

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE

Leitung: Prof. Dr. Daniela Männel

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Charakterisierung der neutrophilen Granulozyten von  
suszeptiblen BALB/c- und resistenten C57BL/6-Mäusen  
im experimentellen Modell der Leishmaniasis**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sebastian Singer

2011



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE

Leitung: Prof. Dr. Daniela Männel

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Charakterisierung der neutrophilen Granulozyten von  
suszeptiblen BALB/c- und resistenten C57BL/6-Mäusen  
im experimentellen Modell der Leishmaniasis**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sebastian Singer

2011

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: PD Dr. Uwe Ritter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Hohenleutner

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2011

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACK-Puffer	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Puffer
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BSA	bovines Serumalbumin
c	Kopien (copies)
CD	cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CL	kutane Leishmaniasis (cutaneous leishmaniasis)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	cycle threshold
CR	Komplementrezeptor (complement receptor)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle (dendritic cell)
DCL	diffuse kutane Leishmaniasis (diffuse cutaneous leishmaniasis)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
<i>et al.</i>	und andere (lat.: et alii)
FACS	Durchfluszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Gramm
h	Stunde (hora)
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
H <sub>2</sub> O	Wasser
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin

iNOS	induzierbare NO-Synthase
int	intermediär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
l	Liter
LC	Langerhans Zelle (Langerhans cell)
LK	Lymphknoten
LPG	Lipophosphoglykan
m	Meter
m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
MACS	magnetic cell separation
MCL	mukokutane Leishmaniasis (mucocutaneous leishmaniasis)
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
mDC	myeloide dendritische Zelle (myeloid dendritic cell)
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NE	neutrophile Elastase
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
p	Piko ( $10^{-12}$ )
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMN	polymorphkernige Leukozyten (polymorphonuclear leukocytes)
PSG	promastigote secretory gel
RKI	Robert Koch-Institut

ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RT – PCR	real time – polymerase chain reaction
S.	Seite
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
TGF	transforming growth factor
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Einheiten (units)
UV	ultraviolett
V.	<i>Viannia</i>
VL	viszerale Leishmaniasis (visceral leishmaniasis)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )

# **Inhaltsverzeichnis**

## **1. Einleitung**

1.1.	Taxonomie und Lebenszyklus der Leishmanien.....	S. 1
1.2.	Die Rolle der Leishmanien als Humanpathogen .....	S. 2
1.2.1.	Formen und Klinik der Leishmaniasis.....	S. 2
1.2.2.	Epidemiologie und Vorkommen.....	S. 4
1.2.3.	Diagnostik und Therapie.....	S. 5
1.3.	Grundlagen der Immunantwort gegen die Leishmaniasis.....	S. 7
1.3.1.	Initiale Abwehrleistungen gegen den Parasiten <i>L. major</i> .....	S. 7
1.3.2.	Die Rolle der Neutrophilen.....	S. 8
1.4.	Bedeutung der Mausstämme BALB/c und C57BL/6 für die experimentelle Leishmaniasis.....	S. 11
1.5.	Zielsetzung der Arbeit .....	S. 13

## **2. Material**

2.1.	Labogeräte.....	S. 15
2.2.	Glas- und Plastikwaren.....	S. 15
2.3.	Mausstämme.....	S. 16
2.4.	Leishmanienstamm.....	S. 16
2.5.	Kulturmedien und Zusätze.....	S. 16
2.6.	Antikörper und Farbstoffe.....	S. 17
2.7.	Chemikalien und Biochemikalien.....	S. 17
2.8.	Puffer und Lösungen.....	S. 18
2.9.	Sonstiges.....	S. 18

## **3. Methoden**

3.1.	Präparation der Leishmanien und Infektion der Mäuse.....	S. 19
3.2.	Zellgewinnung aus Gewebe und Peritoneum.....	S. 19
3.3.	Aufreinigung Ly-6G <sup>+</sup> Zellen mittels MACS.....	S. 20
3.4.	Kultivierung und <i>in vitro</i> – Infektion peritonealer Zellen.....	S. 20
3.5.	Histologie.....	S. 21
3.6.	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	S. 21

3.7. Präparation genomischer DNS.....	S. 23
3.8. Real Time – PCR.....	S. 23

## 4. Ergebnisse

4.1. Etablierung themenrelevanter Methoden.....	S. 26
4.1.1. Peritoneallavage nach Gabe von Thioglycollat-Medium.....	S. 26
4.1.2. Aufreinigung Ly-6G positiver Zellen.....	S. 30
4.1.3. DAPI-Färbung zum Nachweis intrazellulärer Parasiten .....	S. 33
4.1.4. Real Time – PCR.....	S. 34
4.2. <i>In vitro</i> – Experimente .....	S. 37
4.2.1. Histologie.....	S. 37
4.2.2. Infektionskinetik und Apoptoseverhalten <i>in vitro</i> – infizierter Granulozyten.....	S. 43
4.3. <i>In vivo</i> – Experimente.....	S. 51
4.3.1. Zellcharakterisierung des dermalen Infiltrates und des drainierenden, poplitealen Lymphknotens im zeitlichen Verlauf.....	S. 51
4.3.2. Quantifizierung der Leishmanienlast in Milz, poplitealem Lymphknoten und Fuß mittels Real Time – PCR.....	S. 59

5. Diskussion.....	S. 65
--------------------	-------

6. Zusammenfassung.....	S. 75
-------------------------	-------

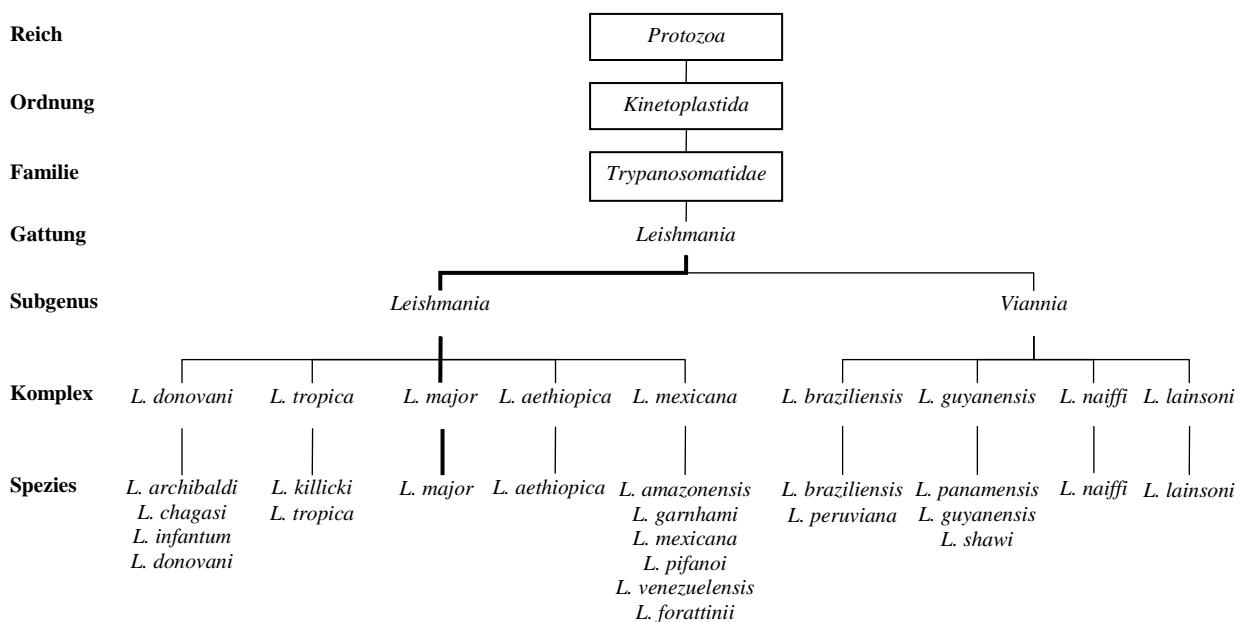
## 7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis.....	S. 77
7.2. Danksagung .....	S. 92
7.3. Erklärung.....	S. 93

# 1. Einleitung

## 1.1. Taxonomie und Lebenszyklus der Leishmanien

Leishmanien sind obligat intrazellulär lebende Parasiten und Erreger der Leishmaniasis. Die Gattung *Leishmania* gehört zur Familie der *Trypanosomatidae* (Ordnung der *Kinetoplastida*, Klasse der *Zoomastigophora*). Innerhalb der Gattung lassen sich, wie in Abbildung 1 dargestellt, verschiedene Arten und Subspecies unterscheiden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Spezies *Leishmania*, Subspezies *Leishmania major* (*L. major*), und hierin mit dem Stamm aus dem Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg (MHOM/IL/81/FE/BNI).



**Abb. 1:** Überblick über die Taxonomie von Leishmanien (modifiziert nach Bañuls *et al.*, 2007)

Bei Leishmanien handelt es sich um Parasiten, die im Laufe ihres Lebenszyklus den Wirt wechseln und hierbei zwischen einer promastigoten Form, die sie im Vektor-Tier annehmen, und einer amastigoten Form im Wirts-Tier variieren. Promastigote Leishmanien sind etwa 10 bis 20  $\mu\text{m}$  lang, 3  $\mu\text{m}$  breit und besitzen ein langes Flagellum, welches neben der Fortbewegung auch der Anheftung an das Darmepithel des Vektors dient (El Sawaf *et al.*, 2008, Killick-Kendrick *et al.*, 1974). Die Amastigoten sind ovoid geformt, etwa 3 – 7  $\mu\text{m}$  im Durchmesser groß und unbeweglich, da ihr kurzes Flagellum nahezu vollständig in der Flagellentasche versteckt bleibt (Wiese *et al.*, 2003). Der unterschiedliche pH-Wert und die Tempera-

terdifferenz von Wirt und Vektor sind für die Ausprägung der Morphologie mitverantwortlich (Zilberman *et al.*, 1994).

Weibliche Sandmücken der Spezies *Phlebotomus* in der Alten Welt und *Lutzomyia* sowie *Psychodopygus* in der Neuen Welt fungieren als Vektoren. Die bei einer Blutmahlzeit aufgenommenen Leishmanien reifen im Darm der Mücke zu prozyklischen Promastigoten heran und werden dabei durch eine peritrophe Matrix vor hydrolytischen Verdauungsenzymen geschützt (Pimenta *et al.*, 1997). Nach Lyse dieser Schutzschicht durch eine parasitäre Chitinase (Schlein *et al.*, 1991) binden die Promastigoten mit Hilfe von Lipophosphoglykan (LPG), welches der Hauptbestandteil ihrer Glykokalix ist, an das Darmepithel der Sandmücke, um dort weiter zu reifen und zu proliferieren (Beverley *et al.*, 1998). Durch die Produktion von PSG (promastigote secretory gel), einer viskosen Substanz, die den Darmtrakt der Mücke wie ein Pflropfen verengt, kommt es bei einer erneuten Blutmahlzeit des Vektors zur Regurgitation von infektiösen, metazyklischen Promastigoten und damit letztlich zu deren Übertragung auf das Wirtstier (Bates *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um Säugetiere, insbesondere um Hunde und Nagetiere. Aber auch der Mensch kann im Rahmen einer Zoonose mit dem Parasiten infiziert werden. Im Wirtstier erreichen die Leishmanien die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems, aber auch dendritische Zellen, Neutrophile und Fibroblasten (Laskay *et al.*, 2003, Bogdan *et al.*, 2000). Hierin wandeln sie sich innerhalb so genannter parasitophorer Vakuolen in die amastigote, obligat intrazelluläre Form um und können proliferieren (Antoine *et al.*, 1998). Durch das Platzen infizierter Makrophagen erreichen die Leishmanien das extrazelluläre Kompartiment und können weitere Zellen infizieren. Wird der Wirt erneut von einer Sandmücke gestochen, gelangen die Amastigoten in deren Darmtrakt und vervollständigen damit den Zyklus.

