.2.1.1.	ELISA-Kits	94
5.2.1.2.	ELISA zu Quantifizierung von Ratten IgG	94
5.2.2.	<i>Magnetic Cell Sorting</i> (MACS)	96
5.2.3.	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (FACS)	96
5.3.	Proteinchemische Methoden	97
5.3.1.	Generierung von TAT-Fusionsproteinen	97
5.3.1.1.	Transformation von <i>E. coli</i>	97
5.3.1.2.	Expression der Proteine in <i>E. coli</i>	98
5.3.1.3.	Aufreinigung der exprimierten Proteine	98
5.3.2.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	99
5.3.3.	BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	101
5.4.	Zellbiologische Methoden	101
5.4.1.	Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark (BMDC)	101
5.4.2.	Transduktion dendritischer Zellen mit TAT-Fusionsproteinen	102
5.4.3.	Präparation von Lymphknotenzellen für <i>in vitro</i> Zellkulturexperimente	103
5.4.4.	Restimulierung von Lymphknotenzellen zur Bestimmung des Zytokinprofils	103
5.4.5.	Restimulierung von T-Zellen mit dendritischen Zellen	103

5.4.6.	Quantifizierung der T-Zell-Proliferation mittels CFSE-Färbung	104
5.4.7.	Präparation von Milzzellen zur Aufreinigung von T-Zellen	104
5.4.8.	Isolierung dermalen Zellen aus dem Ohr	104
5.4.9.	Färbung von Langerhans-Zellen in der Epidermis	105
5.4.10.	Aufreinigung von Lymphozyten aus dem Blut	105
5.4.11.	Herstellung von Zytospins	106
5.5.	Vakzinierungsexperimente	106
5.5.1.	DC-basierte Vakzinierung	106
5.5.2.	Proteinbasierte Vakzinierung	107
5.5.3.	Depletion von T-Zellen	107
5.6.	Zellkultur	107
5.6.1.	Kultivierung von Hybridomen in Zellkulturflaschen	107
5.6.2.	Kultivierung von Hybridomen im <i>CELLine</i> -System	108
5.6.3.	Zellen auftauen	108
5.6.4.	Zellen einfrieren	109
5.7.	Tierversuche	110
5.8.	Statistik	110
5.9.	Allgemeine Puffer und Medien	111
5.9.1.	PBS	111
5.9.2.	RPMI-Complete	111
6.	Materialien und Geräte	112
6.1.	Zelllinien und Parasiten	112
6.2.	Versuchstiere	112
6.3.	Antikörper	112
6.4.	Reagenziensätze (<i>Kits</i>)	113
6.5.	Reagenzien und Chemikalien	113
6.6.	Verbrauchsmaterialien	117
6.7.	Geräte	119
6.8.	Sonstige Materialien	120

7.	Literatur	122
-----------	------------------	------------

Abkürzungen

1x	einfach
10x	zehnfach
100x	hundertfach
20x	zwanzigfach
4x	vierfach
α -	anti-
Abb.	Abbildung
ACS	<i>American Chemical Society</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle(n) (<i>antigen presenting cell(s)</i>)
β gal	β -Galaktosidase
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BMDC	<i>bone marrow-derived dendritic cell(s)</i>
BSA	bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>carboxylfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE)</i>
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG ODN	Oligonukleotide mit nicht methylierten Cytosin-Guanosin Dinukleotiden
CPI und II	Cysteinproteinase Typ I und II
CTL	zytotoxische T-Zelle(n) (<i>cytotoxic T lymphocyte(s)</i>)
Cy5.5	<i>CyChrome</i>
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle(n) (<i>dendritic cell(s)</i>)
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco Mod's Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleinacid</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>enzym-linked immuno sorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward light scatter</i>)
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
gp63	Glykoprotein 63
h	Stunde(n)
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HIgG	Hamster IgG
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
i.d.	intradermal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon(e)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin(e)
IL-12p40 ^{-/-}	IL-12p40 defiziente Mäuse
IL12R	IL-12 Rezeptor
inf.	infiziert
iNOS	induzierbare Stickstoffoxid-Synthase (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
intraz.	intrazellulär

k	kilo
KMP-11	<i>kinetoplastid membrane protein-11</i>
L	LACK
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
l	Liter
LACK	<i>Leishmania homologue of receptors for activated C kinase</i>
LB	Luria-Bertani
LC	Langerhans Zelle(n) (<i>Langerhans cell(s)</i>)
LeIF	<i>Leishmania elongation initiation factor</i>
Lm	Leishmanien
LmSTII	<i>L. major homologue of the eukaryotic stress-inducible protein 1</i>
LN	Lymphknoten (<i>lymph node</i>)
LNC	Lymphknotenzellen (<i>lymph node cells</i>)
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
M	molar
mA	Milliampere
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>

n	Anzahl
nm	Nanometer
nM	nanomolar
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
O, OVA	Ovalbumin
p	p-Wert des <i>student's t test</i>
p.a.	<i>per analysis</i> (zur Analyse)
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PSA2	<i>promastigote surface antigen 2</i>
PTD	Proteintransduktionsdomäne (<i>protein transduction domain</i>)
R2a	Ratten IgG _{2a}
Rad	<i>radiation absorbed dose</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan (<i>subcutaneous</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SLA	lösliches <i>Leishmania</i> Antigen (<i>soluble leishmania antigen</i>)
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SP15	<i>salivary protein 15</i>

<i>spp.</i>	<i>Species</i>
SSC	Seitwärtstreulicht (<i>side scatter</i>)
Tab.	Tabelle
TAT	<i>transactivator protein</i>
TC	T-Zelle(n) (<i>t cell(s)</i>)
Tc	zytotoxische T-Zelle(n) (<i>cytotoxic T cell(s)</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th	T-Helferzelle(n)
TL	TAT-LACK
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TO	TAT-OVA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	<i>L. major</i> homologue of the eukaryotic thiol-specific antioxidant
T β gal	TAT- β -Galaktosidase
ü. N.	über Nacht
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
unbeh.	unbehandelt
UNICEF	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i>
vs.	<i>versus</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
Wo	Woche
WT	Wildtyp
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Zusammenfassung

In der murinen kutanen Leishmaniose ist die Ausheilung der Infektion mit dem Auftreten von schützenden CD4⁺ Th1- sowie CD8⁺ Tc1-Immunantworten assoziiert. Daher sollte eine wirksame Vakzine beide T-Zell-Populationen induzieren.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, daß mit TAT-LACK Fusionsproteinen effektiv gegen eine progressiv verlaufende Infektion mit *Leishmania major* in empfindlichen BALB/c sowie resistenten C57BL/6 Mäusen vakziniert werden kann. TAT-LACK konnte hierbei sowohl im DC- als auch im proteinbasierten Ansatz protektive Immunität verleihen. Das TAT-Peptid ist in der Lage, Proteine direkt in das Zytosol von DC zu schleusen und so den für die CD8⁺ T-Zell-Antworten erforderlichen MHC Klasse I Präsentationsweg einzuschlagen.

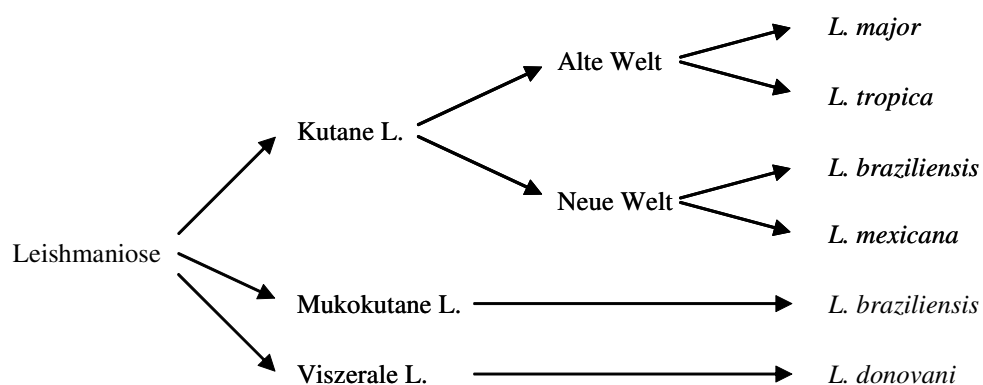
Stammesspezifische Untersuchungen des inflammatorischen Infiltrates in Läsion und Lymphknoten bestätigten die physiologische Relevanz von DC und CD8⁺ T-Zellen im Verlauf einer etablierten *Leishmania*-Infektion in beiden Mausstämmen und rechtfertigten somit den Einsatz einer DC basierten Vakzine, die vermehrt CD8⁺ T-Zellen induzieren sollte. Tatsächlich konnte mit TAT-LACK transduzierten DC in beiden Mausstämmen effektiv gegen eine progressiv verlaufende *Leishmania*-Infektion vakziniert werden. Der Vakzinierungserfolg ließ sich anhand verringerter Läsionsvolumina, reduzierter Parasitenlasten und einer Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung einer Th1 dominierten Immunantwort bestätigen. In allen Ansätzen war die i.d. Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC der Injektion von LACK gepulsten DC überlegen. Experimente mit DC aus IL-12p40 defizienten Mäusen belegten die IL-12 Abhängigkeit der Vakzine. Mit Hilfe von *in vitro* Restimulierungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, daß nach Applikation TAT-LACK transduzierter DC in beiden Mausstämmen vermehrt CD8⁺ T-Zellen induziert werden. Des weiteren waren TAT-LACK transduzierte DC in Restimulationsexperimenten stärkere Aktivoren der CD8⁺ T-Zell-Proliferation als LACK gepulste DC. Depletionsexperimente bestätigten die T-Zell-Abhängigkeit der Vakzine. Weitere *in vivo* Versuche belegten zudem die protektive Wirkung von TAT-LACK Fusionsproteinen im direkten, proteinbasierten Vakzinierungsansatz. Floreszenzmikroskopische Analysen der Epidermis bestätigten hierbei Aktivierung und Auswanderung von LC nach i.d. TAT-LACK Applikation.

2. Einleitung

2.1. Leishmaniose

Die Leishmaniose zählt zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Zur Zeit sind über 12 Millionen Menschen in 88 verschiedenen Ländern infiziert [1]. Ein Großteil davon sind Entwicklungsländer. Etwa zwei Millionen Menschen erkranken jährlich neu und 350 Millionen Menschen leben mit dem täglichen Risiko einer *Leishmania*-Infektion. Knapp 60.000 Patienten versterben pro Jahr an der Infektion. Ein wirksamer Impfstoff gegen die Infektionskrankheit existiert zur Zeit jedoch noch nicht.

Leishmaniosen werden durch obligat intrazelluläre Parasiten, den *Leishmania spp.*, hervorgerufen, die durch den Biß einer Sandmücke der Gattungen *Phlebotomus* oder *Lutzomyia* auf den Menschen übertragen werden. Kleinere Säugetiere, Nagetiere und Hunde fungieren ebenfalls als Zwischenwirte und spielen daher als „natürliche Reservoirs“ eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung der parasitären Erkrankung [2]. Mittlerweile sind über 20 verschiedene *Leishmania* Spezies bekannt, die die verschiedensten Symptome im Wirtsorganismus auslösen können [3]. Aufgrund des Gewebetropismus des jeweiligen Erregers werden drei Hauptformen der humanen *Leishmania*-Infektion unterschieden (Abb. 1).



Alte Welt: Afghansitan, Algerien, Iran, Irak, Saudi Arabien, Syrien

Neue Welt: Brasilien, Peru

Abb. 1 Die drei Hauptformen der Leishmaniose.

Leishmaniosen werden durch intrazelluläre Parasiten, den *Leishmania spp.*, hervorgerufen. Je nach Spezies, die bei einem Biß der Sandfliege auf den Menschen übertragen wird, unterscheidet man drei verschiedene Krankheitsmuster: die kutane, mukokutane und viszerale Leishmaniose [4].

90 % aller *Leishmania*-Erkrankungen gehören zu der kutanen Leishmaniose. Hierbei handelt es sich meist um eine selbstlimitierende Infektion der Haut ohne Systembeteiligung. Bei schlechter Immunlage des Wirtes können allerdings ausgedehnte Läsionen entstehen. Am Ort des Insektenbisses bilden sich granulomatöse und ulzeröse Hautläsionen (Aleppo- oder Orientbeule), die über mehrere Wochen an Größe zunehmen und in den meisten Fällen spontan nach einigen Monaten unter Narbenbildung abheilen [5]. Diese Form der Leishmaniose verläuft zwar nicht tödlich, allerdings verbleiben nach Ausheilung oft entstellende Narben an exponierten Körperstellen und die betroffenen Patienten sind für den Rest ihres Lebens stigmatisiert. Bei der mukokutanen Leishmaniosen finden sich Primärläsionen ähnlich denen der kutanen Form. Zusätzlich können hier Absiedlungen der Parasiten beobachtet werden, die vor allem die Schleimhäute von Nasen, Rachen, Lippen und Kehlkopf befallen. Die Letalität der mukokutanen Form hängt im hohen Maße von zusätzlichen Infektionen ab.

Bei der viszeralen Leishmaniose (Kala-Azar) kommt es nach Übertragung des Parasiten zum Befall der inneren Organe. Besonders betroffen sind Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten. Unbehandelt verläuft diese Krankheitsform zu 100 % tödlich.

Als Therapiemöglichkeiten stehen das Herausschneiden kleinerer Läsionen sowie die chemotherapeutische Behandlung mit fünfwertigem Antimon oder die Behandlung mit Amphotericin B zur Verfügung [6]. Die Therapien sind jedoch oft unzureichend und haben starke Nebenwirkungen. Neuere Forschungsbemühungen haben zur Entwicklung von Miltefosine (Hexadecylphosphocholin) geführt. Es ist das erste orale Medikament zur Behandlung der viszeralen Leishmaniose und wird bereits in Phase IV klinischen Studien getestet [7].

Leishmania-Infektionen sind weit verbreitet und treten vor allem in tropischen und subtropischen Regionen auf. In diesen Gebieten ist der Übertragungsvektor, die Sandmücke, endemisch. Auch für Europa sind *Leishmania*-Infektionen beschrieben. Betroffen sind hier unter anderem Frankreich, Italien, Griechenland, Malta, Spanien und Portugal [1].

Das vermehrte Auftreten von HIV/*Leishmania* Co-Infektionen führte vor allem in den letzten Jahren zu einer rasanten Ausbreitung der parasitären Erkrankung [8;9] (Abb. 2). Ein wirksamer Impfstoff, um diesen Entwicklungen entgegen treten zu können, existiert zur Zeit jedoch noch nicht.

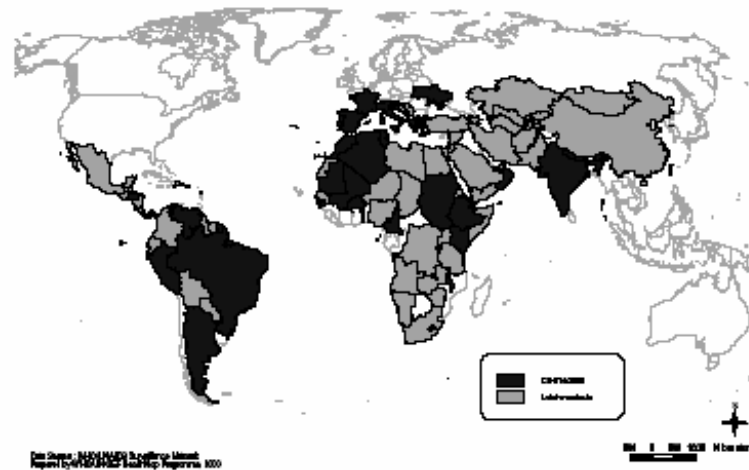


Abb. 2 Weltweite Verbreitung der Leishmaniose.

Leishmania-Infektionen treten vor allem in tropischen und subtropischen Regionen auf. Ein Großteil der betroffenen Staaten sind Entwicklungsländer. Aufgrund des vermehrten Auftretens von HIV/*Leishmania* Co-Infektionen hat sich die Krankheit in den letzten Jahren rasant ausgebreitet. In hellgrau sind von *Leishmania*-Infektionen betroffene Gebiete dargestellt. Die dunkelgrauen Bereiche kennzeichnen HIV/*Leishmania* Co-Infektionen. Quelle: WHO/UNAIDS Surveillance Network. Prepared by WHO/UNICEF HealthMap Network (2000).

2.2. Der Lebenszyklus von *Leishmania major*

Leishmania Parasiten werden durch den Biß einer Sandmücke auf den Menschen übertragen. Nur die weiblichen Fliegen saugen Blut, ohne das ein Heranreifen ihrer Eier nicht möglich wäre. In der Sandmücke liegen die Leishmanien in der hochinfektiösen, metazyklischen promastigoten Form, assoziiert an das Darmepithel, vor (Abb. 3). Bei einer Blutmahlzeit werden 10-1000 Parasiten zusammen mit dem Speichel intradermal auf den Wirt übertragen [10]. Nach Opsonisierung der Promastigoten mit Komplement werden sie von Makrophagen über den Komplementrezeptor CR3 aufgenommen [11;12] und wandeln sich in die obligat intrazelluläre, amastigote Form um [3;13]. Geschützt in den Phagolysosomen replizieren sie sich, um dann nach Ruptur des Wirts-Makrophagen neue Zellen zu infizieren. Viscerotrophe Spezies wie *L. donovani* migrieren über das lymphatische System und infizieren entfernte Wirtszellen, wohingegen dermatotrophe Spezies, wie *L. major*, am Ort der Inokulation verbleiben.

Während einer erneuten Blutmahlzeit können infizierte Makrophagen von Sandmücken aufgenommen werden. Im Darm der Fliege werden sie lysiert, und die freigesetzten Amastigoten wandeln sich in die extrazelluläre promastigote Form um. Diese verbleiben, assoziiert an das Darmepithel, in der Sandmücke, bis sie bei einem nächsten Biß auf einen neuen Wirt übertragen werden.

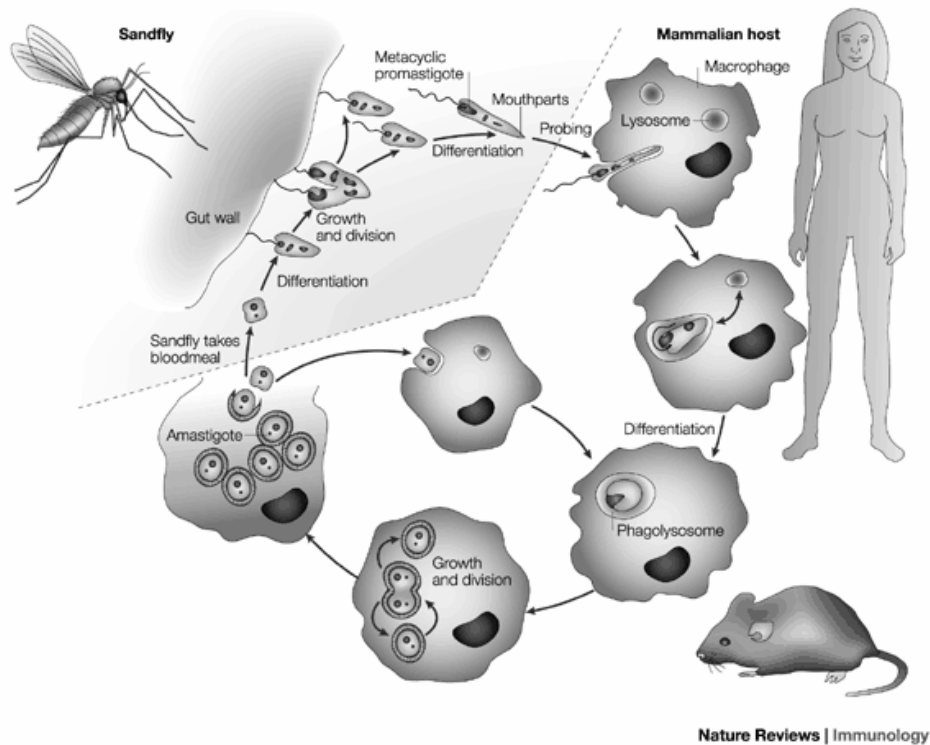


Abb. 3 Der Lebenszyklus von *Leishmania major*.

Durch einen Biß der Sandmücke werden promastigote Leishmanien auf den Wirt (u.a. Mensch und Maus) übertragen und von residenten Makrophagen der Dermis aufgenommen. Sie wandeln sich in die intrazelluläre, amastigote Lebensform um und können sich, geschützt in den Phago-Lysosomen, ungestört vermehren. Nach Ruptur der Wirtszellen werden sie ins Gewebe freigesetzt und können weitere Zellen infizieren. Bei einer erneuten Blutmahlzeit werden infizierte Makrophagen von der Sandmücke aufgenommen und im Darm lysiert. Die freigesetzten Amastigoten wandeln sich in die extrazelluläre, promastigote Lebensform um und verbleiben, assoziiert an das Darmepithel, bis zur nächsten Blutmahlzeit in der Sandmücke. Die Abbildung wurde [13] entnommen.

2.3. Die experimentelle murine kutane Leishmaniose

2.3.1. Das immunologische Th1/Th2-Konzept

Die murine kutane Leishmaniose ist eines der am besten etablierten Tiermodelle für das immunologische Th1/Th2-Konzept [14-16]. BALB/c Mäuse sind genetisch empfindliche Tiere. Sie entwickeln nicht heilende Läsionen mit systemischer Beteiligung und versterben an der Infektion mit *Leishmania major*, da sie vorwiegend IL-4 gesteuerte CD4⁺ Th2-Immunantworten ausbilden (Abb. 4). Die im Rahmen der humoralen Immunität gebildeten Antikörper sind nicht in der Lage, intrazelluläre Parasiten effizient zu eliminieren. Im Gegensatz dazu stehen genetisch resistente C57BL/6 Mäuse, die im Verlauf der Infektion spontan ausheilen und daraufhin lebenslange Immunität gegen Re-Infektion mit demselben Parasiten besitzen. Sie bilden hauptsächlich IL-12 gesteuerte, IFN- γ dominierte CD4⁺ Th1-

Immunantworten aus, welche intrazelluläre Leishmanien erfolgreich bekämpfen können. Schon seit Ende der 1980er Jahre ist bekannt, daß $CD4^+$ Th1-Zellen schützende Immunität vermitteln können [17;18]. *Leishmania*-spezifische $CD4^+$ Th1-Zellen werden in drainierenden Lymphknoten durch antigenpräsentierende dendritische Zellen (DC) induziert und die aktivierten T-Zellen wandern daraufhin in die Haut zum Ort der Infektion. Durch die Freisetzung von $IFN-\gamma$ aktivieren sie infizierte Makrophagen, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (wie z.B. NO) zu bilden, um so intrazelluläre Leishmanien abtöten zu können [3]. Vor einigen Jahren konnte schließlich gezeigt werden, daß auch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen eine entscheidende Rolle für die protektive Immunität in C57BL/6 Mäusen spielen [19-22]. Die Ausheilung der *Leishmania*-Infektion erfordert daher sowohl die Induktion von $CD4^+$ Th1 als auch von $CD8^+$ Tc1 Zellen.

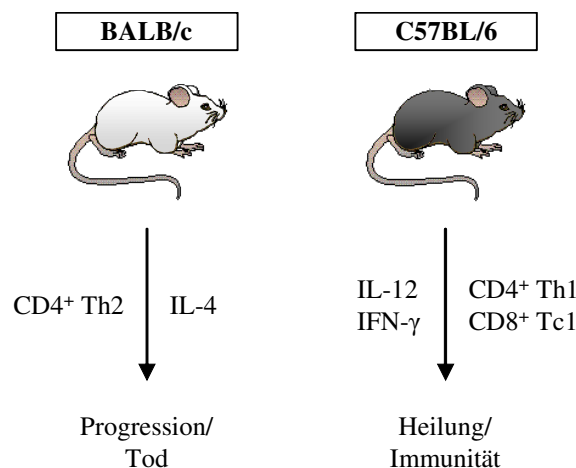


Abb. 4 **Resistenz und Suszeptibilität in der murinen kutanen Leishmaniose.**

BALB/c Mäuse sind genetisch empfindliche Tiere. Sie versterben an der Infektion mit *Leishmania major*, da sie vorwiegend IL-4 gesteuerte $CD4^+$ Th2-Immunantworten ausbilden. Im Gegensatz dazu stehen resistente C57BL/6 Mäuse, die im Verlauf der Infektion spontan ausheilen. Sie generieren hauptsächlich IL-12 gesteuerte, $IFN-\gamma$ dominierte $CD4^+$ Th1- und $CD8^+$ Tc1-Antworten und besitzen lebenslange Immunität gegen Re-Infektion mit demselben Parasiten.

Die *Leishmania major*-Infektion in resistenten C57BL/6 Mäusen wird als Modell für die selbstheilende, kutane Leishmaniose im Menschen betrachtet. Die Infektion in empfindlichen BALB/c Mäusen entspricht eher der humanen, viszeralen Leishmaniose mit systemischer Beteiligung. Im Gegensatz zum murinen Modell ist die Th1/Th2-Dichotomie in der humanen Leishmaniose nur im Gewebe von infizierten Patienten deutlich ausgebildet [23]. Die Immunantworten durch PBMC im Blut sind vielmehr durch das Auftreten gemischter Th1-

und Th2-Antworten gekennzeichnet [24], wie sie in mild verlaufenden Formen der kutanen Leishmaniose beobachtet werden können [25]. In schwerer verlaufenden Infektionen ist dagegen keine IFN- γ gesteuerte, Th1-vermittelte Immunität mehr nachweisbar. Ausgeprägte IL-4 vermittelte, humorale Immunität mit hohen Antikörpertitern sowie stark verminderten zellulären Immunantworten sind charakteristisch für die aktive Phase einer viszeralen Infektion. Eine erfolgreiche Chemotherapie resultiert dann in der Wiederherstellung der zellulären Immunität mit gemischten Th1/Th2-Immunantworten [24].

2.3.2. Infektionsmodelle

Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden zwei verschiedene Infektionsmodelle unterschieden. Im sogenannten *high dose* Modell werden den Mäusen intradermal 2×10^5 metazyklische Promastigote injiziert. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, daß sich Läsionen bereits innerhalb der ersten Woche nach Infektion ausbilden. Im sogenannten *low dose* Modell werden lediglich 1.000 metazyklische Leishmanien intradermal appliziert. Letzteres besitzt im Vergleich zum *high dose* Modell größere physiologische Relevanz, da in der Natur bei einem Biß der Sandmücke auch nur 10-1.000 Leishmanien übertragen werden [26]. Dieser Ansatz hat jedoch experimentell gesehen den Nachteil, daß erste Läsionen erst ab Woche drei meßbar sind und der gesamte Infektionsverlauf zeitlich in die Länge gestreckt wird.

Die Inokulation der Parasiten erfolgt intradermal in das Ohr der Mäuse und ist damit der subkutanen Injektion in die Fußsohle aufgrund größerer physiologischer Relevanz überlegen. Zudem lassen sich intradermal in das Ohr gesetzte Granulome exakter in allen drei Dimensionen vermessen. Die subkutane Infektion in der Fußsohle ermöglicht lediglich die Messung der Fußschwellung. Methodisch läßt sich die Einwanderung von Entzündungszellen am besten nach Infektion der Ohrdermis charakterisieren [27]. Zudem sind die drainierenden, submandibulären Lymphknoten für weitere Analysen leicht zugänglich [26].

2.3.3. Ablauf einer *low dose* Infektion mit *Leishmania major* in resistenten C57BL/6 Mäusen

Belkaid *et al.* konnten zeigen, daß die *low dose* Infektion von C57BL/6 Mäusen in zwei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden kann [28]. Nach Inokulation promastigoter Leishmanien werden diese von residenten Makrophagen und Fibroblasten [29] aufgenommen und wandeln sich in die intrazelluläre, amastigote Form um. Die phagozytierten Parasiten

unterbinden die Initiierung der schützenden anti-*Leishmania* Immunantwort, indem sie die Antigenpräsentation [30-32], die Expression co-stimulatorischer Moleküle [33-35] und die Produktion von IL-12 [36-39] ihrer Wirts-Makrophagen inhibieren. Zudem unterbinden sie die Induktion der iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), die über die Produktion von oxidativem NO maßgeblich an der Beseitigung des Parasiten beteiligt ist [40]. Die aufgenommenen Leishmanien können sich daher ungestört in den Makrophagen replizieren und nach Ruptur der Wirtszelle weitere Zellen infizieren. Diese sogenannte „*silent*“ phase ist durch einen rasanten Anstieg der läSIONalen Parasitenlast gekennzeichnet, zeigt ansonsten aber keinerlei Pathologie.

Mit der Einwanderung von Entzündungszellen (Neutrophilen, Makrophagen und Eosinophilen) in die Dermis beginnt die zweite Phase der Infektion. Sie geht mit Granulombildung und gleichzeitiger Reduktion der Parasitenlast einher. Aufgrund freigesetzter Zytokine und Chemokine werden weitere Entzündungszellen, darunter auch T-Zellen und DC, angezogen. Die T-Zell-vermittelte, IFN- γ gesteuerte Aktivierung infizierter Makrophagen führt letztendlich zur Elimination des Parasiten [41].

2.3.4. Die Bedeutung dendritischer Zellen in resistenten C57BL/6 Mäusen

Makrophagen sind die ersten Zellen, die nach Inokulation der Leishmanien in der Dermis infiziert werden [3]. Über den Komplementrezeptor CR3 können sie sowohl die inokulierte promastigote als auch die von bereits lysierten Makrophagen freigesetzte amastigote Lebensform phagozytieren [42]. Für die Initiierung der protektiven, T-Zell-vermittelten Immunantwort spielen sie jedoch keine Rolle, da die Antigenpräsentation über MHC-Moleküle und die Wanderung in die drainierenden Lymphknoten nach Infektion durch den Parasiten inhibiert werden. Diese Aufgabe fällt den DC zu, die damit eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung der *Leishmania*-Infektion spielen. Ruhende DC der Epidermis, die sogenannten Langerhans-Zellen (LC), werden durch Phagozytose amastigoter Leishmanien aktiviert, exprimieren daraufhin vermehrt MHC Klasse I und Klasse II Moleküle sowie die co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD54, CD80, CD86 und sezernieren verstärkt IL-12 [43]. Die gleichzeitige Herunterregulation des Adhäsionsmoleküles E-Cadherin ermöglicht die Wanderung der infizierten DC in die drainierenden Lymphknoten [44], wo sie, in Anwesenheit von IL-12, protektive, Th1 und Tc1 dominierte Immunantworten induzieren können. Die induzierten T-Zellen migrieren in das infizierte Gewebe und aktivieren über die

Freisetzung von IFN- γ die infizierten Makrophagen, intrazelluläre Leishmanien mittels iNOS abzutöten.

Im Gegensatz zu Makrophagen nehmen DC die Leishmanien über den Fc γ -Rezeptor auf [45]. Daher können DC nur die IgG-opsonisierte, amastigote Lebensform phagozytieren, die zuvor aus lysierten Makrophagen freigesetzt werden muß. Die Aufnahme der von der Sandmücke inokulierten promastigoten Leishmanien ist nicht möglich. Die Infektion der DC erfolgt daher erst zu einem späteren Zeitpunkt der *Leishmania*-Infektion, wenn Amastigote in das Gewebe freigesetzt wurden. Das erklärt das verzögerte Auftreten T-Zell-vermittelter Immunität, wie es in der murinen kutanen Leishmaniose beobachtet werden kann [3;28].

DC spielen nicht nur eine wichtige Rolle als Verbindungsglied zwischen angeborener und erworbener Immunität, sondern sie tragen möglicherweise auch entscheidend zur Aufrechterhaltung der lebenslangen Immunität gegen Re-Infektion mit demselben Parasiten bei [42]. Die Ausheilung der *Leishmania*-Infektion in C57BL/6 Mäusen geht nicht mit einer vollständigen Eliminierung der Parasiten einher. Vielmehr verbleibt eine kleine Anzahl an Erregern in den ausgeheilten Tieren [46;47]. Infizierte DC in den drainierenden Lymphknoten präsentieren möglicherweise den Gedächtnis-T-Zellen *Leishmania*-Antigene und halten so eine IL-12 gesteuerte, Th1-polarisierte Immunantwort aufrecht. Die Persistenz von *Leishmania major* in ausgeheilten Mäusen ist IL-10 abhängig [48], welches von regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen sezerniert wird [49].

2.3.5. Die Rolle von dendritischen Zellen in empfindlichen BALB/c Mäusen

BALB/c Mäuse versterben an der Infektion mit *Leishmania major*, da sie hauptsächlich IL-4 gesteuerte Th2-Immunantworten ausbilden. Da die Induktion *Leishmania*-spezifischer T-Zellen im drainierenden Lymphknoten durch infizierte DC aus dem Gewebe erfolgt, lag die Vermutung nahe, daß die Qualität der DC für die resultierende Immunantwort verantwortlich ist. Überraschenderweise werden Langerhans-Zellen aus BALB/c Mäusen ebenfalls durch eine Infektion mit *Leishmania major* aktiviert, exprimieren vermehrt MHC Klasse I und II sowie co-stimulatorische Moleküle und sezernieren verstärkt IL-12 [50]. Im Gegensatz zu LC aus resistenten C57BL/6 Tieren produzieren sie jedoch deutlich weniger IL-1 α [51] und IL-1 β [52]. *In vivo* Experimente belegen, daß substituiertes IL-1 α die T-Zell-Differenzierung in Richtung einer Th1-Antwort regulieren kann.

2.3.6. Die Rolle von CD8⁺ T-Zellen in der murinen kutanen Leishmaniose

Die Tatsache, daß CD8⁺ T-Zellen für die Ausheilung einer *Leishmania*-Infektion erforderlich sind, ist eine relativ neue Erkenntnis. Lange Zeit hat man geglaubt, daß sie nur für die Immunität gegen eine Re-Infektion mit demselben Parasiten, also für die Gedächtnisantwort, wichtig sind [20;21;53]. In resistenten C57BL/6 Tieren wurden zwar höhere Frequenzen an *Leishmania*-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gefunden als in empfindlichen BALB/c Mäusen, eine schützende Rolle bei der primären Infektion wurde ihnen jedoch nicht zugesprochen [54;55]. Nach Depletion CD8⁺ T-Zellen in resistenten Tieren zeigten diese zwar einen verschlechterten Krankheitsverlauf, heilten aber letztendlich doch aus [55]. Ähnliche Ergebnisse wurden in CD8 und β_2 -Mikroglobulin defizienten Tieren gefunden [56-58]. In allen bisher genannten Studien wurden die Leishmanien in großen Mengen (*high dose*) subkutan in die Fußsohle injiziert. Im Gegensatz dazu konnte nach Verwendung des physiologisch relevanteren *low dose* Modells, in dem lediglich 100-1.000 Parasiten intradermal in das Ohr appliziert wurden, sehr wohl eine Bedeutung der CD8⁺ T-Zellen für die primäre Infektion nachgewiesen werden [19]. CD8 depletierte und defiziente C57BL/6 Mäuse waren nicht mehr in der Lage, die Infektion mit *Leishmania major* unter Kontrolle zu bekommen. Zudem waren T-Zell-defiziente RAG^{-/-} Mäuse nach adoptivem Transfer *Leishmania*-spezifischer CD8⁺ T-Zellen aus infizierten C57BL/6 Tieren gegen eine Infektion mit *Leishmania major* geschützt.

CD8⁺ T-Zellen tragen wohl hauptsächlich durch Freisetzung von IFN- γ zur schützenden anti-*Leishmania* Immunantwort bei, wodurch infizierte Makrophagen aktiviert werden, phagozytierte Parasiten abzutöten [13]. Obwohl Perforin defiziente C57BL/6 Mäuse gegen eine Infektion mit *Leishmania major* resistent waren [59], könnten zytotoxische CD8⁺ T-Zellen dennoch über ihre zytolytische Aktivität zur Eliminierung infizierter Wirtszellen beitragen [22;60;61]. So konnte gezeigt werden, daß CD8⁺ T-Zellen in Mäusen, die eine primäre Infektion mit *Leishmania major* ausgeheilt haben, zytolytische Aktivität besitzen [22]. Weitere Studien konnten zeigen, daß sowohl die IFN- γ Produktion als auch die zytotoxische Aktivität CD8⁺ T-Zellen für die protektive Immunantwort in vakzinieren C57BL/6 Mäusen erforderlich sind [61].

2.4. Entwicklung eines Leishmaniose-Impfstoffes

Forschergruppen auf der ganzen Welt beschäftigen sich bereits seit Jahrzehnten mit der Entwicklung einer *Leishmania*-Vakzine. Dennoch existiert bis zum jetzigen Zeitpunkt kein

wirksamer Impfstoff. Nicht zuletzt die starke Ausbreitung der Infektionskrankheit in den letzten Jahren betont jedoch die Notwendigkeit einer schützenden Vakzine.

Es gibt verschiedenste Ansätze, einen Impfstoff zu entwickeln. Die Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß vor allem DC- und DNA-basierte Vakzinierungsansätze langanhaltende Protektion vermitteln, da nur sie die für die Gedächtnisimmunantwort erforderlichen CD8⁺ T-Zellen induzieren können.

2.4.1. Anforderungen an einen *Leishmania*-Impfstoff

Ziel einer Vakzinierung ist die Auslösung einer adaptiven Immunantwort, die gegen eine spätere Infektion mit dem eigentlichen Erreger schützende Immunität verleiht. Ein guter Impfstoff sollte einige grundlegende Eigenschaften aufweisen [62]: Er muß sicher sein und sollte nach möglichst wenigen Immunsierungen langandauernde Immunität verleihen. Er muß frei von tierischen Komponenten sein, die zur möglichst kostengünstigen Herstellung des Impfstoffes benötigt werden, und er sollte im Idealfall sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eingesetzt werden können.

Die Entwicklung einer wirksamen Vakzine gegen die Leishmaniose im Speziellen hätte den Vorteil, daß ein einziger Impfstoff gegen eine Vielzahl verschiedener *Leishmania spp.* schützen könnte [62]. Eine langandauernde, protektive anti-*Leishmania* Immunantwort erfordert sowohl die Induktion von CD4⁺ Th1- als auch CD8⁺ Tc1-Zellen sowie die anhaltende Produktion von IL-12 [13]. Lange Zeit wurde postuliert, daß auch die Persistenz einer geringen Anzahl an Parasiten in ausgeheilten Tieren für die Immunität gegen eine Re-Infektion erforderlich ist [13]. Neuere Publikationen bestätigen jedoch die Induktion langanhaltender Gedächtnisimmunantworten in Abwesenheit persistierender Parasiten [63].

2.4.2. „*Leishmanization*“ - Vakzinierung mit lebenden Parasiten

Die Injektion lebender, virulenter Leishmanien in verdeckte Körperbereiche, um so vor Läsionen an exponierten Körperteilen zu schützen, bezeichnet man als „*leishmanization*“. Bereits seit der Antike ist bekannt, daß Menschen, die einmal eine kutane Leishmaniose ausgeheilt haben, gegen eine erneute Infektion geschützt sind [64]. Impfungen mittels „kontrollierter Infektionen“ durch virulente, promastigote Leishmanien wurden erstmals 1937 in der ehemaligen Sowjetunion durchgeführt und nach Standardisierung in verschiedenen Studien eingesetzt [62]. Die größten Nachteile dieser Methode waren das Auftreten großer,

unkontrollierter Hautläsionen sowie die Verschlechterung anderer Hauterkrankungen, wie z. B. der Psoriasis [64]. Daher ging man zu sichereren, allerdings nicht so wirksamen Vakzinierungsansätzen mit abgetöteten Erregern über. So konnte die Injektion abgetöteter *Leishmania major* Parasiten mit BCG als Adjuvanz keinen langanhaltenden Schutz gegen die kutane Leishmaniose vermitteln [65;66]. Im Mausmodell konnte bestätigt werden, daß durch Immunisierung mit abgetöteten Parasiten und Adjuvanz nur kurzzeitige und keine langanhaltende Immunität induziert werden konnte [67].

2.4.3. Vakzinierung mit rekombinanten Proteinen

Die Immunisierung mit lebenden Parasiten hat neben den oben genannten Nebenwirkungen den Nachteil, daß sie nicht reproduzierbar ist. Die Infektiosität der Leishmanien variiert von Charge zu Charge und ein einheitlicher Impfstoff ist daher nur schwer herstellbar. Rekombinante Proteine sind definierte Moleküle und daher geeignete Kandidaten für einen reproduzierbaren Impfstoff. In den letzten Jahren wurden eine Reihe potentieller *Leishmania*-Antigene identifiziert und DNA- oder proteinbasiert in Vakzinierungsversuchen eingesetzt. Dabei konnte vor allem mit DNA-basierten Impfstrategien langandauernde Immunität in resistenten und empfindlichen Tieren induziert werden [13].

Es ist bekannt, daß Bestandteile des bei einem Biß der Sandmücke übertragenen Speichels den progressiven Verlauf der *Leishmania*-Infektion fördern. Dies ist, zumindest zum Teil, auf eine verstärkte Th2-Immunantwort zurückzuführen [68]. Wurden bei der Infektion von BALB/c und C57BL/6 Mäuse Parasiten und Speichel co-injiziert, kam es zu einer deutlichen Verschlechterung der Infektion. Die Mäuse waren jedoch geschützt, wenn sie zuvor mit isoliertem Speichel immunisiert wurden [26]. Mittlerweile wurden die Speichelproteine SP15 und Maxadilan charakterisiert, die, als Vakzine eingesetzt, protektive Immunität gegen eine Infektion mit *Leishmania major* vermitteln konnten [69;70].

In Tabelle 1 sind die wichtigsten *Leishmania*-Antigene zusammengefaßt. Im weiteren soll das Antigen LACK genauer beschrieben werden.

CP I und II (Cysteinproteinase Typ I und II) [71] gp63 (Glykoprotein 63) [72-75] Histone H1 [76] LACK (<i>Leishmania</i> homologue of receptors for activated C kinase) [77-79] LmSTH1 (<i>L. major</i> homologue of the eukaryotic stress-inducible protein 1) [80]	LmSTH1+TSA+LACK [67] Maxadilan (Protein aus dem Speichel der Sandmücke) [70] PSA2 (promastigote surface antigen 2) [81;82] SP15 (salivary protein 15) [69] TSA (<i>L. major</i> homologue of the eukaryotic thiol-specific antioxidant) [80;83]
---	---

Tabelle 1 **Die wichtigsten *Leishmania*-Antigene.**

Definierte, rekombinante Proteine sind ideale Kandidaten für einen reproduzierbaren *Leishmania*-Impfstoff. Alle aufgeführten Antigene wurden bereits Protein- oder DNA-basiert in Vakzinierungsversuchen im Modell der murinen Leishmaniose eingesetzt. Quelle [13].

2.4.3.1. **LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase)**

Das 36 kDa große *Leishmania*-Protein LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase) ist eines der am besten geeigneten Antigene für Vakzinierungsansätze, da es stark immunogen ist [84] und in beiden Lebensformen von *Leishmania spp.* gleichermaßen exprimiert wird [79]. Über die molekulare Funktion des Proteins ist bisher wenig bekannt. Man weiß, daß es in *Leishmania infantum* nahe des Kinetoplasten lokalisiert ist und Wechselwirkungen mit Proteinen, die an der DNA-Replikation und RNA-Synthese beteiligt sind, eingeht [85]. Deletionsexperimente in *Leishmania major* konnten zeigen, daß LACK sowohl für die Viabilität als auch für die Infektiosität des Parasiten unerlässlich ist [86].

LACK trägt entscheidend zur Pathogenese in *Leishmania*-empfindlichen BALB/c Mäusen bei und ist gerade deshalb als Antigen für Vakzinierungsexperimente interessant. Innerhalb der ersten drei bis vier Tage nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major* wird ein von I-A^d MHC Klasse II-Molekülen präsentiertes dominantes LACK-Peptid von spezifischen, naiven CD4⁺ T-Zellen erkannt. Diese Zellen exprimieren Vβ4/Vα8 T-Zell-Rezeptoren und sezernieren nach Aktivierung große Mengen an IL-4, welches für die resultierende Th2-Immunantwort und somit für die progressiv verlaufende Infektion in BALB/c Mäusen verantwortlich ist [79;87-89]. Julia *et al.* konnten zeigen, daß LACK-spezifische CD4⁺ T-Zellen auch in resistenten B10.D2 Mäusen zur frühen Produktion von IL-4 beitragen [90]. Resistente Mausstämme sind jedoch im Gegensatz zu BALB/c Tieren in der Lage, die frühe Th2 dominierte Immunantwort in eine Th1-Antwort umzukehren.

Aufgrund seiner Bedeutung für die resultierende Immunantwort wurde das LACK-Antigen bereits in zahlreichen DNA- und proteinbasierten Vakzinierungsexperimenten eingesetzt. Die Immunisierung von suszeptiblen BALB/c Mäusen mit einem trunkierten, 24 kDa großen LACK-Protein (Aminosäuren 143-312 [79]) vermittelte, bei gleichzeitiger Injektion von

IL-12 als Adjuvanz, Protektion gegen eine progressiv verlaufende *Leishmania*-Infektion [73;77]. Langanhaltende anti-*Leishmania* Immunität konnte jedoch nur nach Vakzinierung mit LACK Plasmid-DNA beobachtet werden [78;91;92], da nur bei diesem Ansatz die erforderliche Induktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie die andauernde Präsentation von Antigen gewährleistet war [13]. Auch in resistenten C57BL/6 Mäusen konnte mit Hilfe von LACK-DNA gegen eine Infektion mit *Leishmania major* vakziniert werden [67]. Die Injektion von Plasmid-DNA war der Immunisierung mit abgetöteten Leishmanien plus IL-12 als Adjuvanz überlegen und schützende Immunität konnte noch in der zwölften Woche nach Vakzinierung beobachtet werden.