## 1.2. Die Rolle der Leishmanien als Humanpathogen

### 1.2.1. Formen und Klinik der Leishmaniasis

Abhängig von der Leishmanienspezies und der Immunitätslage des Wirts resultieren verschiedene Verlaufsformen der Erkrankung. Unterschieden werden die kutane (CL), muko-kutane (MCL) und viszerale Leishmaniasis (VL).

Bei etwa 90 % der Infektionen kommt es zu einer CL, die in den meisten Fällen unkompliziert verläuft (von Stebut, 2007). Erreger sind hierbei *L. major* und *L. tropica* in der Alten Welt sowie *L. mexicana* und *L. braziliensis* in der Neuen Welt. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 6 Wochen entsteht an der Einstichstelle eine rötliche Papel, die sich im weiteren Verlauf

zu einem flachen, schmerzlosen Ulkus mit erhabenem Randwall entwickelt, um in der Regel nach eineinhalb bis zwei Jahren spontan unter Narbenbildung abzuheilen (Niedrig *et al.*, 2006, von Stebut *et al.*, 2007). Verschiedene Studien haben allerdings gezeigt, dass ein kleiner Teil der Erreger lebenslang im Organismus persistiert (Mendonca *et al.*, 2004, Bogdan *et al.*, 2000, Schubach *et al.*, 1998, Bogdan *et al.*, 1996). Die Läsionen können einzeln oder multipel auftreten. Einer initialen schmerzlosen Schwellung an der Einstichstelle verdankt die Erkrankung ihre Bezeichnung als Orient-, Bagdad- oder auch Aleppobeule.

Bei Anergie des Patienten gegenüber parasitären Antigenen kann sich bei einer Infektion mit *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* sowie *L. aethiopica* eine diffuse CL (DCL) entwickeln, bei der es zu einem disseminierten Befall des Integuments mit multiplen, nicht ulzerierenden Knoten, ähnlich einer lepromatösen Lepra, kommt (Singh, 2006, von Stebut *et al.*, 2007).

Monate bis Jahre nach einer CL können sich im Rahmen einer Reaktivierung der Leishmaniasis die Parasiten auf die Schleimhäute ausbreiten und eine MCL hervorrufen. Risikofaktoren sind dabei das Vorliegen von Effloreszenzen oberhalb des Beckenringes, von großen Ulzerationen sowie eine fehlende oder mangelhafte Therapie der CL (Lessa *et al.*, 2007). Auch eine DCL geht häufiger mit einer MCL einher als eine CL (Carvalho, 1994). Betroffen sind vorwiegend die Nasen- und Mundschleimhaut, aber auch Lippen, Larynx und Pharynx, woraus eine Destruktion von Nasenseptum, hartem und weichem Gaumen, Kehlkopf und Trachea resultieren kann (Amato *et al.*, 2007, Marsden, 1986). Diese so genannte Espundia wird durch *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* oder *L. amazonensis* hervorgerufen.

Die schwerste Form der Leishmaniasis, die mit einer Infektion der inneren Organe einhergeht, ist die VL, auch Kala Azar genannt und wird durch *L. donovani*, *L. infantum* oder auch *L. chagasi* verursacht. Nach einer Inkubationszeit von drei Monaten treten die ersten Symptome wie nächtliches Fieber, Tachykardie, Diarröh, Abdominalschmerzen und Husten auf. Ferner kommt es zu Hepatosplenomegalie, polyklonaler Hypergammaglobulinämie, persistierender Anämie, Panzytopenie sowie Hypoalbuminämie. Im Zuge einer Immunkomplex- und interstitiellen Glomerulonephritis können schwere Nierenschädigungen entstehen. Relativ spät führt die Erkrankung zu Kachexie und einer Hyperpigmentation der Haut, woraus sich auch die Bezeichnung Schwarzes Fieber (Kala Azar) ableitet (Awasti *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 2006). Unbehandelt endet die VL meist tödlich. Bei 5 – 10 % der behandelten Patienten entwickelt sich nach mehreren Jahren eine ungefährliche Post-kala-azar CL, die sich unterschiedlich manifestieren kann (Ramesh *et al.*, 2007): Es werden bei einigen Patienten erythematöse Läsionen im Gesichtsbereich beschrieben, andere zeigen symmetrisch angeordnete,

hypopigmentierte Makulae an den Extremitäten und am Stamm und wieder andere präsentieren ein gemischtes Bild aus Papulae, Nodulae und Plaques (Salotra *et al.*, 2006).

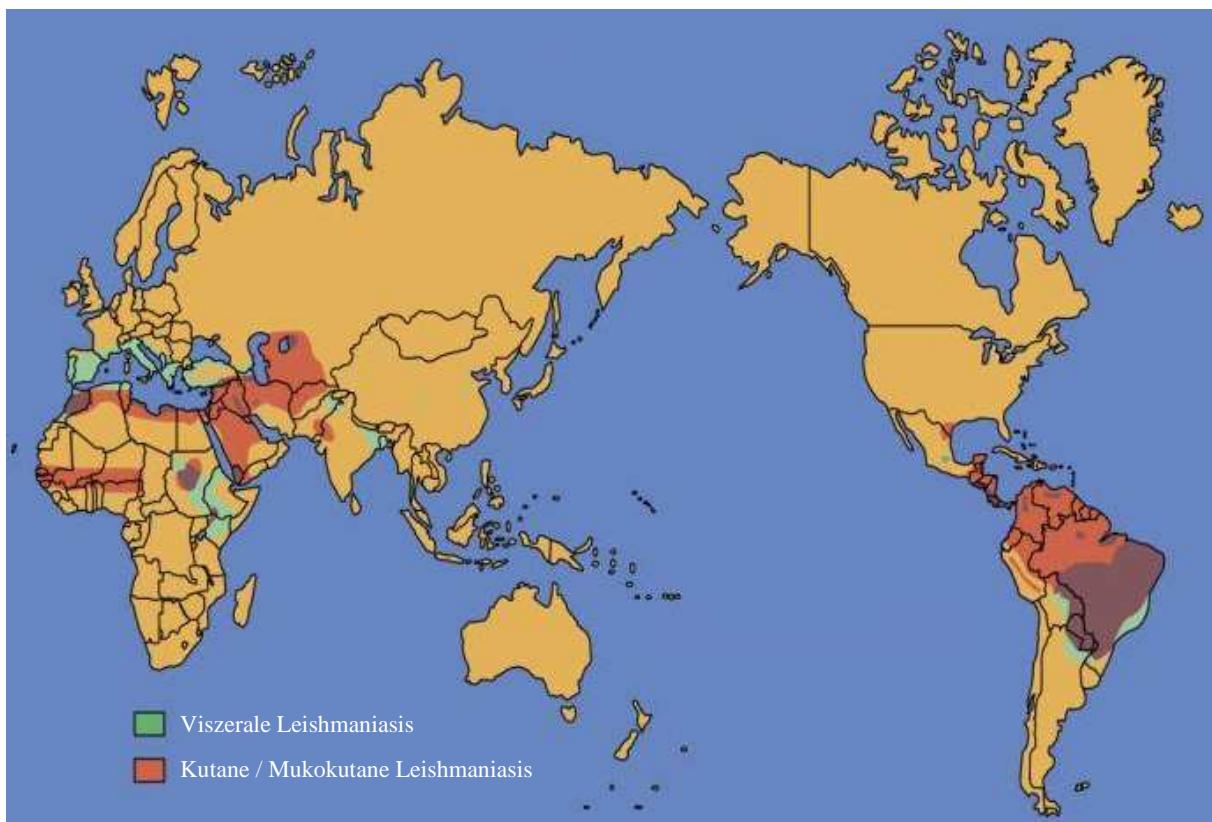
Ein großes Problem stellt die Infektion von Immunsupprimierten dar. Vor allem bei einer Koinfektion mit HIV können selbst harmlosere Leishmanienarten eine VL hervorrufen, das therapeutische Ansprechen verschlechtern und die Rezidivrate erhöhen (WHO, 2007, Farah *et al.*, 1971)

### **1.2.2. Epidemiologie und Vorkommen**

Die WHO zählt die Leishmaniasis mit ihren geschätzten 1,5 – 2 Millionen Neuinfektionen und 60.000 Todesfällen pro Jahr zu den unterschätzten Tropenkrankheiten („neglected tropical diseases“, WHO, 2010). Weltweit sind etwa zwölf Millionen Menschen mit dem Parasiten infiziert und innerhalb der letzten zehn Jahre hat die Inzidenz zugenommen und haben sich die Endemiegebiete rapide ausgebreitet (WHO, 2009). In Deutschland ereigneten sich 2008 laut Robert Koch-Institut 18 dokumentierte Fälle einer Leishmaniasis, darunter 15 Patienten mit einer CL und 3 mit einer VL (RKI, 2009). Schätzungen zufolge muss aber jährlich eher mit 100 bis 200 Erkrankungen in der Bundesrepublik gerechnet werden (RKI, 2003).

Das Auftreten der Erkrankung ist an das Vorhandensein eines Vektors geknüpft. Die nachtaktiven, circa 2 – 3 mm großen Sandmücken, die vorwiegend im tropischen und subtropischen Raum beheimatet sind, halten sich in Bodennähe auf und benötigen zum Überleben Temperaturen von über 10°C. Abbildung 2 zeigt die Gebiete, in denen die viszerale und die kutane/mukokutane Leishmaniasis endemisch vorkommen. Im Zuge der Klimaerwärmung ist jedoch mit einer weiteren Ausbreitung der Endemiegebiete zu rechnen (Stark *et al.*, 2009). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang zum einen die Tatsache, dass mit *Phlebotomus perniciosus* schon ein potenzieller Vektor in Süddeutschland vorhanden ist (Naucke *et al.*, 2008) und zum anderen dass sich in der Bundesrepublik bereits ein Fall einer VL ohne entsprechende Reise- oder Transfusionsanamnese ereignet hat (Bogdan, 2000).

Neben der vektoriellen Übertragung durch die Sandmücken sind bei einigen Leishmania-Stämmen Infektionen auch durch kontaminierte Transfusionen (Dey *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 1996) und Kanülen beim i.v.-Drogenabusus (Cruz *et al.*, 2002), beim Geschlechtsverkehr (Symmers, 1960) sowie kongenital, bei Infektion der Mutter, möglich (Meinecke *et al.*, 1999).



**Abb. 2:** Verbreitung der viszeralen und kutanen/mukokutanen Leishmaniasis (modifiziert nach <http://www.wehi.edu.au/research/divisions/inf/labs/handman/leishmaniasis.html>)

### 1.2.3. Diagnostik und Therapie

Die Leishmaniasis muss von anderen Erkrankungen abgegrenzt werden, die ähnliche Symptome hervorrufen, beziehungsweise ebenfalls im tropisch-subtropischen Raum vorkommen. Differenzialdiagnostisch sind von der kutanen Leishmaniasis unter anderem die Lepra, Hauttuberkulose, atypische Mykobakteriosen, ein Ekthyma und das spinozelluläre Karzinom zu unterscheiden. Von der viszeralen Leishmaniasis sind Malaria, Typhus, Tuberkulose und Schistosomiasis abzugrenzen.

Besonders bewährt hat sich in der Diagnostik der Leishmaniasis der direkte mikroskopische Nachweis von Leishmanien zum Beispiel in Abstrichpräparaten vom Ulkusrand bei der CL, beziehungsweise in Nadelaspiraten aus Lymphknoten, Milz oder Knochenmark bei der VL (Agrawal *et al.*, 2005, Herwaldt, 1999). Der Erreger nachweis ist mit hoher Sensitivität auch über eine Biopsie erreichbar, die ausreichend Material nicht allein für die Mikroskopie, sondern ebenso für eine PCR oder Kultur liefert. Histologische Präparate können darüber hinaus immunhistologisch ausgewertet werden (von Stebut *et al.*, 2007). Da gelegentlich nur sehr wenige Parasiten im Biopsat zu erkennen, beziehungsweise damit leicht zu übersehen sind, stellt ergänzend die PCR ein hochsensitives Verfahren zum Nachweis des Parasiten dar und

ermöglicht zudem eine Speziesbestimmung (Singh, 2006). Diese ist vor dem Hintergrund einer optimalen Pharmakotherapie grundsätzlich anzustreben (von Stebut *et al.*, 2007, Reithinger *et al.*, 2007, Minodier *et al.*, 2007). Mit dem Montenegro-Hauttest steht ein dem Mendel-Mantoux-Test entsprechendes Diagnostikum einer CL zur Verfügung, welches allerdings in Deutschland nicht verfügbar ist (Weigle *et al.*, 1991). Immunologische Verfahren, die dem Nachweis von Leishmanien-spezifischen Antikörpern oder Antigenen dienen, zeichnen sich mittlerweile durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus (Chappuis *et al.*, 2006, Singh, 2006).

Die Entscheidung für oder gegen eine systemische, beziehungsweise lokale Therapie ist abhängig von der Form und Schwere der Leishmaniasis und der verursachenden Spezies. Angeichts der meist raschen Spontanheilung einer CL in der Alten Welt kann hier ein abwartendes Vorgehen gerechtfertigt sein, zumal es dadurch zur Entwicklung einer dauerhaften Immunität kommt (Hepburn, 2003). Bei komplexen Verläufen mit mehr als drei Läsionen, einem Ulkusdurchmesser größer als vier Zentimeter, einer Lokalisation an kosmetisch oder funktionell relevanten Hautpartien wie Gesicht oder Gelenkregionen, dem Vorliegen einer Lymphangitis oder -adenitis, bei refraktärem Verlauf, sowie bei Infektionen durch Leishmanien des Subgenus *Viannia* oder der Art *L. amazonensis* ist eine systemische Therapie indiziert. Andere Formen einer CL können lokal behandelt werden. Grundsätzlich systemisch sollte hingegen die Therapie jeder VL, MCL sowie jeder diffusen Form erfolgen (Boecken *et al.*, 2009, AWMF online, 2006).

Entsprechend den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) von 2006 stellt liposomales Amphotericin B das Mittel der Wahl zur Therapie einer VL dar. Alternativ kann auf Miltefosin oder pentavalentes Antimon ausgewichen werden (AWMF online, 2006). Im Fall einer CL und MCL stehen in Deutschland, abhängig von Erreger und Komplexität der Infektion, topische und systemische Therapeutika zur Verfügung: Lokal finden Paromomycin, 5-wertiges Antimon, Imiquimod sowie die Thermo-, Kryo- und Photodynamische Therapie Anwendung. Systemisch kann mit pentavalenten Antimonaten, Pentamidin, Miltefosin, verschiedenen Azolen, liposomalem Amphotericin B, Allopurinol und Pentoxyfyllinen behandelt werden (Boecken *et al.*, 2009). Ein Problem stellt die zunehmende Resistenz der Erreger gegen Antimon und die mögliche Entwicklung weiterer Resistzenzen dar (Croft *et al.*, 2006).

## 1.3. Grundlagen der Immunantwort gegen die Leishmaniasis

### 1.3.1. Initiale Abwehrleistungen gegen den Parasiten *L. major*

Nach der Inokulation durch den Stich einer Sandmücke wird ein Großteil der Promastigoten durch leishmanizide Bestandteile im humanen Serum, vor allem die Komplementkaskade mit Ausbildung des Membranangriffkomplexes (membrane attack complex), abgetötet (Domínguez *et al.*, 2003, van Zandbergen *et al.*, 2004). Spezielle Strukturen auf der Parasitenoberfläche führen aber gerade auch zu einer verstärkten Opsonierung durch die Komplementfaktoren C3bi, C3b und später IgG und erleichtern dadurch auch die Phagozytose durch ortsständige Makrophagen, die den Komplementrezeptor CR3 (CD11b/CD18) exprimieren (Mosser *et al.*, 1997, Brittingham *et al.*, 1995). Phagozytose ist ein Prozess, bei dem spezialisierte Zellen, so genannte Phagozyten, Pathogene, Zelldebris oder andere korpuskuläre Bestandteile aufnehmen. Derart phagozytierte Partikel finden sich innerhalb von Phagosomen wieder, die mit Lysosomen zu Phagolysosomen fusionieren. Hierin wandeln sich die Leishmanien in den Makrophagen in ihre amastigote Form um und können überleben (Bogdan *et al.*, 1999). Die Makrophagen werden durch die Aufnahme der Leishmanien aktiviert und setzen chemotaktische Faktoren wie MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) frei, die weitere Makrophagen anlocken und diese in ihrer leishmaniziden Wirkung verstärken (Ritter *et al.*, 2007, Ritter *et al.*, 2000).

Dendritische Zellen (DCs) nehmen ebenfalls Leishmanien, beziehungsweise Leishmanien-antigen auf. Als professionell antigenpräsentierende Zellen sind DCs in der Lage, zu den drainierenden Lymphknoten zu wandern – ein Prozess, der durch TNF verstärkt wird – und dort über die immunologische Synapse Leishmanien-spezifische T-Zellen zu aktivieren (Martín-Fontecha *et al.*, 2003). Derart aktivierte, *L. major*-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen proliferieren und wandern ihrerseits an die Infektionsstelle, um dort über IFN- $\gamma$  infizierte Makrophagen zu stimulieren (Ritter *et al.*, 2007). IFN- $\gamma$  führt zur Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) (Kamijo *et al.*, 1993, Liew *et al.*, 1990), welche die Makrophagen dazu befähigt, die intrazellulären Parasiten abzutöten (Bogdan *et al.*, 2000, Diefenbach *et al.*, 1998, Louis *et al.*, 1998). Die Aktivierung der iNOS ist abhängig von IFN- $\alpha$ , sowie IFN- $\beta$  (Diefenbach *et al.*, 1998) und es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, in denen das TNF-Gen ausgenockt wurde, hochempfindlich gegenüber Leishmanien sind und eine disseminierende Infektion entwickeln (Ritter *et al.*, 2007, Wilhelm *et al.*, 2001). Reaktive Stickstoffmetabolite wie NO, als auch reaktive Sauerstoffmetabolite wie O<sub>2</sub><sup>-</sup>, stellen damit in der experimentellen kutanen und viszeralen Leishmaniasis Schlüsselmoleküle für eine erfolgreiche Abwehr gegen den Parasiten dar (Liese *et al.*, 2008).

Myeloide dendritische Zellen (mDCs) bilden nach Kontakt mit *L. major* IL-12 (Schleicher *et al.*, 2007), welches zusätzlich die Bildung von IFN- $\gamma$  fördert und NK-Zellen sowie CD8 $^{+}$  zytotoxische T-Zellen aktiviert (Trinchieri, 2003). Sowohl NK-Zellen, wie auch zytotoxische T-Zellen können effektiv infizierte Wirtszellen und Leishmanien abtöten und nehmen damit eine ebenso bedeutsame Rolle in der erfolgreichen Immunabwehr ein (Liese *et al.*, 2008). Allerdings haben Leishmanien zahlreiche Schutzmechanismen vor der Immunabwehr ihres Wirts entwickelt. So stehen ihnen Möglichkeiten zur Verfügung, die Aktivierung von potenziellen Wirtszellen zu verhindern, beziehungsweise deren Abwehrfunktionen zu inhibieren, die Ausschüttung von Zytokinen aus infizierten Zellen zu modifizieren, sowie durch Störung der Sekretion verschiedener mikrobizider Enzyme intrazellulär zu überleben und sogar zu proliferieren (Kima, 2007, el-On *et al.*, 1990, al Tuwaijri *et al.*, 1990).

### 1.3.2. Die Rolle der Neutrophilen

Die Rolle der Neutrophilen im Rahmen der Leishmanieninfektion wird indes kontrovers diskutiert. Sie stellen die erste Leukozytenpopulation dar, die die Inokulationsstelle erreicht (Müller *et al.*, 2001), und ihnen stehen nach einer Opsonin-vermittelten Phagozytose der Parasiten mit mikrobiziden Enzymen wie der NADPH-Oxidase (Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase) oder der Myeloperoxidase, mit Elektronenpumpen und reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung, diese abzutöten (Segal, 2005, Nathan, 2006). Opsonine stellen dabei Serumbestandteile dar, die sowohl an Mikroorganismen als auch an spezifische Rezeptoren auf Leukozyten binden und die Phagozytose erleichtern. Beispiele hierfür sind das C3b- und C3bi-Fragment des Komplementsystems, Antikörper, aber auch Mannan-bindendes Lektin (Kuhlman *et al.*, 1989, Laufs *et al.*, 2002). Mit der neutrophilen Elastase (NE) besitzen die Neutrophilen ein weiteres Enzym, welches über TLR 4 (Toll-like receptor 4) der Aktivierung infizierter Makrophagen dient und damit eine wichtige Rolle in der Abwehr von *L. major* einnimmt (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007, Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Nach einer Opsonin-unabhängigen Internalisierung überlebt hingegen ein Großteil der Leishmanien innerhalb der Neutrophilen, die dann als Wirtszellen fungieren (Laufs *et al.*, 2002).

Um der Elimination durch Phagozyten zu entgehen haben die Parasiten einige geschickte Strategien entwickelt. So gelangen bei der Infektion zusammen mit lebendigen Leishmanien auch apoptotische Promastigote in den Wirt, die auf ihrer Oberfläche Phosphatidylserin tragen. Dieses kommt physiologischerweise auf apoptotischen Wirtszellen vor und aktiviert

Phagozyten unter Blockierung derer Abwehrmechanismen durch eine verstärkte Freisetzung von TGF- $\beta$  und IL-10, sowie einer Hemmung des proinflammatorischen TNF (van Zandbergen *et al.*, 2006, Voll *et al.*, 1997). Auf diese Weise gelangen auch lebendige Leishmanien per Phagozytose und unter Umgehung der toxischen Abwehrmechanismen in die Neutrophilen, in denen sie jedoch nicht proliferieren können. Jene werden, nachdem auch sie ihrerseits in Apoptose gegangen sind, von Makrophagen aufgenommen (Meagher *et al.*, 1992, Savill *et al.*, 1989), was den Leishmanien in den apoptotischen Neutrophilen einen unbemerkten Zugang auch in diejenigen Zellen erlaubt, in denen sie sich vermehren können. Die Schlussfolgerung, dass die Parasiten die Neutrophilen ausnutzen um verborgen die Makrophagen zu erreichen, wird als „Hypothese des Trojanischen Pferds“ bezeichnet (van Zandbergen *et al.*, 2004, Laskay *et al.*, 2003).