2.4.4. DC-basierte Vakzinierungen

Eine wirksame Vakzine gegen eine Infektion mit *Leishmania major* sollte neben CD4⁺ auch CD8⁺ T-Zellen induzieren. Ein Weg, dies zu erreichen, ist die oben beschriebene Immunisierung mit Plasmid-DNA. Eine weitere Möglichkeit stellt die Vakzinierung mit antigenbeladenen DC dar. DC sind professionelle antigepräsentierende Zellen (APC). Sie sind spezialisiert auf die Aufnahme von Antigenen, die Wanderung zu sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten und die Aktivierung von T-Zellen [93;94]. DC sind die potentesten APC des Organismus, da sie neben CD4⁺ auch CD8⁺ T-Zellen aktivieren können und somit entscheidend zur Ausbildung der Gedächtnisimmunantwort beitragen [93;95]. Aufgrund ihrer Langlebigkeit ist zudem die kontinuierliche Präsentation von Antigenen gewährleistet [96].

In der Tumorummunologie konnten antigengepulste DC bereits zur Induktion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen eingesetzt werden [97;98]. Im Modell der murinen kutanen Leishmaniose konnte bereits erfolgreich mit infizierten DC gegen eine progressiv verlaufende Infektion in BALB/c Mäusen vakziniert werden [50]. Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch nach Injektion von DC, die mit Promastigotenlysat beladen wurden [99]. Nicht nur virulente Parasiten oder Parasitenlysate, sondern auch rekombinante Proteine fanden bereits als Antigene Anwendung. DC, die mit dem Protein LeIF oder einer Kombination aus den Proteinen LACK, KMP-11, gp63 und PSA gepulst wurden, waren ebenfalls in der Lage, in BALB/c Mäusen schützende Immunität gegen eine *Leishmania*-Infektion zu vermitteln [100]. Die DC-basierte Vakzinierung stellt somit nicht zuletzt aufgrund der Induktion CD8⁺ T-Zellen und der Langlebigkeit der DC eine vielversprechende Möglichkeit zur Induktion protektiver anti-*Leishmania* Immunität dar.

2.4.5. Adjuvanzien

Adjuvanzien wurden ursprünglich eingesetzt, um die Immunogenität des Antigens sowie die Stärke der resultierenden Immunantwort zu erhöhen. Im Zusammenhang mit einer *Leishmania*-Vakzine sollten sie zusätzlich die Immunantwort in Richtung einer schützenden Th1-Immunität modulieren. Ziel eines Impfstoffes ist die Induktion eines immunologischen Gedächtnisses. Daher sollte eine Adjuvanz gewählt werden, daß zur Induktion langanhaltender Immunantworten fähig ist. Die beiden am häufigsten eingesetzten, Th1-dirigierenden Adjuvanzien sind das Zytokin IL-12 und CpG Oligodeoxynukleotide (CpG ODN).

Zytokine sind Proteine und haben daher den Nachteil, daß sie *in vivo* nur eine kurze Halbwertszeit aufweisen. So konnte IL-12 in Kombination mit Promastigotenlysat [78] oder LACK-Protein [78;91] nur kurzzeitige Protektion gegen eine *Leishmania*-Infektion hervorrufen. Im Gegensatz dazu konnte mit einer Vakzine aus Leishmanienlysat und CpG dauerhafte, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-abhängige Immunität ausgelöst werden. C57BL/6 Mäuse waren noch sechs Monate nach der Immunisierung gegen eine Infektion geschützt [101]. Vakzinierungen mit lebenden Parasiten (*leishmanization*) führen zwar zu optimalem Schutz gegen eine natürliche *Leishmania*-Infektion, sind aber aufgrund ihrer Infektiosität nicht ungefährlich (siehe Abschnitt 2.4.2.). Durch Co-Injektion von Parasiten und CpG konnte der Krankheitsverlauf in C57BL/6 Mäusen deutlich abgeschwächt werden, ohne dabei den resultierenden Langzeitschutz zu minimieren [102]. CpG sind Deoxynukleotide mit nicht methylierten Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden, wie sie für mikrobielle DNA charakteristisch sind. Über TLR9 stimulieren sie in Makrophagen und vor allem in DC die Sekretion verschiedenster Th1-assoziiierter Zytokine (u.a. IL-12, IL-18, TNF- α und IFN- α) sowie die Hochregulation von co-stimulatorischen Molekülen wie CD40 und MHC Klasse II [103]. CpG ODN können eine Immunantwort sowohl in Richtung Th1 lenken als auch langanhaltende Gedächtnisimmunantworten induzieren und sind daher hervorragend als Adjuvanzien für eine *Leishmania*-Vakzine geeignet.

2.5. TAT-Fusionsproteine

2.5.1. TAT-vermittelte Proteintransduktion

1988 konnten Frankel und Green unabhängig von einander zeigen, daß exogenes HIV-1 TAT-Protein von Zellen aufgenommen wird, wenn es dem Zellkulturmedium zugefügt wird

[104;105]. Das 86 Aminosäuren große TAT-Protein ist *in vivo* ein starker Transaktivator und essentiell für die Virusreplikation [106-108]. Es ist in der Lage, Zellmembranen zu überwinden und direkt in das Zytosol der Zellen zu gelangen. Dieser Prozeß wird als Proteintransduktion bezeichnet. Alle bisher getesteten Zellen wurden vom TAT-Protein konzentrationsabhängig und innerhalb weniger Minuten transduziert [109]. Verantwortlich hierfür ist eine 11 Aminosäuren große, stark basische Domäne (YGRKKRRQRRR), die auch als Proteintransduktionsdomäne (*protein transduction domain*, PTD) bezeichnet wird [110;111]. Aufgrund der stark positiven Ladung der PTD kommt es in einem ersten Schritt zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Phospholipidmembran, bevor das Protein durch Makropinozytose von der Zelle aufgenommen wird [112]. Die resultierenden Makropinosome sind instabile Vesikel, die ihre Ladung in das Zytosol der Zelle freisetzen. Die PTD kann somit als Carriermolekül eingesetzt werden, um Proteine direkt in das Zytosol von Zellen zu schleusen. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl an TAT-Fusionsproteinen unterschiedlichster Größe generiert und für die Proteintransduktion eingesetzt [113-120]. *In vitro* Versuche belegten nach Transduktion die biologische Aktivität der Proteine innerhalb der Zelle [113]. Nach intraperitonealer Injektion des 120 kDa großen Fusionsproteins TAT- β -Galaktosidase in die Maus konnte eine Verteilung des Proteins im gesamten Organismus beobachtet werden [110].

2.5.2. Vakzinierung mit TAT-Fusionsprotein transduzierten dendritischen Zellen

Mit Hilfe von TAT-Fusionsproteinen können Antigene direkt in das Zytosol von DC geschleust werden, um so neben der MHC Klasse II auch die Klasse I abhängige Präsentation antigenen Peptide und letztendlich die Induktion zytotoxischer T-Zellen zu ermöglichen. Im Tumormodell konnte bereits erfolgreich mit TAT-Fusionsprotein transduzierten DC vakziniert werden und die beobachtete Protektion war CD8⁺ T-Zell-abhängig [121-123].

TAT-LACK transduzierte DC stellen somit eine vielversprechende Möglichkeit zur Vakzinierung gegen die murine kutane Leishmaniose dar. Die Wahl des stark immunogenen Antigens LACK gewährleistet eine starke, resultierende Immunantwort. Durch die DC-basierte Vakzinierung und die verstärkte Präsentation über MHC Klasse I Moleküle sind die Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen sowie die Induktion schützender, langanhaltender Immunität gewährleistet.

2.6. Ziele der Arbeit

Schützende Immunität gegen eine *Leishmania major*-Infektion, wie sie in resistenten C57BL/6 Mäusen zu beobachten ist, ist mit der Etablierung IFN- γ produzierender CD4⁺ Th1- und CD8⁺ Tc1-Immunantworten assoziiert. In genetisch empfindlichen BALB/c Mäusen resultiert die Ausbildung einer IL-4 gesteuerten Th2-Immunität in einer progressiv verlaufenden Infektion, an der die Mäuse letztendlich versterben.

Daß CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle für die schützende Immunität in resistenten C57BL/6 Mäusen spielen, ist bereits bekannt [19]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ihre Bedeutung in empfindlichen BALB/c Mäusen analysiert werden. Im Hinblick auf die Entwicklung einer DC-basierten Vakzine sollte des Weiteren die Rolle der während einer *Leishmania*-Infektion rekrutierten DC stammesspezifisch analysiert werden.

Eines der stärksten *Leishmania*-Antigene ist das Protein LACK. Es ist überaus immunogen und wird in beiden Lebensformen von *Leishmania spp.* gleichermaßen exprimiert. Als TAT-Fusionsprotein kann es Phagozytose unabhängig von DC aufgenommen werden und gelangt so direkt in das Zytosol der DC. Dadurch ist neben der MHC Klasse II-Präsentation auch eine vermehrte Präsentation antigenen Peptide über MHC Klasse I Moleküle und somit eine verstärkte Induktion schützender zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen gewährleistet. Im Tumormodell konnte bereits erfolgreich mit TAT-Fusionsprotein transduzierten DC vakziniert werden [121].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die immunmodulatorische Wirkung TAT-LACK transduzierter DC im Modell der murinen kutanen Leishmaniose untersucht werden. Es galt die Frage zu klären, ob TAT-LACK transduzierte DC in der Lage sind, verstärkt *Leishmania*-spezifische, CD8⁺ T-Zellen zu induzieren.

In *in vivo* Experimenten sollte untersucht werden, ob die Immunisierung mit TAT-LACK transduzierten DC der Injektion von LACK gepulsten DC bezüglich der Etablierung einer schützenden anti-*Leishmania* Immunität überlegen ist, und ob mit transduzierten DC in BALB/c und C57BL/6 Mäusen gegen eine progressiv verlaufende Infektion vakziniert werden kann.

In weiterführenden *in vitro* Analysen sollte dann untersucht werden, ob durch Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC tatsächlich vermehrt CD8⁺ T-Zellen in Mäusen beider Stämme induziert werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob TAT-LACK transduzierte

DC, besser als LACK gepulste DC, die Proliferation CD8⁺ T-Zellen aus infizierten Tieren induzieren können.

DC-basierte Vakzinierungen sind in der Herstellung sehr arbeitsaufwendig und kostspielig. Daher sollten TAT-LACK Fusionsproteine in einem weiteren experimentellen Ansatz direkt als proteinbasierte Vakzine in BALB/c Mäusen eingesetzt werden.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer DC-basierten Vakzine gegen die murine kutane Leishmaniose. Daher sollten zunächst Untersuchungen zur Relevanz von DC in der Leishmaniose durchgeführt werden. Es war bereits bekannt, daß DC eine wichtige Rolle bei der Ausheilung der Infektionskrankheit spielen. Inokulierte Parasiten werden von Langerhans-Zellen (LC), den DC der Epidermis, aufgenommen und im drainierenden Lymphknoten präsentiert [124;125]. Mit infizierten DC konnte bereits erfolgreich gegen eine progressiv verlaufende *Leishmania*-Infektion vakziniert werden [50;99]. Daher sollte als erstes die Rekrutierung von DC in die Läsionen sowie in die drainierenden Lymphknoten im Verlauf einer etablierten Infektion analysiert werden. Im Vordergrund stand hierbei die Frage nach stammesspezifischen Unterschieden in empfindlichen BALB/c und resistenten C57BL/6 Mäusen.

Grundlage der zu entwickelnden DC-Vakzine war die Transduktion der Zellen mit TAT-Fusionsprotein, um so neben CD4⁺ T-Zellen gezielt CD8⁺ T-Zellen induzieren zu können. Daß CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Ausheilung der *Leishmania*-Infektion spielen, war bereits für resistente C57BL/6 publiziert [19]. Erste Versuche sollten daher die Bedeutung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in genetisch empfindlichen BALB/c Mäusen analysieren.

3.1. Untersuchungen zu stammesspezifischen Unterschieden in BALB/c und C57BL/6 Mäusen nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major*

3.1.1. Charakterisierung des inflammatorischen Infiltrates in der Läsion und in den drainierenden Lymphknoten

Zur Bestimmung der inflammatorischen Infiltrate im Ohr und in den drainierenden, submandibulären Lymphknoten wurden BALB/c und C57BL/6 Mäuse durch intradermale Injektion von 2×10^5 metazyklische Leishmanien in beiden Ohren *high dose* infiziert. Das Volumen der entstehenden Granulome wurde wöchentlich vermessen (Abb. 5).

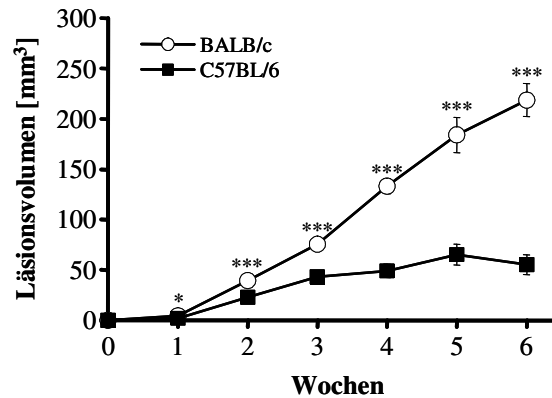


Abb. 5 Nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major* weisen BALB/c Mäuse signifikant größere Läsionsvolumina im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen auf.

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 2×10^5 metazyklischen Promastigoten intradermal in beiden Ohren infiziert. Die Läsionen wurden wöchentlich in allen drei Dimensionen vermessen. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten aus 6 unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 18$, * $p < 0,05$ und *** $p < 0,002$).

Erwartungsgemäß konnte bei BALB/c Mäusen der typisch progressive Infektionsverlauf in genetisch empfindlichen Tieren beobachtet werden. Zu allen Zeitpunkten wiesen sie statistisch signifikant größere Läsionsvolumina als die resistenten C57BL/6 Mäuse auf, deren Ausheilung in Woche 6 bereits wieder begonnen hatte. Die Tötung infizierter BALB/c Mäuse erfolgte, sobald Nekrosen am Ort der Infektion auftraten.

Sowohl vor als auch in wöchentlichen Abständen nach der Infektion wurden Ohren und drainierende Lymphknoten geerntet und die eingewanderten Entzündungszellen wurden im FACS charakterisiert.

Die Gesamtzellzahl in der Läsion korrelierte mit den gemessenen Läsionsgrößen (Abb. 6A). Im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen wiesen BALB/c Mäuse sowohl im Granulom als auch in den drainierenden Lymphknoten signifikant höhere Zellzahlen auf. Interessanterweise nahm die läsionale Gesamtzellzahl der C57BL/6 Mäuse in Woche 6 noch nicht wieder ab, wie es anhand des verringerten Läsionsvolumens (Abb. 5) zu erwarten gewesen wäre.

Im Vergleich zu resistenten C57BL/6 Mäusen rekrutierten BALB/c Mäuse signifikant mehr CD11c⁺ DC in das *Leishmania*-infizierte Ohr (Abb. 6B). In Woche 6 nach Infektion waren mehr als dreimal so viele DC in den Läsionen nachweisbar ($2,3 \pm 0,3 \times 10^6$ vs. $0,6 \pm 0,1 \times 10^6$ DC; *** $p \leq 0,002$). Im Lymphknoten konnten diese stammesspezifischen Unterschiede nicht bestätigt werden.

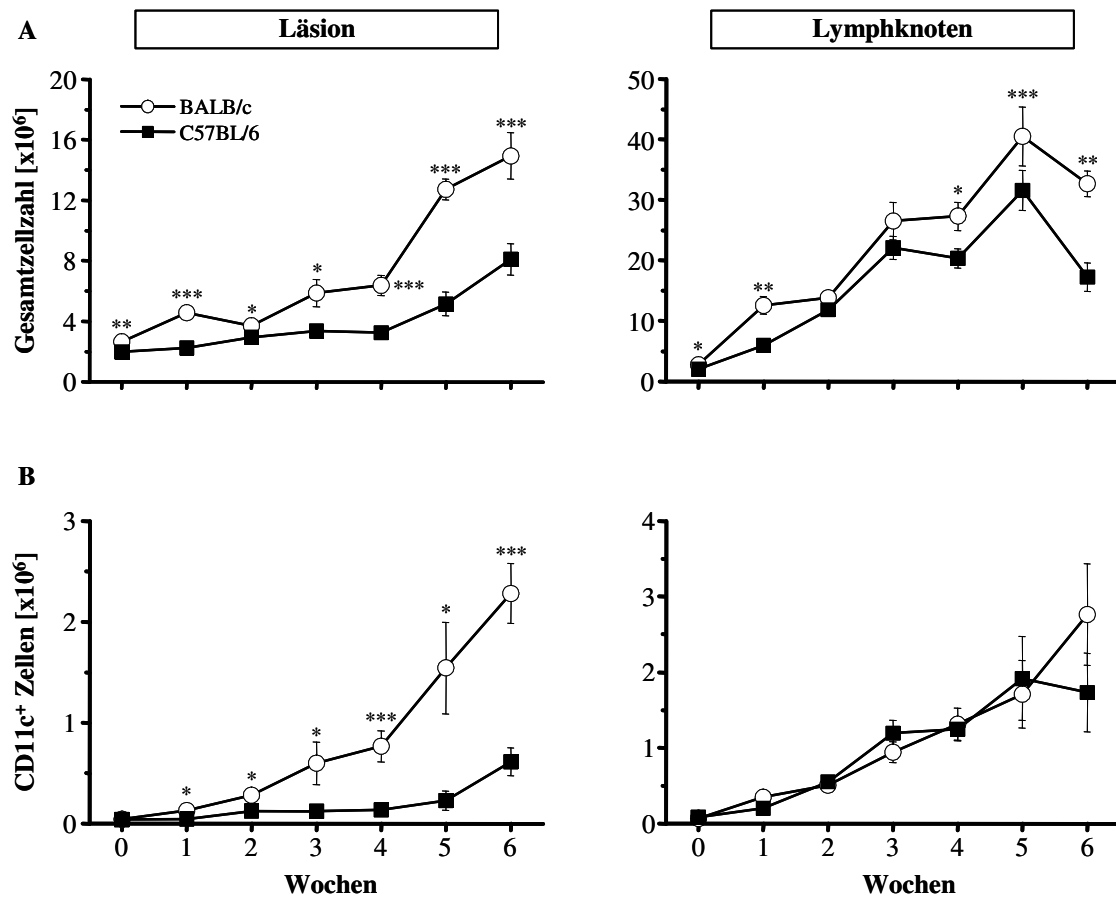


Abb. 6 Nach *high dose* Infektion weisen BALB/c Mäuse signifikant größere Zellzahlen im infizierten Ohr und Lymphknoten auf und rekrutieren mehr als dreimal so viele DC in die Läsion wie C57BL/6 Mäuse. BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 metazyklischen Promastigoten in beiden Ohren infiziert. Sowohl vor als auch in wöchentlichen Abständen nach der Infektion wurden Ohren und drainierende LN geerntet und das inflammatorische Infiltrat wurde im FACS analysiert. **A)** Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen der Zellen in Trypanblau bestimmt. **B)** Die Charakterisierung der DC erfolgte mittels α -CD11c mAk (HL3). Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten aus 7-9 unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 14$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,005$ und $***p \leq 0,002$).

Bezüglich der Einwanderung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in die *Leishmania*-Läsion konnten keine stammesspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 7A+B). Bei beiden Stämmen wanderten signifikant weniger $CD8^+$ als $CD4^+$ Zellen in das Ohr ein. Im Gegensatz dazu rekrutierten BALB/c Mäuse deutlich mehr $CD4^+$ T-Zellen in die drainierenden Lymphknoten. In Woche 4 wiesen sie mehr als doppelt so viele $CD4^+$ Zellen wie C57BL/6 Mäuse auf (107 ± 11 vs. $51 \pm 3,5$ $CD4^+$ TC; $***p \leq 0,002$). Im Hinblick auf $CD8^+$ T-Zellen konnten keine stammesspezifischen Unterschiede im Lymphknoten bestätigt werden.

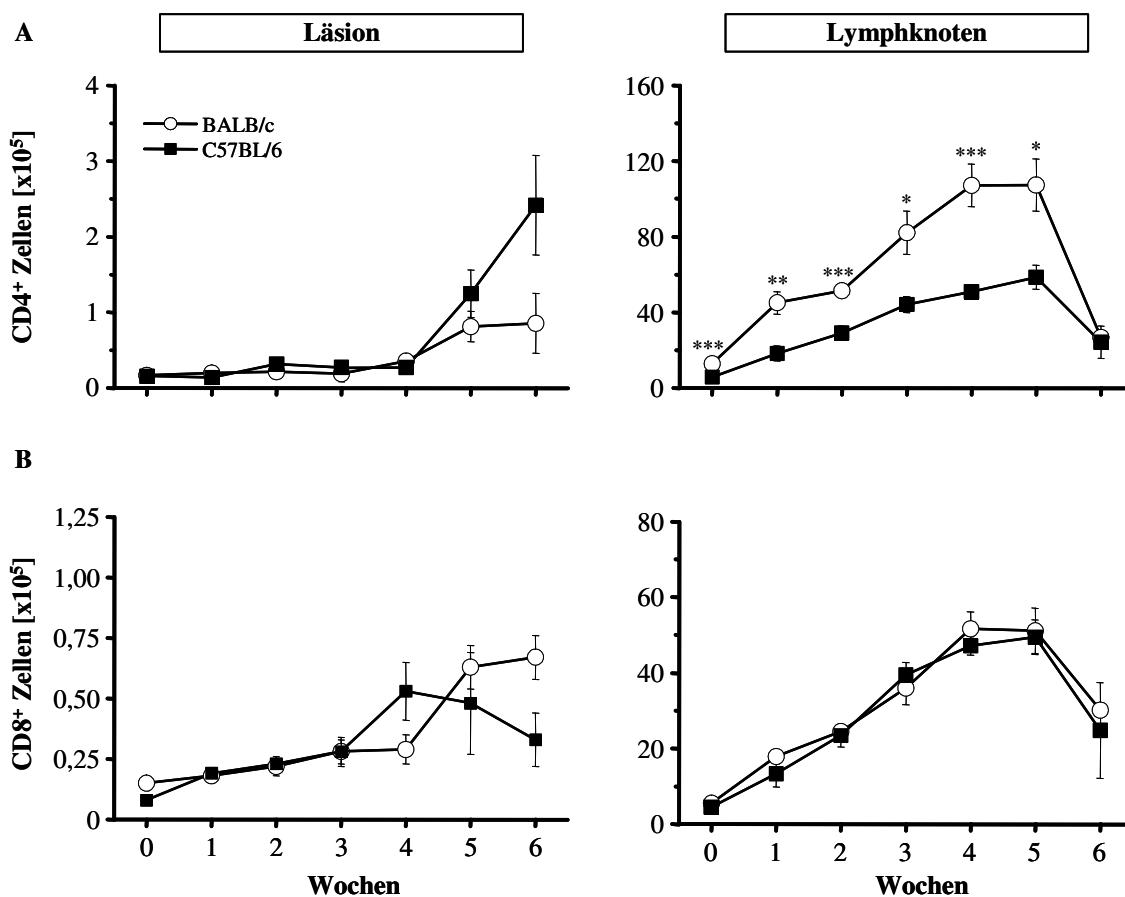


Abb. 7 Im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen rekrutieren BALB/c Mäuse nach *high dose* Infektion signifikant mehr CD4⁺T-Zellen in die drainierenden LN.

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 promastigoten Leishmanien *high dose* in beide Ohren infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Ohren und drainierende LN geerntet und die Einwanderung der T-Zellen wurde im FACS analysiert. **A)** CD4⁺ T-Zellen wurden durch Antikörper gegen das Oberflächenmolekül L3T4 angefärbt. **B)** CD8⁺ T-Zellen wurden durch Färbung des Oberflächenmarkers Ly-2 im FACS sichtbar gemacht. Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten aus 7-9 unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n \geq 14$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$)).

Fazit: Im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen rekrutierten BALB/c Mäuse deutlich mehr CD11c⁺ DC in das infizierte Ohr (Abb. 6B) sowie signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen in die drainierenden Lymphknoten (Abb. 7A). Die Einwanderung von CD8⁺ T-Zellen war bei beiden Stämmen vergleichbar (Abb. 7B). Trotzdem konnten BALB/c Mäuse die *Leishmania*-Infektion nicht unter Kontrolle bringen. Nicht die Rekrutierung der Zellen an sich, sondern vielmehr die Qualität dieser Zellen schien somit Einfluß auf den Infektionsverlauf auszuüben. Daher wurden in weiterführenden Experimenten der Infektions- und Aktivierungsstatus der DC sowie die proliferativen Eigenschaften der T-Zellen analysiert.

3.1.2. Charakterisierung rekrutierter dendritischer Zellen

3.1.2.1. Analyse des Infektionsstatus rekrutierter dendritischer Zellen

Zur Bestimmung des Infektionsstatus wurden $CD11c^+$ DC aus dem infizierten Ohr mittels *FACS*orting und aus dem drainierenden Lymphknoten mittels MACS-Aufreinigung angereichert, auf einen Zytospin aufgeschleudert und nach DiffQuick-Färbung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

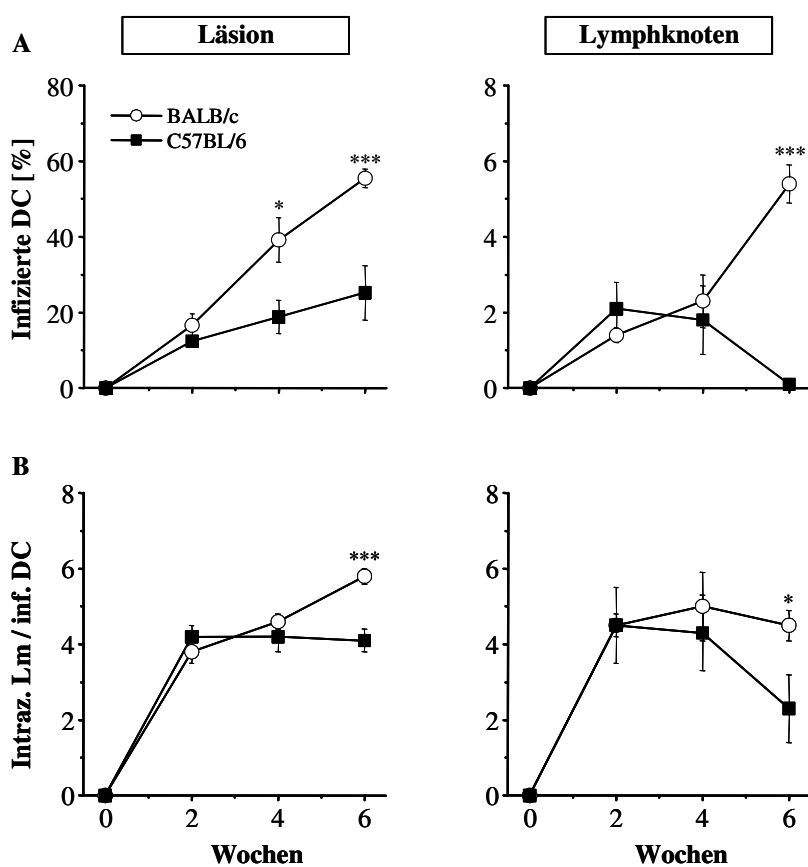


Abb. 8 Nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major* sind in BALB/c Mäusen signifikant mehr infizierte DC als in C57BL/6 Mäusen nachweisbar.

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 metazyklischen Leishmanien in beide Ohren infiziert. Das infizierte Gewebe sowie die drainierenden LN wurden in regelmäßigen Abständen geerntet und $CD11c^+$ DC wurden entweder mittels *FACS*orting (Läsion) oder MACS-Aufreinigung (LN) angereichert. Die isolierten DC wurden auf Zytospins aufgeschleudert und nach DiffQuick-Färbung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil infizierter DC (A) sowie die Anzahl intrazellulärer Leishmanien pro infizierter Zelle (B). Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten aus 3 unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 18$, $*p \leq 0,05$ und $***p \leq 0,002$)

Sowohl in Läsionen als auch in Lymphknoten von BALB/c Mäusen konnten signifikant höhere Zahlen infizierter DC nachgewiesen werden (Abb. 8A). Während die läsionalen

Infektionsraten beider Stämme bis Woche 6 anstiegen, konnte in den drainierenden Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen eine Abnahme infizierter DC auf weit unter 1 % beobachtet werden. Die Fähigkeit resistenter C57BL/6 Mäuse, die Infektion im Lymphknoten unter Kontrolle zu bekommen, wurde durch das vermehrte Abtöten intrazellulärer Leishmanien bestätigt (Abb. 8B). Sowohl in der Läsion als auch im Lymphknoten von BALB/c Mäusen konnte die *Leishmania*-Infektion bis Woche 6 nicht unter Kontrolle gebracht werden. Zudem waren diese Mäuse nicht in der Lage, intrazelluläre Parasiten effizient abzutöten.

Fazit: Obwohl in BALB/c Mäusen weit mehr DC nach Infektion rekrutiert wurden, welche zudem höhere Infektionsraten als DC aus resistenten C57BL/6 Mäusen aufwiesen, waren sie nicht in der Lage, schützende Immunantworten gegen den Parasiten zu initiieren. Dies ließ vermuten, daß infizierte DC aus empfindlichen BALB/c Mäusen nicht ausreichend genug aktiviert wurden, um als APC protektive T-Zell-Antworten zu induzieren. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen der Aktivierungsstatus rekrutierter DC analysiert.

3.1.2.2. Charakterisierung des Aktivierungsstatus rekrutierter dendritischer Zellen

Nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major* wurden infiziertes Gewebe und drainierende Lymphknoten in regelmäßigen Abständen geerntet, die Zellen wurden in Suspension gebracht und im FACS analysiert.

Abbildung 9 zeigt ein typisches FACS-Profil der isolierten Ohrzellen. Zunächst wurden durch das Zellgate R1 tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen (Abb. 9A). Danach wurden mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD45 auf Leukozyten gated (R2), in denen dann CD11c⁺ DC angesteuert wurden (R3, Abb. 9B). Zur Charakterisierung des DC-Aktivierungsstatus wurde die *mean fluorescence intensity* (MFI) der Oberflächenmoleküle CD40 und CD86 in den kombinierten gates R1, R2 und R3 bestimmt (Abb. 9C). Die MFI korreliert mit der Häufigkeit, mit der Moleküle auf der Oberfläche einer Zelle exprimiert werden.

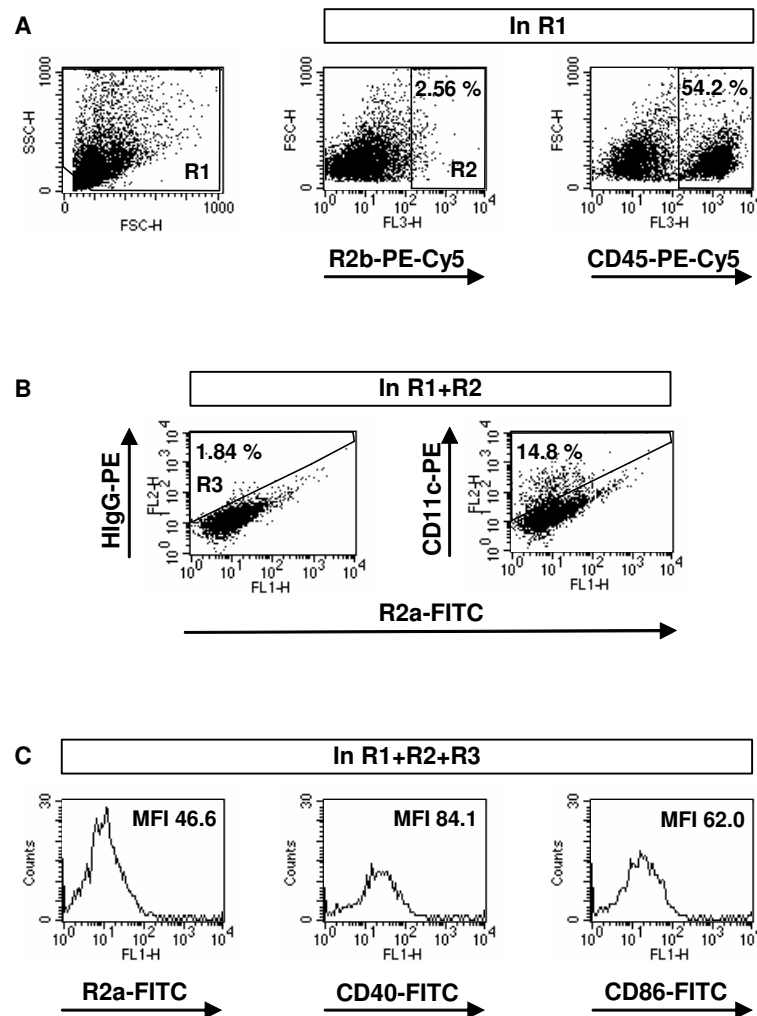


Abb. 9 FACS-Analyse der isolierten Ohrzellen nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major*. C57BL/6 Mäuse wurden *high dose* mit 2×10^5 metazyklischen Leishmanien in beiden Ohren infiziert. Zwei Wochen nach der Infektion wurden die Ohren geerntet. Nach enzymatischer und mechanischer Dissoziation des Gewebes wurden die inflammatorischen Zellen im FACS analysiert. **A**) Durch das Zellgate wurden tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen. Mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD45 wurden Leukozyten in *gate* R2 eingestellt. Hierfür wurden die Zellen mit PE-Cy5.5-konjugiertem α -CD45 mAk angefärbt. **B**) Die *gates* R1 und R2 wurden kombiniert und DC wurden mittels PE-konjugiertem α -CD11c mAk in *gate* R3 angefärbt. Als Isotypkontrolle diente PE-markiertes Hamster IgG (HIgG). **C**) In den *gates* R1+R2+R3 wurde anschließend mit Hilfe der FITC-konjugierten mAk α -CD40 und α -CD86 der Aktivierungsstatus der DC anhand der MFI charakterisiert. Als Isotypkontrolle diente FITC-markiertes Ratten IgG_{2a} (R2a). Ein typisches FACS-Profil ist beispielhaft dargestellt.

In Abbildung 10 ist beispielhaft ein FACS-Profil der isolierten Lymphknotenzellen dargestellt. Das Zellgate R1 wurde so gesetzt, daß tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen wurden (Abb. 10A). Im *gate* R2 wurden anschließend CD11c/CD40 bzw. CD11c/CD86 doppelt positive DC angesteuert (Abb. 10B). Der Aktivierungsstatus der DC wurde daraufhin in den kombinierten *gates* R1+R2 anhand des MFI bestimmt (Abb. 10C).

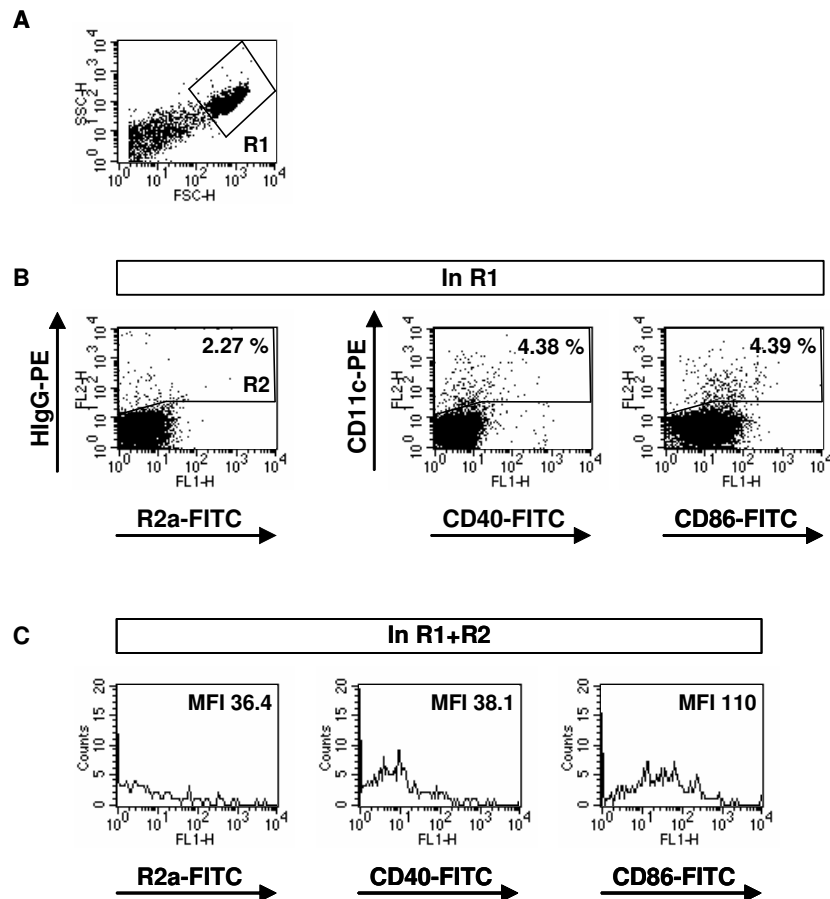


Abb. 10 FACS-Analyse der isolierten Lymphknotenzellen nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major*. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 metazyklischen Leishmanien *high dose* in beiden Ohren infiziert. Zwei Wochen nach der Infektion wurden die drainierenden submandibulären LN entnommen. Die LNC wurden in Suspension gebracht und im FACS analysiert. **A**) Debris und tote Zellen wurden durch das Zellgate R1 von der Analyse ausgeschlossen. **B**) Im *gate* R2 wurde mittels PE-konjugiertem α -CD11c mAk auf DC gated. Als Isotypkontrolle diente Hamster IgG (HlgG). Gleichzeitig wurden die Zellen mit FITC-markiertem α -CD40 und α -CD86 angefärbt. Als Isotypkontrolle diente Ratten IgG_{2a} (R2a). **C**) In den *gates* R1+R2 wurde anschließend der Aktivierungsstatus der DC anhand der MFI charakterisiert. Ein typisches FACS-Profil ist beispielhaft dargestellt.

Nach Infektion mit *Leishmania major* regulierten DC aus BALB/c Läsionen CD86 auf ihrer Oberfläche herunter, wohingegen DC von C57BL/6 Mäusen eine gesteigerte Expression aufwiesen (Abb. 11B). In Woche 6 wiesen DC aus C57BL/6 Tiere einen dreimal höheren MFI von CD86 auf als DC aus BALB/c Mäusen ($11 \pm 2,8$ vs. $38 \pm 7,8$; $**p \leq 0,005$). CD40 wurde von BALB/c Mäusen erst zu späten Zeitpunkten nach der Infektion herunter reguliert (Abb. 11A).

DC aus den Lymphknoten von infizierten Tieren wiesen im Gegensatz dazu keine signifikanten stammesspezifischen Unterschiede bezüglich ihres Aktivierungszustandes auf (Abb. 11A+B).

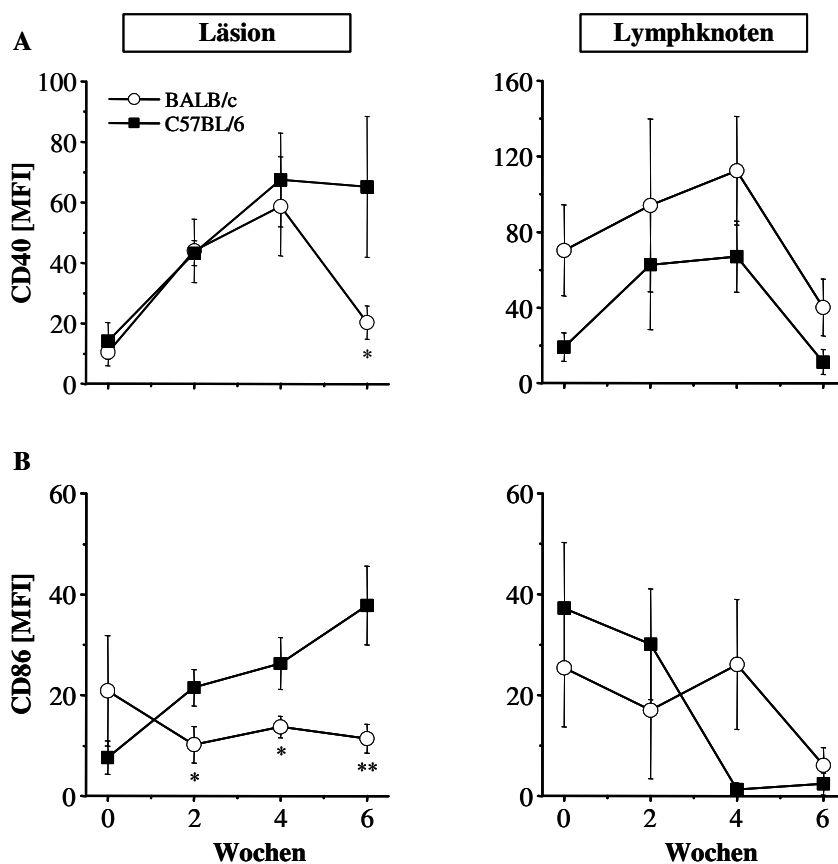


Abb. 11 Dendritische Zellen aus *Leishmania*-Läsionen von BALB/c Mäusen exprimieren signifikant weniger CD86 als läSIONALE dendritische Zellen von C57BL/6 Mäusen.

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden *high dose* in beiden Ohren infiziert. Vor sowie 2, 4 und 6 Wochen nach der Infektion wurden Ohren und LN geerntet und der Aktivierungszustand der DC wurde im FACS analysiert. **A)** Die Zellen wurden mit FITC-konjugiertem α -CD40 mAk angefärbt und die MFI wurde bestimmt. **B)** Nach Inkubation mit FITC-markiertem α -CD86 mAK wurde der Aktivierungszustand anhand der MFI charakterisiert. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten aus drei unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 6$; * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,005$).

3.1.3. Analyse der T-Zell-Proliferation in den drainierenden Lymphknoten

In regelmäßigen Abständen nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major* wurden die drainierenden Lymphknoten von BALB/c und C57BL/6 Mäusen geerntet. Die Zellen wurden mit CFSE gefärbt, antigenspezifisch mit SLA restimuliert und die T-Zell-Proliferation wurde nach 4-6 Tagen im FACS analysiert.

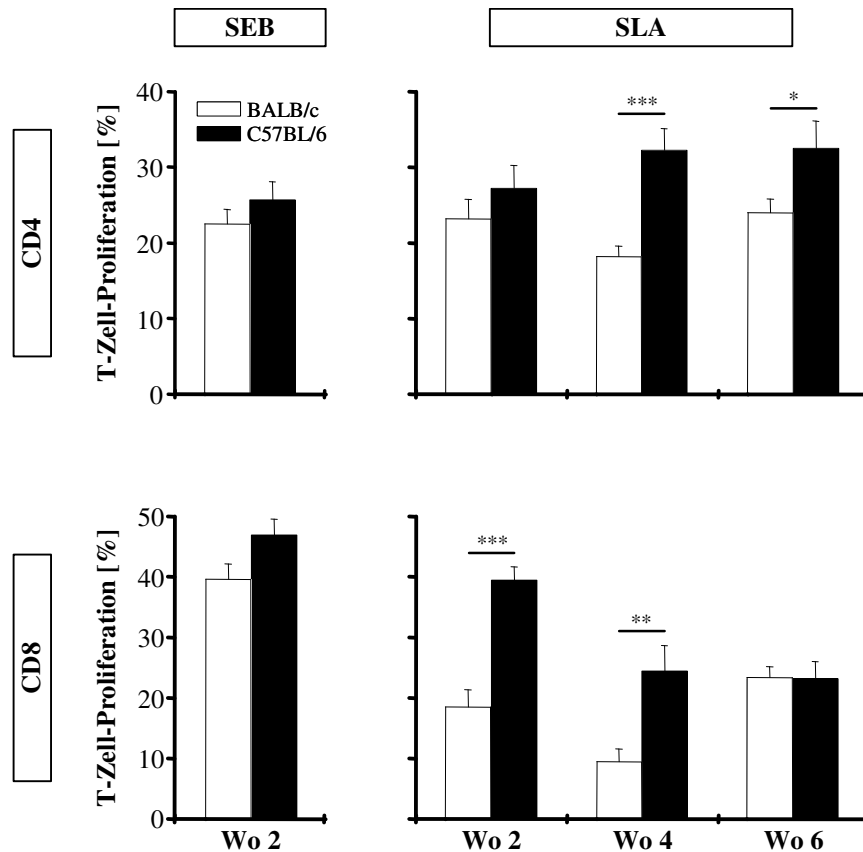


Abb. 12 Nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major* weisen BALB/c Mäuse deutlich verminderte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferationen im Lymphknoten auf.

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 metazyklischen Leishmanien *high dose* in beiden Ohren infiziert. 2, 4 und 6 Wochen nach der Infektion wurden die drainierenden submandibulären LN entnommen, die Zellen wurden mit CFSE gefärbt und anschließend mit 10 μ l SLA antigenspezifisch restimuliert. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit SEB. Nach 4-6 Tagen wurde die T-Zell-Proliferation im FACS analysiert. Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten von 6 unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert + SEM dargestellt ($n \geq 10$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$).

Als Proliferationskontrolle diente die polykolonale Stimulierung mit *Staphylokokken Enterotoxin B* (SEB). Als Superantigen ist SEB in der Lage, eine Vielzahl von T-Zellen T-Zell-Rezeptor unabhängig zu stimulieren. Proliferationsdefizite konnten zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Beispielhaft ist die SEB-Stimulierung in Woche 2 nach Infektion gezeigt (Abb. 12).

Nach antigenspezifischer Restimulierung mit SLA wiesen BALB/c Mäuse sowohl eine verminderte CD4⁺ als auch eine verringerte CD8⁺ T-Zell-Proliferation im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen auf. Die beobachteten Unterschiede waren statistisch signifikant. Im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen war die CD4⁺ T-Zell-Proliferation in BALB/c Mäusen in Woche 4 um 44 %, die CD8⁺ T-Zell-Proliferation sogar um 60 % vermindert (CD4: $18 \pm 1,4$ vs. $32 \pm 2,8$ %; *** $p \leq 0,002$; CD8: $9,5 \pm 2,0$ vs. $24 \pm 4,2$ %; ** $p \leq 0,005$).

Fazit: FACS-Analysen bestätigten einen deutlich geringeren Aktivierungsstatus rekrutierter läsionaler DC aus BALB/c Mäusen im Vergleich zu DC aus resistenten C57BL/6 Tieren. Zudem wiesen die in die Lymphknoten eingewanderten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in empfindlichen BALB/c Mäusen starke Proliferationsdefizite auf. Daher stellte sich die Frage, ob die Immunantwort in BALB/c Mäusen in Richtung einer protektiven Immunität verschoben werden könnte, wenn diese Proliferationsdefekte überwunden würden. Die Vakzinierung mit TAT-Fusionsprotein transduzierten DC wäre hierbei ein vielversprechender Ansatz, um neben CD4⁺ T-Zellen verstärkt CD8⁺ T-Zellen zu induzieren.

3.2. Transduktion von dendritischen Zellen mit TAT-LACK Fusionsproteinen

Ausgangspunkt der DC-basierten Vakzine war die Transduktion von DC mit TAT-LACK Fusionsprotein oder geeigneten Kontrollen. Um den Phänotyp von TAT-LACK transduzierten DC mit dem von LACK gepulsten DC vergleichen zu können, wurden die verschiedenen Zellen im FACS charakterisiert. Zudem wurde die Produktion von IL-12p40 im ELISA gemessen.

3.2.1. Aufreinigung von TAT-LACK und LACK

Zur Herstellung von TAT-LACK und LACK wurden die Proteine zunächst in *E. coli* exprimiert. Die Bakterien wurden im Ultraschallbad aufgeschlossen und die freigesetzten Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. TAT-LACK und LACK besitzen ein N-terminales His₍₆₎-Tag, so daß sie gezielt über Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten [114]. Die Proteine wurden gegen PBS dialysiert und die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 13).

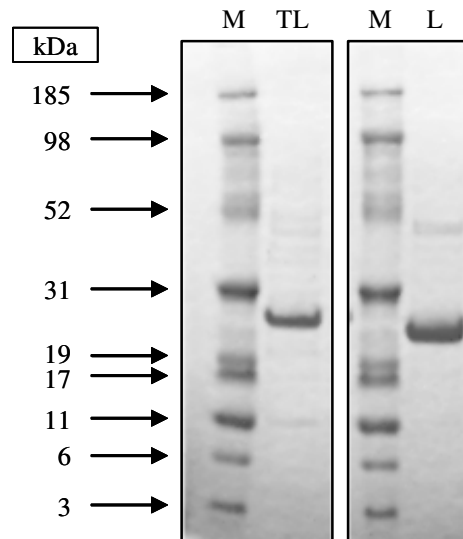


Abb. 13 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) der aufgereinigten Proteine TAT-LACK und LACK.

TAT-LACK (TL) und LACK (L) wurden in *E. coli* exprimiert, über Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt, gegen PBS dialysiert und anschließend mittels SDS-PAGE in 4-12 % Bis-Tris Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden im Gel fixiert und mit Coomassie angefärbt. MultiMark[®] wurde als Proteinstandard (M) auf das Gel mit aufgetragen.

Da sich die Molekulargewichte von TAT-LACK (27 kDa) und LACK (25 kDa) nur um 2 kDa unterschieden, wurden 4-12 % Bis-Tris Gradientengele für die elektrophoretische Auftrennung gewählt. Beide Proteine wanderten entsprechend ihres Molekulargewichtes zwischen der 19 kDa und 31 kDa Markerbande, wobei LACK aufgrund seiner geringeren Größe etwas schneller gewandert war.

3.2.2. Phänotyp transduzierter dendritischer Zellen

Aus murinen hämatopoetischen Stammzellen wurden über sechs Tage mit rekombinantem IL-4 und GM-CSF unreife DC generiert (*bone marrow-derived DC*; BMDC).

Abbildung 14 zeigt beispielhaft FACS-Profil sechs Tage alter BMDC aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen. Das Zellgate R1 wurde so gesetzt, daß tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen wurden. DC wurden durch die Oberflächenmarker CD11c und MHC Klasse II charakterisiert. Die Kultur enthielt durchschnittlich 50-60% doppelt positive Zellen. Als Aktivierungsmarker wurden die Oberflächenmoleküle CD40 und CD86 analysiert.

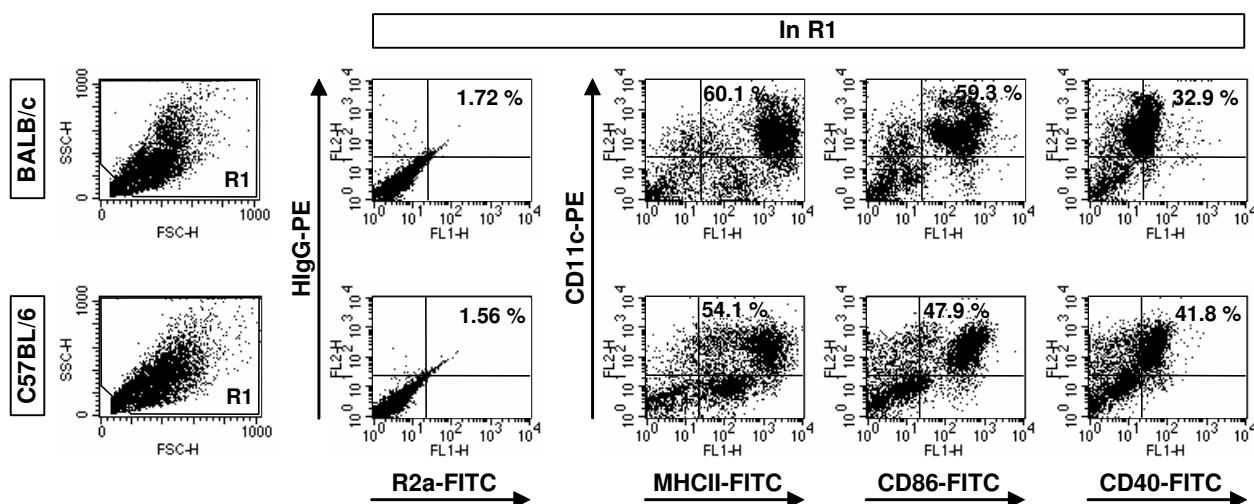


Abb. 14 FACS-Analyse von sechs Tage alten, unreifen BMDC aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen.

Aus hämatopoetischen Stammzellen von BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden über 6 Tage mit rekombinantem IL-4 und GM-CSF unreife DC generiert (BMDC). Diese wurden anschließend im FACS phänotypisch analysiert. Durch das *gate* R1 wurden tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen. DC wurden anhand der Oberflächenmoleküle CD11c und MHC Klasse II charakterisiert. Als Aktivierungsmarker wurden CD86 und CD40 untersucht. Als Isotypkontrollen dienten Ratten IgG_{2a} (R2a) und Hamster IgG (HlgG). Beispielfhaft ist jeweils ein typisches FACS-Profil gezeigt.

Unreife BMDC aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden entweder mit TAT-LACK Fusionsprotein transduziert oder mit LACK allein gepulst. Um die Aktivierung der DC durch Endotoxine der Proteinpräparationen zu unterbinden, wurden die Proteine vor der Injektion mit Polymyxin B vorinkubiert. Unbehandelte DC wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Zur phänotypischen Charakterisierung wurde die MFI (*mean fluorescence intensity*) verschiedener Aktivierungsmarker auf CD11c⁺ Zellen bestimmt. Die MFI beschreibt die Anzahl an Molekülen, die auf einer einzelnen Zelle exprimiert werden.

DC aus C57BL/6 Mäusen wiesen deutlich mehr CD86-Moleküle auf ihrer Oberfläche auf als DC aus BALB/c Mäusen (Abb. 15B). Unterschiede zwischen der Transduktion mit TAT-LACK und dem Pulsen mit LACK alleine ließen sich jedoch nur bezüglich der CD40 Expression beobachten. Nach Inkubation der BMDC mit LACK wurde der Aktivierungsmarker CD40 auf der Oberfläche der Zellen beider Stämme deutlich herunter reguliert (Abb. 15A).

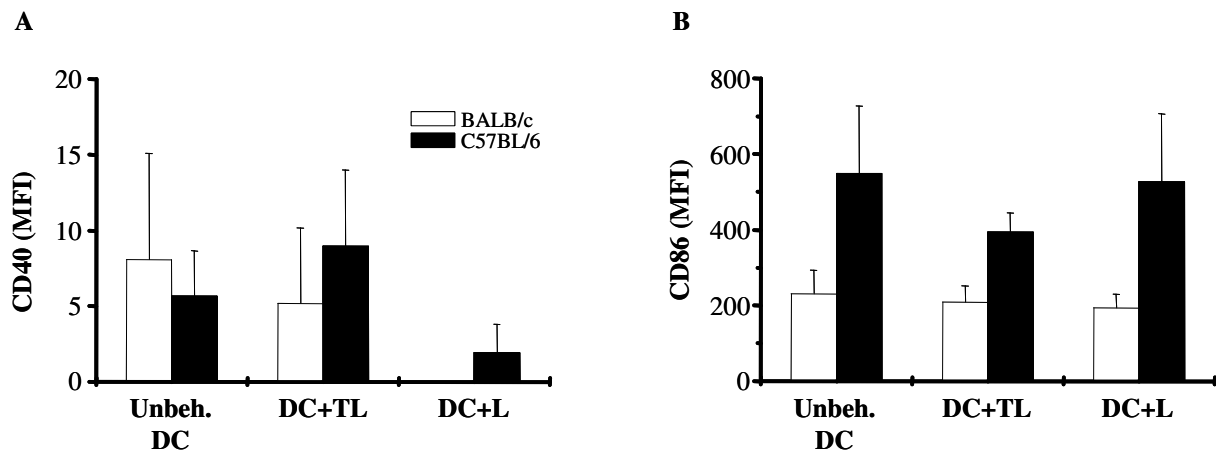


Abb. 15 LACK gepulste CD11c⁺ BMDC exprimieren weniger CD40 auf ihrer Oberfläche als TAT-LACK transduzierte BMDC.

BMDC von BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden entweder mit TAT-LACK transduziert oder mit LACK gepulst. Die Proteinkonzentrationen betragen jeweils 333 nM. Die DC wurden vor der Transduktion für 30 min bei RT mit Polymyxin B (50 µg/ml) inkubiert. Nach 18 h Inkubation wurden die Zellen im FACS analysiert. Gezeigt sind die MFI (*mean fluorescence intensity*) der Oberflächenmoleküle CD40 (A) und CD86 (B) auf CD11c⁺ Zellen. Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten aus 3-8 unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert + SEM (n≥3).

3.2.3. IL-12 Produktion transduzierter dendritischer Zellen

Aktivierte DC produzieren vermehrt IL-12, so daß die Freisetzung dieses Zytokins als Maß für die Aktivierung der DC herangezogen werden kann [43].

Sechs Tage alte BMDC von BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden entweder mit TAT-LACK transduziert oder mit LACK alleine gepulst. Als Kontrolle wurden unbehandelte DC mitgeführt. Nach 18 Stunden wurden die Überstände geerntet und das sezernierte IL-12p40 wurde im ELISA bestimmt.

Sowohl nach Transduktion mit TAT-LACK als auch nach Pulsen mit LACK alleine zeigten die BMDC einen aktivierten Phänotyp (Abb. 16). In BALB/c Mäusen waren keine signifikanten Unterschiede in der IL-12 Freisetzung nach Transduktion bzw. Pulsen zu beobachten (2,5±1,0 vs. 2,6±1,3 ng/ml). Im Gegensatz dazu produzierten BMDC aus C57BL/6 Mäusen nach Inkubation mit LACK mit 1,7±0,6 ng/ml deutlich mehr IL-12p40 als TAT-LACK transduzierte DC mit 1,0±0,02 ng/ml. In allen drei Ansätzen wiesen BMDC aus BALB/c Tieren eine mindestens 1,6fach höhere IL-12-Produktion als DC aus C57BL/6 Mäusen auf (DC: 2,1±0,8 vs. 0,8±0,4 ng/ml; DC+TL: 2,5±1,0 vs. 1,0±0,02 ng/ml; DC+L: 2,6±1,3 vs. 1,7±0,6 ng/ml).

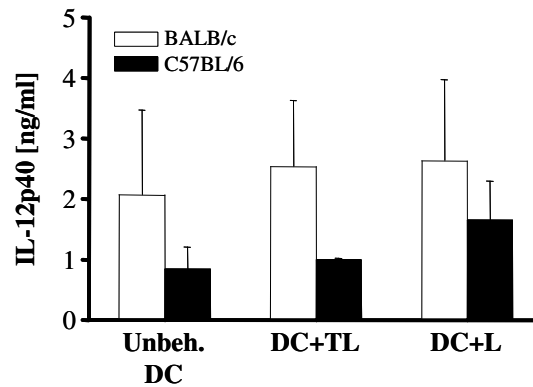


Abb. 16 TAT-LACK transduzierte und LACK gepulste BMDC produzieren vergleichbare Mengen an IL-12p40.

6 Tage alte, unreife BMDC aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden entweder mit TAT-LACK transduziert oder mit LACK alleine gepulst. Die Proteinkonzentrationen betragen jeweils 333 nM. Die DC wurden vor der Inkubation für 30 min bei RT mit Polymyxin B (50 µg/ml) inkubiert. Nach 18 h Inkubation wurden die Überstände geerntet und das freigesetzte IL-12p40 wurde im ELISA bestimmt. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten aus 3-4 unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n≥3).

Fazit: Mit Hilfe von *in vitro* Zellkulturexperimenten sollten Unterschiede im BMDC-Phänotyp nach Transduktion mit TAT-LACK bzw. Pulsen mit LACK alleine analysiert werden. BMDC beider Mausstämme regulierten nach der Inkubation mit LACK den Aktivierungsmarker CD40 auf ihrer Zelloberfläche herunter. Im Gegensatz dazu führte das Pulsen mit LACK in C57BL/6 Mäusen zu einer gesteigerten Freisetzung von IL-12p40.

3.3. Vakzinierung von genetisch empfindlichen BALB/c Mäusen mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen

Aus hämatopoetischen Stammzellen von BALB/c Mäusen wurden mittels IL-4 und GM-CSF über sechs Tage unreife DC generiert (BMDC). Diese wurden mit TAT-LACK Fusionsprotein sowie geeigneten Kontrollen in Anwesenheit von Polymyxin B transduziert und anschließend intradermal in das Ohr von BALB/c Mäusen appliziert. Die *Leishmania*-Infektion erfolgte eine Woche später in das Gegenohr. Das Volumen des entstehenden Granuloms wurde wöchentlich vermessen.

3.3.1. Austestung von CpG 1826 als Adjuvanz

Als erstes sollte untersucht werden, ob die Injektion von Adjuvanzen für die Wirksamkeit der DC-basierten Vakzine erforderlich ist. Hierfür wurden BALB/c Mäuse am Tag -7 mit 2×10^5 TAT-LACK transduzierten DC sowie geeigneten Kontrollen immunisiert. 24 Stunden später wurde einem Teil der Tiere $10 \mu\text{g}$ CpG 1826 intradermal in das vakzinierte Ohr injiziert. Die *high dose* Infektion mit *Leishmania major* erfolgte an Tag 0.

CpG sind immunstimulatorische Oligonukleotide. Sie enthalten die für mikrobielle DNA charakteristischen nicht methylierten Cytidin-Guanosin-Dinukleotide, die das Immunsystem über TLR 9 aktivieren [126;127].

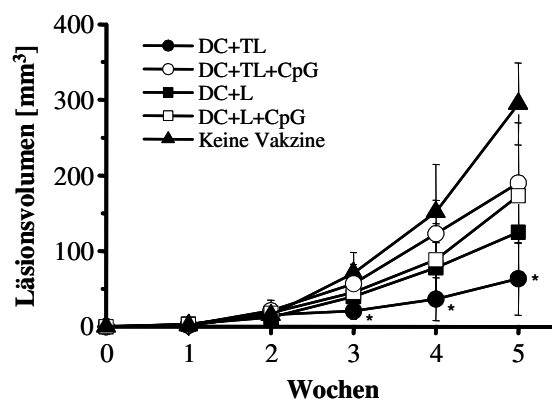


Abb. 17 Die Injektion von CpG 1826 als Adjuvanz verstärkt nicht die Wirksamkeit der DC-basierten Vakzine.

BALB/c Mäuse wurden an Tag -7 mit 2×10^5 TATLACK transduzierten BMDC sowie geeigneten Kontrollen im rechten Ohr vakziniert. Einige Tiere erhielten an Tag -6 zusätzlich $10 \mu\text{g}$ CpG 1826 in das immunisierte Ohr. Die *high dose* Infektion mit 2×10^5 metazyklischen Promastigoten erfolgte an Tag 0 in das kontralaterale linke Ohr. Die Volumina der sich bildenden Granulome wurden wöchentlich vermessen. Die präsentierten Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=4$, $*p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe).

TAT-LACK transduzierte DC waren auch ohne die zusätzliche Injektion von Adjuvanzen in der Lage, schützende Immunität gegen die *Leishmania*-Infektion zu vermitteln (Abb. 17). Dabei war die Injektion von DC+TL der Vakzinierung mit LACK gepulsten DC überlegen. In Woche 3-5 waren die Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe statistisch signifikant. Die Applikation von CpG 1826 führte sowohl in der TAT-LACK als auch in der LACK behandelten Gruppe zu einer Verschlechterung des Infektionsverlaufes. Daher wurden alle folgenden DC-basierten Vakzinierungsexperimente ohne die zusätzliche Injektion von Adjuvanzen durchgeführt.

3.3.2. Austestung der DC-Vakzinierung im *low* und *high dose* Infektionsmodell

Bei der Infektion mit *Leishmania major* werden zwei verschiedene Modelle unterschieden. Im sogenannten *high dose* Modell werden 2×10^5 , im *low dose* Modell dagegen nur 1.000 metazyklische Promastigote inokuliert. Letzteres besitzt größere physiologische Relevanz, da in der Natur bei einem Biß der Sandfliege nur etwa 100-1.000 Parasiten auf den Wirt übertragen werden [13].

Die Wirksamkeit der DC-basierten Vakzine konnte in beiden Modellen bestätigt werden (Abb. 18A). Die unbehandelten Kontrollgruppen zeigten den typisch progressiven Infektionsverlauf in *Leishmania*-empfindlichen Tieren, die letztlich an der Infektion versterben würden. Die Injektion von LACK gepulsten DC führte in keinem der beiden Infektionsansätze zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes. Im Gegensatz dazu resultierte die Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC in einer signifikanten Reduktion der Läsionsvolumina. Statistisch signifikante Unterschiede wurden sowohl zur unbehandelten Kontrollgruppe als auch zu DC+L behandelten Tieren gefunden. In Woche 9 nach *low dose* Infektion wiesen TAT-LACK vakzinierte Mäuse im Vergleich zu LACK immunisierten Tieren eine Reduktion des Läsionsvolumen um knapp 40 % auf (89 ± 16 vs. 141 ± 13 mm³; ⁺ $p \leq 0,05$). Im *high dose* Infektionsmodell waren es in Woche 7 sogar 60 % (143 ± 40 vs. 350 ± 30 mm³; ⁺ $p \leq 0,05$).

Um auszuschließen, daß die beobachtete Protektion Antigen unabhängig war und nur durch das TAT-Peptid vermittelt wurde, wurden die Mäuse parallel mit einem TAT-Fusionsprotein aus einem irrelevanten Antigen, der β -Galaktosidase, immunisiert (Abb. 18B). Erwartungsgemäß vermittelten weder TAT- β gal noch β gal allein schützende Immunität gegen die Infektion mit *Leishmania major*. Die zuvor beobachteten Unterschiede zwischen dem TAT-Fusionsprotein und dem Antigen allein gingen nach Immunisierung mit irrelevanten Kontrollantigenen vollständig verloren. Auch die Injektion von unbehandelten DC konnte keine schützende Immunität vermitteln.

Die TAT-LACK vermittelte Protektion war somit tatsächlich antigenspezifisch und der LACK vermittelten Immunität in allen Ansätzen überlegen.

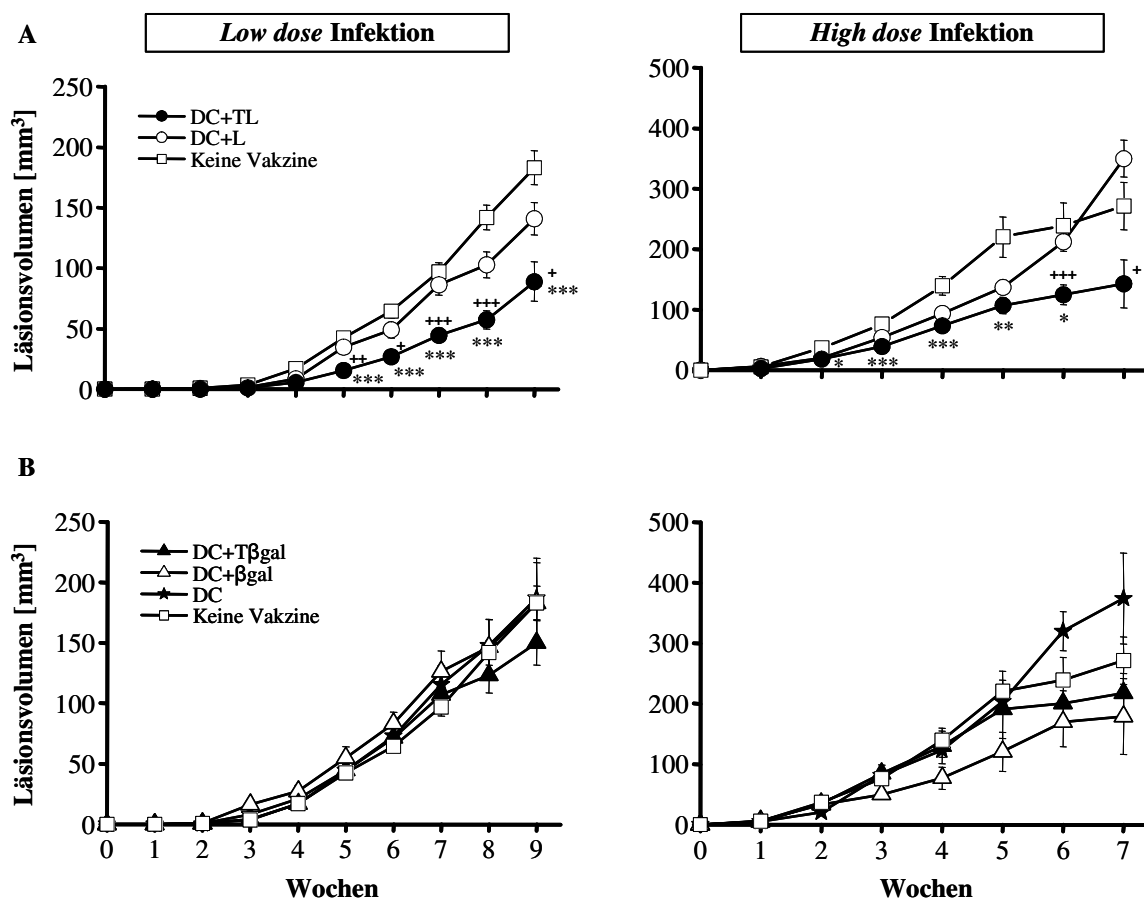


Abb. 18 Die Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC schützt BALB/c Mäuse gegen *low* und *high dose* Infektion mit *Leishmania major*.

BALB/c Mäuse wurden an Tag -7 mit 2×10^5 TAT-LACK transduzierten BMDC sowie geeigneten Kontrollen intradermal im rechten Ohr vakziniert. An Tag 0 wurden sie *low dose* mit 1.000 oder *high dose* mit 2×10^5 metazyklischen Promastigoten intradermal im kontralateralen linken Ohr infiziert. Die Volumina der sich bildenden Granulome wurden wöchentlich vermessen. Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten von drei unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n \geq 7$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$ verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe; + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,005$ und +++ $p \leq 0,002$ im Vergleich zu DC+L vakzinierten Tieren).

3.3.3. Quantifizierung der läSIONALen Parasitenlasten

Die Messung der Läsionsvolumina ist eine gute Möglichkeit, um den Krankheitsverlauf der *Leishmania*-Infektion beurteilen zu können. Möchte man jedoch wissen, inwieweit die Maus in der Lage ist, die Infektion unter Kontrolle zu bringen, muß man sich zusätzlich die Parasitenlasten im Granulom anschauen.

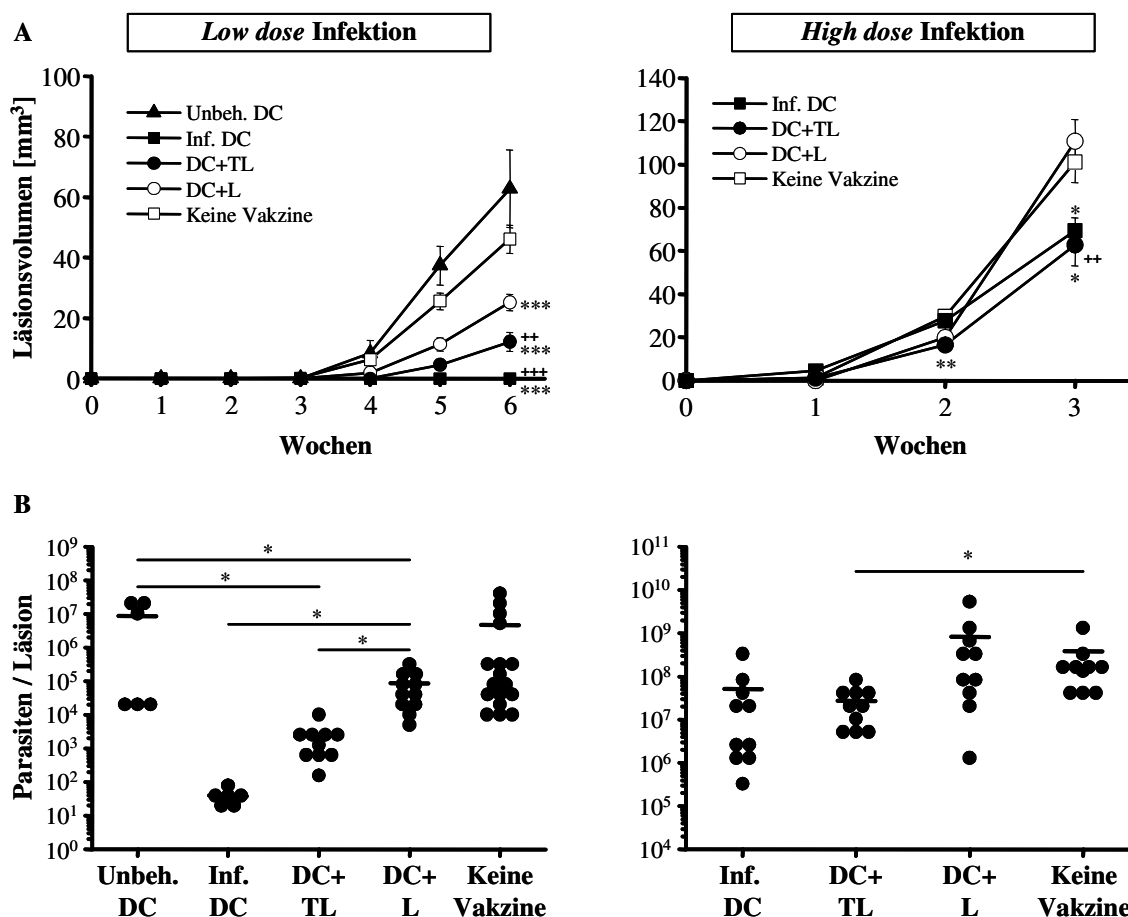


Abb. 19 Sowohl nach *high dose* als auch nach *low dose* Infektion weisen TAT-LACK vakzinierte BALB/c Mäuse signifikant niedrigere läSIONALE Parasitenlasten auf.

BALB/c Mäuse wurden mit 2×10^5 transduzierten BMDC sowie geeigneten Kontrollen i.d. in das rechte Ohr vakziniert. Eine Woche später erfolgte die *low* bzw. *high dose* Infektion in das Gegenohr. **A)** Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich vermessen. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten aus 2-4 unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 6$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$ verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe; ++ $p \leq 0,005$ und +++ $p \leq 0,002$ im Vergleich zu DC+L vakzinierten Tieren). **B)** 3 Wochen nach *high dose* bzw. 6 Wochen nach *low dose* Infektion wurden die infizierten Ohren geerntet und die Anzahl der Parasiten in der Läsion wurde mit Hilfe einer limitierenden Verdünnungsreihe bestimmt. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten aus 2-4 unabhängigen Experimenten. Ein einzelner Punkt entspricht der Parasitenlast in einem Ohr. Der Mittelwert ist durch den Balken dargestellt ($n \geq 6$; * $p \leq 0,05$).

Sowohl nach *low dose* als auch nach *high dose* Infektion wiesen TAT-LACK-vakzinierte BALB/c Mäuse signifikant reduzierte läSIONALE Parasitenlasten auf (Abb. 19B), die mit den zuvor gemessenen Läsionsvolumina korrelierten (Abb. 19A). Unterschiede wurden sowohl zur unbehandelten Kontrollgruppe als auch zur DC+L behandelten Gruppe gefunden. In beiden Infektionsmodellen wiesen DC+L immunisierte Mäuse 30 Mal mehr Parasiten in der Läsion auf als Tiere, die mit TAT-LACK transduzierten DC vakziniert wurden (*low dose*: $2,4 \pm 0,9 \times 10^3$ vs. $8,7 \pm 2,9 \times 10^4$; * $p \leq 0,05$; *high dose*: $2,8 \pm 0,8 \times 10^7$ vs. $8,3 \pm 5,2 \times 10^8$). Mit Amastigoten infizierte DC (inf. DC) wurden als Positivkontrolle mitgeführt. Nach *low dose*

Infektion zeigten sie erwartungsgemäß die niedrigsten Läsionsvolumina und kleinsten Parasitenlasten.

3.3.4. Bestimmung der Zytokinprofile in den drainierenden Lymphknoten

Sechs Wochen nach Vakzinierung und *low dose* Infektion wurden die drainierenden, submandibulären Lymphknoten geerntet. Die Lymphknotenzellen wurden in Suspension gebracht und antigenspezifisch mit SLA restimuliert, um das resultierende Zytokinprofil im ELISA analysieren zu können.

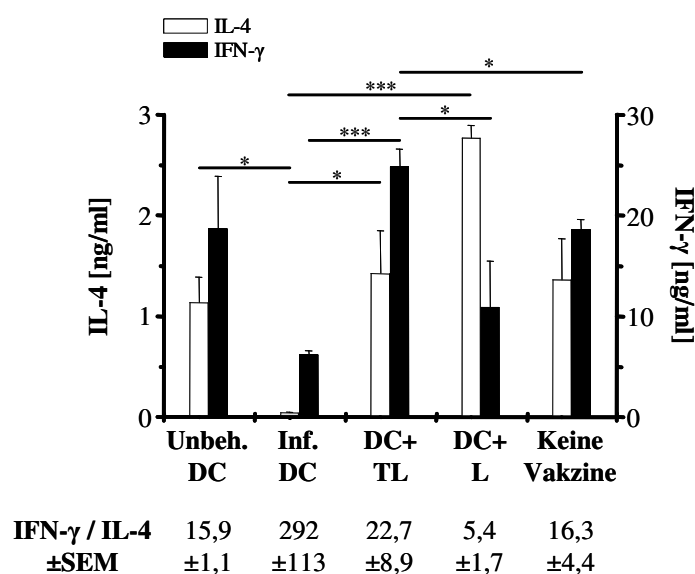


Abb. 20 Nach Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC weisen BALB/c Mäuse ein Th1-Zytokinprofil im LN auf.

BALB/c Mäuse wurden mit TAT-LACK transduzierten BMDC sowie geeigneten Kontrollen i.d. ins rechte Ohr vakziniert. Eine Woche später erfolgte die physiologisch relevantere *low dose* Infektion mit 1.000 metazyklischen Promastigoten in das kontralaterale linke Ohr. 6 Wochen nach der Infektion wurden die drainierenden LN geerntet und die LNC wurden für 48 h antigenspezifisch mit SLA restimuliert. Die Überstände wurden geerntet und die sezernierten Zytokine wurden im ELISA analysiert. Ein repräsentatives Experiment von zweien mit ähnlichen Ergebnissen ist gezeigt. Die Daten sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3; *p≤0,05 und ***p≤0,002). Die IFN-γ / IL-4 Ratio ist tabellarisch aufgeführt und als Mittelwert ± SEM dargestellt.

Durch die Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC konnte das Zytokinprofil im Lymphknoten von BALB/c Mäusen in Richtung einer Th1-Immunantwort verschoben werden, erkennbar an den höheren IFN-γ- (25±1,8 vs. 11±4,6 ng/ml; *p≤0,05) und niedrigeren IL-4-Konzentrationen (1,4±0,4 vs. 2,8±0,1 ng/ml) (Abb. 20). Im Gegensatz dazu, führte die Immunisierung mit LACK gepulsten DC zu einem klassischem Th2-Zytokinprofil.

Die Ergebnisse wurden anhand der IFN- γ / IL-4 Ratio bestätigt. TAT-LACK-vakzinierter Tiere wiesen mit einem Quotienten von $22,7 \pm 8,9$ eine viermal höhere Ratio als LACK-behandelte Mäuse auf ($5,4 \pm 1,7$).

Es ist bekannt, daß vor allem BALB/c Mäuse LACK-reaktive CD4⁺ T-Zellen besitzen, die auf das Antigen reagieren, ohne zuvor damit geprimt worden zu sein. Diese T-Zellen sind für die starke IL-4-Sekretion in der frühen Phase der *Leishmania*-Infektion und somit für die Etablierung der Th2-Immunantwort verantwortlich [88;90;128]. Trotz allem konnten TAT-LACK transduzierte DC BALB/c Mäuse gegen eine progressive Infektion mit *Leishmania major* schützen. Daher mußte als nächstes überprüft werden, wie die DC-basierte Vakzine in resistenten C57BL/6 Mäusen wirkt.

3.4. Vakzinierung von genetisch resistenten C57BL/6 Mäusen mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen

3.4.1. Austestung der DC-Vakzinierung im *low* und *high dose* Infektionsmodell

C57BL/6 Mäuse wurden analog zu den genetisch empfindlichen BALB/c Mäusen intradermal mit 2×10^5 transduzierten DC vakziniert und eine Woche später im Gegenohr *low* bzw. *high dose* infiziert.

Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte den typischen Verlauf einer *low dose* Infektion in resistenten Tieren, die die *Leishmania*-Infektion nach einigen Wochen unter Kontrolle bringen können und dann spontan ausheilen (Abb. 21A). Durch Immunisierung mit LACK gepulsten DC konnte keine Verbesserung des Krankheitsverlaufes erzielt werden. Die Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Läsionsvolumina. Unterschiede konnten sowohl zur unbehandelten Kontrollgruppe als auch zu DC+LACK immunisierten Mäusen beobachtet werden. Letztere wiesen in Woche 6 dreimal so große Läsionsvolumina wie TAT-LACK vakzinierter Tiere auf ($7,4 \pm 2,5 \text{ mm}^3$ vs. $24 \pm 5 \text{ mm}^3$; * $p \leq 0,05$). Zudem heilten TAT-LACK vakzinierter Tiere zwei Wochen früher als die Kontrollgruppe aus. Wie bei den BALB/c Mäusen zeigten auch hier die Immunisierungen mit irrelevanten Kontrollproteinen (TAT- β gal) keinerlei protektive Wirkung (Abb. 21B). Erwartungsgemäß waren vakzinierter und ausgeheilte C57BL/6 Mäuse gegen Re-Infektion mit demselben Parasiten geschützt (Daten sind nicht gezeigt).

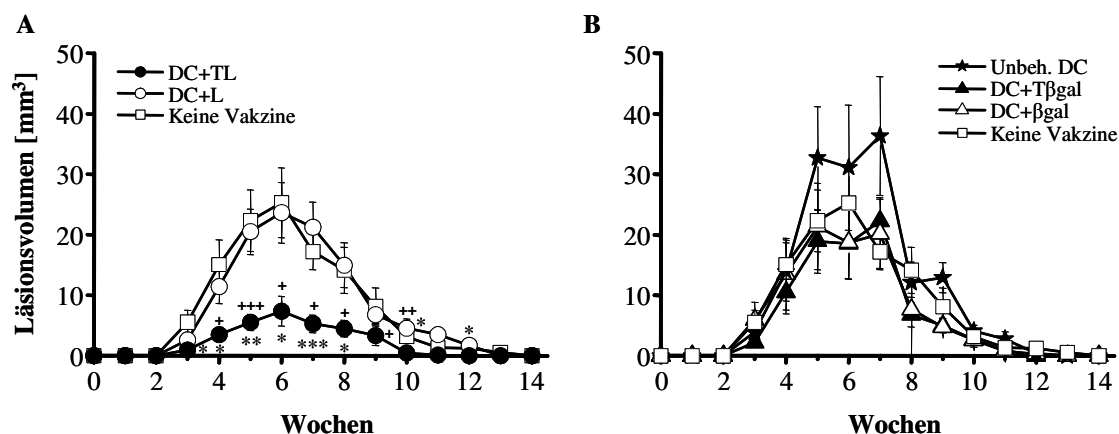


Abb. 21 Die Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC schützt C57BL/6 Mäuse gegen *low dose* Infektion mit *Leishmania major*.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 TAT-LACK transduzierten BMDC intradermal im rechten Ohr vakziniert. Eine Woche später erfolgte die *low dose* Infektion mit 1.000 metazyklischen Promastigoten in das kontralaterale linke Ohr. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich vermessen (A und B). Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten aus vier unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n \geq 8$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,005$ und +++ $p \leq 0,002$ im Vergleich zu DC+L behandelten Tieren).

Die von TAT-LACK vermittelte schützende Immunität konnte auch nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major* bestätigt werden (Abb. 22). Nach Immunisierung mit LACK gepulsten DC wiesen C57BL/6 Mäuse mehr als vier Mal so große Läsionsvolumina wie TAT-LACK vakzinierte Tiere auf ($29 \pm 12 \text{ mm}^3$ vs. $126 \pm 13 \text{ mm}^3$ in Woche 5; +++ $p \leq 0,002$).

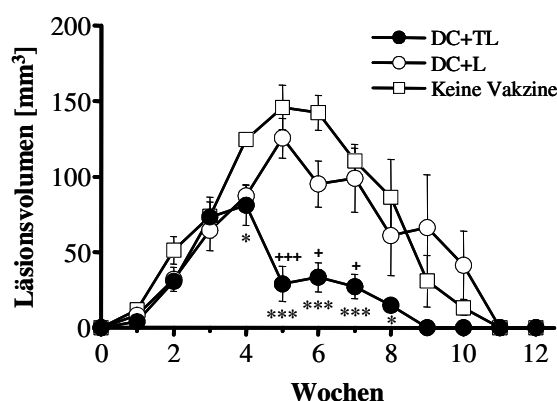


Abb. 22 Nach Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC und *high dose* Infektion mit *Leishmania major* zeigen C57BL/6 Mäuse einen schwächeren Infektionsverlauf.

C57BL/6 Mäuse wurden mit TAT-LACK transduzierten BMDC i.d. im rechten Ohr vakziniert und eine Woche später *high dose* mit 2×10^5 metazyklischen Leishmanien im Gegenohr infiziert. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich vermessen. Die präsentierten Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=4$; * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,002$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; + $p \leq 0,05$ und +++ $p \leq 0,002$ verglichen mit DC+L immunisierten Mäusen).

3.4.2. Quantifizierung der läSIONalen Parasitenlasten

C57BL/6 Mäuse wurden mit TAT-LACK transduzierten DC sowie entsprechenden Kontrollen vakziniert und eine Woche später *low dose* infiziert. Sieben Wochen nach der Infektion wurden die Parasitenlasten in den Läsionen bestimmt.

Die läSIONalen Parasitenlasten korrespondierten mit den zuvor gemessenen Läsionsvolumina (Abb. 23A). Durch Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC konnten nicht nur die Läsionsgrößen sondern auch die Anzahl der Parasiten im Granulom signifikant reduziert werden (Abb. 23B). DC+LACK behandelte Tiere wiesen 11 Mal so viele Parasiten wie TAT-LACK vakzinierte Mäuse auf (453 ± 87 vs. 5120 ± 1145 ; $**p \leq 0,005$) und zeigten damit einen zur unbehandelte Kontrollgruppe ähnlichen Krankheitsverlauf. Wie schon bei den BALB/c Mäusen wurden auch hier mit Amastigoten infizierte DC als Positivkontrolle mitgeführt.

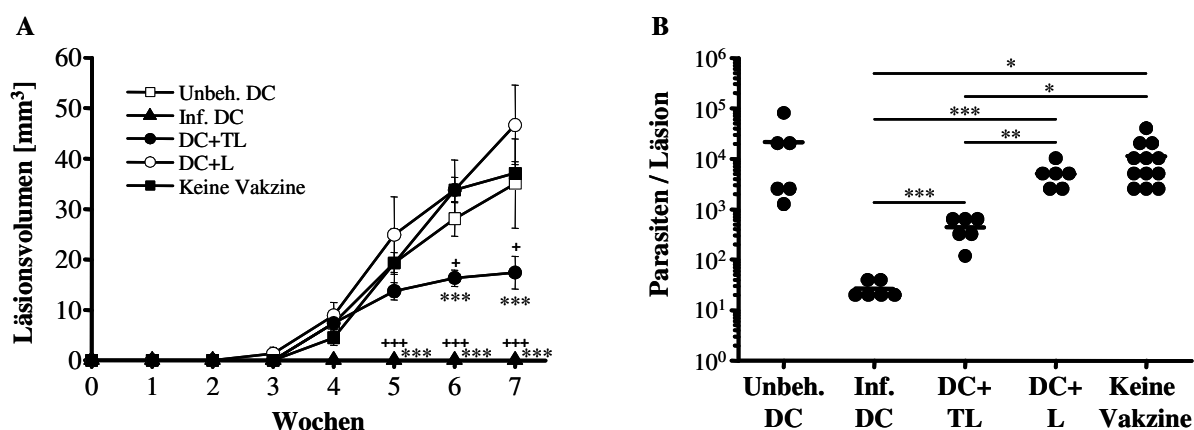


Abb. 23 Nach *low dose* Infektion mit *Leishmania major* weisen TAT-LACK vakzinierte C57BL/6 Mäuse signifikant kleinere Läsionsvolumina und reduzierte Parasitenlasten auf.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 transduzierten BMDC sowie geeigneten Kontrollen i.d. im rechten Ohr vakziniert. Die *low dose* Infektion mit 1.000 metazyklischen Promastigoten erfolgte eine Woche später ins Gegenohr. **A**) Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich gemessen. Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten aus 2 unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n \geq 6$; $***p \leq 0,002$ verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe; $^{\dagger}p \leq 0,05$ und $^{+++}p \leq 0,002$ im Vergleich zu DC+L immunisierten Tieren). **B**) 7 Wochen nach der Infektion wurden die Tiere getötet und die läSIONalen Parasitenlasten wurden mittels einer limitierenden Verdünnungsreihe bestimmt. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten aus 2 unabhängigen Experimenten. Jeder einzelne Punkt entspricht der Parasitenlast in einem Ohr. Der Mittelwert ist durch den Balken dargestellt ($n \geq 6$; $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,005$ und $***p \leq 0,005$).

3.4.3. Bestimmung der Zytokinprofile in den drainierenden Lymphknoten

Sechs Wochen nach *low dose* Infektion mit *Leishmania major* wurden die drainierenden, submandibulären Lymphknoten von vakzinierten C57BL/6 Mäusen gerntet. Die

Lymphknotenzellen wurden in Suspension gebracht und für 48 Stunden antigenspezifisch mit SLA restimuliert. Die Überstände wurden geerntet und die sezernierten Zytokine wurden im ELISA bestimmt.

Bezüglich der IFN- γ -Produktion konnten keine Unterschiede zwischen der Vakzinierung mit TAT-LACK und LACK allein gefunden werden (55 ± 7 vs. 57 ± 4 ng/ml) (Abb. 24). Jedoch sezernierten Lymphknotenzellen von TAT-LACK vakzinierten Mäusen weniger IL-4 als Zellen von LACK behandelten Tieren (19 ± 8 vs. 29 ± 6 pg/ml). Im Vergleich zur Immunisierung mit LACK gepulsten DC wurde das Zytokinprofil im Lymphknoten von TAT-LACK vakzinierten C57BL/6 Mäusen daher leicht in Richtung einer Th1-Immunantwort verschoben. Die berechneten IFN- γ / IL-4 Ratios bestätigten diese Beobachtungen. DC+TAT-LACK vakzinierte Mäuse wiesen mit $14,9\pm 7,2$ einen leicht höheren Quotienten als LACK behandelte Tiere auf ($10,7\pm 7,1$).

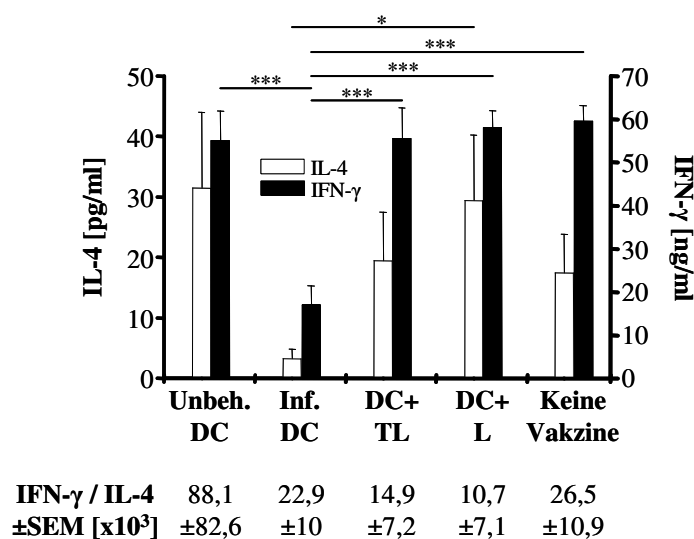


Abb. 24 Lymphknotenzellen von TAT-LACK vakzinierten C57BL/6 Mäusen sezernieren weniger IL-4 als Lymphknotenzellen von LACK immunisierten Tieren.