Peters *et al.* konnten kürzlich über eine *in vivo*-Bildgebung bestätigen, dass Neutrophile rasch an der Einstichstelle der Sandmücke akkumulieren und mit Leishmanien infiziert werden ohne dabei abzusterben (Peters *et al.*, 2008). Nach 6 bis 7 Tagen können die Parasiten dann vorwiegend in CD11b<sup>+</sup> Makrophagen detektiert werden. Allerdings befinden sich die Leishmanien zum Zeitpunkt der Phagozytose durch die Makrophagen nicht mehr innerhalb der Neutrophilen, sondern sie verlassen sie kurz zuvor (Peters *et al.*, 2008). Die Vorstellung ist, dass die apoptotischen Neutrophilen eine Aktivierung der Makrophagen verhindern und somit den unbemerkten Eintritt auch der extrazellulären Parasiten in ihre Wirtszellen ermöglichen. In Anlehnung an die „trojan horse“-Theorie bezeichnet man diesen Vorgang als „trojan rabbit“-Transfer (Ritter *et al.*, 2009).

Vor diesem Hintergrund ist es bemerkenswert, dass unter anderem *L. major* durch die Produktion eines *Leishmania* chemotactic factor (LCF) Neutrophile gezielt an die Inokulationsstelle lockt (van Zandbergen *et al.*, 2002). Gleichzeitig hemmt LCF die Freisetzung des Proteins IP-10, welches NK-Zellen aktivieren kann. NK-Zellen wiederum könnten Leishmanien effizient abtöten. Ferner wird eine Wechselwirkung von LCF mit dem Lipoxin A4 Rezeptor (ALX) beschrieben, woraus eine verstärkte unbemerkte Aufnahme von Leishmanien in Neutrophile, eine Inhibierung der neutrophilen Abwehrmechanismen (Godson *et al.*, 2000) sowie eine höhere Überlebensrate intrazellulärer Parasiten resultiert (Wenzel *et al.*, 2009). Auch der Speichel des Vektors kann durch seinen Gehalt an Antikoagulanzien und Vasodilatatoren die Zusammensetzung des Zellinfiltrates verändern, wobei gezeigt werden konnte, dass der Speichel von *Lutzomyia longipalpis* in BALB/c-Mäusen Neutrophile, Eosinophile sowie Makrophagen anlocken kann, nicht aber in C57BL/6-Tieren (Teixeira *et al.*, 2005). Ebenso auffallend ist in diesem Zusammenhang, dass die von Neutrophilen

phagozytierten *L. major* die Apoptose ihrer Wirtszellen um etwa 24 Stunden verzögern, damit diese dann von den verstärkt nach ein bis zwei Tagen einwandernden Makrophagen phagozytiert werden können (van Zandbergen *et al.*, 2004, Aga *et al.*, 2002). Das auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen erscheinende Phosphatidylserin hemmt dabei die toxischen Abwehrmechanismen der Makrophagen. Und schließlich konnte gezeigt werden, dass nach der Passage durch eine phagozytäre Vakuole in den Neutrophilen die Leishmanien effizienter weitere PMNs (polymorphkernige Leukozyten) und Makrophagen infizieren können (Beil *et al.*, 2000).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach der Inokulation der Leishmanien verstärkt und gezielt Neutrophile angelockt werden, in die einige der Parasiten eindringen können, ohne dabei deren toxische Abwehrmechanismen zu initiieren. Die Apoptose der infizierten Neutrophilen wird um etwa einen Tag verzögert, bevor die Leishmanien den Intrazellulärraum wieder verlassen und in die eingetroffenen Makrophagen eindringen. Deren Abwehrmechanismen werden durch das Vorhandensein der apoptotischen Neutrophilen gehemmt, was den Parasiten einen sicheren Zugang in ihre Zielzellpopulation ermöglicht.

Einerseits sind die Neutrophilen also in der Lage effizient Mikroorganismen abzutöten, andererseits können sie als Hilfsmittel für einen unbemerkt Zutritt in die Makrophagen missbraucht werden (Bogdan *et al.*, 1998). Welche der beiden Rollen nun die ausschlaggebende ist, ließe sich durch Depletionsexperimente klären, bei denen die Granulozyten spezifisch ausgeschaltet werden. Das Problem solcher Versuche liegt in dem Auftreten von unerwünschten Nebeneffekten. So richtet sich der häufig verwendete Antikörper RB6-8C5 gegen das Antigen Gr-1 und bindet somit sowohl an den Oberflächenmarker Ly-6G, der von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, als auch an Ly-6C, welcher auf Neutrophilen, dendritischen Zellen sowie verschiedenen Lymphozyten und Monozyten vorkommt (Daley *et al.*, 2008). Es werden folglich verschiedene Zellspezies beeinflusst. Daley *et al.* empfehlen daher die Verwendung eines anderen Antikörpers, 1A8, welcher sich ausschließlich gegen Ly-6G und damit gegen Neutrophile richtet (Daley *et al.*, 2008).

Davon abgesehen zeigen sich in derartigen Depletionsexperimenten eine verminderte Parasitenlast in BALB/c- und eine verstärkte Infektion in C57BL/6-Mäusen (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004, Tacchini-Cottier *et al.*, 2000), was auf eine unterschiedliche Bedeutung der Neutrophilen in den beiden Mausstämmen hinweist. Im Folgenden sollen daher die Charakteristika und Unterschiede der beiden Mausstämme hinsichtlich ihrer Immunreaktion auf den Parasiten *L. major* näher betrachtet werden.

## 1.4. Bedeutung der Mausstämme BALB/c und C57BL/6 für die experimentelle Leishmaniasis

Der Verlauf einer Infektion mit Leishmanien hängt nicht nur vom Leishmanien-, sondern auch vom Mausstamm ab (Ritter *et al.*, 2004, Sacks *et al.*, 2002). Während die subkutane Infektion von C57BL/6-Tieren, wie auch der meisten anderen Mausstämme, zu einer selbstlimitierten kutanen Leishmaniasis führt, die nach ca. 6 Wochen ausheilt, endet eine analoge Infektion von BALB/c-Mäusen in einer progredienten, systemischen und nach etwa 30 bis 40 Wochen letal endenden Leishmaniasis (Sacks *et al.*, 2002, Beil *et al.*, 1992). Die beiden Mausstämme werden daher in der experimentellen Leishmaniasis als Referenz für eine unkomplizierte, da selbstheilende Erkrankung im Falle der schwarzen C57BL/6-Tiere, beziehungsweise bei den weißen BALB/c-Mäusen für eine komplizierte Form, wie es die DCL oder VL sind, herangezogen (Sacks *et al.*, 2002).

Ein immunologischer Unterschied, der für die ungleiche Suszeptibilität gegen den Parasiten *L. major* und den ungleichen Krankheitsverlauf mitverantwortlich ist, besteht dabei in der Aktivierung verschiedener Subtypen von T-Helfer-Zellen. Als Reaktion auf die Infektion mit dem Parasiten *L. major* reagiert das Immunsystem von C57BL/6-Mäusen, getriggert unter anderem durch IL-12, mit der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen, die dann IFN- $\gamma$  und IL-2 produzieren (Heinzel *et al.*, 1991). Über IFN- $\gamma$  aus den CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen, aber auch aus CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen, können, im Zusammenspiel mit TNF, Makrophagen aktiviert werden (von Stebut *et al.*, 2004, Bogdan *et al.*, 1990, Liew *et al.*, 1990). Derart aktivierte Makrophagen sind in der Lage, vor allem leishmanizide Stickstoffmetabolite wie NO zu produzieren und intrazelluläre Parasiten abzutöten (Bogdan *et al.*, 2000).

Suszeptible BALB/c-Mäuse hingegen entwickeln eine IL-4 abhängige T<sub>H</sub>2-Antwort, welche die Entstehung IFN- $\gamma$ -produzierender T<sub>H</sub>1-Zellen, sowie die Makrophagenfunktion hemmt (von Stebut *et al.*, 2004, Launois *et al.*, 1997). Die aktivierte CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen zeichnen sich durch die Bildung von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 aus (Heinzel *et al.*, 1991). IL-10 ist ein Inhibitor der Makrophagenfunktion, unter anderem durch Hemmung der iNOS (Bogdan, 2008), während IL-4 die Bildung von IgE in humanen Lymphozyten induziert und andererseits die Produktion von IFN- $\gamma$  herabsetzt (Vercelli *et al.*, 1990). Interessanterweise legen weitere Untersuchungen nahe, dass sich initial bei beiden Mausstämmen eine T<sub>H</sub>2-Antwort entwickelt, welche bei den BALB/c-Tieren persistiert und bei den resistenten C57BL/6-Mäusen in eine effektive T<sub>H</sub>1-Antwort gewandelt wird (Sacks *et al.*, 2002).

Die Versuche von Heinzel *et al.* haben IFN- $\gamma$  und IL-4 als die für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf entscheidenden Zytokine identifiziert (Heinzel *et al.*, 1989). So kann durch

den Einsatz von neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen IL-4 der Krankheitsverlauf in BALB/c-Tieren hinsichtlich Größe und Ulzeration der Inokulationsstelle, sowie bezüglich der Parasitenlast im Gewebe deutlich abgemildert werden, während die Inaktivierung von IFN- $\gamma$  mittels Antikörper in C57BL/6-Mäusen zu einer Disseminierung der Leishmanien in die regionalen Lymphknoten, Milz und Leber und damit zu einer Verschlimmerung des Infektionsgeschehens führt (Belosevic *et al.*, 1989, Heinzel *et al.*, 1989). Aber auch IL-12, welches die Proliferation von T<sub>H</sub>1-Zellen und die Bildung von IFN- $\gamma$  anstößt, nimmt eine zentrale Stellung ein. So führt die Behandlung von BALB/c-Mäusen mit IL-12 zu einer Resistenz gegen Leishmanien (Sypek *et al.*, 1993, Heinzel *et al.*, 1993, Ota *et al.*, 2008), während der Einsatz von anti-IL-12 Antikörpern auch bei resistenten Mäusen zu einer Exazerbation der Infektion führt (Heinzel *et al.*, 1995). Ebenso kann durch eine Suppression von T-Lymphozyten in infizierten BALB/c-Mäusen mittels Cyclosporin A die lokale Parasitenlast signifikant reduziert werden (Solbach *et al.*, 1986).

Es bestehen aber weitere Differenzen im Immungeschehen beider Mausstämme. So zeigen die Untersuchungen von Beil *et al.* Unterschiede in der Zusammensetzung des Zellinfiltrates an der Inokulationsstelle, die durch eine ungleiche Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle erklärt wird (Beil *et al.*, 1992). Während bei den BALB/c-Tieren fast ausschließlich polymorphekernige Leukozyten (PMNs) einwandern, die die nächsten 12 Tage die dominierende Zellpopulation bleiben, besteht bei den C57BL/6-Mäusen ein buntes Bild aus PMNs, Monozyten, Makrophagen und Eosinophilen. Zudem erscheint die Inokulationsstelle bei den resistenten C57BL/6 lichtmikroskopisch organisierter und weniger diffus. Ebenso lassen sich Differenzen im peripheren Blutbild detektieren, mit einer signifikanten Zunahme von monozytären und granulozytären Vorläuferzellen in den BALB/c-Tieren nach der Infektion (Mirkovich *et al.*, 1986). Außerdem unterscheiden sich die Neutrophilen der beiden Mausstämme hinsichtlich ihrer Aktivität. So produzieren Neutrophile aus C57BL/6 größere Mengen an NE, welches, wie unter 1.3.2. erwähnt, der Aktivierung von Makrophagen dient, als solche aus BALB/c (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004).