C57BL/6 Mäuse wurden mit TAT-LACK transduzierten BMDC oder geeigneten Kontrollen vakziniert und eine Woche später *low dose* infiziert. 6 Wochen nach der Infektion wurden die drainierenden LN entnommen. Die LNC wurden in Suspension gebracht und antigenspezifisch mit SLA restimuliert. Nach 48 h wurden die Überstände geerntet und die sezernierten Zytokine wurden im ELISA bestimmt. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten von drei unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert + SEM ($n \geq 8$; * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,002$). Die IFN- γ / IL-4 Ratio ist tabellarisch aufgeführt und als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Fazit: In *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC der Immunisierung mit LACK gepulsten DC überlegen war. Sowohl

Leishmania-empfindliche BALB/c als auch resistente C57BL/6 Mäuse waren nach Behandlung mit TAT-LACK gegen eine progressiv verlaufende Infektion geschützt. Der Vakzinierungserfolg ließ sich anhand reduzierter Läsionsvolumina, verringerter Parasitenlasten und anhand von Zytokinprofilen, die in Richtung einer Th1-Immunantwort verschoben wurden, bestätigen.

Als nächstes sollte daher in *in vitro* Experimenten untersucht werden, welche Zellen durch Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC induziert wurden und somit schützende Immunität vermittelten.

3.5. *In vitro* Restimulierungsexperimente zur Charakterisierung der durch DC+TAT-LACK induzierten T-Zellen

3.5.1. Quantifizierung der T-Zell-Proliferation

Eine gut etablierte Methode zur Analyse der T-Zell-Proliferation ist die Anfärbung der Zellen mit CFSE. Der grün fluoreszierende Vitalfarbstoff wird kovalent in der Zelle gebunden und bei der Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben. Die daraus resultierende Ausdünnung der Fluoreszenzintensität kann anschließend im FACS sichtbar gemacht werden.

Abbildung 25 zeigt ein typisches FACS-Profil CFSE gefärbter Lymphknotenzellen, die durch antigenspezifische Restimulierung mit SLA zur Proliferation angeregt wurden. Anhand der grünen Fluoreszenz konnte die Proliferation der gefärbten Zellen im FL1-Kanal gemessen werden. Durch gleichzeitige Anfärbung der T-Zellen mit PE-konjugierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 konnte die Proliferation der verschiedenen Zelltypen genauer charakterisiert werden. Durch das Zellgate R1 wurden tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen. CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden in gate R2 angesteuert. Anhand der CFSE-Ausdünnung konnte die T-Zell-Proliferation anschließend im kombinierten gate R1+R2 analysiert werden. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt, welche bereits ohne spezifischen Stimulus proliferierten. Diese Hintergrundproliferation wurde von der durch SEB bzw. durch SLA induzierten Zellteilung abgezogen.

Die Stimulierung der Lymphknotenzellen mittels *Staphylokokken Enterotoxin B* (SEB) diente als Positivkontrolle. SEB ist als Superantigen in der Lage, T-Zellen polyklonal, das heißt T-Zell-Rezeptor unabhängig, zu aktivieren. Durch die Stimulierung mit SEB sollten etwaige Proliferationsdefizite aufgespürt werden.

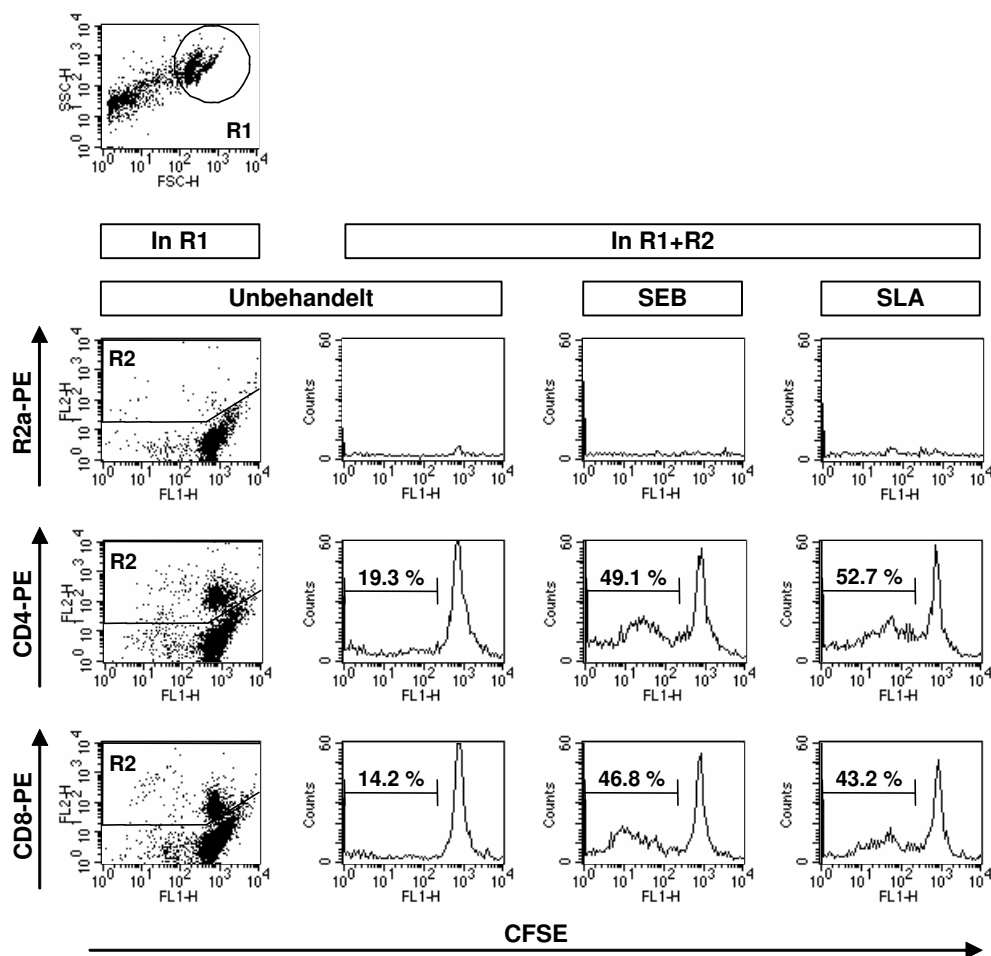


Abb. 25 FACS-Profil von CFSE gefärbten, proliferierenden Lymphknotenzellen.

C57BL/6 Mäuse wurden in beiden Ohren *high dose* infiziert. 8 Wochen nach der Infektion wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen. Die Zellen wurden in Suspension gebracht, mit CFSE gefärbt und antigenspezifisch mit SLA restimuliert. Als Positivkontrolle diente die Stimulierung mit SEB. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt. 4 Tage nach der Restimulierung wurden die Zellen geerntet und die Proliferation wurde im FACS analysiert. Durch das *gate* R1 wurden tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen. Durch Anfärbung mit PE-konjugiertem α -CD4 und α -CD8 mAk konnten die verschiedenen T-Zell-Populationen in *gate* R2 angesteuert werden. Als Isotypkontrolle diente PE-markiertes Ratten IgG_{2a} (R2a). Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der CFSE-Ausdünnung in dem kombinierten *gate* R1+R2 bestimmt. Beispielhaft dargestellt ist eine typische FACS-Analyse.

3.5.2. Analyse der T-Zell-Proliferation nach Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen

Ziel der Untersuchungen war die Charakterisierung der T-Zellen, die durch Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC induziert wurden. Hierfür wurden BALB/c und C57BL/6 Mäuse mit transduzierten DC sowie geeigneten Kontrollen in beide Ohren intradermal vakziniert. Eine Woche später wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen, ohne zuvor eine *Leishmania*-Infektion gesetzt zu haben. Die Lymphknotenzellen wurden mit dem

Vitalfarbstoff CFSE gefärbt und antigenspezifisch mit SLA restimuliert. Nach 4-6 Tagen wurde die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im FACS analysiert.

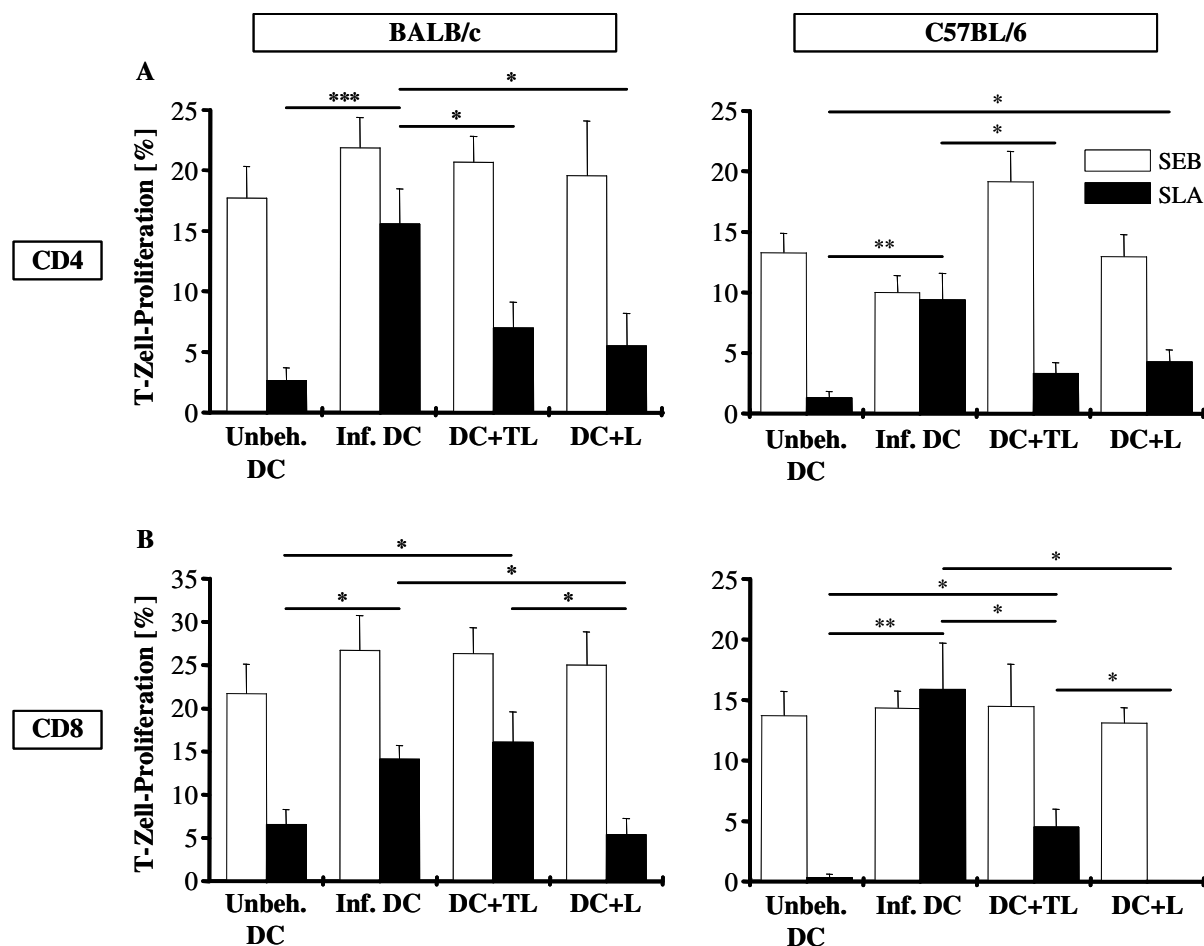


Abb. 26 Durch Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC werden sowohl in BALB/c als auch in C57BL/6 Mäusen vermehrt CD8⁺ T-Zellen induziert.

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 TAT-LACK transduzierten BMDC sowie geeigneten Kontrollen i.d. in beiden Ohren vakziniert. Eine Woche später wurden die drainierenden LN entnommen. Die Zellen wurden in Suspension gebracht, mit CFSE gefärbt und antigenspezifisch mit SLA restimuliert. Als Positivkontrolle diente die Stimulierung mit SEB. Nach 4-6 Tagen wurde die T-Zell-Proliferation im FACS analysiert. Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten von 2-3 unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert + SEM ($n \geq 4$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$).

Weder in BALB/c noch in C57BL/6 Mäusen konnten nach polyklonaler Stimulierung mit SEB Proliferationsdefizite der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 26). Bezüglich der CD4⁺ T-Zell-Proliferation konnten nach antigenspezifischer Stimulierung keine Unterschiede beobachtet werden, wenn Mäuse mit TAT-LACK transduzierten oder LACK gepulsten DC vakziniert wurden (Abb. 26A). In beiden Ansätzen war die Induktion der CD4⁺ T-Zellen vergleichbar (BALB/c: $7,0 \pm 2,1$ vs. $5,5 \pm 2,7$ %; C57BL/6: $3,3 \pm 0,9$ vs. $4,2 \pm 1,0$ %). Im

Gegensatz dazu war TAT-LACK ein deutlich besserer Induktor CD8⁺ T-Zellen als LACK allein (Abb. 26B). Nach Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC wurden in beiden Mausstämmen signifikant mehr CD8⁺ Zellen induziert als nach Immunisierung mit LACK gepulsten DC (BALB/c: 16±3,5 vs. 5,4±1,9 %; *p≤0,05; C57BL/6: 4,5±1,5 vs. 0 %; *p≤0,05). Mit Amastigoten infizierte DC waren in den meisten Ansätzen die stärksten Aktivator der T-Zell-Proliferation. Erwartungsgemäß hatte die Injektion von DC alleine kaum Auswirkung auf die Proliferation.

3.5.3. *In vitro* Restimulierung *Leishmania*-spezifischer T-Zellen mittels TAT-LACK transduzierter dendritischer Zellen

Es konnte bereits gezeigt werden, daß TAT-LACK transduzierte DC *in vivo* vermehrt CD8⁺ T-Zellen induzieren können. Daher stellte sich die Frage, ob die transduzierten DC auch *in vitro* in der Lage sind, T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

Hierfür wurden T-Zellen aus Lymphknoten und Milz von *Leishmania*-infizierten Tieren über den Oberflächenmarker CD90 (Thy 1.2) mittels MACS aufgereinigt, mit CFSE gefärbt und mit TAT-LACK transduzierten DC sowie geeigneten Kontrollen restimuliert. Nach 4-6 Tagen wurde die T-Zell-Proliferation im FACS analysiert.

Abbildung 27 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Thy 1.2-MACS-Aufreinigung. Der Anteil CD3/CD4 doppelt positiver T-Zellen betrug vor der Aufreinigung 21,2 %, der Anteil CD3/CD8 doppelt positiver Zellen 12,7 %. Durch die MACS-Aufreinigung konnten die T-Zell-Populationen auf 52,1 % bzw. 32,5 % angereichert werden. Das entsprach einer Anreicherung der gesamten T-Zellen von 33,9 % auf 84,6 %.

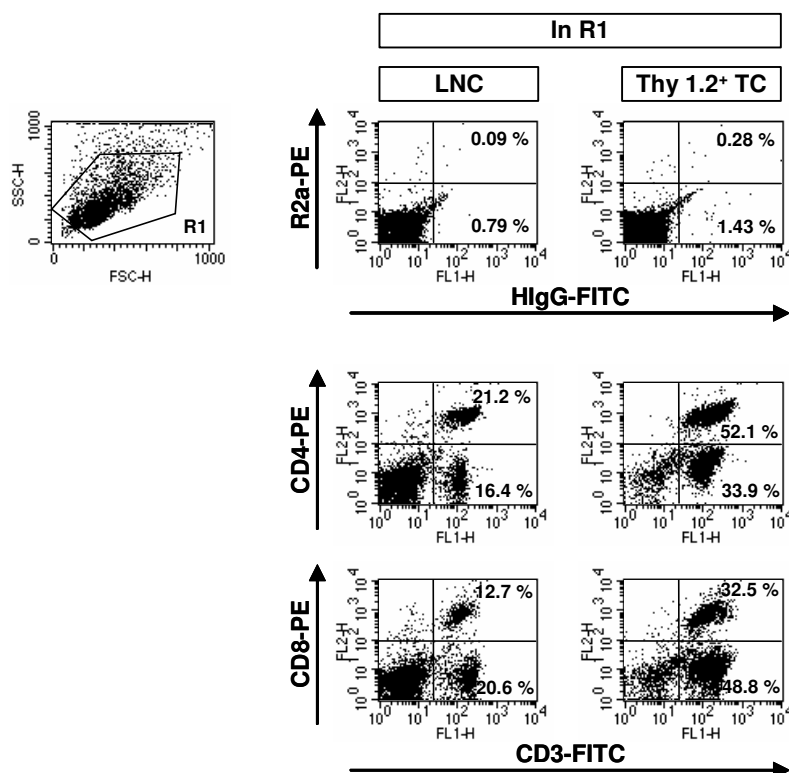


Abb. 27 FACS-Profil der MACS-Aufreinigung von T-Zellen aus dem Lymphknoten *Leishmania*-infizierter C57BL/6 Mäuse.

C57BL/6 Mäuse wurden *high dose* in beide Ohren mit 2×10^5 metazyklischen Leishmanien infiziert. 5 Wochen nach der Infektion wurden die drainierenden LN geerntet und die T-Zellen wurden mittels MACS-Aufreinigung über den Oberflächenmarker CD90 (Thy 1.2) angereichert. Die Qualität der Isolierung wurde im FACS überprüft. Das Zellgate R1 wurde so gesetzt, daß tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen wurden. Die verschiedenen T-Zell-Populationen wurden mittels FITC-konjugiertem α -CD3 mAk und PE-markiertem α -CD4 oder α -CD8 mAk angefärbt. Als Isotypkontrollen dienten FITC-konjugiertes Hamster IgG (HlgG) und PE-markiertes Ratten IgG_{2a} (R2a). Eine typische FACS-Auswertung ist beispielhaft gezeigt.

3.5.3.1. Bestimmung des optimalen Verhältnisses von dendritischen Zellen und T-Zellen in der Co-Kultur

Im Hinblick auf maximale T-Zell-Proliferation mußte in Vorexperimenten zunächst die optimale Zusammensetzung der DC-TC Co-Kultur ermittelt werden. Hierfür wurden *Leishmania*-spezifische T-Zellen aus infizierten Tieren mit CFSE gefärbt und mit infizierten DC in verschiedenen Verhältnissen restimuliert. Anhand der im FACS meßbaren Proliferation ließ sich die optimale Zusammensetzung bestimmen. Als Negativkontrolle wurde die Restimulierung mit unbehandelten DC gewählt. Die hier gemessene, unspezifische Proliferation wurde von der antigenspezifisch induzierten Zellteilung subtrahiert. DC und TC wurden im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10 und 1:20 co-kultiviert.

Abbildung 28 zeigt beispielhaft eine solche FACS-Auswertung. Maximale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferation von 12,6 % bzw. 17,1 % wurde in der 1:10 Co-Kultur erreicht, so daß alle folgenden Experimente mit dieser Zusammensetzung durchgeführt wurden.

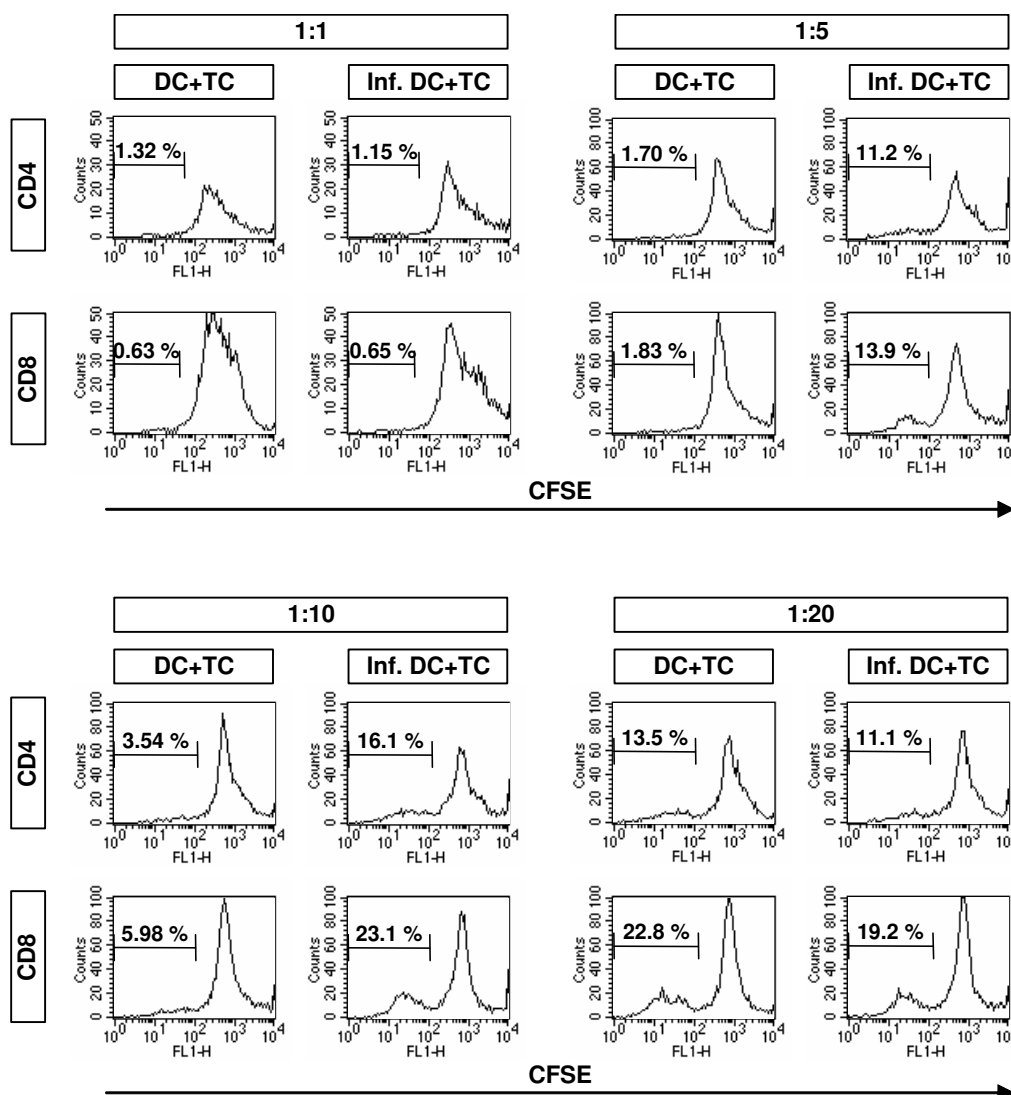


Abb. 28 Maximale T-Zell-Proliferation wird bei einer Co-Kultur Ratio von 1:10 (DC:TC) erreicht.

C57BL/6 Mäuse wurden in beiden Ohren *low dose* mit 1.000 metazyklischen Leishmanien infiziert. 16 Wochen nach der Infektion wurden die drainierenden LN entnommen. T-Zellen wurden mittels MACS-Aufreinigung über den Oberflächenmarker CD90 (Thy 1.2) angereichert, mit CFSE gefärbt und in verschiedenen Verhältnissen mit Amastigoten infizierten oder unbehandelten BMDC restimuliert. 5 Tage nach der Restimulierung wurden die Zellen gerntet und die Proliferation wurde im FACS analysiert. Ein repräsentatives Experiment von zweien ist gezeigt.

3.5.3.2. Analyse der T-Zell-Proliferation nach *in vitro* Restimulierung mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen

T-Zellen aus infizierten Tieren wurden mittels MACS über den Oberflächenmarker CD90 (Thy 1.2) aufgereinigt, mit CFSE gefärbt und mit verschiedenen DC-Präparationen restimuliert. Die resultierende T-Zell-Proliferation wurde nach 4-6 Tagen im FACS analysiert.

Sowohl DC+LACK als auch DC+TAT-LACK waren in der Lage, *Leishmania*-spezifische T-Zellen *in vitro* zur Proliferation anzuregen (Abb. 29). Allerdings mußten die DC hierfür mit 2 µM Protein transduziert werden. In den Vakzinierungsexperimenten hatten bereits 333 nM ausgereicht, um protektive Immunität zu vermitteln.

TAT-LACK transduzierte DC waren deutlich stärkere Induktoren der CD8⁺ T-Zell-Proliferation als LACK gepulste DC (BALB/c: 5,7±0,8 vs. 2,1±0,8 %; *p≤0,05; C57BL/6: 8,3±1,6 vs. 2,3±0,9 %; *p≤0,05). Bezüglich der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen konnten in BALB/c Mäusen keine Unterschiede beobachtet werden (1,1±0,6 vs. 0,9±0,6 %). Allerdings wurden durch TAT-LACK transduzierte DC in C57BL/6 Mäusen dreimal so viele CD4⁺ Zellen wie in BALB/c Mäusen zur Proliferation angeregt (6,4±2,0 vs. 1,8±1,0 %).

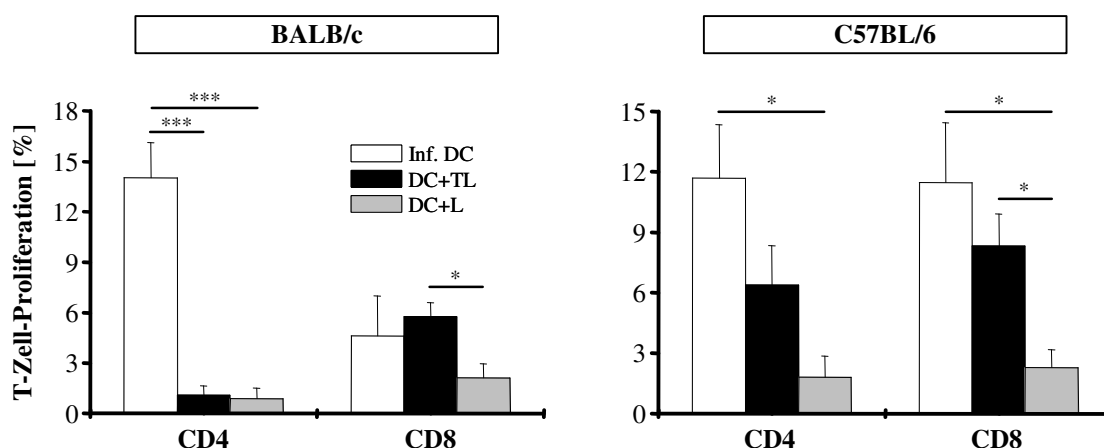


Abb. 29 TAT-LACK transduzierte DC sind signifikant stärkere Induktoren der *in vitro* Proliferation von *Leishmania*-spezifischen T-Zellen als LACK gepulste DC.

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden *high dose* mit 2×10^5 metazyklischen Promastigoten infiziert. Nach 4-8 Wochen wurden die drainierenden LN und die Milz geerntet und die T-Zellen wurden mittels MACS über den Oberflächenmarker CD90 (Thy 1.2) aufgereinigt. Die isolierten Zellen wurden mit CFSE gefärbt und mit verschiedenen BMDC-Präparationen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) restimuliert. Die DC wurden zuvor mit 2 µM TAT-LACK oder Kontrollproteinen inkubiert. Nach 4-6 Tagen wurde die T-Zell-Proliferation im FACS analysiert. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten von 2-3 unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert + SEM dargestellt ($n \geq 3$; *p≤0,05 und ***p≤0,002).

3.5.3.3. Analyse der Zytokinprofile von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach *in vitro* Restimulierung mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen

Parallel zu den Proliferationsexperimenten wurden die Zytokine der restimulierten T-Zellen in den Überständen der C57BL/6 Zellkultur bestimmt. Hierfür wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Lymphknoten und Milz infizierter Mäuse mittels MACS aufgereinigt und mit TAT-LACK transduzierten DC sowie geeigneten Kontrollen restimuliert. Nach 48 h wurden die Überstände geerntet und die sezernierten Zytokine wurden im ELISA bestimmt. Um sicherzustellen, daß die gemessenen Zytokine nur von den T-Zellen produziert wurden, wurden die eingesetzten DC zuvor mit 4.000 Rad bestrahlt.

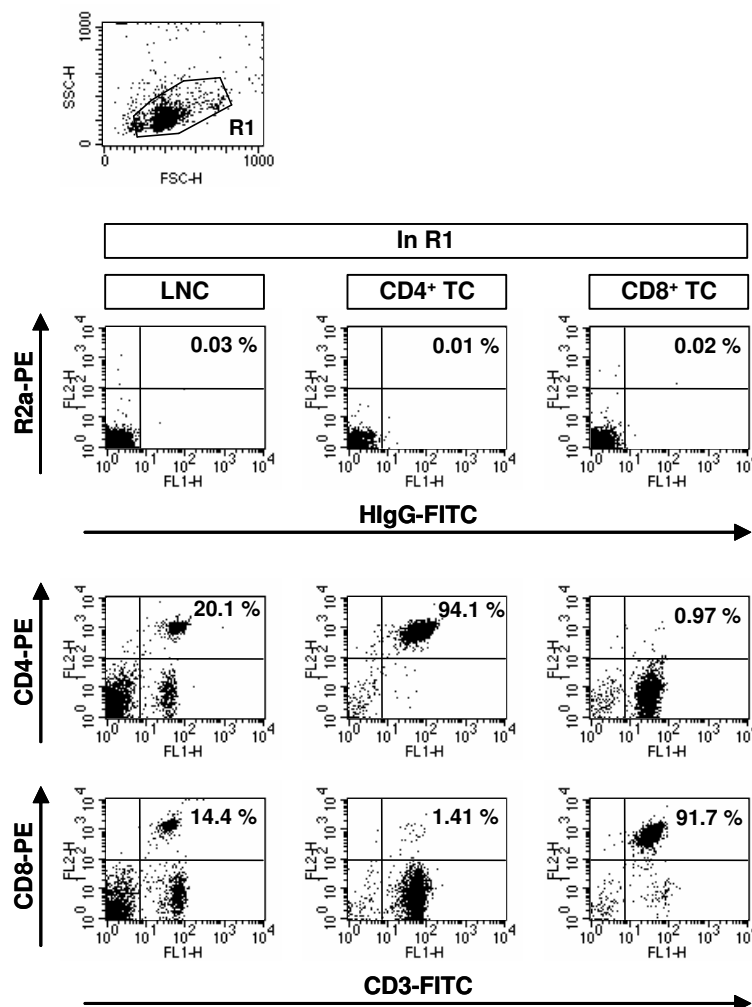


Abb. 30 FACS-Profil der MACS-Aufreinigung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten. C57BL/6 Mäuse wurden *high dose* mit 2×10^5 metazyklischen Leishmanien infiziert. 5-14 Wochen nach der Infektion wurden die drainierenden LN geerntet und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden mittels MACS-Aufreinigung über die entsprechenden Oberflächenmoleküle isoliert. Zur Überprüfung der Anreicherung wurden CD3/CD4 und CD3/CD8 doppelt positive Zellen im FACS analysiert. Zur Überprüfung der Anreicherung wurden CD3/CD4 und CD3/CD8 doppelt positive Zellen im FACS analysiert. Durch das *gate* R1 wurden tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen. Die Zellen wurden mit α -CD3-FITC und PE-konjugiertem α -CD4 und α -CD8 mAk angefärbt. Als Isotypkontrolle diente FITC-markiertes Hamster IgG (HIgG) und PE-konjugiertes Ratten IgG_{2a} (R2a). Beispielhaft ist eine repräsentative FACS-Messung gezeigt.

In Abbildung 30 ist beispielhaft eine MACS-Aufreinigung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gezeigt. Vor der Isolierung lag der Anteil der CD3/CD4 doppelt positiven Zellen im Lymphknoten bei 20,1 % und der der CD3/CD8 doppelt positiven T-Zellen bei 14,4 %. Durch die Aufreinigung konnten die T-Zell-Populationen auf 94,1 % bzw. 91,7 % angereichert werden.

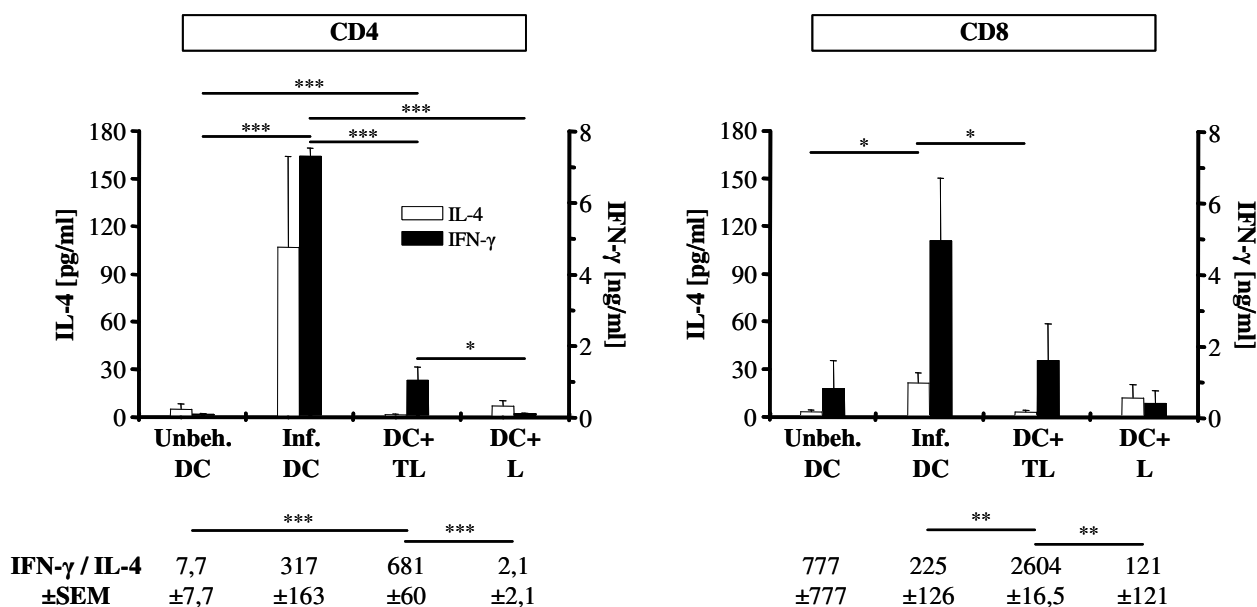


Abb. 31 Nach Restimulierung mit TAT-LACK-transduzierten DC weisen *Leishmania*-spezifische T-Zellen ein klassisches Th1 Zytokinprofil auf.

C57BL/6 Mäuse wurden *high dose* mit 2×10^5 metazyklischen *Leishmanien* infiziert. 5-14 Wochen nach der Infektion wurden drainierende LN und Milz geerntet und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden mittels MACS-Aufreinigung isoliert. Die TC wurden mit verschiedenen BMDC-Präparationen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) restimuliert. Die DC wurden zuvor mit 2 μ M Protein transduziert und mit 4.000 rad bestrahlt. Nach 48 h Inkubation wurden die Überstände geerntet und die sezernierten Zytokine im ELSIA analysiert. Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten aus drei unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert + SEM ($n \geq 3$; * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,002$). IFN- γ / IL-4 Ratio sind tabellarisch aufgeführt und als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen wiesen nach Restimulierung mit TAT-LACK transduzierten DC ein typisches Th1 Zytokinprofil mit hohen IFN- γ - und niedrigen IL-4-Konzentrationen auf (Abb. 31). Im Gegensatz dazu wurde nach Restimulierung mit LACK gepulsten DC ein klassisches Th2 Zytokinprofil mit niedrigen IFN- γ - und hohen IL-4-Konzentrationen beobachtet. Die berechneten IFN- γ / IL-4 Ratio bestätigten diesen Beobachtungen. Sowohl bei CD4⁺ als auch bei CD8⁺ T-Zellen ließen sich nach Restimulierung mit TAT-LACK transduzierten DC statistisch signifikant höhere Quotienten als bei DC+LACK stimulierten Zellen nachweisen (CD4: 681 \pm 60 vs. 2,1 \pm 2,1; CD8:

2604±16,5 vs. 121±121). Außer nach Restimulierung mit infizierten DC wiesen CD8⁺ T-Zellen deutlich höhere IFN- γ / IL-4 Ratio als die entsprechenden CD4⁺ T-Zellen auf, da CD8⁺ Zellen mehr IFN- γ und weniger IL-4 sezernierten als die entsprechenden CD4⁺ Zellen.

Fazit: Mit Hilfe von Restimulierungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß TAT-LACK transduzierte DC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* CD8⁺ T-Zellen zur Proliferation induzieren können. Dabei waren sie der Restimulierung mit LACK gepulsten DC überlegen. Diese Zellkulturdaten bestätigten die in Vakzinierungsversuchen beobachtete, von TAT-LACK vermittelte, schützende Immunität. In weiterführenden Experimenten sollte daher die T-Zell-Abhängigkeit des TAT-vermittelten Effektes bestätigt werden. Dazu wurden Vakzinierungsexperimente in T-Zell-depletierten Mäusen durchgeführt.

3.6. Depletionsexperimente

Um die T-Zell-Abhängigkeit der TAT-LACK vermittelten, schützenden Immunität zu bestätigen, wurden die T-Zellen zum Zeitpunkt der DC-Vakzinierung in BALB/c Mäusen durch Injektion neutralisierender Antikörper depletiert. Die *low dose* Infektion mit *Leishmania major* wurde erst gesetzt, als alle T-Zellen wieder hergestellt waren.

3.6.1. Optimierung des Depletionsprotokolles

Zur T-Zell-Depletion wurden monoklonale Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 eingesetzt. In Vorversuchen mußte die optimale Konzentration der injizierten Antikörper ermittelt werden. Die T-Zellen sollten für mindestens eine Woche depletiert bleiben, da sich in dieser Zeit die Immunantwort auf die DC-basierte Vakzine entwickelt. Die Kontrolle der Depletion erfolgte durch FACS-Analyse mononukleärer Zellen aus dem Blut.

Als optimal erwies sich die einmalige Injektion von 125 μ g α -CD4 (GK1.5) und 50 μ g α -CD8 (2.43) monoklonalem Antikörper. Bereits zwei Tage nach intraperitonealer Injektion der Antikörper waren keine T-Zellen im Blut mehr nachweisbar (Abb. 32). Drei Wochen später waren alle T-Zellen wieder hergestellt. Somit ergab sich folgendes Vakzinierungsprotokoll: An Tag -23 wurden die Mäuse depletiert und an Tag -21 intradermal vakziniert. Die *low dose* Infektion in das Gegenohr erfolgte an Tag 0. Dadurch war sicher gestellt, daß die T-Zellen nur

zum Zeitpunkt der Vakzinierung fehlten und daß die *Leishmania*-Infektion unter normalen Bedingungen ablaufen konnte.

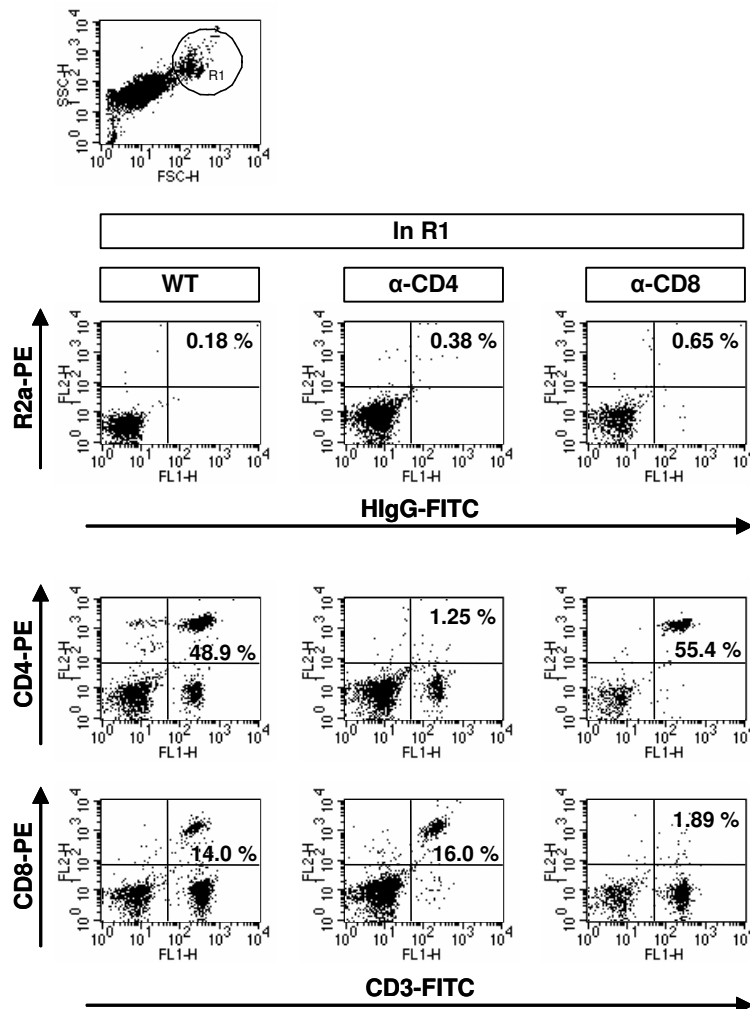


Abb. 32 Zwei Tage nach einmaliger Injektion neutralisierender Antikörper sind alle T-Zellen in BALB/c Mäusen depletiert.

BALB/c Mäusen wurden einmalig 125 μ g α -CD4 (GK1.5) oder 50 μ g α -CD8 (2.43) mAk i.p. injiziert. 2 Tage später wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene abgenommen. Mononukleäre Zellen wurden über einen Biocollgradienten angereichert und im FACS analysiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen aus unbehandelten Mäusen (WT). Zur Charakterisierung der T-Zellen wurden diese mit FITC-markiertem α -CD3 und PE-konjugiertem α -CD4 oder α -CD8 mAk angefärbt. Als Isotypkontrollen dienten FITC-markiertes Hamster IgG (HlgG) oder PE-konjugiertes Ratten IgG_{2a} (R2a). Ein repräsentatives Experiment ist beispielhaft gezeigt.

3.6.2. Depletion von T-Zellen zum Zeitpunkt der DC-Vakzinierung in BALB/c Mäusen

BALB/c Mäuse wurden mit TAT-LACK transduzierten oder LACK gepulsten DC intradermal im rechten Ohr vakzinert, wobei alle T-Zellen zum Zeitpunkt der Vakzinierung depletiert wurden. Nach drei Wochen, als alle T-Zellen wieder hergestellt waren, erfolgte die *low dose* Infektion in das kontralaterale Ohr.

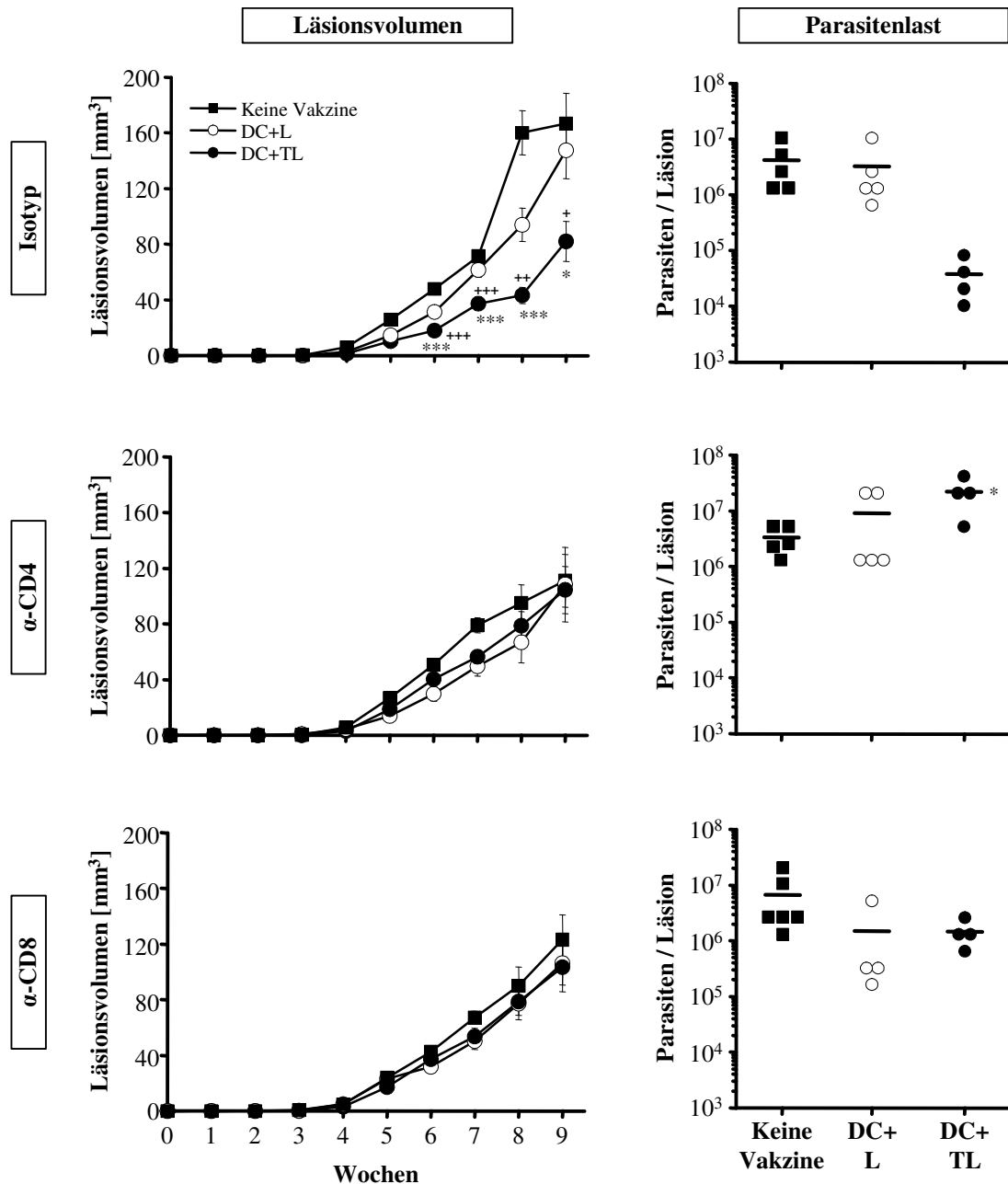


Abb. 33 Nach Depletion der T-Zellen zum Zeitpunkt der DC-Vakzinierung weisen TAT-LACK vakzinierete BALB/c Mäuse größere Läsionsvolumina und höhere Parasitenlasten auf.

BALB/c Mäuse wurden mit 2×10^5 TAT-LACK transduzierten oder LACK gepulsten BMDC i.d. im rechten Ohr vakzinert. Die TC wurden durch i.p. Injektion neutralisierender Antikörper zum Zeitpunkt der Vakzinierung depletiert. Die *low dose* Infektion mit 1.000 metazyklischen Promastigoten erfolgte drei Wochen später. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich vermessen. Die gezeigten Ergebnisse enthalten Daten von 4 unabhängigen Experimenten und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 17$; * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,002$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,005$ und +++ $p \leq 0,002$ verglichen mit LACK behandelten Tieren). 7 Wochen nach der Infektion wurden die infizierten Ohren geerntet und die läSIONALen Parasitenlasten wurden mittels einer limitierenden Verdünnungsreihe bestimmt. Ein repräsentatives Experiment von dreien mit ähnlichen Ergebnissen ist gezeigt ($n \geq 4$; * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe)

In der mit Isotyp behandelten Kontrollgruppe konnte die von TAT-LACK vermittelte schützende Immunität gegen eine progressiv verlaufende *Leishmania*-Infektion unverändert

beobachtet werden (Abb. 33). Die Injektion von LACK gepulsten DC zeigte keinerlei protektive Wirkung und die Infektion verlief annähernd so progressiv wie in der unbehandelten Kontrollgruppe (DC+L: $148 \pm 20,4 \text{ mm}^3$; keine Vakzine: $167 \pm 21,8 \text{ mm}^3$). Statistisch signifikante Unterschiede wurden nach TAT-LACK Behandlung sowohl zur LACK behandelten als auch zur unbehandelten Kontrollgruppe gefunden. TAT-LACK vakzinierte BALB/c Mäuse wiesen in Woche 8 eine 54 %ige Reduktion der Läsionsvolumina im Vergleich zu LACK immunisierten Tieren auf ($43,2 \pm 5,7$ vs. $94,0 \pm 12,0 \text{ mm}^3$; $^{++}p \leq 0,005$). Die beobachtete Protektion konnte durch um mehrere log-Stufen verringerte läSIONALE Parasitenlasten bestätigt werden (DC+TL: $3,8 \pm 1,6 \times 10^4$ Parasiten/Läsion; DC+L: $3,3 \pm 1,8 \times 10^6$ Parasiten/Läsion).

Fehlten zum Zeitpunkt der Vakzinierung entweder $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen, ging die zuvor beobachtete, TAT-LACK abhängige, protektive Immunität vollständig verloren. Die gemessenen Läsionsvolumina der TAT-LACK vakzinierten Mäuse glichen sich den Werten der unbehandelten und der LACK behandelten Tiere an (α -CD4: 104 ± 17 vs. 108 ± 27 vs. $111 \pm 19 \text{ mm}^3$; α -CD8: 103 ± 18 vs. 106 ± 16 vs. $123 \pm 18 \text{ mm}^3$ für DC+TAT-LACK, DC+LACK und keine Vakzine in Woche 9). Die läSIONALEN Parasitenlasten bestätigten den Verlust der TAT-vermittelten Protektion. TAT-LACK vakzinierte Tiere wiesen zum Teil höhere Parasitenlasten als LACK immunisierte oder unbehandelte Mäuse auf (α -CD4: $2,2 \pm 0,8 \times 10^7$ vs. $9,2 \pm 4,8 \times 10^6$ vs. $3,4 \pm 0,8 \times 10^6$ Parasiten/Läsion; α -CD8: $1,5 \pm 0,4 \times 10^6$ vs. $1,5 \pm 1,2 \times 10^6$ vs. $6,8 \pm 3,2 \times 10^6$ Parasiten/Läsion für DC+TAT-LACK, DC+LACK und keine Vakzine).

Fazit: Die Ergebnisse der vorausgegangenen *in vitro* Restimulierungsexperimente ließen vermuten, daß die von TAT-LACK vermittelte schützende Immunität T-Zell-abhängig war. Mit Hilfe von Depletionsexperimenten konnte diese Vermutung bestätigt werden. Fehlten zum Zeitpunkt der Vakzinierung entweder $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen, ging die TAT-LACK abhängige Protektion vollständig verloren. Sowohl gemessene Läsionsvolumina als auch läSIONALE Parasitenlasten bestätigten diesen Verlust.

3.7. Vakzinierung mit dendritischen Zellen aus IL-12p40 defizienten Mäusen

IL-12 ist unerlässlich für die Etablierung einer schützenden Th1 Immunantwort in der murinen kutanen Leishmaniose [129;130]. Mit Leishmanien infizierte DC sind eine mögliche Quelle für das sezernierte IL-12 [43;124;131]. Um die IL-12-Abhängigkeit der DC-basierten Vakzine zu überprüfen, wurden C57BL/6 Mäuse mit TAT-LACK transduzierten DC aus

Wildtyp und IL-12p40 defizienten Tieren sowie geeigneten Kontrollen intradermal im rechten Ohr vakziniert. Die *low dose* Infektion erfolgte eine Woche nach Immunisierung in das Gegenohr.

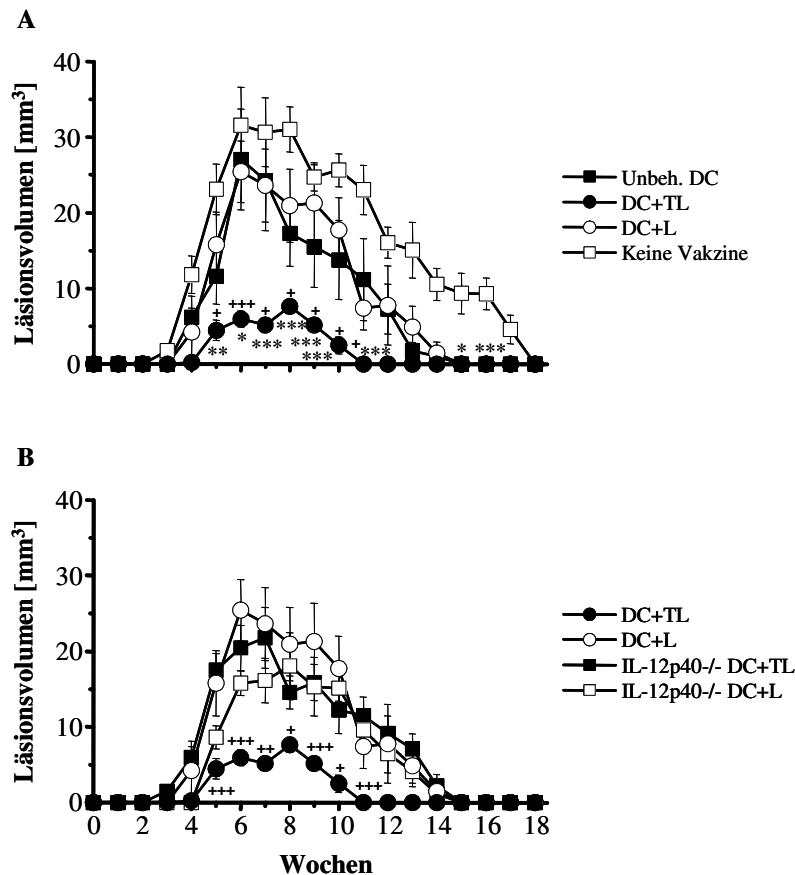


Abb. 34 Die protektive Wirkung TAT-LACK transduzierter DC ist IL-12 abhängig.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^5 TAT-LACK transduzierten BMDC aus Wildtyp (A) und IL-12p40 defizienten Mäusen (B) sowie geeigneten Kontrollen i.d. im rechten Ohr vakziniert. Die *low dose* Infektion mit 1.000 metazyklischen Promastigoten erfolgte eine Woche später in das kontralaterale linke Ohr. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich vermessen. Ein repräsentatives Experiment von dreien mit ähnlichen Ergebnissen ist gezeigt. Die präsentierten Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 4$; A) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; + $p \leq 0,05$ und +++ $p \leq 0,002$ verglichen mit DC+LACK behandelten Tieren; B) + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,005$ und +++ $p \leq 0,002$ verglichen mit TAT-LACK transduzierten DC aus IL-12p40 defizienten C57BL/6 Mäusen).

Erwartungsgemäß konnten bei C57BL/6 Mäuse nach Vakzinierung mit TAT-LACK-transduzierten Wildtyp-DC deutlich verringerte Läsionsvolumina sowie eine raschere Ausheilung beobachtet werden (Abb. 34A). Statistisch signifikante Unterschiede wurden sowohl zu DC+LACK behandelten Tieren als auch zur unbehandelten Kontrollgruppe gefunden.

Das Monomer IL-12p40 bildet zusammen mit der Untereinheit p35 bioaktives IL-12p70. IL-12p40 defiziente Mäuse besitzen daher kein IL-12p70.

Nach Vakzinierung mit transduzierten DC aus IL-12p40 defizienten C57BL/6 Mäusen ging die von TAT-LACK vermittelte protektive Wirkung vollständig verloren (Abb. 34B). Sechs Wochen nach Immunisierung mit transduzierten DC aus defizienten Mäusen konnten mehr als dreimal so große Läsionsvolumina wie nach Vakzinierung mit Wildtyp-DC beobachtet werden ($5,9 \pm 1,0$ vs. $20,4 \pm 3,0$ mm³). Die gemessenen Läsionsgrößen glichen sich denen der LACK behandelten Tiere an. Interessanterweise konnten zwischen LACK gepulsten DC aus Wildtyp und IL-12p40-defizienten Tieren keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Fazit: Diese *in vivo* Versuche zeigten, daß die protektive Wirkung TAT-LACK transduzierter DC stark IL-12 abhängig war, und daß das IL-12 von den DC selbst produziert werden mußte.

3.8. Direkte, proteinbasierte Vakzinierung mit TAT-LACK Fusionsproteinen

DC-basierte Vakzinierungen sind aufgrund der Generierung von DC aus *Buffy Coats* arbeitsaufwendig und sehr kostspielig. Daher sind sie gerade in armen, Leishmaniose endemischen Ländern nur schwer einsetzbar. Aus diesem Grund wurde das Potential von TAT-LACK als direkte, proteinbasierte Vakzine in empfindlichen BALB/c Mäusen untersucht, um DC *in vivo* anzusteuern. Zudem konnte in solch einem direkten Ansatz bestätigt werden, daß die im DC-basierten Modell beobachtete Protektion nicht vom Aktivierungsstatus der DC abhing, sondern tatsächlich auf TAT-LACK zurückzuführen war.

3.8.1. Austestung von CpG 1826 als Adjuvanz

Es ist bekannt, daß Proteine allein oft nicht ausreichend immunogen sind, um eine Immunantwort im Empfängertier hervorzurufen [132]. Daher wurde in ersten Experimenten überprüft, ob die Injektion von Adjuvanzen für die protektive Wirkung von TAT-LACK erforderlich ist.

Pro Mäuseohr konnte maximal ein Volumen von 50 µl intradermal appliziert werden. Um die Injektion ausreichender Proteinmengen gewährleisten zu können, wurden BALB/c Mäuse am Tag -7 und -6 mit jeweils 10 µg TAT-LACK oder geeignete Kontrollen i.d. im rechten Ohr immunisiert. An Tag -5 wurden 10 µg CpG 1826 in das vakzinierte Ohr injiziert. Die

physiologisch relevante *low dose* Infektion mit *Leishmania major* erfolgte an Tag 0 in das kontralaterale linke Ohr. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich gemessen.

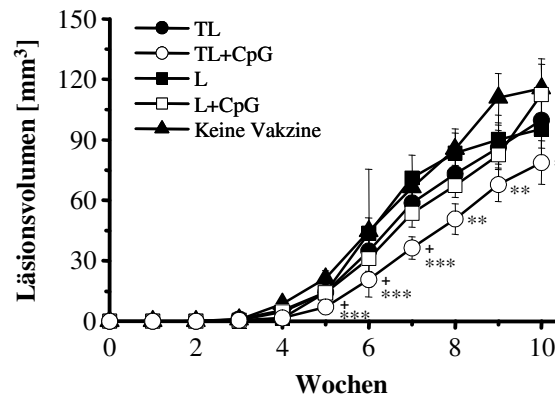


Abb. 35 **Im proteinbasierten Vakzinierungsmodell ist die Injektion von CpG 1826 als Adjuvanz erforderlich.**

BALB/c Mäuse wurden an Tag -7 und -6 mit jeweils 10 µg TAT-LACK oder LACK i.d. im rechten Ohr vakziniert. An Tag -5 erhielten einige Tiere 10 µg CpG 1826 als Adjuvanz in das immunisierte Ohr. Die *low dose* Infektion mit 1.000 metazyklischen Leishmanien erfolgte an Tag 0 in das kontralaterale linke Ohr. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich vermessen. Die präsentierten Ergebnisse enthalten Daten aus vier unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert ± SEM dargestellt ($n \geq 5$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; + $p \leq 0,05$ verglichen mit TAT-LACK behandelten Tieren).

Ohne gleichzeitige Applikation von CpG 1826 führten weder die Immunisierung mit LACK noch die mit TAT-LACK zu einer Verbesserung des Infektionsverlaufes (Abb. 35). Durch Co-Injektion von CpG konnte bei TAT-LACK behandelten Mäusen eine 39 %ige Verringerung der Läsionsvolumina erzielt werden ($58,7 \pm 7,6$ vs. $36,4 \pm 5,5$ mm³ in Woche 7). Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich sowohl zur TAT-LACK behandelten Gruppe ohne CpG als auch zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Bei LACK immunisierten Mäusen ließ sich nach Adjuvanzapplikation ebenfalls eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes beobachten, allerdings waren die Unterschiede nicht so deutlich wie in der TAT-LACK immunisierten Gruppe. So kam es in Woche 7 nach Infektion nur zu einer 25 %igen Reduktion der Läsionsgrößen ($71,2 \pm 11,3$ vs. $53,4 \pm 6,6$ mm³).

Aufgrund der beobachteten Ergebnisse wurden alle weiteren proteinbasierten Vakzinierungen mit CpG 1826 als Adjuvanz durchgeführt.

3.8.2. Optimierung des proteinbasierten Vakzinierungsprotokolles

Das hier verwendete Vakzinierungsprotokoll orientierte sich an dem der DC-basierten Vakzinierung. Da zwischen TAT-LACK+CpG und LACK+CpG behandelten Mäusen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten (Abb. 35), lag die Vermutung nahe, daß der Zeitraum zwischen Vakzinierung und Infektion mit sieben Tagen für das proteinbasierte Modell zu kurz gewählt worden war. Aus diesem Grund wurde die Zeitspanne in weiterführenden Versuchen auf zwei Wochen verlängert.

BALB/c Mäuse erhielten am Tag -14 und -13 i.d. in das rechte Ohr jeweils 10 µg TAT-LACK oder geeignete Kontrollproteine. 10 µg CpG 1826 wurden am Tag -12 in dasselbe Ohr injiziert. Die *low dose* Infektion erfolgte an Tag 0 in das Gegenohr. Die Läsionen wurden wöchentlich vermessen.

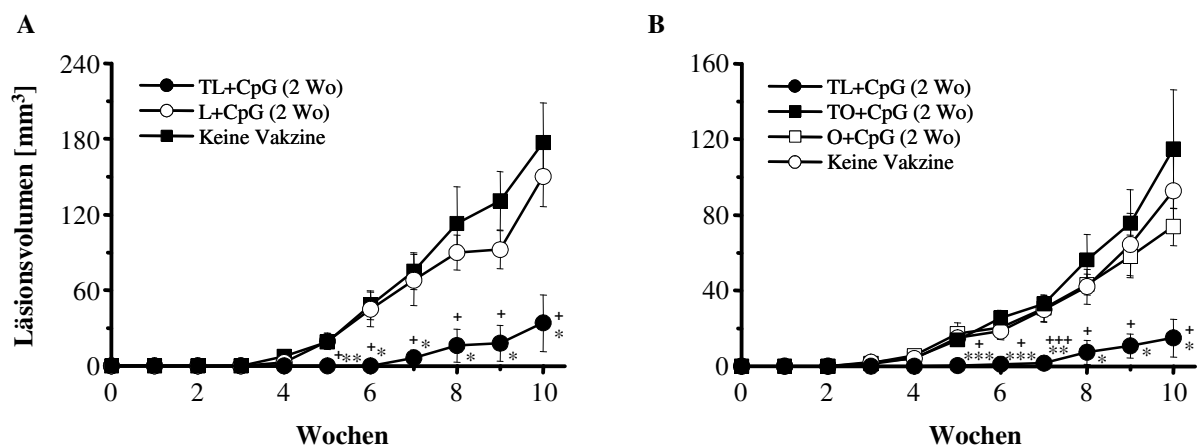


Abb. 36 Nach Vakzinierung mit TAT-LACK Fusionsproteinen sind BALB/c Mäuse gegen eine progressiv verlaufende *low dose* Infektion mit *Leishmania major* geschützt

BALB/c Mäuse wurden an Tag -14 und -13 mit jeweils 10 µg TAT-LACK (TL) bzw. LACK (L) (A) oder den irrelevanten Kontrollproteinen TAT-OVA (TO) und OVA (O) (B) im rechten Ohr vakzinert. Die Injektion von 10 µg CpG 1826 als Adjuvanz erfolgte an Tag -12 in das immunisierte Ohr. An Tag 0 wurden die Tiere *low dose* mit 1.000 metazyklischen Leishmanien im kontralateralen linken Ohr infiziert. Die Läsionen wurden wöchentlich in allen drei Dimensionen vermessen. Jeweils ein repräsentatives Experiment von dreien ist gezeigt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n \geq 4$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,002$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; + $p \leq 0,05$ und +++ $p \leq 0,002$ verglichen mit L+CpG behandelten Tieren (A) oder verglichen mit TO+CpG und O+CpG immunisierten Mäusen (B).

Allein die Verlängerung des Zeitraumes zwischen Vakzinierung und Infektion auf zwei Wochen führte zu einer signifikanten Reduktion der Läsionsvolumina TAT-LACK immunisierter BALB/c Mäuse. Bei LACK immunisierten Tieren konnte im Gegensatz dazu keine Verbesserung beobachtet werden (Abb. 36A). Ihr Krankheitsverlauf unterschied sich nicht wesentlich von dem der unbehandelten Kontrollgruppe.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Protektion tatsächlich antigenspezifisch war und nicht nur durch das fusionierte TAT-Peptid vermittelt wurde, wurden BALB/c Mäuse mit einem Fusionsprotein aus TAT und OVA als irrelevantes Kontrollprotein immunisiert. Die Wahl fiel auf OVA und nicht, wie bei der DC-basierten Vakzinierung, auf β -Galaktosidase, da OVA mit einem Molekulargewicht von 49 kDa dem 25 kDa großem LACK ähnlicher ist als die 120 kDa große β -Galaktosidase.

Erwartungsgemäß konnte weder die Immunisierung mit TAT-OVA noch mit OVA allein schützende Immunität gegen die Infektion mit *Leishmania major* vermitteln (Abb. 36B). Der Infektionsverlauf unterschied sich nicht von dem der unbehandelten Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wiesen TAT-LACK vakzinierter Mäuse auch hier einen deutlich milderen Krankheitsverlauf auf. Statistisch signifikante Unterschiede wurden sowohl zu TAT-OVA und OVA behandelten Tieren als auch zur unbehandelten Kontrollgruppe gefunden. Letztere wiesen in Woche 7 nach Infektion fast 20fach größere Läsionsvolumina als TAT-LACK vakzinierter Tiere auf ($1,52 \pm 1,14$ vs. $30,0 \pm 6,84$ mm³).

Fazit: Im Gegensatz zur DC-basierten Vakzinierung konnte die direkte, proteinbasierte Immunisierung mit TAT-LACK Fusionsprotein nur dann schützende Immunität vermitteln, wenn gleichzeitig CpG 1826 als Adjuvanz appliziert wurde. Der Vakzinierungserfolg ließ sich verbessern, in dem der Zeitraum zwischen Immunisierung und Infektion von einer auf zwei Wochen verlängert wurde. Die beobachtete Protektion war antigenspezifisch, da die irrelevanten Kontrollproteine TAT-OVA und OVA keine Verbesserung des Infektionsverlaufes bewirken konnten.

3.8.3. Quantifizierung der Aktivierung und Auswanderung von Langerhans-Zellen nach proteinbasierter Vakzinierung mit TAT-LACK Fusionsproteinen

Im Gegensatz zur DC-basierten Vakzinierung wurden bei der proteinbasierten Immunisierung keine transduzierten, antigenpräsentierenden Zellen, sondern nur das TAT-Fusionsprotein allein gespritzt. Es stellte sich daher die Frage, von welchen Zellen das Protein *in vivo* aufgenommen und prozessiert wurde. Da die Vakzine intradermal appliziert wurde, lag die Vermutung nahe, daß es sich dabei um die DC der Epidermis, den sogenannten Langerhans-Zellen (LC) handelte. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Epidermis vakzinierter Ohren präpariert und Aktivierung und Auswanderung von DC wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

BALB/c Mäuse wurden mit TAT-LACK und LACK sowie geeigneten Kontrollen i.d. in beiden Ohren vakziniert. Einige Tiere erhielten zusätzlich CpG 1826 als Adjuvanz. Um die Aktivierung von LC durch Endotoxine der Proteinpräparationen zu unterbinden, wurden die Proteine vor der Injektion mit Polymyxin B inkubiert. Drei Tage nach der Vakzinierung wurden die Ohren geerntet und die Epidermis wurde präpariert. LC wurden mittels FITC-markiertem α -MHC Klasse II Antikörper angefärbt und Aktivierungszustand sowie Grad der Auswanderung wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Inaktive LC besitzen deutlich erkennbare Dendriten. Nach Aktivierung der Zelle verliert diese ihre Dendriten, gleichzeitig wird die Expression von MHC Klasse II Molekülen hochreguliert, so daß aktivierte DC stärker gefärbt sind. Die Auswanderung aktivierter LC wurde in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe (keine Migration) berechnet.

Durch die proteinbasierte Vakzinierung wurden epidermale LC aktiviert und wanderten daraufhin aus der Epidermis aus. Im Vergleich zur Injektion von PBS als Negativkontrolle belegten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eine deutliche Aktivierung epidermaler LC nach i.d. Applikation von TAT-LACK Fusionsproteinen und CpG (Abb. 37A). Sowohl die Injektion von TAT-LACK als auch die von LACK alleine führte zu einer deutlichen Aktivierung der LC von 4,7 % (Negativkontrolle) auf 13,8 % (LACK) bzw. 14,4 % (TAT-LACK; Abb. 37B). Durch gleichzeitige Injektion von CpG 1826 konnte jedoch keine wesentliche Steigerung mehr erzielt werden. Der höchste prozentuale Anteil aktivierter LC (19,3 %) sowie die größte prozentuale Auswanderung (24,6 %) konnte nach Applikation von CpG alleine beobachtet werden. Interessanterweise nahmen beide Parameter in Kombination mit TAT-LACK und LACK wieder ab. Bezüglich der LC-Auswanderung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Proteinen beobachtet werden.

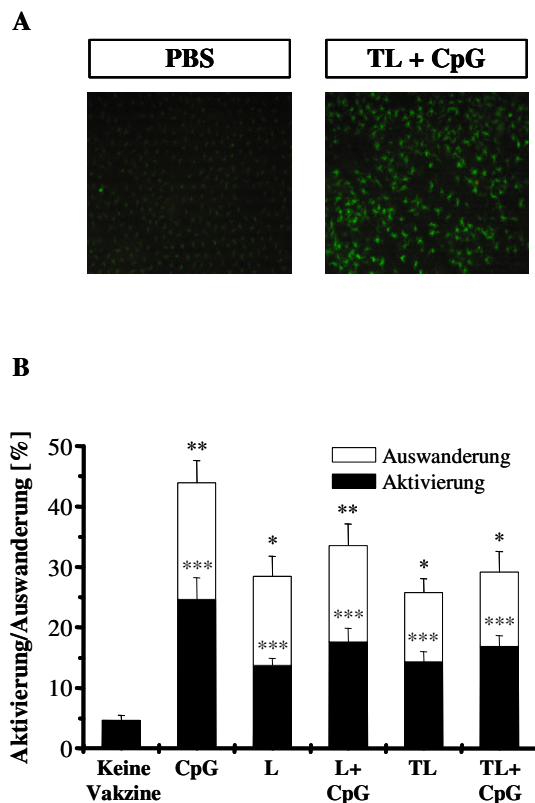


Abb. 37 Die Vakzinierung mit TAT-LACK Fusionsproteinen resultiert in Aktivierung und Auswanderung epidermaler Langerhans-Zellen.

BALB/c Mäuse wurden mit je 20 µg TAT-LACK und LACK sowie geeigneten Kontrollen in beiden Ohren i.d. vakziniert. Die Proteine wurden mit Polymyxin B (50 µg/ml) und teilweise mit 10 µg CpG 1826 für 30 min bei RT vorinkubiert. **A)** Drei Tage später wurden die Ohren geerntet, die Epidermis wurde isoliert und Langerhans-Zellen (LC) wurden mittels FITC-konjugiertem α -MHC Klasse II mAk angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. **B)** Aktivierung und Auswanderung der LC wurden fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Die Auswanderung wurde in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe (keine Migration) berechnet. Ein repräsentative Experiment von zweien ist gezeigt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM dargestellt. (n=4; *p<0,05, **p<0,005 und ***p<0,002 im Vergleich zur unbehandelten Gruppe).

Fazit: TAT-LACK Fusionsproteine waren auch im direkten, proteinbasierten Vakzinierungsansatz in der Lage, schützende Immunität gegen eine progressiv verlaufende Infektion mit *Leishmania major* zu vermitteln, wenn CpG 1826 als Adjuvanz co-injiziert wurde. Die Vakzinierungserfolge in diesem proteinbasierten Modell belegten, daß die Protektion der DC-basierten Immunisierung nicht nur auf unterschiedliche Aktivierungszustände der DC zurückzuführen war.

Für die proteinbasierte, TAT-LACK vermittelte Protektion war eine Verlängerung des Zeitraumes zwischen Immunisierung und Infektion von Vorteil. Fluoreszenzfärbungen der isolierten Epidermis belegten, daß LC nach proteinbasierter Vakzinierung aktiviert wurden und aus der Epidermis ausgewandert waren.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß mit TAT-Fusionsproteinen effektiv gegen eine progressiv verlaufende *Leishmania*-Infektion in BALB/c und C57BL/6 Mäusen vakziniert werden kann. Schützende Immunität konnte sowohl nach DC als auch nach proteinbasierter Vakzinierung beobachtet werden. *In vitro* Analysen bestätigten die verstärkte Induktion CD8⁺ T-Zellen.

4.1. Stammesspezifische Unterschiede in BALB/c und C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit *Leishmania major*

Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung einer DC basierten Vakzine gegen die murine kutane Leishmaniose. Daher sollte in Vorversuchen die Relevanz von DC während einer *Leishmania*-Infektion analysiert werden. Es war bereits bekannt, daß inokulierte Leishmanien von Langerhans-Zellen, den DC der Epidermis, aufgenommen und in den drainierenden Lymphknoten präsentiert werden [124;125]. Außerdem konnte mit infizierten DC bereits erfolgreich gegen eine *Leishmania*-Infektion vakziniert werden [50;99;100;133]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst die Rekrutierung von DC in Läsionen und Lymphknoten im Verlauf einer etablierten *Leishmania*-Infektion stammesspezifisch analysiert werden.

Nach *high dose* Infektion mit *Leishmania major* wiesen BALB/c Mäuse zu allen Zeitpunkten signifikant größere Läsionsvolumina als C57BL/6 Mäuse auf (Abb. 5) und entsprachen damit dem Infektionsverlauf, wie er bereits vielfach publiziert wurde [26;134]. Die ebenfalls höheren Gesamtzellzahlen korrelierten mit dieser Beobachtung (Abb. 6A) und erklären die größeren Läsionsvolumina und Lymphknoten.

Die Analyse der in die Läsion eingewanderten Entzündungszellen ergab, daß BALB/c Mäuse signifikant mehr DC rekrutierten als C57BL/6 Tiere (Abb. 6B) und diese so zur höheren Gesamtzellzahl beitrugen. Diese Ergebnisse entsprechen Daten früherer Beobachtungen im *low dose* [135] und *high dose* Modell [136], die zudem zeigten, daß es sich bei einem Großteil der läsionalen DC um LC handelte [135]. Die Rekrutierung läsionaler DC in C57BL/6 Mäusen begann drei Wochen später als in BALB/c Tieren und entsprach damit dem Verlauf, wie er bereits für das *low dose* Modell publiziert wurde [28].

Bezüglich der Einwanderung von DC in die drainierenden Lymphknoten konnten keine stammesspezifischen Unterschiede beobachtet werden. Die Unterschiede in der Gesamtzellzahl müssen daher auf die Rekrutierung anderer Entzündungszellen

zurückzuführen sein. In der Tat rekrutierten BALB/c Mäuse signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen in die drainierenden Lymphknoten als C57BL/6 Tiere (Abb. 7A), wodurch frühere Beobachtungen bestätigt wurden [54]. Die Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in die Läsion verlief in beiden Mausstämmen in den ersten vier Wochen nach Infektion identisch. Ab Woche 5 konnte in C57BL/6 Tieren ein deutlicher Anstieg der Zellzahl beobachtet werden, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Infektionen langsam wieder ausheilten. Bezüglich der Einwanderung von CD8⁺ T-Zellen in Läsion und Lymphknoten konnten keine stammesspezifischen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 7B). Sowohl die Rekrutierungen der CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zellen in die Läsion entsprachen den Verläufen, wie sie bereits für eine Infektion mit *Leishmania mexicana* publiziert wurden [137].

Erste Untersuchungen konnten also zeigen, daß die Rekrutierung von DC während einer etablierten *Leishmania*-Infektion vor allem in empfindlichen BALB/c Mäusen große Relevanz besaß. Zudem wanderten in diesen Mäusen, verglichen mit resistenten C57BL/6 Tieren, signifikant mehr CD4⁺, aber ähnlich viele CD8⁺ T-Zellen in die Läsion ein. Dennoch waren sie nicht in der Lage, die *Leishmania*-Infektion unter Kontrolle zu bringen. Nicht die Quantität, sondern vielmehr die Qualität der eingewanderten Entzündungszellen schien daher Einfluß auf den Infektionsverlauf auszuüben. Um so überraschender war die Beobachtung, daß rekrutierte DC aus BALB/c Mäusen höhere Infektionsraten als DC aus C57BL/6 Tieren aufwiesen (Abb. 8A). Ein zu geringer Infektionsstatus der DC schied somit als Grund für die *Leishmania*-Suszeptibilität aus. Die beobachteten Ergebnisse bestätigen bereits publizierte Daten anderer Arbeitsgruppen, in denen gezeigt werden konnte, daß *Leishmania*-Läsionen von BALB/c Mäusen deutlich mehr infizierte Zellen aufwiesen als Granulome von C57BL/6 Tieren, und daß es sich bei den infizierten Zellen neben Makrophagen und Granulozyten auch um DC handelte [136].

Während die DC-Infektionsrate in den drainierenden Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen bis zur sechsten Woche nach Infektion annähernd auf den Ausgangswert zurückgegangen war, war in den Lymphknoten von BALB/c Tieren ein kontinuierlicher Anstieg der DC-Infektionsrate zu beobachten (Abb. 8A). Zudem waren BALB/C DC bis Woche 6 nach Infektion nicht in der Lage, intrazelluläre Amastigote effektiv zu eliminieren (Abb. 8B). Das Unvermögen, die Infektion in den Lymphknoten unter Kontrolle zu bringen, könnte mit zur Suszeptibilität in BALB/c Mäusen beitragen. Die Ergebnisse entsprechen Daten bereits publizierter Arbeiten, in denen Infektionsraten und Anzahl der Parasiten pro Zelle vier Wochen nach Infektion mit *Leishmania major* in den drainierenden Lymphknoten untersucht

wurden [136]. Hierbei wurden jedoch deutlich mehr Amastigote pro infizierte DC als im Rahmen dieser Doktorarbeit gefunden und stammesspezifische Unterschiede konnten bereits nach vier und nicht erst nach sechs Wochen nachgewiesen werden. Vermutlich ist die mehr als doppelt so hohe Konzentration an *Leishmania major*, mit denen die Tiere infiziert wurden, und der daraus resultierende, schnellere Infektionsverlauf Ursache für diese Diskrepanzen.

Obwohl in BALB/c Mäusen weit mehr DC nach Infektion rekrutiert wurden und diese zudem höhere Infektionsraten als in resistenten C57BL/6 Mäusen aufwiesen, waren sie nicht in der Lage, protektive Immunität gegen den Parasiten zu initiieren. Für die Suszeptibilität von BALB/c Mäusen gibt es eine Vielzahl an möglichen Erklärungen, sowohl auf T-Zell- als auch auf DC-Ebene. Die vermehrte Produktion von IL-4 durch LACK-reaktive CD4⁺ T-Zellen zum frühen Zeitpunkt der Infektion [87;88] sowie die gleichzeitig verringerte Sekretion des Th1-dirigierenden Zytokins IL-12 [14] fördern die Etablierung einer Th2-Immunantwort. IL-4 vermittelt zusätzlich die Herunterregulation der $\beta 2$ Kette des IL-12-Rezeptors auf Th2-Zellen [138;139]. IFN- γ , welches die Expression des IL-12R $\beta 2$ wieder herauf regulieren könnte, wird in infizierten BALB/c Mäusen in geringerem Maße als in resistenten Tieren produziert [14]. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß DC aus infizierten BALB/c Mäusen, im Vergleich zu DC aus C57BL/6 Tieren, weniger IL-1 α [51] und IL-1 β [52] sezernieren. Durch Substitution mit rekombinanten IL-1 α zum frühen Zeitpunkt einer *Leishmania*-Infektion konnte das Zytokinprofil in Richtung einer Th1-Immunantwort verschoben werden. Zudem produzieren DC aus suszeptiblen BALB/c Mäusen nach Infektion mit *Leishmania major* vermehrt das inhibitorisch wirkende Homodimer IL-12(p40)₂, welches als IL-12 Antagonist die Etablierung einer schützenden Th1-Immunantwort erschwert [von Stebut *et al.*, Manuskript in Vorbereitung].

Im Rahmen dieser Dissertation konnten zwei weitere mögliche Erklärungen für die Suszeptibilität von BALB/c Mäusen heraus gearbeitet werden. Zum einen exprimierten läsionale DC aus BALB/c Mäusen signifikant weniger CD86 auf ihrer Oberfläche (Abb. 11B) und zum anderen wiesen *Leishmania*-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen starke Proliferationsdefizite auf (Abb. 12).

CD86 (B7-2) gehört zu den co-stimulatorischen Molekülen der B7-Familie und gibt neben den MHC Molekülen, die an den T-Zell-Rezeptor binden, das entscheidende zweite Signal für die klonale Expansion antigenspezifischer T-Zellen [94]. In dem es an das Oberflächenmolekül CD28 auf T-Zellen bindet, werden diese aktiviert. Fehlt CD86, kann die T-Zell-Aktivierung nur unvollständig ablaufen und die resultierende Immunantwort wird

unterdrückt. CD86 spielt somit eine Schlüsselrolle bei der Initiierung schützender Immunantworten [140].

Die Rolle von CD86 bei der Initiierung einer anti-*Leishmania* Immunantwort wird immer noch kontrovers diskutiert. Zum einen konnte gezeigt werden, daß die Blockade von CD86 in BALB/c Mäusen zu einer verringerten Th2-Immunantwort [141] und sogar zur Resistenz gegen eine *Leishmania*-Infektion führen konnte [142]. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, daß nach Blockade von CD86 sowohl die Th1- als auch die Th2-Immunantwort verstärkt wurde [143]. Allerdings wurden bisher noch nie stammesspezifische Unterschiede bezüglich der CD86-Expression im Verlauf einer *Leishmania*-Infektion analysiert. Lediglich in C57BL/6 Mäusen konnte 9 Stunden nach Infektion mit *L. donovani*, *L. major*, *L. braziliensis* oder *L. mexicana* eine Hochregulation der Aktivierungsmarker MHC Klasse II, CD40, CD80 und CD86 auf DC beobachtet werden [144]. Für CD40 und CD86 entspricht das den Ergebnissen, die auch im Rahmen dieser Arbeit, allerdings im Verlauf mehrerer Wochen, beobachtet werden konnten.

Sowohl *Leishmania*-spezifische CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aus BALB/c Mäusen zeigten nach antigenspezifischer Restimulierung signifikant reduzierte Zellproliferation. Generelle Proliferationsdefekte dieser Zellen konnten durch polyklonale Stimulierung mit SEB jedoch ausgeschlossen werden. Die in BALB/c Mäusen beobachteten Proliferationsdefizite waren somit *Leishmania*-spezifisch und stellen eine weitere mögliche Erklärung für die Suszeptibilität dieses Mausstammes dar. Die Ergebnisse entsprechen Resultaten aus dem Modell der viszeralen Leishmaniose [145]. Hier konnte gezeigt werden, daß Lymphozyten aus der Milz von *Leishmania donovani* resistenten Mäusen nach antigenspezifischer Restimulation proliferieren, wohingegen Lymphozyten aus suszeptiblen Tieren keine Proliferation aufwiesen. Für das Modell der murinen kutanen Leishmaniose wurden stammesspezifische Unterschiede in der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferation zum ersten Mal im Rahmen dieser Doktorarbeit beschrieben.

Stammesspezifische Untersuchungen bestätigten die physiologische Relevanz von DC im Rahmen einer etablierten *Leishmania*-Infektion sowohl in BALB/c als auch in C57BL/6 Mäusen. Daß CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle für die schützende anti-*Leishmania* Immunität spielen, war für resistente C57BL/6 Mäuse bereits bekannt [19]. Im Zuge dieser Dissertation konnte gezeigt werden, daß sie auch in empfindlichen BALB/c Mäusen nach Infektion mit *Leishmania major* in die Läsion und die drainierenden Lymphknoten rekrutiert

werden. Allerdings wiesen die rekrutierten CD8⁺ T-Zellen, ebenso wie die CD4⁺ Zellen, deutliche Proliferationsdefizite auf. Die Ergebnisse rechtfertigten somit den Einsatz einer DC-basierten Vakzine, die vermehrt CD8⁺ T-Zellen induzieren sollte, um so möglicherweise die proliferativen Defizite zu überwinden.

4.2. Transduktion von BMDC mit TAT-LACK Fusionsproteinen

DC sind die potentesten APC des Organismus und in der Lage, sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren [93]. Letzteres erfordert die Präsentation antigener Peptide über MHC Klasse I Moleküle und somit die zytosolische Verteilung des Antigens in der Zelle. Die Proteintransduktionsdomäne des HIV-1 TAT-Proteins kann *Leishmania*-Antigene direkt in das Zytosol von DC schleusen [110]. Konfokalmikroskopische Aufnahmen bewiesen, zusätzlich zur endosomalen Verteilung, eine diffuse zytosolische Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle [121]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential TAT-LACK transduzierter BMDC als intradermale Vakzine gegen eine Infektion mit *Leishmania major* in BALB/c und C57BL/6 Mäusen analysiert.

Die Generierung der BMDC erfolgte aus hämatopoetischen Stammzellen in Gegenwart der Zytokine GM-CSF und IL-4. Letzteres unterdrückt hierbei nicht nur die Bildung von Makrophagen, sondern es konnte auch gezeigt werden, daß BMDC von BALB/c und C57BL/6 Mäusen, die in Abwesenheit von IL-4 generiert wurden, nach Simulation mit LPS deutlich weniger bioaktives IL-12p70 sezernierten [146]. Im Gegensatz dazu produzierten ohne IL-4 hergestellte BMDC aus BALB/c Mäusen nach Infektion mit *Leishmania major* signifikant mehr IL-12p40. Da bekannt ist, daß IL-4 die Sekretion des IL-12(p40)₂ Homodimers inhibiert [147], ist zu vermuten, daß es sich bei einem Großteil des von BALB/c Mäusen sezernierten IL-12p40 um das inhibitorisch wirkende Homodimer handelt. Um dessen Produktion zu minimieren, wurden die BMDC in Gegenwart von IL-4 generiert. Daß die sezernierte Menge an bioaktivem IL-12 trotzdem noch ausreicht, um Protektion und Th1-vermittelte Immunantworten induzieren zu können, zeigen Versuche, in denen erfolgreich mit infizierten DC vakziniert werden konnte [50].

FACS-Analysen bestätigten anhand der niedrig exprimierten Oberflächenmarker CD40 und CD86 den unreifen Phänotyp sechs Tage alter BMDC (Abb. 14).

Anhand von Vakzinierungsexperimenten im Tumormodell konnte bereits gezeigt werden, daß BMDC bei der Transduktion mit TAT-Fusionsproteinen durch Endotoxine (Lipopolysaccharide), die in der Proteinpräparation enthaltenen waren, aktiviert wurden [121]. Um dies zu umgehen, erfolgte die Transduktion in Gegenwart von Polymyxin B, welches nicht nur antibakteriell wirkt, sondern auch freie Endotoxine binden und somit neutralisieren kann [148].

Nach Analyse der MFI von CD40 und CD86 (Abb. 15) sowie der Produktion von IL-12p40 TAT-LACK transduzierter DC (Abb. 16) konnte keine eindeutige Aktivierung der Zellen beobachtet werden. Die eingesetzte Menge an Polymyxin B (10 µg/ml) reichte somit aus, um eine deutliche Aktivierung der DC durch freie Endotoxine zu verhindern. Zudem kam es durch die 18 stündige Transduktion mit TAT-LACK zu keiner klassischen DC-Aktivierung (Hochregulation der Aktivierungsmarker, vermehrte Produktion von IL-12), wie sie zum Beispiel nach Infektion mit *Leishmania major* beobachtet werden konnte [43;50]. Die Ergebnisse entsprechen bereits publizierten Daten im humanen System [149], in dem nach Transduktion von DC mit TAT-Fusionsproteinen keine Expressionsänderungen der Oberflächenmoleküle CD83, CD11c, CD54 und HLA-DR beobachtet werden konnten.

Da die Aktivierung von DC in direktem Zusammenhang mit der durch Phagozytose vermittelten Aufnahme von Pathogenen bzw. Antigen steht [93], legen die beobachteten Ergebnisse eine vorwiegend Endozytose unabhängige Aufnahme von TAT-LACK Fusionsproteinen nahe. Im Gegensatz dazu würde man nach Inkubation mit LACK allein einen deutlich aktivierten Phänotyp erwarten. Überraschenderweise konnte jedoch nur eine gesteigerte Produktion an IL-12p40 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant. Bezüglich der Aktivierungsmarker konnte keine Hochregulation beobachtet werden. Möglicherweise reichte die eingesetzte Menge an LACK-Protein (333 nM) nicht für eine vollständigen Aktivierung der DC aus. Vielmehr konnte bei beiden Mausstämmen eine drastische Reduktion der CD40-Expression beobachtet werden. CD40 auf der Oberfläche von DC bindet an den CD40-Liganden auf T-Zellen. Durch diese Ligation wird nicht nur die Viabilität der DC erhöht, CD40-Ligand ist außerdem ein starker Aktivator der IL-12 Produktion in DC [150;151], welche wiederum für die Th1-Differenzierung der resultierenden Immunantwort unerlässlich ist. Wie wichtig diese Wechselwirkungen für die Etablierung einer schützenden anti-*Leishmania* Immunantwort sind, zeigt die Tatsache, daß genetisch resistente Mäuse, denen die CD40/CD40-Ligand Interaktionen fehlen, empfindlich

für eine Infektion mit *Leishmania major* werden [152]. Zusammengenommen ließe sich daher vermuten, daß LACK gepulste DC schlechtere Induktoren schützender Th1-vermittelter Immunität als TAT-LACK transduzierte DC sein könnten. Im Gegensatz dazu stehen die ELISA-Ergebnisse von DC aus C57BL/6 Mäusen, die eine, wenn auch nur leichte, Erhöhung der IL-12 Produktion nach Inkubation mit LACK bestätigten (Abb. 16). Es darf hierbei jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß unter diesen Bedingungen die Aktivierung der DC T-Zell-unabhängig, das heißt auch CD40/CD40-Ligand unabhängig, erfolgte. Möglicherweise wurden die DC durch nicht neutralisiertes LPS über *Toll-like* Rezeptor 4 [153;154] zur IL-12 Produktion induziert [155].

4.3. Vakzinierung von BALB/c und C57BL/6 Mäusen mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen

In den letzten zehn Jahren wurden zahlreiche Publikationen veröffentlicht, die sich mit der Entwicklung einer *Leishmania*-Vakzine befassten. DC-basierte Vakzinierungsansätze beruhten hierbei entweder auf infizierten [50] oder mit *Leishmania*-Lysat gepulsten DC [99;100;156;157]. In allen Ansätzen konnte erfolgreich gegen eine progressiv verlaufende Infektion mit *Leishmania major* bzw. *Leishmania donovani* vakziniert werden. Infizierte bzw. mit *Leishmania*-Lysat gepulste DC haben jedoch den Nachteil, daß sie nicht hundertprozentig sicher sind, da sich nach Injektion der DC immer noch *Leishmania*-Läsionen bilden können. Daher können sie aus ethischen Gründen nicht als Impfstoff am Menschen eingesetzt werden. Zudem sind sie nicht gut reproduzierbar, da Infektiosität und Antigenzusammensetzung der Parasiten von Charge zu Charge differieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine DC-basierte Vakzine auf der Grundlage eines definierten und somit reproduzierbaren, rekombinanten Antigens, dem LACK-Protein, etabliert werden. LACK wurde auch vorher schon als Antigen für eine Vakzine eingesetzt. In den meisten Ansätzen wurde mit DNA, die für das LACK-Protein codiert, vakziniert [158-161], da bisher nur DNA-basierte Ansätze die Induktion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen und langanhaltender Immunität ermöglichten [67;91;162;163]. Auch mit LACK gepulsten LC konnte bereits gegen eine progressiv verlaufende Infektion mit *Leishmania major* in BALB/c Mäusen vakziniert werden [100]. Allerdings wurde die Rolle von CD8⁺ T-Zellen in dieser Publikation nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit belegen zum ersten Mal die Induktion *Leishmania*-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch Antigen beladene DC.