Insgesamt betrachtet verschiebt sich das Verhältnis aus Replikation und Elimination von *L. major* durch Makrophagen bei den schwarzen C57BL/6-Tieren zunehmend in Richtung Elimination und damit Ausheilung, bei den BALB/c-Mäusen hingegen hin zur Replikation der Parasiten (Beil *et al.*, 1992).

All diese Befunde verdeutlichen, dass das Immunsystem der BALB/c-Tiere im Gegensatz zu dem der C57BL/6-Mäuse einer Leishmanieninfektion nicht wirkungsvoll begegnen kann. Mit IL-4 beziehungsweise IL-12 und IFN- $\gamma$  hat man einige Schlüsselzytokine ausfindig gemacht,

deren Modifikation zu einer Verschlechterung beziehungsweise Verbesserung der Immunabwehr gegen den Parasiten führt. Durch ein genaueres Verständnis der ursächlichen Unterschiede im murinen Modell könnten in Zukunft neue Therapieansätze zur Behandlung der Leishmaniasis auch beim Menschen gewonnen werden. Denn auch im humanen System spielen die verschiedenen T-Helfer-Zellpopulationen eine prognostisch bedeutsame Rolle. Lymphozyten, die aus Patienten mit einer CL gewonnen werden, reagieren auf eine Stimulation mit Leishmanien-Antigen mit der Produktion von IFN- $\gamma$ , solche, die aus Patienten mit einer VL isoliert werden, hingegen mit der Bildung von IL-4 und IFN- $\gamma$  (Kharazmi *et al.*, 1999). Das spricht dafür, dass bei Patienten mit einem komplizierteren Verlauf einer Leishmaniasis auch eher eine  $T_H2$ -Antwort vermutet werden kann. In Patienten mit einer unkomplizierten CL dominieren dagegen  $T_H1$ -Zellen. Ob und inwiefern eine Behandlung der Patienten beispielsweise mit IFN- $\gamma$  oder gar ein Eingriff in die Differenzierung von T-Helferzellen einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen bleibt zu klären.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunabwehr gegen den Parasiten *L. major* wird kontrovers diskutiert. Einerseits steht ihnen ein beachtliches Arsenal an toxischen Metaboliten zur Verfügung, um in den Organismus eindringende Pathogene zu neutralisieren. Andererseits weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass Leishmanien diese Abwehrmechanismen unterwandern und Neutrophile als Wirtszellen ausnutzen können (Peters *et al.*, 2009, Laskay *et al.*, 2003). BALB/c- und C57BL/6-Mäuse unterscheiden sich in ihrer Suszeptibilität gegen den Parasiten *L. major*. Wie bereits beschrieben, liegt das unter anderem an der Ausschüttung von IL-4 in BALB/c-Tieren. Dies führt zu einer  $T_H2$ -Immunantwort und hemmt somit die Bildung von  $CD4^+$   $T_H1$ -Zellen als auch die Aktivierung von Makrophagen, die für die erfolgreiche Rekonvaleszenz entscheidend sind. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist es aber durchaus auch möglich, dass sich die Neutrophilen von suszeptiblen BALB/c- und resistenten C57BL/6-Mausstämmen unterscheiden (Ritter *et al.*, 2009). Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, die unterschiedliche Rolle der Neutrophilen in der experimentellen Leishmaniasis vor dem Hintergrund der genetischen Suszeptibilität der beiden Mausstämme BALB/c und C57BL/6 näher zu beleuchten. Folgende Fragestellungen standen hierbei im Vordergrund:

1. Unterscheiden sich BALB/c- und C57BL/6-Mäuse hinsichtlich der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Infektionsort oder in den drainierenden poplitealen Lymphknoten?
2. Zeigen sich bei der Konfrontation der Neutrophilen mit *L. major* Unterschiede in der Infektionskinetik und dem Apoptoseverhalten?
3. Enthalten die Neutrophilen beider Mausstämme am Inokulationsort des Parasiten, am lokal drainierenden, poplitealen Lymphknoten oder in der Milz intrazellulär die gleiche Menge an *L. major*?

## 2. Material

### 2.1. Laborgeräte

- FACS-Geräte (alle BD Biosciences, Deutschland):
  - FACSaria II Flow Cytometer
  - FACSCalibur Flow Cytometer
  - LSR II
- Fotoapparatur: Gene Genius BioImagingSystem (Syngene, Synoptics Ltd, Großbritannien)
- Inkubatoren:
  - Gasboy C40 (Labotect, Deutschland)
  - NU-4750E (INTEGRA Biosciences, Deutschland)
- Mikroskope: Axiostar plus und Axiostar Imager.M1 (beide Zeiss, Deutschland)
- pH-Meter: InoLab pH Level 1 (InoLab, Deutschland)
- Photometer: eppendorf BioPhotometer (eppendorf, Deutschland)
- Pipetten:
  - Eppendorf Research 0,5 - 10 µl (eppendorf, Deutschland)
  - Finnpipette 100 - 1000 µl und 10 - 100 µl (Thermo Electron Corporation, Deutschland)
- Pipettierhelfer: accu-jet pro (BRAND, Deutschland)
- Real Time – PCR Gerät: Multicolor Real-Time PCR Detection System iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Deutschland)
- Sterile Arbeitsbank Herasafe (Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland)
- Thermoschüttler TS-100 (Hartenstein, Deutschland)
- Trocken-Blockthermostat Bio TDB-100 (Hartenstein, Deutschland)
- Vortexer (IKA, Deutschland)
- Waage PJ400 (Mettler-Toledo, Deutschland)
- Wasserbad TW12 (Julabo, Deutschland)
- Zählkammer Neubauer und Neubauer improved
- Zentrifugen:
  - Centrifuge 5810R und rf Centrifuge 5417R (beide eppendorf, Deutschland)
  - Spectrafuge Mini Centrifuge (Labnet, Deutschland)

### 2.2. Glas- und Plastikwaren

- 96 Well PCR Plate, Semi-Skirted (PeqLab, Deutschland)

- Abdeckfolie für Real Time – PCR: Microseal B Adhesive Sealer (Bio-Rad Laboratories, Deutschland)
- BD Falcon Cell Strainers, 70 µm (BD Biosciences, USA)
- BD Multiwell 6 Well und 24 Well (BD Biosciences, Deutschland)
- FACS-Probengefäß: Röhre 5 ml (Sarstedt, Deutschland)
- Filter Minisart, 0,8 µm (Sartorius, Deutschland)
- Kanülen: BD Microlance 22 G und 27 G (BD Medical, Deutschland)
- Objektträger (engelbrecht, Deutschland)
- Petrischalen: Easy Grip Tissue Culture Dish (BD Falcon, Deutschland)
- Pipettenspitzen gestopft: UNITIPS (ABIMED, Deutschland), ungestopft (Sarstedt, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (eppendorf, Deutschland)
- Röhre 15 ml und 50 ml (Sarstedt, Deutschland)
- Spritzen: BD Discardit 2 ml, 5 ml und 10 ml (BD Medical, Deutschland)
- UV-Küvette mikro (BRAND, Deutschland)

### **2.3. Mausstämme**

- BALB/c
- C57BL/6

} Janvier, Frankreich

### **2.4. Leishmanienstamm**

- *L. major*, Stamm MHOM/IL/81/FE/BNI

### **2.5. Kulturmedien und Zusätze**

- Fetales Kälberserum / FKS (PAN-Biotech, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin-Lösung mit 10.000 U Penicillin / ml und 10 mg Streptomycin / ml (PAN-Biotech, Deutschland)
- RPMI 1640 mit L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO3 (PAN-Biotech, Deutschland)
- Zellkulturmedium: RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 25 µM β-Mercaptoethanol
- β-Mercaptoethanol (PAN-Biotech, Deutschland)

## 2.6. Antikörper und Farbstoffe

- Annexin V – Cy5 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
- Antikörper:
  - Gr-1 – APC, 1:500, Klon RB6-8C5 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
  - Gr-1 – FITC, 1:150, Klon RB6-8C5 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
  - CD11b – APC, 1:800, Klon M1/70 (eBioscience, USA)
  - CD11b – FITC, 1:200, Klon M1/70.15 (AbD Serotec, Deutschland)
  - CD11b – PE, 1:200, Klon M1/70 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
  - Ly-6G – PE, 1:200, Klon 1A8 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
  - Ly-6C – Biotin, 1:400, Klon AL-21 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
  - Streptavidin – PerCP, 1:200 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
  - B220 – PE, 1:200, Klon RA3-6B2 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
  - CD4 – Pacific Blue, 1:1000, Klon RM4-5 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
  - CD8 – FITC, 1:50, Klon 53-6.7 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland)
- DAPI-Färbelösung, 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Giemsa-Färbelösung: 0,4 % (w/v) Giemsa-Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) 1:10 verdünnt in H<sub>2</sub>O
- Ladepuffer, Standard für Gelelektrophorese Ladders (New England BioLabs, Deutschland)
- Trypanblaulösung: 0,16 g Trypanblau (Sigma-Aldrich, Deutschland) in 100 ml 0,9 % NaCl

## 2.7. Chemikalien und Biochemikalien

- Agarose (USB Corporation, USA)
- Bovines Serumalbumin / BSA (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Cell Lysis Solution (QIAGEN, Deutschland)
- Cohn II (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Cytofix/Cytoperm-Lösung (BD Biosciences, Deutschland)
- EDTA (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Ethanol (Mallinckrodt, Holland)
- Formaldehyd (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Glykogen (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- H<sub>2</sub>O (Promega, Deutschland)
- Isopropanol (Merck, Deutschland)
- Kollagenase (Roche, Deutschland)

- MasterMix, 2x:
  - Applied Biosystems Inc, Deutschland
  - Bio-Rad Laboratories, Deutschland
  - Eurogentec, Deutschland
  - Thermo Electron Corporation, Deutschland
- Mucocit-Lösung (Merz, Deutschland)
- Protein Precipitation Solution (QIAGEN, Deutschland)
- Proteinase K (PeqLab, Deutschland)
- Trypsin (PAA Laboratories, Österreich)

## 2.8. Puffer und Lösungen

- ACK-Puffer: 8,29 g NH<sub>4</sub>Cl + 1 g KHCO<sub>3</sub> + 37,2 mg Na<sub>2</sub>EDTA + 800 ml H<sub>2</sub>O, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,2 - 7,4 und ein Endvolumen von 1000 ml (alle enthaltenen Chemikalien von Merck, Deutschland)
- Annexin V – Puffer: 0,82 g NaCl + 0,238 g Hepes + 90 ml Millipore-H<sub>2</sub>O, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,4 mit NaOH und ein Endvolumen von 100 ml mit Millipore-H<sub>2</sub>O (alle enthaltenen Chemikalien von Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Brewer Thioglycollat-Medium (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Dulbecco's PBS / DPBS (PAA Laboratories, Österreich)
- FACS-Puffer: DPBS + 1 % FKS
- Fixierlösung: DPBS + 2 % FKS + 2 % Formaldehyd
- Hanks Balanced Salt Solution (PAA Laboratories, Österreich)
- Latex beads – Lösung, Durchmesser 6,4 µm (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Caseinhydrolysat: enzymatisch verdautes Casein (C 0626, Sigma-Aldrich, Deutschland)
- MACS-Puffer: DPBS + 1 % BSA + 2 mM EDTA
- Perm/Wash Buffer (BD Biosciences, Deutschland)