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob die zusätzliche Injektion von Adjuvantien für die Wirksamkeit der DC-basierten Vakzine erforderlich ist. Die Entscheidung fiel auf CpG 1826 als Adjuvanz, da bereits gezeigt werden konnte, daß Antigen gepulste BMDC, die *ex vivo* mit CpG ODN stimuliert wurden, protektive, Th1-vermittelte Immunität gegen eine Infektion mit *Leishmania major* in BALB/c Mäusen induzieren konnten [157].

Wie bereits erfolgreich für das *Leishmania*-Modell publiziert [164;165], wurden 10 µg des Th1-dirigierenden CpG 1826 als Adjuvanz eingesetzt. Die Wirksamkeit TAT-LACK transduzierter DC konnte dadurch jedoch nicht verbessert werden (Abb. 17). Es ist bekannt, daß intradermal appliziertes CpG 1826 LC aktiviert, die Oberflächenmoleküle MHC Klasse II und CD86 hoch zu regulieren sowie vermehrt IL-12 zu produzieren [166]. Eine mögliche Hypothese könnte sein, daß die Co-Injektion von CpG bei TAT-LACK und LACK immunisierten Tieren deshalb keinerlei Verbesserung des Infektionsverlaufes gezeigt hat, da die Ohrdermis nach lokaler Injektion von 2×10^5 DC derart mit Zellen und inflammatorischen Zytokinen überladen war, daß der Adjuvanzeffekt vollständig unterging. Vielmehr kam es zu einer leichten Verschlechterung des Krankheitsverlaufes, deren Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant waren. Da die Mäuse nicht unter vollständig pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden, hat die Injektion von CpG möglicherweise bereits etablierte Infektionen, wie z. B. Milbenerkrankungen, verstärkt. Da die Co-Injektion von CpG 1826 zu keiner Verbesserung der DC-basierten Vakzine beitragen konnte, wurden alle nachfolgenden Vakzinierungsexperimente ohne zusätzliche Applikation von Adjuvantien durchgeführt.

Die Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu den von Ramirez-Pineda *et al.* publizierten Daten, in denen nur mit Antigen gepulsten BMDC, die zuvor mit CpG ODN stimuliert wurden, protektive Immunität ausgelöst werden konnte [157]. Die Immunisierung mit entsprechenden BMDC, die keine vorherige Stimulation erfahren haben, konnte keine Protektion vermitteln. Zudem konnte die protektive Wirkung nur nach i.v. Applikation und nicht, wie im Rahmen dieser Dissertation, nach i.d. Injektion der DC beobachtet werden. Die unterschiedlichen Applikationswege der DC sind möglicherweise auch der Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse.

TAT-LACK transduzierte DC wurden als Vakzine sowohl in *Leishmania*-empfindlichen BALB/c als auch in resistenten C57BL/6 Mäusen eingesetzt. Zudem wurde die Wirksamkeit der Vakzine in beiden Infektionsmodellen, dem *high dose* sowie dem physiologisch relevanterem *low dose* Modell [28], analysiert (Abb. 18, 21 und 22).

In allen Ansätzen war die Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC der Injektion von LACK gepulsten DC überlegen. TAT-LACK behandelte Tiere wiesen deutlich kleinere Läsionsvolumina auf und zeigten einen milderen Infektionsverlauf. Die beobachteten Unterschiede waren sowohl zu DC+LACK behandelten als auch zur unbehandelten Kontrollgruppe statistisch signifikant. Im Vergleich zur starken Protektion TAT-LACK transduzierter DC zeigten LACK gepulste DC nur in suszeptiblen BALB/c Mäusen geringe protektive Wirkung. Die Ergebnisse entsprechen bereits publizierten Daten, in denen mit LACK gepulsten DC Protektion vermittelt werden konnte, die jedoch durch Vakzinierung mit *Leishmania*-Lysat gepulsten DC übertroffen wurde [100]. Im Gegensatz dazu wurde LACK als DNA-basierte Vakzine sowohl in BALB/c [84;91;159-161;163] als auch in C57BL/6 Mäusen [67] erfolgreich eingesetzt.

Die verminderte Expression von CD40 auf der Oberfläche LACK gepulster DC könnte eine mögliche Erklärung für die geringere protektive Wirkung sein. Die CD40/CD40-Ligand Wechselwirkungen tragen entscheidend zur Aktivierung der IL-12 Produktion durch DC bei, welche wiederum für die Initiierung einer schützenden Th1-Immunantwort erforderlich ist.

Um zu bestätigen, daß der protektive Effekt antigenspezifisch, und nicht nur dem fusionierten TAT-Peptid zuzuschreiben war, wurden beide Mausstämme mit irrelevanten Kontrollproteinen (TAT- β gal und β gal) immunisiert. Nach *low dose* Infektion konnte weder in BALB/c noch in C57BL/6 Mäusen Protektion gegen die *Leishmania*-Infektion beobachtet werden. TAT- β gal war, im Gegensatz zu TAT-LACK, nicht in der Lage, schützende Immunität zu verleihen. Die beobachtete Protektion war somit tatsächlich *Leishmania*-spezifisch.

Interessanterweise wiesen β gal-immunisierte BALB/c Mäuse nach *high dose* Infektion, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppe, einen milderen Infektionsverlauf auf (Abb. 18B). Wieso β gal gepulste DC zu einer Verbesserung der *Leishmania*-Infektion führten, ist unklar. Möglicherweise induzierten derart gepulste DC vermehrt zelluläre Th1-Immunantworten, wie es bereits für entsprechende *gene-gun* Experimente publiziert wurde [167], und trugen so zu einem verbesserten Verlauf der *Leishmania*-Infektion in BALB/c Mäusen bei.

Bisher ist in der Literatur kein Vakzinierungsansatz beschrieben worden, bei dem empfindliche BALB/c Mäuse die Infektion ausheilen konnten und auch nach Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC konnte nur ein abgeschwächter Infektionsverlauf

beobachtet werden. Im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen ist die TAT-LACK vermittelte Protektion in BALB/c Mäusen nicht so deutlich ausgeprägt. Resistente C57BL/6 Mäuse bilden vorwiegend schützende Th1- und Tc1-Immunität und heilen im Verlauf der Infektion auch ohne vorherige Vakzinierung von selber aus. BALB/c Mäuse generieren vorwiegend Th2-Immunantworten. Damit sie die Infektion ausheilen könnten, müßten die Mäuse vermehrt Th1/Tc1-Antworten ausbilden. Das ist jedoch nur in geringem Ausmaß möglich, da sich die beiden Antworten gegenseitig negativ regulieren [15]. Daher wird in BALB/c Mäusen vermutlich nie ein vergleichbar großer Vakzinierungserfolg wie in C57BL/6 Tieren zu beobachten sein.

Es ist bekannt, daß LACK-reaktive $V_{\beta}4V_{\alpha}8$ CD4⁺ T-Zellen für die frühe IL-4 Produktion in *Leishmania*-infizierten empfindlichen BALB/c Mäusen verantwortlich sind [88]. Tatsächlich konnte auch in resistenten Mausstämmen die frühe, wenn auch transiente, Produktion von IL-4 [28;36;168;169] durch LACK-spezifische T-Zellen bestätigt werden [90]. Untersuchungen mit Hilfe LACK-spezifischer MHC Klasse II Tetramere konnten zudem zeigen, daß die Frequenz an IL-4 produzierenden T-Zellen in resistenten und empfindlichen Mausstämmen annähernd gleich ist [89]. Die frühe IL-4 dominierte Immunantwort in resistenten Tieren ist jedoch nur vorübergehend und kann die Resistenz dieser Mausstämme nicht durchbrechen. Vielmehr besitzen diese Mäuse, im Vergleich zu suszeptiblen BALB/c Tieren, die Fähigkeit, die frühe Th2-Immunantwort mit Hilfe von IL-12 in eine Th1-Antwort umzuwandeln [13]. Da LACK-reaktive, IL-4 produzierende CD4⁺ T-Zellen sowohl in BALB/c als auch in C57BL/6 Mäusen physiologische Relevanz besitzen, war es erstaunlich, daß TAT-LACK transduzierte DC derart starke Protektion gegen eine *Leishmania*-Infektion vermitteln konnten. Diese Beobachtungen decken sich mit einer Reihe anderer Vakzinierungsergebnisse der letzten Jahre, anhand derer man herausgefunden hat, daß paradoxerweise gerade Th2-induzierende Antigene, in Kombination mit Th1-dirigierenden Adjuvantien, gute Kandidaten für eine schützende Vakzine darstellten, wohingegen Th1-Antigene kaum Protektion vermitteln konnten [170]. Die richtige Kombination aus Antigen und Adjuvant sorgt hierbei für die Etablierung einer Th1-Gedächtnisantwort, die daraufhin bei einer späteren Infektion abgerufen werden kann.

Der von DC+TAT-LACK vermittelte Vakzinierungserfolg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen ließ sich nicht nur anhand verringerter Läsionsvolumina nachweisen, sondern wurde zusätzlich durch signifikant reduzierte läsionale Parasitenlasten bestätigt, welche mit den

gemessenen Granulomgrößen korrespondierten (Abb. 19 und 23). Erwartungsgemäß wurden nach Vakzinierung mit infizierten DC die niedrigsten Parasitenlasten und somit die stärkste Protektion beobachtet. In der Tat bildeten derart vakzinierte C57BL/6 Mäuse nach *low dose* Infektion mit *Leishmania major* keine Läsionen aus, während die Granulombildung in BALB/c Mäusen nur verzögert verlief (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu TAT-LACK transduzierten oder LACK gepulsten DC besitzen infizierte DC den Vorteil, daß sie mit ganzen Parasiten und nicht nur mit einem einzigen definiertem Antigen beladen wurden. Dadurch können sie eine größere Vielfalt an antigenen Peptiden auf ihrer Oberfläche präsentieren und zwangsläufig eine größere Anzahl an T-Zellen aktivieren.

Die Zytokinprofile in den drainierenden Lymphknoten von DC+TAT-LACK vakzinierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen bestätigten eine Verschiebung der Immunantworten in Richtung Th1-Immunität und komplettieren den beobachteten Vakzinierungserfolg (Abb. 20 und 24). Zur besseren Beurteilung der Immunantwort wurde der Quotient aus der IFN- γ und IL-4 Konzentration zur Hilfe genommen. Je größer die Konzentration an sezerniertem IFN- γ , desto höher ist der Quotient. Die Unterschiede der Zytokinprofile waren dabei in C57BL/6 Mäusen nicht so deutlich wie in BALB/c Tieren. Der Grund hierfür ist, daß C57BL/6 Mäuse *per se* mehr IFN- γ bilden, da sie im Verlaufe der Infektion spontan ausheilen. Daher wurde auch bei C57BL/6 Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe ein höherer Quotient als bei DC+TAT-LACK vakzinierten Tieren gefunden. Entscheidend war hierbei jedoch der Unterschied zwischen TAT-LACK und LACK behandelten Tieren. In der Tat konnte bei beiden Mausstämmen eine TAT-LACK vermittelte Verschiebung der resultierenden Immunantwort in Richtung Th1 beobachtet werden, wohingegen LACK behandelte Tiere ein klassisches Th2 Profil aufwiesen. Allein die Fusionierung des TAT-Peptids an das LACK Antigen und somit die gezielte Ansteuerung CD8⁺ T-Zellen wandelt das LACK-Protein in ein Th1-dirigierendes Antigen um.

IL-12 ist eines der wichtigsten Zytokine für die Etablierung einer schützenden Th1-Immunantwort gegen eine Infektion mit *Leishmania major* [171;172]. DC stellen möglicherweise die wichtigste Quelle für das IL-12 dar, da sie nach Infektion mit *Leishmania major* [43] oder *Leishmania donovani* [173] große Mengen des Zytokins sezernieren. Um die IL-12 Abhängigkeit der DC-basierten Vakzine zu überprüfen, wurden C57BL/6 Mäuse mit TAT-LACK transduzierten DC aus Wildtyp und IL-12p40 defizienten Mäusen vakziniert. Transduzierte DC aus defizienten Mäusen waren nicht mehr in der Lage, schützende

Immunität zu vermitteln (Abb. 34). Die Ergebnisse stimmen mit Resultaten anderer Publikationen überein [174] und belegen, daß das von den DC produzierte IL-12 absolut notwendig für die Etablierung einer schützenden Th1-Immunantwort ist. Zudem bestätigen sie Daten bereits publizierter Versuche, in denen mit Antigen gepulsten LC aus IL-12p35 defizienten BALB/c Mäusen vakziniert wurde [100]. Die Verwendung von DC aus IL-12p40 defizienten Tieren bietet gegenüber IL-12p35 defizienten Mäusen jedoch den Vorteil, daß IL-12 antagonistische Effekte durch p40-Homodimere [175], welche in einer verringerten Th1-Immunantwort resultieren [176], als Ursache für die fehlende protektive Immunität ausgeschlossen werden können.

Interessanterweise zeigte die Immunisierung mit LACK gepulsten DC aus Wildtyp und IL-12p40 defizienten Tiere keine Unterschiede im resultierenden Infektionsverlauf. Wie bereits erwähnt, regulierten DC nach Inkubation mit LACK CD40 auf ihrer Oberfläche herunter. Aufgrund minimierter Wechselwirkungen mit CD40-Liganden auf T-Zellen führt das wahrscheinlich zur verminderten Produktion von bioaktivem IL-12p70 in DC. In Vorexperimenten konnte zwar die Produktion von IL-12p40 in den Überständen LACK gepulster DC nachgewiesen werden (Abb. 16), allerdings konnte hierbei keine Unterscheidung zwischen bioaktivem IL-12p70 und inhibitorisch wirkendem IL-12(p40)₂-Homodimer getroffen werden. Daher ist nicht auszuschließen, daß LACK gepulste DC vermehrt antagonistisch wirkendes Homodimer sezernieren, wodurch die Etablierung einer schützenden Th1-Immunantwort erschwert wird. Sollte diese Hypothese stimmen, ähneln gepulste DC bezüglich ihres Unvermögens, bioaktives IL-12 zu produzieren, stark DC aus IL-12p40 defizienten Tieren.

In allen hier beschriebenen Vakzinierungsversuchen wurden die DC intradermal in das Mäuseohr appliziert. Dieser Weg der Applikation wurde aus zwei Gründen gewählt: Erstens erfolgt die Inokulation der Leishmanien in der Natur durch den Biß einer Sandfliege ebenfalls intradermal, und zweitens ist das *homing* der T-Zellen abhängig von dem Inokulationsort der DC, durch die sie induziert wurden. So konnten Dudda *et al.* zeigen, daß nur nach intradermaler und nicht nach intravenöser Applikation von BMDC CD8⁺ T-Zellen induziert werden konnten, die nach Aktivierung im Lymphknoten in die Haut ausgewandert sind [177]. Die Ergebnisse dieser Dissertation belegen, daß BALB/c und C57BL/6 Mäuse nach intradermaler Injektion von transduzierten oder infizierten DC gegen eine progressiv verlaufende *Leishmania*-Infektion geschützt sind. Diese Resultate widersprechen bereits publizierten Daten, bei denen nur nach intravenöser Applikation Antigen gepulster LC

protektive Immunität vermittelt werden konnte [178]. Derart verabreichte DC-Vakzinen haben jedoch den Nachteil, daß DC nach i.v. Injektion vermehrt in Apoptose bzw. Nekrose übergehen. Antigene apoptotischer Zellen können dann wiederum von CD8⁺ DC in der Milz aufgenommen und *cross*-präsentiert werden [179-182]. Das bedeutet, daß das für die Vakzinierung erforderliche Antigen nach i.v. Injektion gar nicht von den ursprünglich gespritzten DC in der Milz präsentiert wird, sondern von völlig anderen Zellen. Nach intradermaler Applikation von DC können diese Mechanismen auch nicht vollständig ausgeschlossen werden, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit zur *cross*-Präsentation geringer.

4.4. *In vitro* Restimulierungsexperimente

In *in vivo* Vakzinierungsexperimenten konnte bereits eine Überlegenheit von TAT-LACK transduzierten DC im Vergleich zu LACK gepulsten DC bestätigt werden. *In vitro* Analysen sollten nun die Ursache für diese Unterschiede auf zellulärer Ebene genauer beleuchten. Als erstes interessierte die Frage, welche T-Zell-Populationen nach Immunisierung mit transduzierten bzw. gepulsten DC *in vivo* induziert wurden. Hierbei war von entscheidender Bedeutung, daß die Mäuse nur vakziniert und nicht zusätzlich infiziert wurden, da ansonsten die durch die Immunisierung induzierte Immunantwort nicht von der Parasiten induzierten Immunität zu unterscheiden gewesen wäre. Die hier angewandte Methode beruht auf der Annahme, daß durch DC+TAT-LACK bzw. durch DC+LACK induzierte T-Zellen *ex vivo* durch Restimulierung mit *Leishmania*-Lysat zur Proliferation angeregt werden können. Das Ausmaß der Proliferation steht dabei in direktem Zusammenhang mit der Stärke der voraus gegangenen Induktion. Durch CFSE-Färbung der T-Zellen konnte die resultierende Proliferation im FACS sichtbar gemacht werden.

Um generelle Proliferationsdefizite, die nicht auf die antigenspezifische Aktivierung der T-Zellen zurück zuführen sind, ausschließen zu können, wurden die Zellen parallel mit SEB polykolonal stimuliert. Da sich keine generellen Defekte nachweisen ließen, konnten die beobachteten Proliferationen in direkten Zusammenhang mit der vakzinierungsabhängigen Induktion gebracht werden (Abb. 26).

Sowohl in BALB/c als auch in C57BL/6 Mäusen konnten nach Vakzinierung mit DC+TAT-LACK bzw. DC+LACK keine Unterschiede bezüglich der CD4⁺ T-Zell-Proliferation beobachtet werden. Das war zu erwarten, da der hierfür erforderliche MHC Klasse II Präsentationsweg nach Endozytose exogener Antigen beschriftet wird und sowohl TAT-LACK als auch LACK gleichermaßen von DC phagozytiert werden sollten. Wie bereits bei

den Parasitenlasten zu beobachten, waren infizierte DC auch hier die stärksten Aktivatoren der CD4⁺ T-Zellen. Da sie, im Vergleich zu TAT-LACK oder LACK behandelten DC, mit ganzen Parasiten beladen waren, konnten sie eine größere Vielzahl antigener Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren und daher auch eine größere Anzahl naiver T-Zellen aktivieren.

Die zu Beginn dieser Arbeit aufgestellte Hypothese besagt, daß TAT-LACK, im Vergleich zu LACK allein, zusätzlich zur Aufnahme durch Endozytose auch in das Zytosol von DC geschleust werden kann, wodurch antigene Peptide auch über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden können. Die beobachteten Proliferationen CD8⁺ T-Zellen bestätigen diese Annahme. Sowohl in BALB/c als auch in C57BL/6 Mäusen waren TAT-LACK transduzierte DC, verglichen mit LACK gepulsten DC, signifikant stärkere Aktivatoren der CD8⁺ T-Zellen. Die nach Vakzinierung mit DC+LACK ausgelöste Proliferation entsprach hierbei lediglich der Hintergrundproliferation unbehandelter DC (in BALB/c) oder war nicht meßbar (in C57BL/6). Diese Ergebnisse entsprechen Daten von Studien aus der Tumorummunologie, in denen nach Vakzinierung mit TAT-Fusionsprotein transduzierten DC eine verstärkte Induktion zytotoxischer T-Zellen beobachtet werden konnte [121;122].

Für das *Leishmania*-Modell wird hier zum ersten Mal beschrieben, daß DC, die mit einem definierten, rekombinanten Antigen beladen wurden, in der Lage sind, CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Bisher war dies nur von DNA basierten Vakzinierungen [67;80;91;161;162;183] und von Vakzinierungen mit *Leishmania*-Lysat gepulsten DC bekannt [133]. Allerdings wurde bei Letzterem die Aktivierung nur anhand der Hochregulation von Aktivierungsmarkern und nicht anhand antigenspezifischer Effektormechanismen nachgewiesen.

Die Proliferationsexperimente belegten weiterhin, daß in BALB/c Mäusen nach Vakzinierung mit TAT-LACK transduzierten DC deutlich mehr CD8⁺ als CD4⁺ T-Zellen induziert wurden. Wie bereits erwähnt, sind BALB/c Mäuse nicht in der Lage, die frühe, durch LACK-reaktive CD4⁺ T-Zellen induzierte Th2-Immunantwort in eine schützende Th1-Antwort umzuwandeln. Trotzdem konnte durch die Immunisierung mit TAT-LACK transduzierten DC schützende Immunität in diesen Mäusen ausgelöst werden. Möglicherweise produzieren die in der Überzahl vorhandenen LACK-reaktiven CD8⁺ T-Zellen kein IL-4, wie es für C57BL/6 Mäuse gezeigt werden konnte (Abb. 31), und tragen so zur protektiven Immunantwort bei.

Nach Immunisierung mit LACK gepulsten DC konnten in C57BL/6 Mäusen, im Gegensatz zu BALB/c Tieren, keine CD8⁺ T-Zellen induziert werden. Diese sind jedoch vor allem im *low dose* Modell unerlässlich für die Etablierung einer schützenden Immunantwort [19]. Das Fehlen dieser Zellpopulation erklärt möglicherweise die Beobachtung, daß LACK gepulste

DC in C57BL/6 Mäusen keinerlei Protektion vermitteln konnten und die Infektion genauso schlecht wie bei der unbehandelten Kontrollgruppe verlief (Abb. 21A und 22). Im Gegensatz dazu zeigten DC+LACK vakzinierte BALB/c Mäuse einen eher intermediären Infektionsverlauf, der zwischen dem der DC+TAT-LACK immunisierten Tieren und dem der unbehandelten Kontrollgruppe lag (Abb. 18).

In weiterführenden Restimulierungsexperimenten sollte überprüft werden, ob TAT-LACK transduzierte DC nicht nur wie oben beschrieben *in vivo*, sondern auch *in vitro* in der Lage waren, vermehrt CD8⁺ T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Dafür wurden sie mit aufgereinigten T-Zellen aus *Leishmania*-infizierten Tieren co-kultiviert. Im Hinblick auf maximale T-Zell-Proliferation wurde in Vorexperimenten die optimale Zusammensetzung der Co-Kultur aus DC:TC mit 1:10 ermittelt (Abb. 28). *In situ* Analysen bestätigten, daß einzelne DC mit antigenspezifischen T-Zellen im Lymphknoten Cluster bilden und so ein Mikromilieu schaffen, in dem sich die Immunantworten entwickeln können [93;184]. Dies könnte als Erklärung dafür dienen, daß bei einem unphysiologischen DC:TC Verhältnis von 1:1 keinerlei T-Zell-Proliferation nachweisbar war. Vermutlich spielen hier aufgrund des Überschusses an DC sterische Behinderungen eine große Rolle.

Die Ergebnisse der Proliferationsexperimente bestätigten, daß TAT-LACK transduzierte DC auch *in vitro* besser dazu in der Lage waren, *Leishmania*-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu restimulieren als LACK gepulste DC (Abb. 29). In C57BL/6 Mäusen konnten zudem CD4⁺ T-Zellen stärker mit TAT-LACK transduzierten als mit LACK gepulsten DC restimuliert werden, was im Widerspruch zu den *in vivo* Daten steht (Abb. 26A). Diese unterschiedlichen Ergebnisse verdeutlichen, daß ein *in vivo* System keinesfalls mit einem *in vitro* Ansatz gleichzusetzen ist. Letzteres ist lediglich ein artifizielles System, in dem das Mikromilieu, wie es im lebenden Organismus zur Verfügung steht, kaum berücksichtigt wird.

Überraschenderweise waren LACK gepulste DC beider Mausstämme in der Lage, wenn auch nur in geringem Ausmaß, die Proliferation von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen auszulösen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits nach Analyse der T-Zell-Proliferation von LACK immunisierten BALB/c Mäusen beobachtet (Abb.26B). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wäre die Fähigkeit der DC, exogene Antigene über MHC Klasse I Moleküle zu präsentieren, eine Vorgang, der als *cross-presentation* bezeichnet wird [185].

Die Zytokinprofile *Leishmania*-spezifischer T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen bestätigten nach Restimulierung mit TAT-LACK transduzierten DC eine Verschiebung in Richtung einer Th1-

Immunität und lieferten dadurch eine weitere Erklärung für die *in vivo* beobachtete, schützende Immunantwort (Abb. 31). In der Tat wiesen sowohl DC+TAT-LACK restimulierte CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen ein klassisches Th1-Profil auf, wohingegen nach Restimulierung mit LACK gepulsten DC eine Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th2 beobachtet werden konnte. Die TAT-LACK induzierte Th1-Immunantwort war bei beiden T-Zellpopulationen durch das fast vollständige Fehlen von sezerniertem IL-4 gekennzeichnet, wie es zuvor bereits für einige wenige Vakzinierungsansätze in der Literatur beschrieben worden war [186;187]. Die Analyse des Zytokinprofils erfolgreich vakzinierter C57BL/6 Mäuse ergab zwar auch eine Verschiebung in Richtung Th1, allerdings mit deutlich höheren IL-4 Konzentrationen (Abb. 24). Hierbei darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß die vakzinierten Tiere gleichfalls infiziert waren und daß die resultierende Immunantwort sowohl durch die Vakzine als auch durch die Infektion bestimmt wurde. Daß mit *Leishmania* infizierte C57BL/6 Mäuse IL-4 sezernieren, ist nicht überraschend und wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [19;45;188;189].

Für beide T-Zellpopulationen wurden die höchsten Konzentrationen an sezerniertem IL-4 und IFN- γ nach Restimulierung mit infizierten DC gefunden. Das bestätigt erneut die Überlegenheit dieses DC-Ansatzes, wie sie im Verlaufe dieser Arbeit schon des öfteren beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß zusätzlich andere Antigene als das LACK Protein für die starke Immunantwort verantwortlich waren, da durch TAT-LACK oder LACK allein eine wesentlich schwächere Antwort ausgelöst wurde. Trotz allem darf nicht vergessen werden, daß infizierte DC als Vakzine nicht besonders sicher und nicht reproduzierbar sind, und daher aus ethischen Gründen nicht für den Einsatz am Menschen geeignet sind. In dieser Arbeit dienten sie lediglich als Positivkontrolle, um grundsätzliche Fehler bei den Versuchen ausschließen zu können.

4.5. Depletionsexperimente

Mit Hilfe von *in vitro* Restimulierungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, daß T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der DC+TAT-LACK vermittelten Protektion spielen. Um diese Abhängigkeit endgültig zu beweisen, wurden Vakzinierungen in T-Zell-depletierten BALB/c Mäusen durchgeführt. Die depletierenden Antikörper GK1.5 [190;191] und 2.43 [192;193] zerstören CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen hierbei durch Komplementlyse oder mittels Opsonisierung und anschließender Phagozytose.

In Vorexperimenten mußte die optimale Antikörperkonzentration bestimmt werden, um die T-Zellen für mindestens eine Woche zu depletieren. Diese Zeitspanne wurde gewählt, da mit Hilfe der Restimulierungsexperimente gezeigt werden konnte, daß die Immunisierung mit transduzierten bzw. gepulsten DC bereits innerhalb der ersten Woche eine Immunantwort in den Empfängertieren auslösen konnte (Abb. 26). Drei Wochen nach der Depletion waren alle T-Zellen wieder hergestellt und die Tiere wurden infiziert. Von entscheidender Bedeutung war, daß die T-Zellen nur zum Zeitpunkt der Vakzinierung fehlten, damit die Infektion unter normalen Bedingungen ablaufen konnte. So war sichergestellt, daß nur die T-Zell-Abhängigkeit der Vakzine und nicht die der Infektion untersucht werden konnte. Das hatte zur Folge, daß die Zeitspanne zwischen Vakzinierung und Infektion von bisher einer Woche auf drei Wochen verlängert werden mußte. Wie die Infektionsverläufe der Isotyp behandelten Kontrollgruppe jedoch bestätigten, hatte diese Verlängerung keinen Einfluß auf die DC+TAT-LACK vermittelte Protektion (Abb. 33). Die durch die Vakzine ausgelöste Immunantwort war demnach stark genug, um auch noch nach drei Wochen die volle protektive Wirkung vermitteln zu können. Für die Depletionsexperimente wurde das *low dose* Infektionsmodell gewählt, da dieses größere physiologische Relevanz besitzt und da CD8⁺ T-Zellen vor allem im *low dose* Modell eine entscheidende Rolle spielen [19;155].

Sowohl Läsionsvolumina als auch Parasitenlasten bestätigten, daß die von TAT-LACK transduzierten DC vermittelte Protektion vollständig verschwand, sobald CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der Vakzinierung depletiert wurden. Die Ergebnisse korrespondieren mit Resultaten, die nach CD8 Depletion im LACK DNA basierten Vakzinierungsansatz beobachtet werden konnten [91].

Depletierte BALB/c Mäuse zeigten zwar kleinere Läsionsvolumina als die Isotyp behandelte Tiere, die Parasitenlasten bestätigten jedoch weiterhin eine progressiv verlaufende Infektion. Drei Wochen nach der Depletion konnte zwar die vollständige Wiederherstellung der T-Zellen im Blut mittels FACS-Analysen bestätigt werden, das Vorhandensein von Effektorzellen im Gewebe wurde jedoch nicht untersucht. Möglicherweise waren diese T-Zell-Populationen zum Zeitpunkt der Infektion noch nicht wieder vollständig hergestellt. Zudem kann keine Aussage über die Differenzierungsstadien der T-Zellen getroffen werden. Ob alle Stadien wieder hergestellt wurden, muß in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden.

Das Fehlen der T-Zellen im Granulom ist möglicherweise eine Erklärung für die geringeren Läsionsgrößen. Ein weiterer Grund könnte die Tatsache sein, daß CD4⁺ T-Zellen für die Einwanderung von Neutrophilen, Makrophagen und Eosinophilen in die Läsion erforderlich

sind [28]. Die Beobachtungen, daß die Depletion von CD4⁺ T-Zellen zwar zu einer Reduktion der Läsionsvolumina bei ansonsten aber gleich bleibender progressiv verlaufenden *Leishmania*-Infektion führten, stehen im Widerspruch zu bereits publizierten Ergebnissen, in denen nach Depletion nicht nur eine Reduktion der Läsionsgrößen, sondern auch der Sterblichkeit und der Parasitenlasten beobachtet wurde [194]. In der hier zitierten Arbeit wurden depletierte BALB/c Mäuse allerdings mit *Leishmania amazonensis* infiziert, einem Parasitenstamm, der auch in *Leishmania major* resistenten C57BL/6 Mäusen die Bildung von nicht heilenden, kutanen Läsionen induziert [195]. Die widersprüchlichen Ergebnisse sind daher vermutlich auf die Verwendung der unterschiedlichen *Leishmania spp.* zurückzuführen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte die von TAT-LACK transduzierten DC vermittelte Induktion CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Ob es sich bei den induzierten Zellen um zytotoxische T-Zellen handelt, läßt sich nicht sagen. Hierfür sind weitere Analysen mit Hilfe von Zytotoxizitätstest erforderlich. Allerdings konnte in Restimulierungsexperimenten bestätigt werden, daß *Leishmania*-spezifische CD8⁺ T-Zellen nach Inkubation mit TAT-LACK transduzierten DC vermehrt IFN- γ sezernieren (Abb. 31). Die hauptsächliche Funktionsweise von CD8⁺ T-Zellen in der Leishmaniose wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte die physiologische Relevanz von IFN- γ sezernierenden CD8⁺ T-Zellen für die Gedächtnisantwort einer *Leishmania*-Infektion in resistenten CBA und empfindlichen BALB/c Mäusen bestätigt werden [21;53]. IFN- γ wiederum ermöglicht die Aktivierung infizierter Makrophagen, die aufgenommenen Leishmanien über die Bildung von reaktivem NO abzutöten. Die physiologische Relevanz von CD8⁺ T-Zellen für eine primäre *Leishmania*-Infektion konnte erstmals nach *low dose* Infektion resistenter C57BL/6 Mäuse nachgewiesen werden [19]. Die CD8⁺ Zellen trugen in diesem Modell ebenfalls durch Produktion von IFN- γ zur protektiven Immunantwort bei. Obwohl Perforin defiziente C57BL/6 Mäuse in der Lage waren, eine Infektion mit *Leishmania major* auszuheilen [59], konnten zytotoxische T-Zellen in lymphatischen Organen ausgeheilte Mäuse nachgewiesen werden [22]. Weitere Studien konnten zeigen, daß sowohl die INF- γ Produktion als auch die zytotoxische Aktivität CD8⁺ T-Zellen für die protektive Immunantwort in vakzinierten C57BL/6 Mäusen erforderlich sind [61]. *In vitro* Analysen bestätigten die Lyse *Leishmania*-infizierter Makrophagen sowie die Eliminierung der Parasiten durch zytotoxische T-Zellen [60].

4.6. Direkte, proteinbasierte Vakzinierung mit TAT-LACK Fusionsproteinen

DC-basierte Vakzinierungen sind aufgrund der Generierung von DC aus *buffy coats* in der Herstellung sehr arbeitsaufwendig und kostspielig. Daher sind sie gerade in *Leishmania*-endemischen Ländern, bei welchen es sich zum Großteil um Dritte-Welt-Länder handelt, nur schwer einsetzbar. Aus diesem Grund wurde das Potential von TAT-LACK als proteinbasierte Vakzine in BALB/c Mäusen analysiert.

Wie bereits im DC basierten Modell beobachtet, war auch hier die Vakzinierung mit TAT-LACK Fusionsprotein der Immunisierung mit LACK allein überlegen. Letztere zeigte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe keinerlei verbesserten Infektionsverlauf.

Da Proteine nur schwach immunogen sind, wenn sie allein verabreicht werden [132], war im proteinbasierten Ansatz, im Gegensatz zur DC-basierten Vakzinierung, die Co-Injektion von CpG 1826 als Adjuvanz erforderlich, um protektive Immunität in BALB/c Mäusen induzieren zu können (Abb. 35). Diese Beobachtungen bestätigen Ergebnisse anderer Arbeiten, in denen die Vakzinierung mit *Leishmania*-Lysat nur zusammen mit CpG schützende Immunität vermitteln konnte [165]. Die therapeutische Wirkung des CpG war dabei direkt von endogen produziertem IFN- γ und IL-12 abhängig. Letzteres wird durch die Beobachtungen bestätigt, daß intradermal appliziertes CpG direkt auf die LC der Dermis wirkt, in dem es die vermehrte Expression der Oberflächenmoleküle MHC Klasse II und CD86 sowie die gesteigerte Produktion von IL-12 induziert [166].

Interessanterweise ließ sich die Wirkung von LACK durch Co-Injektion von CpG nicht weiter steigern. Möglicherweise ist LACK in BALB/c Mäusen ein derart starker Induktor der Th2-Immunantwort, daß der Th1-dirigierende Effekt des CpG überlagert wird.

Alternative Vakzinierungsprotokolle zeigten, daß die durch TAT-LACK vermittelte Protektion nach Verlängerung des Zeitraumes zwischen Vakzinierung und Infektion von einer auf zwei Wochen deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 36A). Da im proteinbasierten Modell DC *in vivo* durch die Vakzine aktiviert werden sollten, war die Induktionszeit von einer Woche vermutlich zu kurz, um eine vollständige Immunantwort hervorrufen zu können. Die Verlängerung des Zeitraumes zwischen Vakzinierung und Infektion von einer auf drei Wochen im DC-basierten Modell, wie es im Zuge der Depletionsexperimente erfolgte, führte im Gegensatz dazu zu keiner signifikanten Verbesserung des Vakzinierungserfolges.

Daß das gezielte Ansteuern von DC nach Injektion von Proteinen plus Adjuvanz möglich ist, konnte bereits nach Immunisierung mit LACK und CpG in BALB/c Mäusen bestätigt werden [196]. 36 Stunden nach Immunisierung konnte ein Anstieg an DC im drainierenden

Lymphknoten beobachtet werden, welche nach Isolierung und adoptiven Transfer Protektion vermitteln konnten.

Interessanterweise zeigte LACK allein im proteinbasierten Vakzinierungsmodell dieser Dissertation keinerlei protektive Wirkung, unabhängig davon, wie lang der Zeitraum zwischen Immunisierung und Infektion gewählt wurde. Dies widerspricht Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die nach Immunisierung mit LACK und rekombinanten IL-12 schützende Immunität in BALB/c Mäusen auslösen konnten [91;197]. Allerdings wurden diese Experimente mit einem anderen *Leishmania major* Stamm durchgeführt als jenem, der in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Zudem wurde IL-12 und nicht CpG als Adjuvanz injiziert.

Um auszuschließen, daß die beobachteten Unterschiede in der Immunisierung mit TAT-LACK bzw. LACK nicht nur auf das TAT-Peptid zurückzuführen waren, wurden BALB/c Mäuse, analog zum DC-basierten Ansatz, mit den irrelevanten Kontrollproteinen TAT-OVA und OVA immunisiert (Abb. 36B). Die Ergebnisse zeigten, daß keines der beiden Proteine in der Lage war, Protektion zu induzieren. Die von TAT-LACK vermittelte Immunität war somit eindeutig antigenspezifisch.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen der Epidermis vakzinierter Tiere bestätigten die Aktivierung und Auswanderung von LC (Abb. 37). Somit waren die injizierten Proteine in diesem Vakzinierungsmodell tatsächlich in der Lage, DC *in vivo* zu aktivieren. Obwohl sich die Aktivierung der LC durch TAT-LACK bzw. LACK durch Co-Injektion von CpG noch steigern ließ, wurde der größte prozentuale Anteil aktivierter LC überraschenderweise nach Immunisierung mit CpG allein gemessen. Warum es in Kombination mit den Proteinen zu einer Reduzierung von Aktivierung und Migration kam, läßt sich bisher nicht erklären. Weiterhin erstaunlich war die Tatsache, daß nach Vakzinierung mit TAT-LACK+CpG bzw. LACK+CpG keinerlei Unterschiede bezüglich Aktivierung und Auswanderung beobachtet werden konnten. Die von TAT-LACK vermittelte Protektion beruht daher nicht auf einer gesteigerten Induktion der LC. Vermutlich spielen andere Faktoren, wie z. B. Unterschiede in der Zytokinsekretion oder der T-Zell-Aktivierung, eine entscheidende Rolle. Die Analyse dermalen DC wurde in diesem experimentellen Ansatz nicht berücksichtigt, so daß es sich bei der Auswanderung der LC nur um eine Schätzung des Ausmaßes der DC-Aktivierung handeln kann.

4.7. Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, daß TAT-Fusionsproteine vielversprechende Werkzeuge für die Induktion von CD8⁺ T-Zellen darstellen. Im Modell der murinen kutanen Leishmaniose konnte mit dem Fusionsprotein TAT-LACK erfolgreich gegen eine progressiv verlaufende *Leishmania*-Infektion vakziniert werden. Protektive Immunität wurde dabei sowohl nach DC- als auch nach proteinbasiertem Einsatz des TAT-Fusionsproteins beobachtet. Nach DC-Vakzinierung konnte zudem die verstärkte Induktion CD8⁺ T-Zellen mittels *in vitro* Restimulierungen bestätigt werden.

In weiterführenden Experimenten muß die Funktionsweise der durch die DC-basierten Vakzine induzierten CD8⁺ T-Zellen genauer analysiert werden. Erste *in vitro* Restimulierungen konnten bereits die Sekretion von IFN- γ durch diese Zellen bestätigen. Mit Hilfe von Zytotoxizitätstest sollte des weiteren untersucht werden, ob es sich bei den induzierten CD8⁺ Zellen um zytotoxisch wirkende T-Zellen handelt.

Unter Zuhilfenahme einer Peptidlibrary des LACK Proteins sollten mögliche CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Epitope charakterisiert werden. Anschließende Tetrameranalysen könnten dann Aufschluß über die Frequenz LACK-reaktiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in vakzinierten Mäusen geben.

Mittels adoptiver Transfers sollte in weiteren *in vivo* Experimenten bestätigt werden, daß CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus vakzinierten Tieren protektive Immunität auf naive Mäuse übertragen können.

In Analogie zu den bei der DC-basierten Vakzinierung durchgeführten Experimenten, sollte die zelluläre Grundlage des proteinbasierten Vakzinierungsansatzes detailliert analysiert werden.

Die von TAT-LACK induzierten, schützenden Immunantworten ließen sich möglicherweise durch Verwendung eines alternativen Adjuvanzes, wie z. B. IL-12 oder Imiquimod, weiterhin optimieren.

Neben der prophylaktischen Vakzinierung stellt auch die therapeutische Behandlung ein vielversprechendes Anwendungsgebiet dar. Daher sollte das therapeutische Potential von TAT-LACK transduzierten DC sowie von TAT-LACK Fusionsproteinen an bereits infizierten Tieren getestet werden.

5. Methoden

5.1. Infektionsbiologische Methoden

5.1.1. Kultivierung von promastigoten Leishmanien

Die promastigote Lebensform von *Leishmania major* liegt in der Sandfliege assoziiert an das Darmepithel vor. Um vergleichbare Bedingungen für die Zellkultur zu schaffen, werden die promastigoten Leishmanien in speziellem *Leishmania*-Medium bei 27 °C und unter Luftausschluß kultiviert [28].

Zum Animpfen einer neuen Kultur werden 10-20x10⁶ frisch isolierte amastigote Parasiten mit 5 ml *Leishmania*-Medium in eine 25 cm² große Kulturflasche eingesät. Diese wird luftdicht mit Parafilm verschlossen. Sobald sich die Leishmanien regelmäßig teilen und die Kultur dichter geworden ist, wird diese mit weiteren 5 ml Medium auf 10 ml aufgestockt. Zur Aufrechterhaltung der Kultur werden die Leishmanien alle zwei Tage je nach Parasitendichte 1:3 bis 1:5 geteilt.

<i>Leishmania</i> -Medium:	M199 (1x)	350 ml
	M199 (10x)	14,25 ml
	FCS	100 ml
	HEPES (1 M)	20 ml
	Adenin (10 mM)	5 ml
	Hemin (0,25 %)	1 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	Glutamin	5 ml

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

Hemin: 50 % Triethanolamin
0,25 % Hemin
in Aqua dest.

5.1.2. Isolierung metazyklischer Leishmanien

Bei den in Kultur gehaltenen Parasiten handelt es sich um eine heterogene Population promastigoter Leishmanien in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Bei der Infektion von Mäusen werden ausschließlich hochinfektiöse, metazyklische Promastigote injiziert. Diese

werden zuvor aus einer 5-6 Tage alten Kultur, in der sich die Parasiten in der stationären Wachstumsphase befinden, über einen biphasischen Ficoll-Gradienten aufgereinigt.

Die Parasiten werden zunächst zweimal mit DMEM für 8 min bei 200 g gewaschen. Bei dieser Drehzahl verbleiben die Leishmanien im Überstand, während der Debris abzentrifugiert wird. Zur Sedimentation der Parasiten werden diese für 8 min bei 3.000 g zentrifugiert und anschließend in 2 ml DMEM resuspendiert. In einem 15 ml Röhrchen werden die Leishmanien zusammen mit jeweils 2 ml 20 %igem und 10 %igem Ficoll zu einem Gradienten geschichtet. Dieser wird bei RT für 15 min bei 2.000 g ohne Bremse zentrifugiert. Die metazyklischen Leishmanien befinden sich in den oberen beiden Phasen und müssen anschließend noch einmal mit DMEM gewaschen werden, bevor sie in 4 %igem Paraformaldehyd gezählt werden können.

Ficoll: 20 % Ficoll
 in Aqua dest.

5.1.3. Isolierung von amastigoten Leishmanien

Bei bestimmten experimentellen Fragestellungen werden *Leishmania*-Infektionen mit der intrazellulär vorkommenden, amastigoten Lebensform durchgeführt. Hierzu zählen u. a. die Infektion von DC sowie das Animpfen einer neuen Zellkultur.

Amastigote werden direkt aus infizierten Füßen von BALB/c Mäusen isoliert [43]. Etwa vier Wochen nach *high dose* Infektion werden die Fußsohlen geerntet und in PBS/Glucose/EDTA-Puffer überführt. Das Gewebe wird zunächst mit Hilfe einer Schere zerkleinert. Daraufhin werden die Zellen mechanisch im *Tissue Grinder* aufgeschlossen, wobei die Parasiten in den Überstand freigesetzt werden. Dieser wird über ein 70 µm Sieb gegeben und anschließend zweimal für 8 min bei 200 g zentrifugiert, um den Debris heraus zu waschen. Die Amastigoten werden durch Zentrifugation bei 3.000 g für 8 min pelletiert, in 2 ml DMEM resuspendiert und in Trypanblau gezählt.

PBS/Glucose/EDTA-Puffer: 0,2 % Glucose
 2 mM EDTA (pH 6,5)
 in PBS

5.1.4. Herstellung von SLA (*soluble leishmania antigen*)

Beim SLA handelt es sich um ein komplexes Gemisch degradierter Leishmanienantigene, welches vor allem zur antigenspezifischen Restimulierung *Leishmania*-geprimter T-Zellen eingesetzt wird.

Zur Herstellung des Lysates werden die Leishmanien direkt aus der Zellkultur geerntet und dreimal bei 200 g gewaschen, bevor sie durch Zentrifugation bei 3.000 g pelletiert werden. Die Parasiten werden anschließend auf 300×10^6 metazyklische Leishmanien pro ml RPMI-Complete eingestellt und danach durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wie folgt degradiert:

1. Parasiten in flüssigem Stickstoff einfrieren
2. Anschließend bei 50 °C im Wasserbad auftauen
3. Zum Schluß 1 min bei maximaler Leistung vortexen

Dieser Zyklus wird mindestens 10 Mal wiederholt. Die Immunogenität des SLA wird in Restimulierungsexperimenten anhand der sezernierten Zytokine IFN- γ und IL-4 bestimmt.

5.1.5. Intradermale Infektion im Ohr

Zum Setzen einer *Leishmania*-Infektion in Mäusen werden aufgereinigte metazyklische Leishmanien intradermal in das Mäuseohr appliziert. Im *low dose* Modell werden 1.000, im *high dose* Modell 2×10^5 Parasiten in jeweils 10 μ l DMEM pro Ohr injiziert.

5.1.6. Subkutane Infektion im Fuß

Für die Gewinnung amastigoter Leishmanien müssen BALB/c Mäuse zuvor im Fuß infiziert werden. Hierfür werden 8×10^5 metazyklische Parasiten in 40 μ l DMEM s.c. in die hintere Fußsohle injiziert.

5.1.7. Messung der Läsionsvolumina

Um den Infektionsverlauf in Mäusen verfolgen zu können, wird das sich bildende Granulom wöchentlich vermessen. Hierfür werden mit einem Uhrenmeßschieber Dicke, Breite und Länge der am Ohr lokalisierten Läsion bestimmt und das daraus resultierende Volumen wird anhand folgender Formel für ein Ellipsoid berechnet:

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

5.1.8. Bestimmung der läSIONalen Parasitenlast

Die Anzahl der Parasiten in der Läsion ist ein Maß dafür, wie gut die *Leishmania*-Infektion unter Kontrolle gebracht werden kann. Zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion werden daher in den infizierten Geweben die Parasitenlasten bestimmt, indem die Ohren zuerst enzymatisch und anschließend mechanisch zerkleinert, und die so freigesetzten Parasiten in einer Verdünnungsreihe austitriert werden [198].

Die infizierten Ohren werden geerntet, in Längsrichtung geteilt und mit der Dermis nach unten für 2 h bei 37 °C und 5% CO₂ in Kollagenasemedium inkubiert. Die enzymatisch angedauten Ohren werden danach zuerst mit einer Schere und anschließend für 1 min mit dem *Pellet pestle* weiter mechanisch zerkleinert. Das so aufgeschlossene Gewebe wird über ein 70 µm Sieb gegeben und zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, wobei die Parasiten aus dem Gewebe gespült werden. Durch Zentrifugation für 8 min bei 3.000 g werden die Leishmanien pelletiert und anschließend in 1 ml Schneider's Medium resuspendiert.

Für die Verdünnungsreihe wird eine 96 *well* Flachbodenplatte mit jeweils 100 µl Schneider's Medium pro *well* beschickt. 100 µl der *Leishmania*-haltigen Zellsuspension werden in das erste *well* pipettiert und dann über mindestens drei Spalten 1:2 weiter verdünnt. Die Platte wird luftdicht mit Parafilm verschlossen und für 6-9 Tage bei 27 °C inkubiert. Aufgrund der Mediumzusammensetzung und der Temperatur wandeln sich die amastigoten Leishmanien in dieser Zeit zum Großteil in die promastigote Lebensform um. Anhand der Verdünnung, bei welcher die letzte lebende Leishmanie gefunden wird, kann man auf die gesamte Parasitenzahl in der Läsion schließen.

Kollagenasemedium: 1 % Penicillin/Streptomycin
 0,1 % Collagenase A
 in DMEM

Schneider's Medium: 2 % Humanurin
 10 % FCS
 2 % Glutamin
 1 % Penicillin / Streptomycin
 0,5 % HEPES (1M)
 in Schneider's Drosophila Medium

5.1.9. Infektion von dendritischen Zellen mit Amastigoten

Leishmania-infizierte DC werden als Positivkontrolle in Vakzinierungs- und Restimulierungsexperimenten eingesetzt.

6 Tage alte, unreife dendritische Zellen werden auf 1×10^6 pro ml DC-Medium eingestellt und für 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 5×10^6 frisch isolierten amastigoten Leishmanien infiziert. Die Parasiten werden vor der Infektion mit 5 Vol% normalen Mausserum für 10 min bei 37 °C opsonisiert.

5.2. Immunologische Methoden

5.2.1. Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Das Prinzip des ELISA beruht auf der Erkennung von Antigenen durch spezifische Antikörper. In den hier angewandten „Sandwich-ELISA“ werden gegen das Antigen gerichtete Antikörper an einer Trägersubstanz immobilisiert (*Coating*), wodurch das Antigen aus der Probe abgefangen werden kann (*Capture*). In einem nächsten Schritt bindet ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper an das Antigen (*Detection*). Dieses Enzym katalysiert anschließend die Umsetzung eines chromogenen Substrates, wodurch die Immunkomplexe sichtbar gemacht werden und die Antigenkonzentration der Probe durch photometrische Bestimmung ermittelt werden kann.

5.2.1.1. ELISA-Kits

Die Quantifizierung der Zytokine IL-4, IFN- γ und IL-12 p40 erfolgt mit Hilfe fertiger ELISA-Kits. Die ELISA werden, bis auf folgende Ausnahmen, wie vom Hersteller angegeben durchgeführt:

1. Der Waschpuffer enthält 0,1 % Tween 20 in PBS
2. Zwischen den Inkubationen wird die Platte nur dreimal gewaschen
3. Es wird mit nur 150 μ l Blockpuffer pro *well* geblockt

5.2.1.2. ELISA zu Quantifizierung von Ratten IgG

Die Konzentration der von Hybridomzelllinien gebildeten monoklonalen Ratten-Antikörper wird ebenfalls mittels ELISA bestimmt.

Hierfür wird der *Capture*-Antikörper auf 1,8 µg/ml in *Coating*-Puffer verdünnt. Eine 96 *well* Maxisorp-Platte wird mit 100 µl Antikörper pro *well* beschickt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platte wird dreimal mit Waschpuffer gewaschen und freie Bindungsstellen werden anschließend mit 150 µl *Blocking*-Puffer pro *well* für 90 min bei RT geblockt. Die Platte wird erneut gewaschen, mit Standard und Proben (100 µl/*well*, verdünnt in Probenpuffer) beladen und 90 min bei RT inkubiert. Vom Standard wird eine 1:2 Verdünnungsreihe mit 1.000 pg/ml als höchsten Standard angefertigt. Der *Detection*-Antikörper wird mit Probenpuffer auf 160 ng/ml verdünnt und die Platte nach dem Waschen mit 100 µl Antikörper pro *well* für 90 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen werden 100 µl Substratlösung in jedes *well* pipettiert und die Farbentwicklung im Dunkeln abgewartet. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 50 µl 1 M H₃PO₄ pro *well* abgestoppt und die Absorption bei 450 nm wird im *ELISA-Reader* gemessen.

Capture-Antikörper: Ziege α-Ratte IgG, F(ab')₂-Fragment spezifisch

Detection-Antikörper: Peroxidase-konjugiertes *AffiniPure* Ziege α-Ratte IgG, Fcγ-Fragment spezifisch

Standard: Ratte α-Maus IgG_{2a}

Coating-Puffer: 0,1 M NaHCO₃
0,1 M Na₂CO₃
in Aqua dest., pH 9,5

Waschpuffer: 0,1 % Tween 20
in PBS

Blocking-Puffer: 1 % BSA
1 % Tween 20
in PBS

Probenpuffer: 0,05 % Tween 20
in PBS

Substratlösung: TMB und H₂O₂
1:1 mischen

5.2.2. *Magnetic Cell Sorting (MACS)*

Mit Hilfe der MACS-Aufreinigung können verschiedene Zellpopulationen gezielt angereichert werden. Die aufzureinigende Zellfraktion wird mittels sogenannter *MicroBeads* magnetisch markiert. Das geschieht über Antikörper, die kovalent an die *Beads* gebunden sind und spezifisch definierte Oberflächenmoleküle auf der Zielzelle erkennen. Die heterogene Zellsuspension wird über eine Separationssäule gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befindet. Dadurch werden die magnetisch markierten Zielzellen in der Säule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen hindurch laufen. Die Elution der angereicherten Zielzellen erfolgt anschließend außerhalb des magnetischen Feldes.

Die Methode der MACS-Aufreinigung wird zur Anreicherung von CD90 (Thy1.2)-, CD4- und CD8-positiven T-Zellen sowie CD11c⁺ DC eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.3. *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)*

Die Durchflußzytometrie ist eine weit verbreitete Methode zur Analyse und Charakterisierung von Einzelzellen in Suspension. Sie ermöglicht die gleichzeitige Messung verschiedener physikalischer Eigenschaften einer Zelle wie Größe, Granularität oder intrazelluläre Komplexität. Anhand der relativen Fluoreszenzintensität können verschiedene Zellpopulationen von einander unterschieden werden, wenn diese zuvor an fluoreszenzmarkierte, monoklonale Antikörper gegen definierte Oberflächenmarker gekoppelt wurden [199]. Die Einzelzellen werden unter hohem Druck am Analysepunkt des Gerätes vorbei geführt, wo sie auf einen Argonlaser treffen. Das dabei auftretende Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht, das sogenannte Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), ist stark von der intrazellulären Granularität der Zelle abhängig. Da Argon-Ionenlaser Licht von 488 nm Wellenlänge generieren, sind für die Fluoreszenzmarkierung alle Farbstoffe geeignet, die bei 488 nm angeregt werden können. Die beiden gebräuchlichsten sind Fluorescein Isothiocyanat (FITC) mit einem Emissionsmaximum von 525 nm (grün) und Phycoerythrin (PE) mit einer Emission von 575 nm (rot-orange).

Da Fluoreszenzfarbstoffe stark licht- und temperaturempfindlich sind, muß die Färbung der Zellen im Dunkeln und bei 4 °C statt finden. 0,2-1x10⁶ Zellen können pro Ansatz gefärbt werden. Die Antikörper werden in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, mit Ausnahme des PE-konjugierten α-CD11c Antikörpers, der mit 20 µg/ml doppelt so hoch

konzentriert ist. Pro Ansatz werden 10 µl Antikörper zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden zuerst mit FACS-Puffer gewaschen. Freie Fc-Rezeptoren werden durch 5 minütige Inkubation mit Fc-Block abgesättigt. Die Zellen werden für mindestens 20 min mit jeweils einem Antikörper inkubiert. Zwischen den Inkubationen müssen die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen werden. Gegebenenfalls werden die Zellen nach der Färbung mit 2 % Paraformaldehyd für 10 min fixiert.

Für die Anreicherung von CD11c⁺ DC werden die gefärbten Zellen zum *FACS*orting in die *Core Facility* der Uniklinik Mainz gegeben.

FACS-Puffer: 2 % FCS
 50 µl NaN₃ (10 %ige Lsg.)
 in PBS

5.3. Proteinchemische Methoden

5.3.1. Generierung von TAT-Fusionsproteinen

Die Herstellung der TAT-Fusionsproteine sowie der dazugehörigen Kontrollproteine erfordert zunächst ihre Expression in *E. coli*, bevor sie affinitätschromatographisch aufgereinigt werden können [116;200].

5.3.1.1. Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA, die für das entsprechende Protein codiert, in *E. coli* Bakterien eingeschleust, welche das Protein anschließend in großen Mengen exprimieren. Die meisten Bakterienarten nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Durch spezielle physikalische und/oder chemische Behandlungen läßt sich die Transformationseffizienz jedoch enorm steigern. Das *RosettaBlue (DE3) Competent Cells Standard Kit* enthält solch chemisch kompetente *E. coli* Bakterien. Diese lassen sich nicht nur leichter transformieren, sondern sind zu dem in der Lage, vermehrt eukaryotische Proteine zu exprimieren.

Die Transformation wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die transformierten Bakterien werden anschließend auf ampicillinhaltigen LB Agarplatten ausplattiert und für 15-18 h bei 37 °C inkubiert.

LB-Agar: 35 g Agar
in 1 l Aqua dest. lösen und autoklavieren
danach 0,1 g Ampicillin dazu geben

5.3.1.2. Expression der Proteine in *E. coli*

Von den Platten werden einzelne Klone gepickt und in jeweils 3 ml LB Broth-Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttler herangezogen. Am nächsten Morgen werden 100 ml LB-Medium mit 1 ml ü.N.-Kultur angeimpft und für weitere 8 h bei 37 °C geschüttelt. Durch Zugabe von jeweils 200 ml LB Broth und Super Broth wird das Volumen auf 500 ml aufgestockt und die Bakterien werden ü. N. bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am nächsten morgen wird die Bakterienkultur geerntet und für die Proteinaufreinigung eingesetzt.

LB Broth: 20 g LB Broth
in 1 l Aqua dest. lösen und autoklavieren
danach 0,1 g Ampicillin dazu geben

Super Broth: 60 g Super Broth
in 1 l Aqua dest. lösen und autklavieren
danach 0,1 g Ampicillin dazu geben

5.3.1.3. Aufreinigung der exprimierten Proteine

Die von *E. coli* exprimierten Proteine liegen entweder löslich im Zytoplasma vor oder akkumulieren in den sogenannten *inclusion bodies*. Daher müssen die Bakterien zunächst durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen werden, bevor die Proteine aufgereinigt werden können. Diese besitzen N-terminal ein sechs Aminosäure langes (His)₆-Tag, welches die Aufreinigung über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie ermöglicht, in dem es einen Chelatkomplex mit den Ni²⁺-Ionen eingeht. Die Elution des Proteins erfolgt durch Imidazol, welches die Histidine aus ihrer Bindung verdrängt. Da die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff erfolgt, muß das Protein zur Renaturierung gegen PBS dialysiert werden.

Die Bakterienkultur wird geerntet und für 15 min bei 2.600 g und 4 °C zentrifugiert. Eine Tablette Proteaseinhibitor wird in 10 ml Bindungspuffer gelöst und das Pellet darin resuspendiert. Die Bakterien werden daraufhin viermal 5 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wird für 20 min bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand wird anschließend durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter

gegeben. Die Säule wird mit 5 ml der Ni²⁺-Matrix gepackt, was einem Säulenvolumen von 2,5 ml entspricht. Das Säulenbett wird mit 12,5 ml Bindungspuffer äquilibriert, bevor die Säule mit Überstand beladen wird. Nach dem Waschen der Säule mit 24 ml Bindungspuffer erfolgt die Elution mit zweimal 6 ml Elutionspuffer. Die Eluate werden separat gesammelt und anschließend bei 4°C für dreimal 2 h gegen PBS dialysiert.

Puffer Z: 8 M Harnstoff
 100 mM NaCl
 20 mM HEPES, pH 8,0
 mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Bindungspuffer: Puffer Z plus 10 mM Imidazol

Elutionspuffer: Puffer Z plus 1 M Imidazol

5.3.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Proteinaufreinigung werden die dialysierten Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

SDS (*sodium dodecyl sulfate*) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, daß Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen, so daß Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können [201]. Die Proben werden mit einem Überschuß an SDS auf 95 °C erhitzt, und so die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, wie z. B. β -Mercaptoethanol, aufgespalten.

Für die SDS-PAGE wird ein Tris/Glycin Gel, bestehend aus einem Sammelgel und einem 12 %igem Trenngel, gegossen. Die Proben werden mit *Laemmli*-Puffer [202] versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und in die Probentaschen des Gels pipettiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wird parallel ein Proteinstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei einer Stromstärke von 40 mA durchgeführt, wobei der Fortschritt der Auftrennung anhand der sichtbaren Bromphenolblau-Bande zu erkennen ist.

Als Alternative zu den selbst gegossenen Gelen können vorgefertigte, 4-12 % Bis-Tris Gradientengele von Novex (Invitrogen) mit MES-Laufpuffer verwendet werden.

Nach Beendigung der Elektrophorese müssen die Proteine im Gel fixiert und anschließend durch Coomassie-Färbung [203] sichtbar gemacht werden.

Zur Fixierung der Proteine wird das Gel für 15 min in Fixierlösung geschwenkt, anschließend dreimal 5 min in Aqua dest. gewaschen, für 1 h in *GelCode[®] Blue Stain Reagent* gefärbt und zum Schluß 1-2 h in Aqua dest. entfärbt.

Das Gel kann anschließend in Aqua dest. bei 4 °C gelagert oder zwischen Zellulosemembranen getrocknet werden.

Trenngel (12 %):	9,9 ml Aqua dest. 8,3 ml Rotiphorese [®] Gel 30 6,3 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 250 µl 10 % SDS 250 µl 10 % Ammoniumpersulfat 10 µl TEMED
Sammelgel:	4,1 ml Aqua dest. 1,0 ml Rotiphorese [®] Gel 30 750 µl 1,0 M Tris (pH 6,8) 60 µl 10 % SDS 60 µl 10 % Ammoniumpersulfat 6 µl TEMED
Laufpuffer (10x):	30 g Tris 144 g Glycin 50 ml 20 % SDS mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen, pH 8,5
<i>Laemmli</i> -Puffer:	2,5 ml Aqua dest. 20 ml 10 % SDS 12,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) 5 ml β-Mercaptoethanol 10 ml Glycerin Spatelspitze Bromphenolblau
Fixierlösung:	50 % Methanol 7 % Essigsäure in Aqua dest.

Proteinstandard (MultiMark®):

Markerprotein	Molekulargewicht [kDa]
Myosin	185
Phosphorylase B	98
Glutamat Dehydrogenase	52
Carbonic Anhydrase	31
Myoglobin (rot)	19
Myoglobin (blau)	17
Lysozym	11
Aprotinin	6
Insulin	3

Die Angaben beziehen sich auf vorgefertigte Gradientengele mit MES als Laufpuffer.

5.3.3. BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung durch den BCA (*bicinchoninic acid*)-Assay kombiniert die bekannte Biuret-Reaktion mit der selektiven Bicinchoninsäure-Komplexierung von Cu^+ [204]. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine in alkalischer Lösung. Zwei BCA-Moleküle bilden mit einem Cu^+ -Ion einen farbigen Chelatkomplex. Dies ermöglicht einen sensitiven, kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm, dem Absorptionsmaximum des Komplexes.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird das *BCA Protein Assay Reagent Kit* eingesetzt. Der Test wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.4. Zellbiologische Methoden

5.4.1. Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark (BMDC)

Durch Zugabe von rekombinanten IL-4 und GM-CSF können aus murinen hämatopoetischen Stammzellen über 6 Tage unreife DC generiert werden [205].

Hierfür werden Ober- und Unterschenkel der Hinterbeine in PBS ausgespült, und das Knochenmark wird in Suspension gebracht. Die Zellen werden für 8 min bei 200 g zentrifugiert. Das Pellet wird für 3 min in 1 ml ACK-Lösung resuspendiert, um die Erythrozyten zu lysieren, bevor die Zellen nochmals mit PBS gewaschen werden. Etwa 40×10^6 Zellen werden in 20 ml DC-Medium in eine 75 cm^2 große Zellkulturflasche eingesät. Die Konzentration an rekombinantem IL-4 und GM-CSF im Kulturmedium beträgt 10 ng/ml. Nach zwei Tagen in Kultur sind die DC-Vorläuferzellen noch adhärent, so daß das alte Medium vollständig abgenommen und durch 15 ml frisches DC-Medium ersetzt werden kann. Da sich die Zellen an Tag 4 bereits vom Boden abgelöst haben, werden hier lediglich 5 ml neues Medium zur Kultur dazu gegeben.

Nach sechs Tagen können die unreifen DC geerntet und im FACS charakterisiert werden.

Je nach Fragestellung kann das FCS im DC-Medium durch 0,5 % hitzeinaktiviertes normales Mausserum ersetzt werden.

DC-Medium: 10 ng/ml rekombinantes IL-4
 10 ng/ml rekombinantes GM-CSF
 in RPMI-Complete (Biochrom)

5.4.2. Transduktion dendritischer Zellen mit TAT-Fusionsproteinen

Transduzierte dendritische Zellen werden sowohl *in vivo* für Vakzinierungsversuche als auch *in vitro* für Restimulierungsexperimente benötigt.

Unreife DC werden nach 6 Tagen in Kultur geerntet und auf 1×10^6 Zellen/ml in DC-Medium eingestellt. Bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 werden die DC für 18 h mit 333 nM TAT-Fusionsprotein oder geeigneten Kontrollen transduziert. Um die Aktivierung der DC durch LPS-Kontaminationen zu verhindern, werden die Proteinpräparationen vor der Transduktion mit Polymyxin B (50 $\mu\text{g/ml}$) für 30 min bei RT inkubiert [121]. Sollen die DC in *in vitro* Restimulierungsexperimenten eingesetzt werden, werden sie mit 2 μM TAT-LACK oder geeigneten Kontrollen transduziert. Je nach Fragestellung können sie vor der Restimulierung mit 4.000 Rad bestrahlt werden.

5.4.3. Präparation von Lymphknotenzellen für *in vitro* Zellkulturexperimente

Lymphknoten (LN) von naiven oder immunisierten Mäusen werden entnommen und die Zellen werden manuell, durch Quetschen mit einem Spritzenstempel, in Suspension gebracht. Die Lymphknotenzellen (LNC) werden über ein 70 µm Sieb gegeben, mit RPMI-Complete gewaschen und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Die Zellen können nun für Restimulierungsexperimente oder für die MACS-Aufreinigung von T-Zellen eingesetzt werden.

5.4.4. Restimulierung von Lymphknotenzellen zur Bestimmung des Zytokinprofils

Um die resultierenden Immunantworten nach Vakzinierung oder Infektion einer Maus besser charakterisieren zu können, wird das Zytokinprofil in den drainierenden Lymphknoten bestimmt.

Die isolierten LNC werden auf 1×10^6 pro 200 µl RPMI-Complete eingestellt und in einer 96 *well* Flachbodenplatte ausgesät (200 µl/*well*). Die antigenspezifische Restimulierung erfolgt mit 10 µl SLA. Als Positivkontrolle dient Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 1 pg/ml), welches als Superantigen T-Zellen polyklonal aktivieren kann. Als Negativkontrolle werden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Zellen werden für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Überstände werden geerntet und die Zytokine im ELISA bestimmt.

5.4.5. Restimulierung von T-Zellen mit dendritischen Zellen

Sollen gezielt T-Zellen mit dendritischen Zellen restimuliert werden, müssen diese zuvor aus den Lymphknotenzellen mittels MACS aufgereinigt werden. Hierbei können entweder die gesamten T-Zellen über α -CD90-*Beads* oder definierte T-Zell-Populationen mittels α -CD4- oder α -CD8-*Beads* angereichert werden.

Die transduzierten bzw. infizierten DC werden mit 4.000 Rad bestrahlt und im Verhältnis 1:10 mit den aufgereinigten TC in einer 96 *well* Rundbodenplatte zusammen pipettiert, wobei die Gesamtzellzahl der Co-Kultur mit 1×10^6 in 200 µl RPMI-Complete pro *well* nicht überschritten werden soll.

Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ werden die Überstände geerntet und die Zytokinproduktion wird im ELISA analysiert.

5.4.6. Quantifizierung der T-Zell-Proliferation mittels CFSE-Färbung

Der Vitalfarbstoff CFDA SE (*carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester*), kurz CFSE, ist farblos und diffundiert in lebende Zellen. Dort werden seine Acetatgruppen durch Esterasen gespalten und es entsteht ein hoch reaktiver, fluoreszierender Farbstoff, der mit intrazellulären Aminen eine kovalente Bindung eingeht. Diese Protein-Farbstoff-Konjugate verbleiben in der Zelle, welche anhand der grünen Fluoreszenz im FACS analysiert werden kann. Bei der Zellteilung werden die Farbstoffkomplexe auf die Tochterzelle weitergegeben, so daß die Zellproliferation im FACS anhand der Ausdünnung der Fluoreszenzintensität im FL-1-Kanal sichtbar gemacht werden kann [206].

Für die Färbung von Lymphknoten- oder aufgereinigten T-Zellen wird das *VybrantTM CFDA SE Cell Tracer Kit* verwendet. 5×10^6 Zellen/ml werden mit 1 μ M CFSE in PBS für 15 min bei 37 °C im Wasserbad gefärbt. Die Zellen werden anschließend mit RPMI-Complete gewaschen und können für weitere Restimulierungsexperimente eingesetzt werden. Nach etwas 4-6 Tagen kann die Zellproliferation im FACS analysiert werden. Durch Färbung mit PE-konjugierten α -CD4- oder α -CD8-Antikörpern läßt sich der prozentuale Anteil proliferierender T-Zellen genau bestimmen.

5.4.7. Präparation von Milzzellen zur Aufreinigung von T-Zellen

Die entnommene Milz wird in ein 70 μ m Sieb überführt, welches in eine 55 mm große Petrischale gelegt wird, die mit 5 ml PBS beschickt wurde. Die Milz wird manuell, durch Quetschen mit einem Spritzenstempel, zerkleinert. Die isolierten Milzzellen gelangen durch das Sieb in das PBS und werden anschließend für 8 min bei 200 g zentrifugiert. Erythrozyten werden mit 2 ml ACK-Lösung für 2-3 min lysiert. Die Milzzellen werden mit RPMI-Complete gewaschen und in Trypanblau gezählt. Sie können anschließend für die MACS-Aufreinigung von T-Zellen über den Oberflächenmarker CD90 (Thy1.2) eingesetzt werden.

5.4.8. Isolierung dermalen Zellen aus dem Ohr

Zur Gewinnung dermalen Zellen aus naiven oder *Leishmania*-infizierten Ohren werden diese zunächst enzymatisch angedaut, bevor sie mechanisch zerkleinert werden.

Die geernteten Ohren werden in Längsrichtung geteilt und für 90 min bei 37 °C und 5 % CO₂ mit der Dermis nach unten in Liberasemedium inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von FCS-haltigem RPMI-Complete abgestoppt und die Ohren werden für 7 min

in der *Medimachine* mechanisch zerkleinert. Die Zellsuspension wird über ein 70 µm Sieb gegeben und für 8 min bei 200 g zentrifugiert. Nach dem Zählen können die Zellen für die FACS-Analyse gefärbt werden.

Liberasemedium: 0,5 mg/ml Liberase
5 % Penicillin/Streptomycin
in RPMI 1640

5.4.9. Färbung von Langerhans-Zellen in der Epidermis

Um nach proteinbasierter Vakzinierung den Aktivierungszustand sowie die Auswanderung von Langerhans-Zellen (LC) analysieren zu können, werden diese in der Epidermis von vakzinierten Ohren mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen MHC Klasse II-Moleküle angefärbt.

3 Tage nach der Immunisierung werden die Ohren geerntet, in Längsrichtung geteilt und mit der Dermis nach unten für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in Thiocyanatpuffer inkubiert. Die Epidermis wird seitlich abgeschoben, zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min in eiskaltem Aceton fixiert. Nach erneutem Waschen wird sie für 90 min mit FITC-konjugiertem α-MHC Klasse II-Antikörpern (10 µg/ml) inkubiert. Die gefärbte Epidermis wird nochmals mit PBS gewaschen, auf einen Objektträger aufgebracht und die angefärbten Langerhans-Zellen werden unter dem Fluoreszenzmikroskop in vier verschiedenen Gesichtsfeldern ausgezählt. Inaktive LC sind durch deutliche Dendriten gekennzeichnet, wohingegen aktivierte Zellen ihre Dendriten verlieren und durch die Hochregulation von MHC Klasse II-Molekülen stärker gefärbt sind. Zur Bestimmung der LC-Migration wird die Gesamtzellzahl gegen die unbehandelte Kontrollgruppe (keine Migration) normalisiert und die Auswanderung in % berechnet.

Thiocyanatpuffer: 0,5 M NH₄SCN
0,1 M Na₂HPO₄
0,1 M K₂HPO₄
mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, pH 7,0

5.4.10. Aufreinigung von Lymphozyten aus dem Blut

Lymphozyten lassen sich aus dem peripheren Blut mit einer Dichtezentrifugation über einen Stufengradienten aus Biocoll (spezifische Dichte von 1,077) isolieren.

Das an der Schwanzvene entnommene Blut wird durch Zugabe von 50 µl Heparinlösung gerinnungsunfähig gemacht, mit DMEM auf 1 ml verdünnt und über 3 ml Biocoll geschichtet. Der Gradient wird für 15 min bei 200 g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Rote Blutkörperchen und Granulozyten besitzen eine größere Dichte und wandern durch das Biocoll hindurch. Mononukleäre Zellen, vor allem Lymphozyten und Monozyten, reichern sich an der Phasengrenze an und können von der Grenzschicht abgenommen werden.

Heparinlösung: 8 % Heparin
 2 mM EDTA
 in PBS

5.4.11. Herstellung von Zytospins

Um isolierte Zellen unter dem Lichtmikroskop auszählen zu können, müssen sie zuvor als sogenannte Zytospins auf Objektträger aufgebracht werden. Hierfür werden etwa 40.000 Zellen für 5 min und bei 500 rpm in der Zytospinzentrifuge auf den Objektträger aufgeschleudert. Vor dem Auszählen werden die Zellen mit Diff-Quick® nach Angaben des Herstellers angefärbt.

5.5. Vakzinierungsexperimente

5.5.1. DC-basierte Vakzinierung

Vakziniert wird mit Antigen transduzierten DC, die antigene Peptide über MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren und so eine T-Zell-Antwort in der Maus induzieren können.

Unreife DC werden nach 6 Tagen in Kultur geerntet und auf 1×10^6 Zellen pro ml in DC-Medium eingestellt. Die Zellen werden für 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 333 nM TAT-Fusionsprotein oder geeigneten Kontrollen transduziert. Um eine Aktivierung der DC durch LPS-Kontaminationen zu vermeiden, werden die Proteinpräparationen mit Polymyxin B (50 µg/ml) für 30 min bei RT vorinkubiert [121].

2×10^5 transduzierte DC werden in 50 µl PBS intradermal in das Ohr von BALB/c oder C57BL/6 Mäusen injiziert. Die *Leishmania*-Infektion erfolgt eine Woche später in das Gegenohr.

5.5.2. Proteinbasierte Vakzinierung

Im Gegensatz zur DC-basierten Vakzinierung wird in diesem Ansatz direkt mit dem Protein immunisiert. Immunstimulatorische CpG-Oligonukleotide werden als Adjuvanz co-injiziert. Diese Oligonukleotide besitzen nicht methylierte Cytosin-Guanosin-Dinukleotide, die charakteristisch für mikrobielle DNA sind und das Immunsystem über TLR 9 aktivieren [126].

Jeweils 10 µg TAT-Fusionsprotein oder entsprechende Kontrollproteine werden am Tag -7 und -6 intradermal in das rechte Ohr appliziert. 10 µg CpG 1826 werden an Tag -5 in das vakzinierte Ohr injiziert. Die *Leishmania*-Infektion erfolgt an Tag 0 in das Gegenohr.

Je nach Fragestellung kann der Zeitraum zwischen Vakzinierung und Infektion verlängert werden.

5.5.3. Depletion von T-Zellen

Um die Bedeutung der T-Zellen für die DC-basierte Vakzinierung besser untersuchen zu können, werden diese zum Zeitpunkt der Immunisierung durch Injektion neutralisierender Antikörper depletiert.

Durch einmalige, intraperitoneale Injektion von α -CD4 (GK 1.5, 125 µg) oder α -CD8 (2.43, 50 µg) monoklonaler Antikörpern können CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen in BALB/c Mäusen depletiert werden. Als Isotypkontrolle dient die Injektion von Ratten IgG (GL 113). Die Vollständigkeit der Depletion wird nach Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Blut im FACS überprüft. Zwei Tage nach der Depletion erfolgt die Vakzinierung mit transduzierten DC. Die *Leishmania*-Infektion wird drei Wochen später gesetzt, wenn die T-Zellen wieder hergestellt sind.

5.6. Zellkultur

5.6.1. Kultivierung von Hybridomen in Zellkulturflaschen

Hybridome sind Zelllinien, die monoklonale Antikörper einer bestimmten Spezifität produzieren können. Sie entstehen durch Fusion von Myelomzellen mit antigenspezifischen B-Zellen. Letztere liefern die Fähigkeit zur Antikörperproduktion, während die Myelomzellen die unbegrenzte Wachstumsfähigkeit und die kontinuierliche Antikörpersekretion beisteuern.

Die Hybridomzelle GK1.5 produziert Antikörper gegen das L3T4 Antigen auf CD4⁺ T-Zellen [207]. Der von der Zelllinie 2.43 sezernierte Antikörper ist gegen das Antigen Lyt-2.2 auf der Oberfläche von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen gerichtet [192].

Die von den Hybridomen produzierten Antikörper werden zur Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in BALB/c Mäusen eingesetzt.

Beide Hybridome werden in RPMI-Complete kultiviert. Je nach Wachstumsraten, werden die Zellen alle zwei Tage zwischen 1:2 und 1:5 geteilt.

5.6.2. Kultivierung von Hybridomen im *CELLine*-System

Das *CELLine* Zellkultursystem ist speziell für die Kultivierung Antikörper produzierender Hybridomzellen entwickelt worden. Während durch die Kultivierung in normalen Zellkulturflaschen lediglich Antikörperkonzentrationen zwischen 1 und 5 mg/ml erreicht werden, lassen sich diese im *CELLine*-System um das 50 bis 100fache steigern. Die *CELLine*-Kultivierung stellt somit eine gute Alternative zur Antikörperproduktion in der Ascitesflüssigkeit von Mäusen dar.

Die *CELLine*-Kulturflasche besteht aus einem 1 l umfassenden Nährstoffkompartiment und einer 15 ml großen Zellkammer, die durch eine semipermeable Acetatmembran voneinander getrennt sind. Nährstoffe aus dem Medium können diese Membran passieren und die Zellen versorgen, wohingegen von den Zellen produzierte Antikörper in der Zellkammer zurückgehalten und dort angereichert werden.

Bis auf folgende Ausnahmen wird die Kultivierung der Hybridome im *CELLine*-System wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt:

1. Die Adaption der Zellen an das serumfreie *CellMab*-Medium erfolgt in normalen Zellkulturflaschen.
2. Das *CellMab*-Medium wird mit 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt.
3. Bei schlechter Viabilität der Zellen kann das *CellMab*-Medium durch RPMI-Complete mit 2 % FCS ersetzt werden.

5.6.3. Zellen auftauen

Die im flüssigen Stickstoff tiefgefrorenen Zellen werden zunächst 2 min bei RT und anschließend 2 min bei 37 °C im Wasserbad angetaut. Bevor die Zellen vollständig aufgetaut sind, werden sie langsam in 37 °C warmes Auftaumedium überführt (etwa 20x10⁶ Zellen in

20 ml in einer 75 cm² großen Zellkulturflasche). Die Zellen werden für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, anschließend für 8 min bei 200 g zentrifugiert und gezählt. 3x10⁵ Zellen/ml werden in frisches Auftaumedium eingesät. Nach weiteren 24 h werden die Hybridome erneut geerntet und neu eingestellt. Sobald sich die Zellen regelmäßig teilen, können sie auf normales RPMI-Complete adaptiert werden. Dies geschieht in folgenden Schritten:

- 100 % Auftaumedium
- 75 % Auftaumedium + 25 % RPMI-Complete
- 50 % Auftaumedium + 50 % RPMI-Complete
- 25 % Auftaumedium + 75 % RPMI-Complete
- 100 % RPMI-Complete

Die Zellen werden 3-4 Mal passagiert, bevor das Auftaumedium weiter reduziert wird.

Auftaumedium: 20 % FCS
 1 % Penicillin/Streptomycin
 2 % Glutamin
 1 % HEPES (1 M)
 1 % nicht essentielle Aminosäuren
 0,1 % β-Mercaptoethanol (50 mM)

5.6.4. Zellen einfrieren

Das Einfrieren der Zellen erfolgt in DMSO-haltigem Medium. DMSO verhindert die Kristallbildung und das Platzen der Zellen.

Die Hybridome werden auf 20x10⁶ Zellen pro 500 µl in DMEM eingestellt und dann tropfenweise unter ständigem Schütteln mit 500 µl Einfriermedium versetzt. Damit die Zellen möglichst langsam herunter kühlen, werden sie zunächst im Isopropanolbad auf -80 °C tiefgefroren. Die Abkühlgeschwindigkeit liegt bei 1 °C pro min, so daß die Zellen nach spätestens 3 Tagen aus dem Bad heraus genommen und in den flüssigen Stickstoff überführt werden können.

Einfriermedium: 20 % FCS
 15 % DMSO
 in DMEM

5.7. Tierversuche

Alle Tierversuche werden in den Räumen der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in einem SPF (*specific pathogen free*) Tierstall durchgeführt.

Bei der Vakzinierung der Mäuse mit DC bzw. Fusionsproteinen sowie bei der Infektion mit *Leishmania major* werden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Xylazin/Ketamin (1:10) anästhesiert. Die Mäuse werden bis zum Wiedererwachen überwacht und unter einer Wärmelampe verwahrt.

Zum Messen der Läsionsvolumina werden die Tiere jeweils für einige Sekunden durch die Inhalation von Isofluran betäubt.

Folgende Tierversuchsanträge wurden für dieses Projekt genehmigt:

1. „Prophylaktische und therapeutische Vakzinierung gegen Leishmaniose mit TAT-Proteinantigen-transduzierten dendritischen Zellen“ (1.5 177-07/021-2);
gültig vom 28.02.2002 bis 28.02.2005
Antragstellerin: Dr. med. Esther von Stebut
Stellvertreter: Dr. med. Marcus Maurer
2. „Vakzinierung gegen die murine kutane Leishmaniose mit TAT-LACK-Fusionsproteinen“ (1.5 177-07/051-38);
gültig vom 01.09.2005 bis 30.08.2008
Antragstellerin: PD Dr. med. Esther von Stebut
Stellvertreterin: Dipl. Biochem. Katharina Mölle

5.8. Statistik

Die statistischen Analysen werden unter Anwendung des ungepaarten *Student's t test* und der Software *StatView*[®] für Windows durchgeführt.

5.9. Allgemeine Puffer und Medien

5.9.1. PBS

PBS (10x): 1,38 M NaCl
0,1 M NaH₂PO₄ x 1 H₂O
in 1 l Aqua dest., pH 6,6

Für einfaches PBS wird das Konzentrat 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Der pH-Wert wird auf 7,2 bis 7,3 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert

5.9.2. RPMI-Complete

5 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % Glutamin
1 % HEPES
1 % nicht essentielle Aminosäuren
0,1 % β -Mercaptoethanol
in RPMI 1640

Nur für die Generierung von DC und deren anschließende Transduktion bzw. Infektion wird das RPMI 1640 der Firma Biochrom verwendet. Bei allen anderen Ansätzen findet das Medium von BioWhittaker Anwendung.

6. Materialien und Geräte

6.1. Zelllinien und Parasiten

GK1.5, Hybridomzelllinie, α -CD4 mAk	ATCC, über LGC Promochem, Wesel
2.43, Hybridomzelllinie, α -CD8 mAk	ATCC, über LGC Promochem, Wesel
<i>Leishmania major</i> , Klon VI (MHOM/IL/80IFriedlin)	Geschenk vom Institut Pasteur, Paris, Frankreich

6.2. Versuchstiere

BALB/c Mäuse	ZVTE, Johannes Gutenberg Universität Mainz
C57BL/6 Mäuse	ZVTE, Johannes Gutenberg Universität Mainz
IL-12p40-/- C57BL/6 Mäuse	Geschenk vom Institut für Immunologie, Universität Mainz

6.3. Antikörper

FITC-konjugierte Antikörper

Hamster IgG, Gruppe 1, κ (α -TNP), Klon A19-3	Becton Dickinson, Heidelberg
α -Maus CD3e, Klon 145-2C11	Becton Dickinson, Heidelberg
α -Maus CD40, Klon 3/23	Becton Dickinson, Heidelberg
α -Maus CD86 (B7-2), Klon GL1	Becton Dickinson, Heidelberg
α -Maus I-A/I-E (MHC Klasse II), Klon 2G9	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratten IgG _{2a} , κ , Klon R35-95	Becton Dickinson, Heidelberg

PE-konjugierte Antikörper

Hamster IgG, Gruppe 1, λ (α -TNP), Klon G235-2356	Becton Dickinson, Heidelberg
α -Maus CD4 (L3T4), Klon RM4-5	Becton Dickinson, Heidelberg
α -Maus CD8a (Ly-2), Klon 53-6.7	Becton Dickinson, Heidelberg
α -Maus CD11c (Integrin α_x Kette), Klon HL3	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratten IgG _{2a} , κ , Klon R35-95	Becton Dickinson, Heidelberg

PE-Cy5.5-konjugierte Antikörper

α -Maus CD45, Klon 30-F11

Caltag Laboratories, Hamburg

Ratten IgG_{2b}

Caltag Laboratories, Hamburg

HRP-konjugierte Antikörper

AffiniPure Ziege α -Ratten IgG,

Fc γ -Fragment spezifisch

Dianova, Hamburg

Aufgereinigte Antikörper

α -Maus CD16/CD32 (Fc γ Rezeptor III/II, Fc-Block),

Klon 2.4G2

Becton Dickinson, Heidelberg

Monoklonales Ratten IgG, Klon GL113

Geschenk von Dr. D. Sacks,

NIH, Bethesda, MD, USA

Ratte α -Maus IgG_{2a}, Klon LO-MG2a

Caltag Laboratories, Hamburg

Ziege α -Ratte IgG, F(ab')₂-Fragment spezifisch

Dianova, Hamburg

6.4. Reagenziensätze (*Kits*)

BCA Protein Assay Kit

Pierce, Perbio Science, Bonn

Diff-Quik[®] Färbeset

Dade Behring, Düringen, CH

DuoSet ELISA Development System, Mouse IFN- γ

R&D Systems, Wiesbaden

DuoSet ELISA Development System, Mouse IL12p40

R&D Systems, Wiesbaden

BD OptEIA[™] Mouse IL-4 ELISA Set

Becton Dickinson, Heidelberg

RosettaBlue[™] (DE3) Competent Cells

Novagen, über Merck Biosciences,

Bad Soden

TMB Substrate Reagent Set

Becton Dickinson, Heidelberg

Vybrant[™] CFDA SE Cell Tracer Kit

Molecular Probes, Leiden,

Niederlande

6.5. Reagenzien und Chemikalien

Aceton, p.a.