## 2.9. Software

- CellQuest Pro (BD Biosciences, USA)
- GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., USA)
- Microsoft Excel, Microsoft Word (Microsoft, Deutschland)

### 3. Methoden

#### 3.1. Präparation der Leishmanien und Infektion der Mäuse

Die promastigoten Leishmanien wurden in 96 well-Blutagarplatten (Herstellung nach Solbach *et al.*, 1986) kultiviert und in einem Inkubator konstant bei 28°C und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Zur Aufrechterhaltung der Virulenz erfolgte im monatlichen Abstand eine Passage durch eine BALB/c-Maus. Nach Aufnahme der Leishmanien mittels einer Pipette wurden diese dreimal mit DPBS (PAA Laboratories, Österreich) gewaschen. Die Bestimmung der Parasitenzahl erfolgte in einer Neubauer improved Zählkammer nach vorheriger Inkubation für 10 min in Fixierlösung und anschließender Färbung mittels Trypanblaulösung. Gezählt wurden dabei nur ungefärbte, spindelförmige Leishmanien mit sichtbarem Flagellum. Die Infektion der Mäuse erfolgte durch eine Injektion von  $3 \cdot 10^6$  Leishmanien subkutan in die Hinterpfote, entsprechend 30 µl einer dreimal mit DPBS gewaschenen Leishmaniensuspension mit  $1 \cdot 10^8$  Leishmanien pro ml DPBS. Zur Fluoreszenzmarkierung der Parasiten wurden  $1 \cdot 10^7$  Leishmanien in 1 ml einer 1 µM CFSE-Färbelösung (Invitrogen, Deutschland) resuspendiert, für 10 min bei 37°C unter mehrmaligem Invertieren inkubiert und anschließend dreimal mit DPBS / 5 % FKS (FKS bezogen von PAN-Biotech, Deutschland) gewaschen. Infektiöser Flüssigabfall wurde über Nacht in eine Glasflasche mit Mucocitlösung (Merz, Deutschland) der Endkonzentration 1,5 bis 2 % gegeben, Hartabfall bei 121°C autoklaviert.

#### 3.2. Zellgewinnung aus Gewebe und Peritoneum

Für die Zellisolierung aus den Hinterpfoten wurden die Füße knapp oberhalb des oberen Sprunggelenks abgeschnitten und, nach Verwerfen der Zehen, mit Hilfe einer Schere in 1 ml HBSS (PAA Laboratories, Österreich) grob zerkleinert. Nach der Zugabe von Kollagenase D der Endkonzentration 1 mg/ml (Roche, Deutschland) folgte ein Verdau bei 37°C im Schüttler, der nach 30 min durch das Zufügen einer EDTA-Lösung der Endkonzentration 50 mM (Sigma-Aldrich, Deutschland) und einer weiteren Inkubation für 10 min bei 37°C im Schüttler beendet wurde. Im Anschluss an das Überführen durch ein Stahlsieb erfolgte ein Waschen der Zellen mit DPBS / 1 % FKS.

Zellen aus dem poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie aus der Milz konnten durch das Zerdrücken der Organe in DPBS / 1 % FKS und anschließendem Waschen gewonnen werden. Für das Zellisolat aus der gut durchbluteten Milz folgte eine Erythrozytenlyse. Dazu wurden die Zellen in 5 ml ACK-Puffer resuspendiert, pelletiert, dekantiert und nochmals mit

DPBS / 1 % FKS gewaschen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer improved Zählkammer nach vorheriger Färbung toter Zellen mit Trypanblaulösung.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an peritonealen Granulozyten zu erreichen war eine vorausgehende intraperitoneale Injektion von Brewer Thioglycollat-Medium (Sigma-Aldrich, Deutschland) oder alternativ Caseinhydrolysat (Sigma-Aldrich, Deutschland) nötig. Die Gabe von jeweils 1 ml einer 10-prozentigen Caseinhydrolysat-Lösung erfolgte 24 Stunden und 2 Stunden vor der Peritoneallavage. Das Thioglycollat-Medium wurde 16 Stunden vor der Bauchraumspülung gegeben, die mit 5 ml eiskaltem DPBS durchgeführt wurde.

### **3.3. Aufreinigung Ly-6G<sup>+</sup> Zellen mittels MACS**

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen erfolgte eine fünfminütige Inkubation der zuvor mit 5 ml MACS-Puffer (DPBS mit 1 % BSA (Merck, Deutschland) und 2 mM EDTA) gewaschenen Zellen mit 1 µl einer Cohn II-Lösung der Konzentration 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Deutschland). Daran schlossen sich eine Inkubation der Zellen mit 50 µl einer Anti-Ly-6G-Biotin-Antikörperlösung (Miltenyi Biotec, Deutschland) für 10 min im Kühlschrank, eine Zugabe von 150 µl MACS-Puffer und eine weitere Inkubation mit 100 µl einer Anti-Biotin-MicroBeads-Lösung mit magnetischen Eigenschaften (Miltenyi Biotec, Deutschland) für 15 min im Kühlschrank an. Nach dem Waschen der Zellen mit 5 ml MACS-Puffer wurden sie in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und über eine MS MACS-Säule (Miltenyi Biotec, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### **3.4. Kultivierung und *in vitro* – Infektion peritonealer Zellen**

Nach dem Waschen der zu kultivierenden Zellen mit Zellkulturmedium wurden je Näpfchen einer 24 well-Platte  $1 \cdot 10^6$  der Zellen in 1 ml Zellkulturmedium pipettiert. Das Medium setzte sich aus 500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> (PAN-Biotech, Deutschland), 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (mit 10.000 U Penicillin/ml und 10 mg Streptomycin/ml, PAN-Biotech, Deutschland) und 50 µM β-Mercaptoethanol (PAN-Biotech, Deutschland) zusammen. Die Infektion erfolgte mit  $5 \cdot 10^6$  Leishmanien in 100 µl Zellkulturmedium je Näpfchen. Dies entspricht einer Infektionsrate von 5 Leishmanien pro Zelle. Das Ernten der Zellen geschah mittels mehrmaligen Waschens der Näpfchen mit DPBS / 1 % FKS. Zur selektiven Gewinnung der kultivierten Makrophagen wurden die nicht adhärierten Zellen durch mehrmaliges, vorsichtiges Spülen mit DPBS abgewaschen und die verbliebenen, adhä-

rierten Makrophagen durch Inkubation mit 300 µl einer 0,05 % Trypsinlösung (PAA Laboratories, Österreich) für 5 min bei 37°C abgelöst. Die Trypsinwirkung konnte durch das Überführen der Zellen in 10 ml Zellkulturmedium und das Waschen mit DPBS beendet werden.

### **3.5. Histologie**

Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 150.000 in 80 µl DPBS / 1 % FKS eingestellt und mit Hilfe eines CytoSpins (Shandon Cytospin 4 Cytocentrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland) auf einen Objektträger gebracht. Die Färbung der Zellen erfolgte nach Giemsa. Dazu wurden die Objektträger für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und die Zellen danach für 10 min in Methanol fixiert. Nach dem Trocknen erfolgte eine fünfzehnminütige Färbung in Giemsa-Färbelösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) und zuletzt eine Differenzierung der gefärbten Zellen mit Wasser.

### **3.6. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)**

Wie bereits unter Punkt 3.3. beschrieben konnte durch die Zugabe von 1 µl einer Cohn II-Lösung der Konzentration 1 mg/ml eine Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen erreicht werden. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 min im Kühlschrank mit den fluorochrommarkierten Antikörpern entsprechend Tabelle 1 inkubiert und anschließend mit DPBS / 1 % FKS gewaschen. Wurde ein biotinylierter Antikörper verwendet, so musste jetzt eine Streptavidin-PerCP-Lösung gemäß Tabelle 1 zugegeben und die Zellen für weitere 15 min im Kühlschrank inkubiert werden.

Durch das Zufügen von 13.000 Latexkügelchen mit einem Durchmesser von 6,4 µm (Sigma-Aldrich, Deutschland) noch vor der Zugabe von Cohn II war es möglich, bei Verlust von Zellmaterial im Rahmen der einzelnen Waschschritte auf die ursprüngliche Anzahl von Zellen zurückzurechnen. Insofern konnten die Versuchsergebnisse dann nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ interpretiert werden.

Nach der Inkubation wurden ungebundene Antikörper mit DPBS / 1 % FKS weggewaschen und die Zellen über Nacht im Kühlschrank in DPBS mit 2 % FKS und 2 % Formaldehyd (Sigma-Aldrich, Deutschland) fixiert um tags darauf mit DPBS / 1 % FKS gewaschen und über ein Filterpapier gefiltert zu werden. Sollten in einem Experiment lebendige Zellen hinsichtlich ihrer Expression von Oberflächenantigenen mittels FACS sortiert werden, so blieb der Fixierungsschritt aus. Vor der Färbung der Zellen mit Annexin V wurden diese mit

Annixin V – Puffer gewaschen. Anschließend folgten eine Inkubation der Zellen mit 2,5 µl Annexin V – Cy5 (BD Biosciences Pharmingen, Deutschland) für 15 min bei Raumtemperatur und ein weiterer Waschschritt mit Annexin V – Puffer.

Für den Einsatz des interkalierenden Fluorogens DAPI mussten die Zellen zuvor mit Cytofix/Cytoperm-Lösung (BD Biosciences, Deutschland) für 30 min lichtgeschützt inkubiert werden um sie zu fixieren und die Zellmembranen für den Farbstoff permeabel zu machen. Nach dem Waschen mit Perm/Wash Buffer (BD Biosciences, Deutschland) konnte die DNS für 5 min bei Raumtemperatur mit DAPI-Färbelösung der Konzentration 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, Deutschland) gefärbt werden. Abschließend wurden die Zellen erneut mit Perm/Wash Buffer gewaschen.

Bezeichnung des AK	Massenkonz. der AK- Stammlösung	eingesetzter Titer	Masse des AK im Ansatz	Hersteller
APC Anti-Mouse Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) (Clone RB6-8C5)	0,2 mg/ml	1:500	20 ng	BD Biosciences Pharmingen
FITC Rat Anti-Mouse Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) (Clone RB6-8C5)	0,5 mg/ml	1:150	167 ng	BD Biosciences Pharmingen
APC Conjugated Anti-mouse CD11b (Clone M1/70)	0,2 mg/ml	1:800	12,5 ng	eBioscience
Rat Anti-Mouse CD11b: FITC (Clone M1/70.15)	0,1 mg/ml	1:200	25 ng	AbD Serotec
PE Rat Anti-Mouse CD11b (Clone M1/70)	0,2 mg/ml	1:200	50 ng	BD Biosciences Pharmingen
PE Rat Anti-Mouse Ly-6G (Clone 1A8)	0,2 mg/ml	1:200	50 ng	BD Biosciences Pharmingen
Biotin Rat Anti-Mouse Ly-6C (Clone AL-21)	0,5 mg/ml	1:400	62,5 ng	BD Biosciences Pharmingen
PerCP Streptavidin	0,2 mg/ml	1:200	50 ng	BD Biosciences Pharmingen
PE Rat Anti-Mouse CD45R/B220 (Clone RA3-6B2)	0,2 mg/ml	1:200	50 ng	BD Biosciences Pharmingen
Pacific Blue Rat Anti-Mouse CD4 (Clone RM4-5)	0,2 mg/ml	1:1000	10 ng	BD Biosciences Pharmingen
FITC Rat Anti-Mouse CD8a (Clone 53-6.7)	0,5 mg/ml	1:50	500 ng	BD Biosciences Pharmingen

**Tabelle 1:** In dieser Arbeit verwendete Antikörper einschließlich der Massenkonzentration der Stammlösung, des eingesetzten Titers und der resultierenden Masse an AK in jedem Ansatz

Als FACS-Geräte dienten der LSR II sowie der FACSCalibur (beide BD Biosciences, Deutschland). Nicht fixierte, lebendige Zellen wurden mit Hilfe des FACS ARIA II (BD Biosciences, Deutschland) direkt in FACS-Tubes mit 500 µl FKS hineinsortiert und anschließend mit DPBS gewaschen.