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

ACK Lysing Buffer

BioWhittaker/Cambrex BioScience

Verviers, Belgien

Adenin, $\geq 99\%$	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA), proteasefrei, $>98\%$	Carl Roth, Karlsruhe
Alkopharm 70 (Ethanol 70 %)	Brüggemann Alcohol, Heilbronn
Ammoniumpersulfat (Ammoniumperoxodisulfat), $\geq 98\%$, p.a., ACS	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumthiocyanat (NH_4SCN), p.a.	Merck, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biocoll-Trennlösung, Dichte 1,077 g/ml, isoton	Biochrom, Berlin
Bromphenolblau Natriumsalz, für die Elektrophorese	Carl Roth, Karlsruhe
CD4 (L3T4) MicroBeads, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8a (Ly-2) MicroBeads, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD11c (N418) MicroBeads, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD90 (Thy1.2) MicroBeads, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell TM Mab Medium, animal component free	Becton Dickinson, Heidelberg
Collagenase, Clostridiopeptidase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
CpG ODN 1826, vollständig verschwefelt, (TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT)	Operon, über Qigaen, Hilden
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), $>99\%$, p.a., wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), p.a.	Merck, Darmstadt
DMEM, mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin, ohne Pyruvat	Gibco, über Invitrogen, Karlsruhe
DMSO, Rotipuran [®] , $\geq 99,8\%$, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA di-Natriumsalz Dihydrat, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure (CH_3COOH), Rotipuran [®] , 100 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
FACS Clean Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSFlow TM sheath fluid	Becton Dickinson, Heidelberg

FACS Rinse Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
Ficoll [®] 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Fötales Kälberserum „Gold“, Kategorie „EU“	PAA Laboratories, Cölbe
Forene [®] (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden
GelCode [®] Blue Stain Reagent	Pierce, über Perbio Science, Bonn
D-(+)-Glucose, p.a., ACS, wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM (100x)	Gibco, über Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin Rotipuran [®] , ≥99,5 %, p.a., wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin Pufferan [®] , ≥99 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff, ≥99,5 %, p.a., Ultra Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Helipur [®] H plus N	B. Braun, Melsungen
Hemin(chlorid), ≥98 %	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES Pufferan [®] , ≥99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
Humanurin, 24h Sammelurin	Mitarbeiter AG von Stebut
Immidazol Pufferan [®] , ≥99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Immersionsöl für die Mikroskopie	Merck, Darmstadt
Isopropylalkohol (Isopropanol)	Hedinger, Stuttgart
Ketamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LB Agar (Lennox L Agar)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LB Broth (Lennox L Broth)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Liberase CI Purified Enzyme Blend	Roche Diagnostics, Mannheim
Liquemin [®] N 25000 (Heparin)	Roche Diagnostics, Mannheim
Medium 199 (1x), mit Hanks' Salzen, L-Glutamin, 25 mM HEPES, L-Aminosäuren	Gibco, über Invitrogen, Karlsruhe
Medium 199 (10x), mit Hanks' Salzen, ohne Glutamin und Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MEM Non-essential amino acids (100x)	Gibco, über Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol), 99 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol, analytical reagent grade	Fisher Scientific, Schwerte
MultiMark [®] Multi-Colored Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃), ≥99 %, wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl), >99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	

(NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O), >98 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃), ≥99,5 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Ni-NTA His•Bind [®] Resin	Novagen, über Merck Biosciences, Bad Soden
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Novex, 4-12 % Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 10 well	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd, zur Synthese	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄), 85 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Plasmide	Geschenk von Dr. Mark Udey, NIH, Bethesda, MD, USA
Polymyxin B Sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rekombinantes murines GM-CSF, >98 %, Aktivität >5x10 ⁶ units/mg	PeptoTech, über Tebu-Bio, Offenbach
Rekombinantes murines IL-4, >98 %, Aktivität >1x10 ⁷ units/mg	PeptoTech, über Tebu-Bio, Offenbach
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium, mit 2 g/l NaHCO ₃ und Glutamin	Biochrom, Berlin
RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamine	BioWhittaker/Cambrex BioScience Verviers, Belgien
Salzsäure (HCl), 25 %, p.a.	Merck, Darmstadt
Schneider's Drosophila Medium, modifiziert	BioWhittaker/Cambrex BioScience Verviers, Belgien
SDS, für die Elektrophorese, ≥98,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Staphylokokken Enterotoxin B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Super Broth	Qbiogene, über MP Biomedicals, Heidelberg
TEMED, 99 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Triethanolamin, ≥98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Trizma [®] base, ≥99,9 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Trypanblaulösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween [®] 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylazin Hydrochlorid, ≥99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

6.6. Verbrauchsmaterialien

CELLine CL-1000	Becton Dickinson, Heidelberg
Cell Strainer (Zellsieb), 70 μm	BD Falcon, über Fisher Scientific, Schwerte
Chirurgische Einmalskalpelle	B. Braun, Melsungen
Deckgläser, 24x40 mm	Glasbearbeitungswerk Menzel, Braunschweig
Dialysekammern Slide-A-Lyzer [®] , 10.000 MWCO, 3-12 ml	Pierce, Perbio Science, Bonn
Einmalspritze, 1 ml (Tuberkulin)	B. Braun, Melsungen
Einmalspritze, 2 ml	B. Braun, Melsungen
Einmalspritze, 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritze, 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritze, 20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Finntip 300, 5-300 μl	Thermo Labsystems, über VWR International, Darmstadt
Kanüle, 23Gx1 ¹ / ₄ , 0,6x30	B. Braun, Melsungen
Kanüle, 26Gx1 ¹ / ₂ , 0,45x12	B. Braun, Melsungen
Kanüle, 30Gx1 ¹ / ₂ , 0,3x13	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen, 1,8 ml, PP	Nunc, über VWR International, Darmstadt
MACS [®] Cell Separation Column, LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS [®] Cell Separation Column, MS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MaxiSorp Nunc-Immuno [™] Plate, 96 well, PS	Nunc, über Brand, Wertheim
Medicons, 50 μm, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
Microplatte 96 well, Rundboden, PS, unsteril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger, ca. 76x26 mm, geputzt	Diagonal, Münster

Parafilm „M“ Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Petrischalen Rotilabo [®] , 55x15 mm, PS	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen, 100x15 mm, PS	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 0,1-10 µl	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, 0,5-10 µl	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen Typ Gilson [®] , 10-200 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen Typ Gilson [®] , 200-1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PD Tips Plastibrand [®] , 0,5 ml	Brand, Wertheim
PD Tips Plastibrand [®] , 2,5 ml	Brand, Wertheim
PD Tips Plastibrand [®] , 5,0 ml	Brand, Wertheim
PD Tips Plastibrand [®] , 12,5 ml	Brand, Wertheim
Pellet pestle, grinders, PP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly-Prep [®] Chromatography Columns, 0,8x4 cm	Bio-Rad Laboratories, München
Poly-Prep [®] Column Stack Caps	Bio-Rad Laboratories, München
Rasierklingen	Apollo Herkenrath, Solingen
Reagiergefäß, 0,5 ml, PP	Sarstedt, Nürnberg
Reagiergefäß, 1,5 ml, PP	Sarstedt, Nürnberg
Reagiergefäß, 2,0 ml, PP	Sarstedt, Nürnberg
Röhrchen, 15 ml, PP, konischer Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röhrchen, 50 ml, PP, konischer Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röhrchen mit Rundboden, 5 ml, PS, unsteril	BD Falcon, über Fisher Scientific, Schwerte
Serologische Pipette, 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipette, 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipette, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Shandon TPX Filter Cards	Thermo Electron, Langeselbold
Spritzenvorsatzfilter Minisart, 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Spritzenvorsatzfilter Minisart, 0,45 µm	Sartorius, Göttingen
Tuberculin Syringe (Tuberkulinspritze), 0,5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
ZapCap-S Bottle-top filters, 0,2 µm, Whatman [®]	Schleicher & Schuell, über VWR International, Darmstadt
Zellkulturflasche 25 cm ² , mit Standardschraubverschluß	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Zellkulturflasche 75 cm²,

mit Filterschraubverschluß

Zellkulturplatte 6 well, Flachboden, PS, steril

Zellkulturplatte 24 well, Flachboden, PS, steril

Zellkulturplatte 48 well, Flachboden, PS, steril

Zellkulturplatte 96 well, Flachboden, PS, steril

Zellkulturplatte 96 well, Rundboden, PS, steril

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Falcon, über Fisher Scientific,
Schwerte

6.7. Geräte

Absorptions Microplate Reader ELx808™

Consort Power Supply E835

Digitalkamera Canon PowerShot S40

Durchlichtmikroskop Diavert

Durchlichtmikroskop Diaplan

Elektrophoresesystem XCell SureLock™ Mini-Cell

FACSCalibur™ Flow Cytometer

FACScan™ Flow Cytometer

Feinwaage, 0,05-210 g

Fluoreszenzmikroskop DM IL HC

Forma Incubated Tabletop Orbital Shaker

Heizblock HLC

HERAcell® CO₂-Inkubator,

mit Dekontaminationsroutine

Kühlbrutschrank KB 53

Magnetrührer MR 3001 K

Medimachine™

Mikrobiologischer Brutschrank

Milli-Q® Reinstwassersystem,

Q-Gard® 3 Vorbehandlungspack

Pellet pestle, cordless motor

BioTEK Instruments,

Bad Friedrichshall

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Canon Deutschland, Krefeld

Leitz, Wetzlar

Leitz, Wetzlar

Invitrogen, Karlsruhe

Becton Dickinson, Heidelberg

Becton Dickinson, Heidelberg

Sartorius, Göttingen

Leica Microsystems, Wetzlar

Thermo Electron, Langenselbold

Labotec Labortechnik, Wiesbaden

Heraeus, über Kendro Laboratory

Products, Langenselbold

Binder, Tuttlingen

Heidolph Instruments, Schwabach

Becton Dickinson, Heidelberg

Heraeus, über Kendro Laboratory

Products, Langenselbold

Millipore, Schwalbach

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PerfecBlue Doppelgelsystem Twin M

Gelgröße: 16x14 cm

pH-Meter CG820

Pieptus[®]-Akku

Röntgengerät RT 100

Shandon Cytospin[®] 2 Zytozentrifuge

Thermomixer compact

Uhrenmeßschieber, digital, 150 mm

Ultraschallbad Sonorex Super RK 103

Varioklav[®], Dampfsterilisator

Vortex Schüttler

Waage, 5-2200 g

Wasserbad Typ GFL-1003, 14 l

Zentrifuge Biofuge pico

Zentrifuge Multifuge 3 L-R

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Schott Instruments, Mainz

Hirschmann Laborgeräte,

Eberstadt

CHF Müller, Hamburg

Thermo Electron, Langenselbold

Eppendorf, Hamburg

Rheinwerkzeuge, Mainz

Bandelin electronic, Berlin

H+P Labortechnik,

Oberschleißheim

Merck Eurolab, Darmstadt

Sartorius, Göttingen

Gesellschaft für Labortechnik,

Burgwedel

Heraeus, über Kendro Laboratory

Products, Langenselbold

Heraeus, über Kendro Laboratory

Products, Langenselbold

6.8. Sonstige Materialien

Finnpipette[®], 50-300 µl, 12 Kanal

Handhomogenisator nach Dounce (Tissue Grinder),

15 ml, mit je einem weiten und engen Pistill

HandyStep[®], manueller Handdispenser

Kamm 1.5 mm/15 Zähne für Twin M

MACS[™] MultiStand

Microliter[™] Syringe 705, 50 µl

MidiMACS[™] Separation Unit

Thermo Labsystems, über VWR

International, Darmstadt

Fisher Scientific, Schwerte

Brand, Wertheim

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach

Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach

MiniMACS™ Separation Unit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mouse restrainer	Braintree Scientific, Braintree, MA, USA
Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	VWR International, Darmstadt
Neubauerzählkammer	VWR International, Darmstadt
Pipetman® P, Precision Microliter Pipette, 10 µl	Gilson International, Bad Camberg
Pipetman® P, Precision Microliter Pipette, 100 µl	Gilson International, Bad Camberg
Pipetman® P, Precision Microliter Pipette, 200 µl	Gilson International, Bad Camberg
Pipetman® P, Precision Microliter Pipette, 1000 µl	Gilson International, Bad Camberg
Schüttelschikane 500 ml, mit 3 Schikanen	Fisher Scientific, Schwerte
Schüttelschikane 1000 ml, mit 3 Schikanen	VWR International, Darmstadt
Shandon Cytoclip Stainless Steel Slide Clip	Thermo Electron, Langenselbold
Shandon Single Cytofunnel®	Thermo Electron, Langenselbold

7. Literatur

- [1] World Health Organization (WHO) (2001) Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). *www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm*.
- [2] Roberts,L.J., Handman,E., & Foote,S.J. (2000) Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ*, **321**, 801-804.
- [3] von Stebut,E. & Udey,M.C. (2004) Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes. Infect.*, **6**, 1102-1109.
- [4] Hepburn,N.C. (2000) Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, **25**, 363-370.
- [5] Pschyrembel,W. (1998) Klinisches Wörterbuch, 258., neu bearbeitete Auflage. *Walter de Gruyter, Berlin*.
- [6] Cascio,A., di Martino,L., Occorsio,P., Giacchino,R., Catania,S., Gigliotti,A.R., Aiassa,C., Iaria,C., Giordano,S., Colomba,C., Polara,V.F., Titone,L., Gradoni,L., Gramiccia,M., & Antinori,S. (2004) A 6 day course of liposomal amphotericin B in the treatment of infantile visceral leishmaniasis: the Italian experience. *J. Antimicrob. Chemother.*, **54**, 217-220.
- [7] Bommer,W., Eibl,H.J., Engel,K.R., Kuhlencord,A., Sindermann,H., Sundar,S., & Zappel,H. (2004) [Leishmaniasis--oral treatment with hexadecylphosphocholine]. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **116 Suppl 4**, 24-29.
- [8] Paredes,R., Munoz,J., Diaz,I., Domingo,P., Gurgui,M., & Clotet,B. (2003) Leishmaniasis in HIV infection. *J. Postgrad. Med.*, **49**, 39-49.
- [9] Ali,A. (2002) Leishmaniasis and HIV/AIDS co-infections: review of common features and management experiences. *Ethiop. Med. J.*, **40 Suppl 1**, 37-49.
- [10] Warburg,A. & Schlein,Y. (1986) The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 926-930.
- [11] Mosser,D.M. & Edelson,P.J. (1985) The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.*, **135**, 2785-2789.
- [12] Schonlau,F., Scharffetter-Kochanek,K., Grabbe,S., Pietz,B., Sorg,C., & Sunderkotter,C. (2000) In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. *Eur. J. Immunol.*, **30**, 2729-2740.
- [13] Sacks,D. & Noben-Trauth,N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 845-858.
- [14] Reiner,S.L. & Locksley,R.M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**, 151-177.

- [15] Lohoff,M., Gessner,A., Bogdan,C., & Rollinghoff,M. (1998) The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **115**, 191-202.
- [16] Scott,P. & Farrell,J.P. (1998) Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Chem. Immunol.*, **70**, 60-80.
- [17] Scott,P., Natovitz,P., Coffman,R.L., Pearce,E., & Sher,A. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.*, **168**, 1675-1684.
- [18] Heinzl,F.P., Sadick,M.D., Holaday,B.J., Coffman,R.L., & Locksley,R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*, **169**, 59-72.
- [19] Belkaid,Y., von Stebut,E., Mendez,S., Lira,R., Caler,E., Bertholet,S., Udey,M.C., & Sacks,D. (2002) CD8(+) T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.*, **168**, 3992-4000.
- [20] Muller,I. (1992) Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.*, **22**, 3063-3069.
- [21] Muller,I., Kropf,P., Louis,J.A., & Milon,G. (1994) Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect. Immun.*, **62**, 2575-2581.
- [22] Conceicao-Silva,F., Perlaza,B.L., Louis,J.A., & Romero,P. (1994) *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 2813-2817.
- [23] Van Weyenbergh,J., Santana,G., D'Oliveira,A., Jr., Santos,A.F., Jr., Costa,C.H., Carvalho,E.M., Barral,A., & Barral-Netto,M. (2004) Zinc/copper imbalance reflects immune dysfunction in human leishmaniasis: an *ex vivo* and *in vitro* study. *BMC Infect. Dis.*, **4**, 50.
- [24] Saha,S., Mondal,S., Banerjee,A., Ghose,J., Bhowmick,S., & Ali,N. (2006) Immune responses in kala-azar. *Indian J. Med. Res.*, **123**, 245-266.
- [25] Kharazmi,A., Kemp,K., Ismail,A., Gasim,S., Gaafar,A., Kurtzhals,J.A., El Hassan,A.M., Theander,T.G., & Kemp,M. (1999) T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol. Lett.*, **65**, 105-108.
- [26] Belkaid,Y., Kamhawi,S., Modi,G., Valenzuela,J., Noben-Trauth,N., Rowton,E., Ribeiro,J., & Sacks,D.L. (1998) Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J. Exp. Med.*, **188**, 1941-1953.

- [27] Belkaid, Y., Jouin, H., & Milon, G. (1996) A method to recover, enumerate and identify lymphomyeloid cells present in an inflammatory dermal site: a study in laboratory mice. *J. Immunol. Methods*, **199**, 5-25.
- [28] Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., & Sacks, D. (2000) A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol.*, **165**, 969-977.
- [29] Bogdan, C., Donhauser, N., Doring, R., Rollinghoff, M., Diefenbach, A., & Rittig, M.G. (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, **191**, 2121-2130.
- [30] Prina, E., Jouanne, C., de Souza, L.S., Szabo, A., Guillet, J.G., & Antoine, J.C. (1993) Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J. Immunol.*, **151**, 2050-2061.
- [31] Kima, P.E., Soong, L., Chicharro, C., Ruddle, N.H., & McMahon-Pratt, D. (1996) *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.*, **26**, 3163-3169.
- [32] Courret, N., Prina, E., Mougneau, E., Saraiva, E.M., Sacks, D.L., Glaichenhaus, N., & Antoine, J.C. (1999) Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 762-773.
- [33] Reiner, N.E., Ng, W., & 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.
- [34] Kaye, P.M., Rogers, N.J., Curry, A.J., & Scott, J.C. (1994) Deficient expression of costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 2850-2854.
- [35] Saha, B., Das, G., Vohra, H., Ganguly, N.K., & Mishra, G.C. (1995) Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 2492-2498.
- [36] Reiner, S.L., Zheng, S., Wang, Z.E., Stowring, L., & Locksley, R.M. (1994) *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.*, **179**, 447-456.
- [37] Carrera, L., Gazzinelli, R.T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R., & Sacks, D.L. (1996) *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.*, **183**, 515-526.
- [38] Sartori, A., Oliveira, M.A., Scott, P., & Trinchieri, G. (1997) Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. *J. Immunol.*, **159**, 2849-2857.

- [39] Belkaid, Y., Butcher, B., & Sacks, D.L. (1998) Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 1389-1400.
- [40] Liew, F.Y., Wei, X.Q., & Proudfoot, L. (1997) Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **352**, 1311-1315.
- [41] Bogdan, C., Rollinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.*, **173**, 17-26.
- [42] Moll, H. (2000) The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **479**, 163-173.
- [43] von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D.L., & Udey, M.C. (1998) Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J. Exp. Med.*, **188**, 1547-1552.
- [44] Jakob, T., Saitoh, A., & Udey, M.C. (1997) E-cadherin-mediated adhesion involving Langerhans cell-like dendritic cells expanded from murine fetal skin. *J. Immunol.*, **159**, 2693-2701.
- [45] Woelbing, F., Kostka, S.L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A.P., Knop, J., Udey, M.C., & von Stebut, E. (2006) Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc{gamma} receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J. Exp. Med.*, **203**, 177-188.
- [46] Aebischer, T., Moody, S.F., & Handman, E. (1993) Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect. Immun.*, **61**, 220-226.
- [47] Moll, H., Flohe, S., & Blank, C. (1995) Dendritic cells seclude *Leishmania* parasites that persist in cured mice--a role in the maintenance of T-cell memory? *Adv. Exp. Med. Biol.*, **378**, 507-509.
- [48] Belkaid, Y., Hoffmann, K.F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M.C., Wynn, T.A., & Sacks, D.L. (2001) The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med.*, **194**, 1497-1506.
- [49] Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., & Sacks, D.L. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, **420**, 502-507.
- [50] von Stebut, E., Belkaid, Y., Nguyen, B.V., Cushing, M., Sacks, D.L., & Udey, M.C. (2000) *Leishmania major*-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, **30**, 3498-3506.
- [51] von Stebut, E., Ehrchen, J.M., Belkaid, Y., Kostka, S.L., Molle, K., Knop, J., Sunderkotter, C., & Udey, M.C. (2003) Interleukin 1 alpha promotes Th1

- differentiation and inhibits disease progression in *leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J. Exp. Med.*, **198**, 191-199.
- [52] Filippi,C., Hugues,S., Cazareth,J., Julia,V., Glaichenhaus,N., & Ugolini,S. (2003) CD4+ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **198**, 201-209.
- [53] Muller,I., Kropf,P., Etges,R.J., & Louis,J.A. (1993) Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infect. Immun.*, **61**, 3730-3738.
- [54] Milon,G., Titus,R.G., Cerottini,J.C., Marchal,G., & Louis,J.A. (1986) Higher frequency of *Leishmania major*-specific L3T4+ T cells in susceptible BALB/c as compared with resistant CBA mice. *J. Immunol.*, **136**, 1467-1471.
- [55] Titus,R.G., Milon,G., Marchal,G., Vassalli,P., Cerottini,J.C., & Louis,J.A. (1987) Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, **17**, 1429-1433.
- [56] Wang,Z.E., Reiner,S.L., Hatam,F., Heinzl,F.P., Bouvier,J., Turck,C.W., & Locksley,R.M. (1993) Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.*, **151**, 2077-2086.
- [57] Overath,P. & Harbecke,D. (1993) Course of *Leishmania* infection in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Immunol. Lett.*, **37**, 13-17.
- [58] Huber,M., Timms,E., Mak,T.W., Rollinghoff,M., & Lohoff,M. (1998) Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect. Immun.*, **66**, 3968-3970.
- [59] Conceicao-Silva,F., Hahne,M., Schroter,M., Louis,J., & Tschopp,J. (1998) The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 237-245.
- [60] Smith,L.E., Rodrigues,M., & Russell,D.G. (1991) The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages. *J. Exp. Med.*, **174**, 499-505.
- [61] Colmenares,M., Kima,P.E., Samoff,E., Soong,L., & McMahon-Pratt,D. (2003) Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immun.*, **71**, 3172-3182.
- [62] Coler,R.N. & Reed,S.G. (2005) Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, **21**, 244-249.
- [63] Zaph,C., Uzonna,J., Beverley,S.M., & Scott,P. (2004) Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat. Med.*, **10**, 1104-1110.
- [64] Handman,E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 229-243.

- [65] Sharifi,I., FeKri,A.R., Aflatonian,M.R., Khamesipour,A., Nadim,A., Mousavi,M.R., Momeni,A.Z., Dowlati,Y., Godal,T., Zicker,F., Smith,P.G., & Modabber,F. (1998) Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet*, **351**, 1540-1543.
- [66] Momeni,A.Z., Jalayer,T., Emamjomeh,M., Khamesipour,A., Zicker,F., Ghassemi,R.L., Dowlati,Y., Sharifi,I., Aminjavaheri,M., Shafiei,A., Alimohammadian,M.H., Hashemi-Fesharki,R., Nasser,K., Godal,T., Smith,P.G., & Modabber,F. (1999) A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine*, **17**, 466-472.
- [67] Mendez,S., Gurunathan,S., Kamhawi,S., Belkaid,Y., Moga,M.A., Skeiky,Y.A., Campos-Neto,A., Reed,S., Seder,R.A., & Sacks,D. (2001) The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J. Immunol.*, **166**, 5122-5128.
- [68] Gillespie,R.D., Mbow,M.L., & Titus,R.G. (2000) The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.*, **22**, 319-331.
- [69] Valenzuela,J.G., Belkaid,Y., Garfield,M.K., Mendez,S., Kamhawi,S., Rowton,E.D., Sacks,D.L., & Ribeiro,J.M. (2001) Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J. Exp. Med.*, **194**, 331-342.
- [70] Morris,R.V., Shoemaker,C.B., David,J.R., Lanzaro,G.C., & Titus,R.G. (2001) Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J. Immunol.*, **167**, 5226-5230.
- [71] Rafati,S., Kariminia,A., Seyde-Eslami,S., Narimani,M., Taheri,T., & Lebbatard,M. (2002) Recombinant cysteine proteinases-based vaccines against *Leishmania major* in BALB/c mice: the partial protection relies on interferon gamma producing CD8(+) T lymphocyte activation. *Vaccine*, **20**, 2439-2447.
- [72] Yang,D.M., Fairweather,N., Button,L.L., McMaster,W.R., Kahl,L.P., & Liew,F.Y. (1990) Oral Salmonella typhimurium (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J. Immunol.*, **145**, 2281-2285.
- [73] Connell,N.D., Medina-Acosta,E., McMaster,W.R., Bloom,B.R., & Russell,D.G. (1993) Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 11473-11477.
- [74] Spitzer,N., Jardim,A., Lippert,D., & Olafson,R.W. (1999) Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide vaccine. *Vaccine*, **17**, 1298-1300.
- [75] Xu,D. & Liew,F.Y. (1995) Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*, **84**, 173-176.

- [76] Solioz,N., Blum-Tirouvanziam,U., Jacquet,R., Rafati,S., Corradin,G., Mauel,J., & Fasel,N. (1999) The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **18**, 850-859.
- [77] Stobie,L., Gurunathan,S., Prussin,C., Sacks,D.L., Glaichenhaus,N., Wu,C.Y., & Seder,R.A. (2000) The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **97**, 8427-8432.
- [78] Gurunathan,S., Prussin,C., Sacks,D.L., & Seder,R.A. (1998) Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat. Med.*, **4**, 1409-1415.
- [79] Mougneau,E., Altare,F., Wakil,A.E., Zheng,S., Coppola,T., Wang,Z.E., Waldmann,R., Locksley,R.M., & Glaichenhaus,N. (1995) Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science*, **268**, 563-566.
- [80] Campos-Neto,A., Webb,J.R., Greeson,K., Coler,R.N., Skeiky,Y.A., & Reed,S.G. (2002) Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTII leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect. Immun.*, **70**, 2828-2836.
- [81] Handman,E., Symons,F.M., Baldwin,T.M., Curtis,J.M., & Scheerlinck,J.P. (1995) Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect. Immun.*, **63**, 4261-4267.
- [82] Sjolander,A., Baldwin,T.M., Curtis,J.M., & Handman,E. (1998) Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *J. Immunol.*, **160**, 3949-3957.
- [83] Webb,J.R., Campos-Neto,A., Ovendale,P.J., Martin,T.I., Stromberg,E.J., Badaro,R., & Reed,S.G. (1998) Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect. Immun.*, **66**, 3279-3289.
- [84] Melby,P.C., Yang,J., Zhao,W., Perez,L.E., & Cheng,J. (2001) *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*, **69**, 4719-4725.
- [85] Gonzalez-Aseguinolaza,G., Taladriz,S., Marquet,A., & Larraga,V. (1999) Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur. J. Biochem.*, **259**, 909-916.
- [86] Kelly,B.L., Stetson,D.B., & Locksley,R.M. (2003) *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *J. Exp. Med.*, **198**, 1689-1698.
- [87] Julia,V., Rassoulzadegan,M., & Glaichenhaus,N. (1996) Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science*, **274**, 421-423.
- [88] Launois,P., Maillard,I., Pingel,S., Swihart,K.G., Xenarios,I., Acha-Orbea,H., Diggelmann,H., Locksley,R.M., MacDonald,H.R., & Louis,J.A. (1997) IL-4 rapidly

- produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity.*, **6**, 541-549.
- [89] Stetson,D., Mohrs,M., Mallet-Designe,V., Teyton,L., & Locksley,R. (2002) Rapid expansion and IL-4 expression by *Leishmania*-specific naive helper T cells *in vivo*. *Immunity.*, **17**, 191.
- [90] Julia,V. & Glaichenhaus,N. (1999) CD4(+) T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infect. Immun.*, **67**, 3641-3644.
- [91] Gurunathan,S., Sacks,D.L., Brown,D.R., Reiner,S.L., Charest,H., Glaichenhaus,N., & Seder,R.A. (1997) Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, **186**, 1137-1147.
- [92] Gonzalo,R.M., del Real,G., Rodriguez,J.R., Rodriguez,D., Heljasvaara,R., Lucas,P., Larraga,V., & Esteban,M. (2002) A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **20**, 1226-1231.
- [93] Banchereau,J. & Steinman,R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**, 245-252.
- [94] Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., & Palucka,K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 767-811.
- [95] Hart,D.N. (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, **90**, 3245-3287.
- [96] Brandonisio,O., Spinelli,R., & Pepe,M. (2004) Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes. Infect.*, **6**, 1402-1409.
- [97] Nouri-Shirazi,M., Banchereau,J., Fay,J., & Palucka,K. (2000) Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol. Lett.*, **74**, 5-10.
- [98] Figdor,C.G., de Vries,I.J., Lesterhuis,W.J., & Melief,C.J. (2004) Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.*, **10**, 475-480.
- [99] Flohe,S.B., Bauer,C., Flohe,S., & Moll,H. (1998) Antigen-pulsed epidermal langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 3800-3811.
- [100] Berberich,C., Ramirez-Pineda,J.R., Hambrecht,C., Alber,G., Skeiky,Y.A., & Moll,H. (2003) Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J. Immunol.*, **170**, 3171-3179.
- [101] Rhee,E.G., Mendez,S., Shah,J.A., Wu,C.Y., Kirman,J.R., Turon,T.N., Davey,D.F., Davis,H., Klinman,D.M., Coler,R.N., Sacks,D.L., & Seder,R.A. (2002) Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG

- oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J. Exp. Med.*, **195**, 1565-1573.
- [102] Mendez,S., Tabbara,K., Belkaid,Y., Bertholet,S., Verthelyi,D., Klinman,D., Seder,R.A., & Sacks,D.L. (2003) Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous leishmaniasis but maintains its potency and durability. *Infect. Immun.*, **71**, 5121-5129.
- [103] Brodskyn,C., de Oliveira,C.I., Barral,A., & Barral-Netto,M. (2003) Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert. Rev. Vaccines.*, **2**, 705-717.
- [104] Frankel,A.D. & Pabo,C.O. (1988) Cellular uptake of the TAT protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, **55**, 1189-1193.
- [105] Green,M. & Loewenstein,P.M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus TAT trans-activator protein. *Cell*, **55**, 1179-1188.
- [106] Sodroski,J., Rosen,C., Wong-Staal,F., Salahuddin,S.Z., Popovic,M., Arya,S., Gallo,R.C., & Haseltine,W.A. (1985) Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science*, **227**, 171-173.
- [107] Dayton,A.I., Sodroski,J.G., Rosen,C.A., Goh,W.C., & Haseltine,W.A. (1986) The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell*, **44**, 941-947.
- [108] Fisher,A.G., Feinberg,M.B., Josephs,S.F., Harper,M.E., Marselle,L.M., Reyes,G., Gonda,M.A., Aldovini,A., Debouk,C., Gallo,R.C., & . (1986) The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature*, **320**, 367-371.
- [109] Schwarze,S.R., Hruska,K.A., & Dowdy,S.F. (2000) Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol.*, **10**, 290-295.
- [110] Schwarze,S.R., Ho,A., Vocero-Akbani,A., & Dowdy,S.F. (1999) *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, **285**, 1569-1572.
- [111] Pantano,S., Tyagi,M., Giacca,M., & Carloni,P. (2002) Amino acid modification in the HIV-1 Tat basic domain: insights from molecular dynamics and *in vivo* functional studies. *J. Mol. Biol.*, **318**, 1331-1339.
- [112] Wadia,J.S., Stan,R.V., & Dowdy,S.F. (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.*, **10**, 310-315.
- [113] Nagahara,H., Vocero-Akbani,A.M., Snyder,E.L., Ho,A., Latham,D.G., Lissy,N.A., Becker-Hapak,M., Ezhevsky,S.A., & Dowdy,S.F. (1998) Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.*, **4**, 1449-1452.

- [114] Vocero-Akbani,A., Lissy,N.A., & Dowdy,S.F. (2000) Transduction of full-length Tat fusion proteins directly into mammalian cells: analysis of T cell receptor activation-induced cell death. *Methods Enzymol.*, **322**, 508-521.
- [115] Kwon,H.Y., Eum,W.S., Jang,H.W., Kang,J.H., Ryu,J., Ryong,L.B., Jin,L.H., Park,J., & Choi,S.Y. (2000) Transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells. *FEBS Lett.*, **485**, 163-167.
- [116] Vocero-Akbani,A., Chellaiah,M.A., Hruska,K.A., & Dowdy,S.F. (2001) Protein transduction: delivery of Tat-GTPase fusion proteins into mammalian cells. *Methods Enzymol.*, **332**, 36-49.
- [117] Jin,L.H., Bahn,J.H., Eum,W.S., Kwon,H.Y., Jang,S.H., Han,K.H., Kang,T.C., Won,M.H., Kang,J.H., Cho,S.W., Park,J., & Choi,S.Y. (2001) Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1509-1519.
- [118] Yoon,H.Y., Lee,S.H., Cho,S.W., Lee,J.E., Yoon,C.S., Park,J., Kim,T.U., & Choi,S.Y. (2002) TAT-mediated delivery of human glutamate dehydrogenase into PC12 cells. *Neurochem. Int.*, **41**, 37-42.
- [119] Cao,G., Pei,W., Ge,H., Liang,Q., Luo,Y., Sharp,F.R., Lu,A., Ran,R., Graham,S.H., & Chen,J. (2002) *In vivo* delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.*, **22**, 5423-5431.
- [120] Harada,H., Hiraoka,M., & Kizaka-Kondoh,S. (2002) Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res.*, **62**, 2013-2018.
- [121] Shibagaki,N. & Udey,M.C. (2002) Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J. Immunol.*, **168**, 2393-2401.
- [122] Shibagaki,N. & Udey,M.C. (2003) Dendritic cells transduced with TAT protein transduction domain-containing tyrosinase-related protein 2 vaccinate against murine melanoma. *Eur. J. Immunol.*, **33**, 850-860.
- [123] Wang,H.Y., Fu,T., Wang,G., Zeng,G., Perry-Lalley,D.M., Yang,J.C., Restifo,N.P., Hwu,P., & Wang,R.F. (2002) Induction of CD4(+) T cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J. Clin. Invest.*, **109**, 1463-1470.
- [124] Blank,C., Fuchs,H., Rappersberger,K., Rollinghoff,M., & Moll,H. (1993) Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.*, **167**, 418-425.
- [125] Moll,H., Fuchs,H., Blank,C., & Rollinghoff,M. (1993) Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 1595-1601.

- [126] Krieg,A.M., Yi,A.K., Matson,S., Waldschmidt,T.J., Bishop,G.A., Teasdale,R., Koretzky,G.A., & Klinman,D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 546-549.
- [127] Wagner,H. (2001) Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity*, **14**, 499-502.
- [128] Himmelrich,H., Launois,P., Maillard,I., Biedermann,T., Tacchini-Cottier,F., Locksley,R.M., Rocken,M., & Louis,J.A. (2000) In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J. Immunol.*, **164**, 4819-4825.
- [129] Heinzl,F.P., Schoenhaut,D.S., Rerko,R.M., Rosser,L.E., & Gately,M.K. (1993) Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, **177**, 1505-1509.
- [130] Sypek,J.P., Chung,C.L., Mayor,S.E., Subramanyam,J.M., Goldman,S.J., Sieburth,D.S., Wolf,S.F., & Schaub,R.G. (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.*, **177**, 1797-1802.
- [131] Konecny,P., Stagg,A.J., Jebbari,H., English,N., Davidson,R.N., & Knight,S.C. (1999) Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 1803-1811.
- [132] Singh,M. & O'Hagan,D. (1999) Advances in vaccine adjuvants. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 1075-1081.
- [133] Ahuja,S.S., Reddick,R.L., Sato,N., Montalbo,E., Kostecki,V., Zhao,W., Dolan,M.J., Melby,P.C., & Ahuja,S.K. (1999) Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J. Immunol.*, **163**, 3890-3897.
- [134] Howard,J.G., Hale,C., & Chan-Liew,W.L. (1980) Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol.*, **2**, 303-314.
- [135] Baldwin,T., Henri,S., Curtis,J., O'Keeffe,M., Vremec,D., Shortman,K., & Handman,E. (2004) Dendritic cell populations in *Leishmania major*-infected skin and draining lymph nodes. *Infect. Immun.*, **72**, 1991-2001.
- [136] Muraille,E., De Trez,C., Pajak,B., Torrentera,F.A., De Baetselier,P., Leo,O., & Carlier,Y. (2003) Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. *Infect. Immun.*, **71**, 2704-2715.
- [137] Rosas,L.E., Keiser,T., Barbi,J., Satoskar,A.A., Septer,A., Kaczmarek,J., Lezama-Davila,C.M., & Satoskar,A.R. (2005) Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol.*, **17**, 1347-1357.

- [138] Rogge,L., Barberis-Maino,L., Biffi,M., Passini,N., Presky,D.H., Gubler,U., & Sinigaglia,F. (1997) Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.*, **185**, 825-831.
- [139] Himmelrich,H., Parra-Lopez,C., Tacchini-Cottier,F., Louis,J.A., & Launois,P. (1998) The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor beta 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. *J. Immunol.*, **161**, 6156-6163.
- [140] Janeway,C.A. & Travers,P. (1997) *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- [141] Brown,J.A., Titus,R.G., Nabavi,N., & Glimcher,L.H. (1996) Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response. *J. Infect. Dis.*, **174**, 1303-1308.
- [142] Brown,J.A., Greenwald,R.J., Scott,S., Schweitzer,A.N., Satoskar,A.R., Chung,C., Schopf,L.R., van der,W.D., Sypek,J.P., & Sharpe,A.H. (2002) T helper differentiation in resistant and susceptible B7-deficient mice infected with *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.*, **32**, 1764-1772.
- [143] Murphy,M.L., Engwerda,C.R., Gorak,P.M., & Kaye,P.M. (1997) B7-2 blockade enhances T cell responses to *Leishmania donovani*. *J. Immunol.*, **159**, 4460-4466.
- [144] De Trez,C., Brait,M., Leo,O., Aebischer,T., Torrentera,F.A., Carlier,Y., & Muraille,E. (2004) Myd88-dependent *in vivo* maturation of splenic dendritic cells induced by *Leishmania donovani* and other *Leishmania species*. *Infect. Immun.*, **72**, 824-832.
- [145] Nickol,A.D. & Bonventre,P.F. (1985) Visceral leishmaniasis in congenic mice of susceptible and resistant phenotypes: T-lymphocyte-mediated immunosuppression. *Infect. Immun.*, **50**, 169-174.
- [146] Nigg,A.P. Genetische Unterschiede in der Expression von Th1-/Th2-Zytokinen durch dendritische Zellen im Modell der murinen kutanen Leishmaniose. 2004. Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [147] Hochrein,H., O'Keeffe,M., Luft,T., Vandenabeele,S., Grumont,R.J., Maraskovsky,E., & Shortman,K. (2000) Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **192**, 823-833.
- [148] Vesentini,S., Soncini,M., Zaupa,A., Silvestri,V., Fiore,G.B., & Redaelli,A. (2006) Multi-scale analysis of the toraymyxin adsorption cartridge. Part I: molecular interaction of polymyxin B with endotoxins. *Int J. Artif. Organs*, **29**, 239-250.
- [149] Tanaka,Y., Dowdy,S.F., Linehan,D.C., Eberlein,T.J., & Goedegebuure,P.S. (2003) Induction of antigen-specific CTL by recombinant HIV trans-activating fusion protein-pulsed human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, **170**, 1291-1298.
- [150] Cella,M., Sallusto,F., & Lanzavecchia,A. (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 10-16.

- [151] O'Sullivan,B. & Thomas,R. (2003) CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev. Immunol.*, **23**, 83-107.
- [152] Campbell,K.A., Owendale,P.J., Kennedy,M.K., Fanslow,W.C., Reed,S.G., & Maliszewski,C.R. (1996) CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity.*, **4**, 283-289.
- [153] Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van Huffel,C., Du,X., Birdwell,D., Alejos,E., Silva,M., Galanos,C., Freudenberg,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Layton,B., & Beutler,B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, **282**, 2085-2088.
- [154] Hoshino,K., Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Ogawa,T., Takeda,Y., Takeda,K., & Akira,S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.*, **162**, 3749-3752.
- [155] Scott,P., Artis,D., Uzonna,J., & Zaph,C. (2004) The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol. Rev.*, **201**, 318-338.
- [156] Ghosh,M., Pal,C., Ray,M., Maitra,S., Mandal,L., & Bandyopadhyay,S. (2003) Dendritic cell-based immunotherapy combined with antimony-based chemotherapy cures established murine visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, **170**, 5625-5629.
- [157] Ramirez-Pineda,J.R., Frohlich,A., Berberich,C., & Moll,H. (2004) Dendritic cells (DC) activated by CpG DNA *ex vivo* are potent inducers of host resistance to an intracellular pathogen that is independent of IL-12 derived from the immunizing DC. *J. Immunol.*, **172**, 6281-6289.
- [158] Ramiro,M.J., Zarate,J.J., Hanke,T., Rodriguez,D., Rodriguez,J.R., Esteban,M., Lucientes,J., Castillo,J.A., & Larraga,V. (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, **21**, 2474-2484.
- [159] Ahmed,S.B., Bahloul,C., Robbana,C., Askri,S., & Dellagi,K. (2004) A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine*, **22**, 1631-1639.
- [160] Marques-da-Silva,E.A., Coelho,E.A., Gomes,D.C., Vilela,M.C., Masioli,C.Z., Tavares,C.A., Fernandes,A.P., Afonso,L.C., & Rezende,S.A. (2005) Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitol. Res.*, **98**, 67-74.
- [161] Perez-Jimenez,E., Kochan,G., Gherardi,M.M., & Esteban,M. (2006) MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes. Infect.*, **8**, 810-822.
- [162] Gurunathan,S., Stobie,L., Prussin,C., Sacks,D.L., Glaichenhaus,N., Iwasaki,A., Fowell,D.J., Locksley,R.M., Chang,J.T., Wu,C.Y., & Seder,R.A. (2000) Requirements

- for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J. Immunol.*, **165**, 915-924.
- [163] Pinto,E.F., Pinheiro,R.O., Rayol,A., Larraga,V., & Rossi-Bergmann,B. (2004) Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infect. Immun.*, **72**, 4521-4527.
- [164] Zimmermann,S., Egeter,O., Hausmann,S., Lipford,G.B., Rocken,M., Wagner,H., & Heeg,K. (1998) CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol.*, **160**, 3627-3630.
- [165] Walker,P.S., Schariton-Kersten,T., Krieg,A.M., Love-Homan,L., Rowton,E.D., Udey,M.C., & Vogel,J.C. (1999) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 6970-6975.
- [166] Jakob,T., Walker,P.S., Krieg,A.M., Udey,M.C., & Vogel,J.C. (1998) Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.*, **161**, 3042-3049.
- [167] Joussemet,B., Vu,A.T., Sai,P., & Bach,J.M. (2005) Gene-gun biolistic immunization encoding glutamic acid decarboxylase: a model for studying Langerhans cell abnormalities and mimicry in the nonobese diabetic mouse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1051**, 613-625.
- [168] Morris,L., Troutt,A.B., Handman,E., & Kelso,A. (1992) Changes in the precursor frequencies of IL-4 and IFN-gamma secreting CD4+ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*, **149**, 2715-2721.
- [169] Scott,P., Eaton,A., Gause,W.C., di,Z., X, & Hondowicz,B. (1996) Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*. *Exp. Parasitol.*, **84**, 178-187.
- [170] Campos-Neto,A. (2005) What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **38**, 979-984.
- [171] Schariton-Kersten,T., Afonso,L.C., Wysocka,M., Trinchieri,G., & Scott,P. (1995) IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.*, **154**, 5320-5330.
- [172] Mattner,F., Magram,J., Ferrante,J., Launois,P., Di Padova,K., Behin,R., Gately,M.K., Louis,J.A., & Alber,G. (1996) Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur. J. Immunol.*, **26**, 1553-1559.
- [173] Gorak,P.M., Engwerda,C.R., & Kaye,P.M. (1998) Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 687-695.
- [174] Maldonado-Lopez,R., De Smedt,T., Michel,P., Godfroid,J., Pajak,B., Heirman,C., Thielemans,K., Leo,O., Urbain,J., & Moser,M. (1999) CD8alpha+ and CD8alpha-

- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **189**, 587-592.
- [175] Gillessen,S., Carvajal,D., Ling,P., Podlaski,F.J., Stremlo,D.L., Familletti,P.C., Gubler,U., Presky,D.H., Stern,A.S., & Gately,M.K. (1995) Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 200-206.
- [176] Yoshimoto,T., Wang,C.R., Yoneto,T., Waki,S., Sunaga,S., Komagata,Y., Mitsuyama,M., Miyazaki,J., & Nariuchi,H. (1998) Reduced T helper 1 responses in IL-12 p40 transgenic mice. *J. Immunol.*, **160**, 588-594.
- [177] Dudda,J.C., Simon,J.C., & Martin,S. (2004) Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J. Immunol.*, **172**, 857-863.
- [178] Moll,H. & Berberich,C. (2001) Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunobiology*, **204**, 659-666.
- [179] Albert,M.L., Sauter,B., & Bhardwaj,N. (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, **392**, 86-89.
- [180] Albert,M.L., Pearce,S.F., Francisco,L.M., Sauter,B., Roy,P., Silverstein,R.L., & Bhardwaj,N. (1998) Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **188**, 1359-1368.
- [181] Kurts,C., Miller,J.F., Subramaniam,R.M., Carbone,F.R., & Heath,W.R. (1998) Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.*, **188**, 409-414.
- [182] Pooley,J.L., Heath,W.R., & Shortman,K. (2001) Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol.*, **166**, 5327-5330.
- [183] Mendez,S., Belkaid,Y., Seder,R.A., & Sacks,D. (2002) Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **20**, 3702-3708.
- [184] Ingulli,E., Mondino,A., Khoruts,A., & Jenkins,M.K. (1997) *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.*, **185**, 2133-2141.
- [185] Heath,W.R., Belz,G.T., Behrens,G.M., Smith,C.M., Forehan,S.P., Parish,I.A., Davey,G.M., Wilson,N.S., Carbone,F.R., & Villadangos,J.A. (2004) Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.*, **199**, 9-26.
- [186] Hernandez,M.X., Barcante,T.A., Vilela,L., Tafuri,W.L., Afonso,L.C., & Vieira,L.Q. (2006) Vaccine-induced protection against *Leishmania amazonensis* is obtained in the absence of IL-12/23p40. *Immunol. Lett.*, **105**, 38-47.

- [187] Aebischer,T., Wolfram,M., Patzer,S.I., Ilg,T., Wiese,M., & Overath,P. (2000) Subunit vaccination of mice against new world cutaneous leishmaniasis: comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. *Infect. Immun.*, **68**, 1328-1336.
- [188] Kostka,S.L., Knop,J., Konur,A., Udey,M.C., & von Stebut,E. (2006) Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania major* infections. *J. Invest Dermatol.*, **126**, 1582-1589.
- [189] Zahn,S., Wirtz,S., Birkenbach,M., Blumberg,R.S., Neurath,M.F., & von Stebut,E. (2005) Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.*
- [190] Wilde,D.B., Marrack,P., Kappler,J., Dialynas,D.P., & Fitch,F.W. (1983) Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigen reactivity; monoclonal antibody GK1.5 (anti-L3T4a) blocks class II MHC antigen-specific proliferation, release of lymphokines, and binding by cloned murine helper T lymphocyte lines. *J. Immunol.*, **131**, 2178-2183.
- [191] Wofsy,D. & Seaman,W.E. (1986) Analysis of the function of L3T4+ T cells by in vivo treatment with monoclonal antibody to L3T4. *Immunol. Res.*, **5**, 97-105.
- [192] Sarmiento,M., Glasebrook,A.L., & Fitch,F.W. (1980) IgG or IgM monoclonal antibodies reactive with different determinants on the molecular complex bearing Lyt 2 antigen block T cell-mediated cytolysis in the absence of complement. *J. Immunol.*, **125**, 2665-2672.
- [193] Sriram,S. & Carroll,L. (1988) *In vivo* depletion of Lyt-2 cells fails to alter acute and relapsing EAE. *J. Neuroimmunol.*, **17**, 147-157.
- [194] Silva,E.M., Bertho,A.L., & Mendonca,S.C. (1994) Effect of *in vivo* depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.*, **56**, 111-120.
- [195] Afonso,L.C. & Scott,P. (1993) Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.*, **61**, 2952-2959.
- [196] Shah,J.A., Darrah,P.A., Ambrozak,D.R., Turon,T.N., Mendez,S., Kirman,J., Wu,C.Y., Glaichenhaus,N., & Seder,R.A. (2003) Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.*, **198**, 281-291.
- [197] Wakil,A.E., Wang,Z.E., & Locksley,R.M. (1996) *Leishmania major*: targeting IL-4 in successful immunomodulation of murine infection. *Exp. Parasitol.*, **84**, 214-222.
- [198] Lima,H.C., Bleyenbergh,J.A., & Titus,R.G. (1997) A simple method for quantifying leishmania in tissues of infected animals. *Parasitology Today*, **13**, 80-82.
- [199] Herzenberg,L.A. & De Rosa,S.C. (2000) Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol. Today*, **21**, 383-390.
- [200] Becker-Hapak,M., McAllister,S.S., & Dowdy,S.F. (2001) TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods*, **24**, 247-256.

-
- [201] Lottspeich,F. & Zorbas,H. (1998) *Bioanalytik*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- [202] Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- [203] Sedmak,J.J. & Grossberg,S.E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.*, **79**, 544-552.
- [204] Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goetze,N.M., Olson,B.J., & Klenk,D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- [205] Inaba,K., Inaba,M., Romani,N., Aya,H., Deguchi,M., Ikehara,S., Muramatsu,S., & 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.
- [206] Lyons,A.B. & Parish,C.R. (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **171**, 131-137.
- [207] Dialynas,D.P., Wilde,D.B., Marrack,P., Pierres,A., Wall,K.A., Havran,W., Otten,G., Loken,M.R., Pierres,M., Kappler,J., & . (1983) Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. *Immunol. Rev.*, **74**, 29-56.