### **3.7. Präparation genomicscher DNS**

Zur Präparation genomicscher DNS erfolgte ein Verdau von Zellen in 500 µl Cell Lysis Solution (Qiagen, Deutschland) und Proteinase K in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml (Peqlab, Deutschland) bei 55°C über Nacht. Nach dem Ausfällen der Proteine mittels 115 µl Protein Precipitation Solution (Qiagen, Deutschland) für 5 min auf Eis konnte nach dem Pelletieren der Überstand mit 300 µl Isopropanol und 1 µl Glykogenlösung der Konzentration 20 mg/ml (Sigma-Aldrich, Deutschland) versetzt werden. Nach erneutem Pelletieren wurde der Überstand verworfen und dem Pellet 350 µl Ethanol zugegeben. Die DNS-Lösung musste ein weiteres Mal pelletiert und der Überstand verworfen werden. Das Pellet wurde dann bei 37°C getrocknet und die DNS in 100 µl H<sub>2</sub>O (Promega, Deutschland) bei 55°C für 15 min gelöst und anschließend eingefroren. Eine photometrische Quantifizierung der gewonnenen DNS-Menge gelang über ein Eppendorf BioPhotometer.

### **3.8. Real Time – PCR**

Für die Real Time – PCR wurden 96 well-PCR-Platten (Peqlab, Deutschland) verwendet. Um eine Verdunstung der Reaktionsansätze zu verhindern wurde die Platte mit einer Folie versiegelt (Microseal „B“ Film, Bio-Rad Laboratories, Deutschland). Bei dem genutzten RT – PCR Gerät handelte es sich um das Multicolor Real-Time PCR Detection System, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Deutschland). Als Primer fungierten entweder der β-Actin forward- und β-Actin reverse-Primer zur Amplifikation des β-Aktin-Gens der Maus, oder aber der ISS1- und ISRV-Primer zur Vervielfältigung eines Abschnittes aus dem Genom von *L. major*. Die Sequenzen der Primer, bestellt bei der Firma metabion international, Deutschland, zeigt Tabelle 2.

Je Näpfchen sollten 25 µl Gesamtvolume eingesetzt werden. Initial erfolgte die Herstellung einer Stammlösung für alle Näpfchen einer Platte, bestehend aus:

- 12,5  $\mu$ l SYBR Green Supermix (Firma BioRad, iQ SYBR Green Supermix 2x)
- 2  $\mu$ l der 10  $\mu$ M Primerlösung (sowohl forward- als auch reverse-Primer enthaltend)
- H<sub>2</sub>O (Volumen so gewählt, dass abhängig von der eingesetzten DNS-Probe je Näpfchen 25  $\mu$ l Gesamtvolume vorlagen)

Name des Primers	Sequenz
$\beta$ -Actin forward	5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A - 3'
$\beta$ -Actin reverse	5'-GGA TGC CAC AGG ATT CCA TAC CCA - 3'
ISS1 ( <i>L. major</i> Primer forward)	5'-GCT CCA AAA GCG TAT ATT AAT GCT GT - 3'
ISRV ( <i>L. major</i> Primer reverse)	5'-TCC TTC ATT CCT AGA GGC CGT GAG T - 3'

**Tabelle 2:** Sequenzen der verwendeten Primer

Je nach Versuch wurden 1  $\mu$ l bis 9  $\mu$ l der DNS-Probe eingesetzt. Als Standard diente zum einen die genomische DNS aus der Milz einer C57BL/6-Maus, die in H<sub>2</sub>O entsprechend Tabelle 3 verdünnt wurde, zum anderen ein Plasmid von Prof. Dr. Christian Drosten vom Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg als Bezug für die *L. major*-DNS, welches gemäß Tabelle 4 in genomischer Maus-DNS der Konzentration 125 pg/ $\mu$ l verdünnt wurde. Für den Standard wurde je Näpfchen 1  $\mu$ l der DNS-Probe eingesetzt. Zusätzlich blieben auf jeder Platte einige Näpfchen frei von DNS und fungierten als Leerwert. Die Real Time – PCR folgte folgendem Procedere:

- 15,5 min Denaturierung bei 95°C
- 20 s Denaturierung bei 95°C
- 30 s Primerhybridisierung bei 58°C
- 30 s Elongation bei 72°C
- 5 min Abkühlung von 72°C auf 24°C

} 40 Zyklen

Zur quantitativen Auswertung wurden die sog. Ct-Werte herangezogen. Dabei handelt es sich um den Zeitpunkt innerhalb der Real Time – PCR, an dem die Fluoreszenz, und damit die Menge an DNS im Ansatz, einen bestimmten Schwellenwert übersteigt, der als „threshold“ bezeichnet wird. Jenseits des „threshold“ hebt sich die Fluoreszenz signifikant von der Hintergrundfluoreszenz ab. Der Ct-Wert ist indirekt proportional zu der ursprünglichen Anzahl an Genkopien im Ansatz, die im Rahmen der PCR amplifiziert werden.

Bei den beiden Standards handelt es sich um Ansätze mit vorher bekannter Anzahl an Genkopien. Da die Verdünnung der Standardpunkte logarithmisch erfolgte, liegen die entsprechenden Ct-Werte bei logarithmischer Skalierung idealerweise auf einer Geraden. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  dient dabei der Quantifizierung der Abweichung der Ct-Werte der Standardpunkte von der idealen, theoretischen Standardkurve und nimmt Werte zwischen 0 (keine Korrelation der Werte) und 1 (perfekte Korrelation) an.

Name des Standardpunktes	Konzentration der DNS in pg/ $\mu$ l
B1	12.500
B2	1.250
B3	125
B4	12,5
B5	1,25
B6	0,125
B7	0,0125
B8	0,00125
B9	0,000125
B10	0,0000125
B11	0,00000125

**Tabelle 3:** Bezeichnung und Konzentration in pg/ $\mu$ l der einzelnen Punkte der Standardkurve für  $\beta$ -Aktin (B für  $\beta$ -Aktin); als Standard diente hierzu die genomische DNS aus einer C57BL/6-Maus, die in H<sub>2</sub>O verdünnt wurde.

Name des Standardpunktes	Konzentration des Plasmids in c/run	Konzentration des Plasmids in U/ $\mu$ l
L-4	$10^6$	$10^6$
L-5	$10^5$	$10^5$
L-6	$10^4$	$10^4$
L-7	$10^3$	$10^3$
L-8	$10^2$	$10^2$
L-9	10	10
L-10	1	1
L-11	0,1	0,1

**Tabelle 4:** Benennung und Konzentration in c/run und in U/ $\mu$ l der einzelnen Punkte der Standardkurve für das *L. major*-Plasmid (L für *L. major*, c = copies); das Plasmid stammt von Prof. Dr. Christian Drosten vom Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg und wurde in genomischer Maus-DNS der Konzentration 125 pg/ $\mu$ l verdünnt.

## 4. Ergebnisse

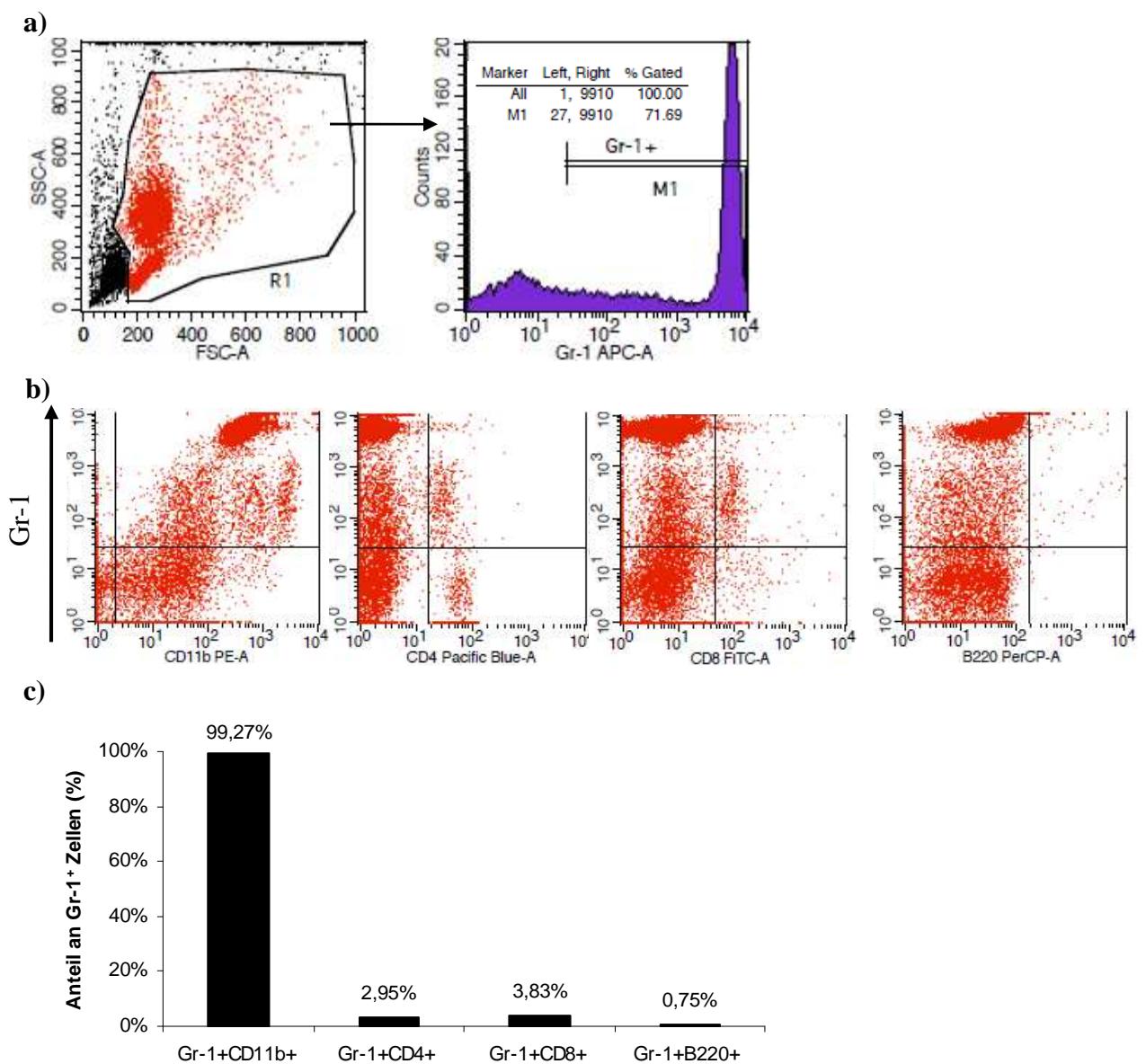
### 4.1. Etablierung themenrelevanter Methoden

#### 4.1.1. Peritoneallavage nach Gabe von Thioglycollat-Medium

Die Etablierung eines Verfahrens zur Gewinnung von neutrophilen Granulozyten stand am Anfang der *in vitro* – Experimente. Dabei sollte eine möglichst hohe Ausbeute erreicht werden.

In einem ersten Versuch wurden dazu einer BALB/c-Maus 2 ml einer 1,6-prozentigen Thioglycollat-Lösung i.p. appliziert und nach 16 Stunden der Peritonealraum mit DPBS gespült. Die derart gewonnenen Zellen wurden mit fluorochrommarkierten AK gegen Gr-1, CD11b, CD4, CD8 und B220 inkubiert um einen Überblick über die Zusammensetzung des Zellinfiltrates zu gewinnen. Bei dem Oberflächenantigen Gr-1 handelt es sich um einen Granulozytenmarker, CD4 kommt auf T-Helfer-Zellen, CD8 auf zytotoxischen T-Zellen vor und B220 stellt einen B-Zellmarker dar. CD11b ist sowohl auf Makrophagen, dendritischen Zellen, wie auch auf Neutrophilen zu finden.

Wie sich im Laufe der Dissertation zeigte, sind Gr-1 und CD11b allein zur Unterscheidung von Neutrophilen und Makrophagen nur bedingt geeignet – allenfalls differieren beide Zelltypen in der Menge an exprimiertem Oberflächenantigen. Hinzu kommt, dass auch myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  und damit den beiden recht ähnlich sind. Bei MDSCs handelt es sich um eine erst vor kurzem identifizierte, recht heterogene Gruppe myeloider Zellen, die in der Lage ist, sowohl die angeborene, wie auch die adaptive Immunantwort zu inhibieren (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2009). Zur genaueren Unterscheidung eignen sich die Oberflächenmarker Ly-6G (ein reiner Granulozytenmarker) und Ly-6C (kommt auf Neutrophilen, DCs, sowie auf verschiedenen Formen von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten vor), die wie Gr-1 zur Ly-6-Genfamilie gehören. Allerdings lagen diese zu Beginn des praktischen Teils der Dissertation noch nicht vor, so dass in einigen Versuchen auf sie verzichtet werden musste. Neutrophile Granulozyten sind demnach  $\text{Gr-1}^{\text{high}}$   $\text{CD11b}^+ \text{Ly-6C}^{\text{int}}$ , während es sich bei unreifen Makrophagen um  $\text{Gr-1}^{\text{int}} \text{CD11b}^+ \text{Ly-6C}^{\text{high}}$  Zellen handelt (Sawanobori *et al.*, 2008, Sunderkötter *et al.*, 2004).

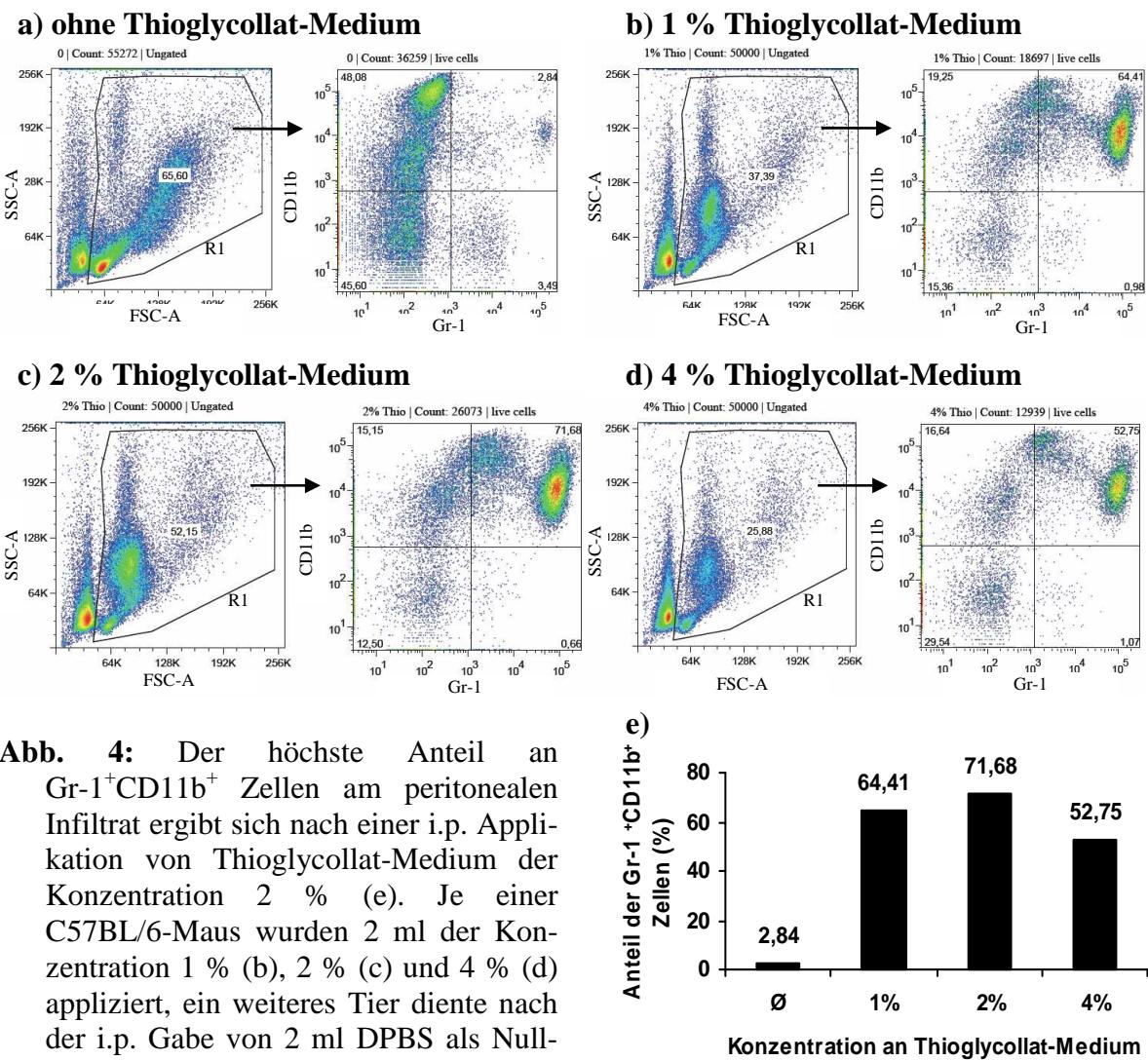


**Abb. 3:** Anreicherung von  $\text{Gr-1}^+$  $\text{CD11b}^+$  Zellen im Peritonealraum einer BALB/c-Maus durch eine intraperitoneale Injektion von 2 ml einer 1,6-prozentigen Thioglycollatlösung 16 Stunden vor der Peritoneallavage. Für die Auswertung fanden nur solche Zellen in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich R1 Berücksichtigung (a). Ausgehend davon sind 71,69 % der Zellen  $\text{Gr-1}^+$ . Ferner wurden die Zellen mit fluorochrommarkierten AK gegen CD11b, CD4, CD8 und B220 inkubiert (b): Die Zellpopulation mit stark  $\text{Gr-1}^+$  Zellen ist bei vergleichender Betrachtung der dot-plot-Diagramme  $\text{Gr-1}^{\text{high}}\text{CD11b}^{\text{int}}\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{B220}^-$ . Es handelt sich am wahrscheinlichsten um neutrophile Granulozyten. Makrophagen finden sich in einer Population von  $\text{Gr-1}^{\text{int}}\text{CD11b}^{\text{high}}$  Zellen wieder. 99,27 % der  $\text{Gr-1}^+$  Zellen sind  $\text{Gr-1}^+$   $\text{CD11b}^+$ , 2,95 % sind  $\text{Gr-1}^+$  $\text{CD4}^+$ , 3,83 % sind  $\text{Gr-1}^+$  $\text{CD8}^+$  und lediglich 0,75 % sind  $\text{Gr-1}^+$  $\text{B220}^+$  (c). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines einzelnen Experiments mit einem BALB/c-Tier.

Die FACS-Analyse der Lavage ist in Abbildung 3 dargestellt. Im Folgenden werden nur diejenigen Zellen berücksichtigt, die aufgrund ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich liegen, fortan bezeichnet als Region 1 (R1). Dadurch soll das Miteinbeziehen von Zelldetritus und anderen Partikeln vermieden werden. 71,69 % der derart selektionierten Zellen sind Gr-1<sup>+</sup>, 87,72 % CD11b<sup>+</sup>, 4,34 % CD4<sup>+</sup>, 3,63 % CD8<sup>+</sup> und 0,58 % B220<sup>+</sup>. Betrachtet man nur die Gr-1<sup>+</sup> Zellen, so ist mit 99,27 % der überwiegende Teil Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. 2,95 % sind Gr-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, 3,83 % sind Gr-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> und lediglich 0,75 % sind Gr-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>. Vergleicht man die dot-plot-Diagramme miteinander, in denen der Gr-1-Status gegen die übrigen untersuchten Oberflächenantigene aufgetragen ist (Abbildung 3, Figur b) so zeigt sich, dass ein Großteil der Zellen in einer stark Gr-1<sup>+</sup> Population zu finden ist. Diese Zellen sind Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>int</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> und damit am ehesten Neutrophile. Die Makrophagen finden sich in einer kleineren Population Gr-1<sup>int</sup>CD11b<sup>high</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> Zellen wieder.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass es sich bei den Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>int</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> Zellen mutmaßlich um Neutrophile handelt, die nach der Behandlung mit Thioglycollat-Medium die dominierende Population im Peritonealraum darstellen. In dem folgenden Experiment sollte nun diejenige Konzentration an Thioglycollat-Medium mit der höchsten Ausbeute an neutrophilen Granulozyten gefunden werden.

Um den Einfluss der Konzentration an Thioglycollat-Medium auf die Zellzusammensetzung der Lavage zu bestimmen, wurden je einer C57BL/6-Maus 2 ml einer Thioglycollat-Lösung der Konzentration 1 %, 2 % oder 4 % i.p. injiziert. Einem weiteren Tier wurden als Nullkontrolle 2 ml DPBS appliziert. Die Färbung der Peritonealzellen auf Gr-1 und CD11b ist in Abbildung 4 dargestellt. Es lassen sich hierbei mit Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>low</sup> (Neutrophile) und Gr-1<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup> Zellen (Makrophagen) zwei Zellpopulationen von Interesse unterscheiden. Die Konzentration an Thioglycollat-Medium beeinflusst vor allem den Anteil an Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen, in denen die Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>low</sup> Zellen dominieren. Betrachtet man wieder nur diejenigen Zellen, in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich R1, so liegt der Anteil Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen bei der Nullkontrolle bei nur 2,84 % der Zellen, bei 1 % Thioglycollat-Medium bei 64,41 %, bei 2 % beträgt er 71,68 % und bei 4 % 52,75 %. Die höchste Ausbeute an Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen konnte in den folgenden Experimenten demzufolge über eine Behandlung mit 2-prozentigem Thioglycollat-Medium erzielt werden.



**Abb. 4:** Der höchste Anteil an Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen am peritonealen Infiltrat ergibt sich nach einer i.p. Applikation von Thioglycollat-Medium der Konzentration 2 % (e). Je einer C57BL/6-Maus wurden 2 ml der Konzentration 1 % (b), 2 % (c) und 4 % (d) appliziert, ein weiteres Tier diente nach der i.p. Gabe von 2 ml DPBS als Nullkontrolle (a). Für die weitere Auswertung fanden nur solche Zellen in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich R1 Eingang. Die gewonnenen Daten stammen aus einem einzelnen Experiment, in dem je ein C57BL/6-Tier pro getester Konzentration an Thioglycollat-Medium verwendet wurde.

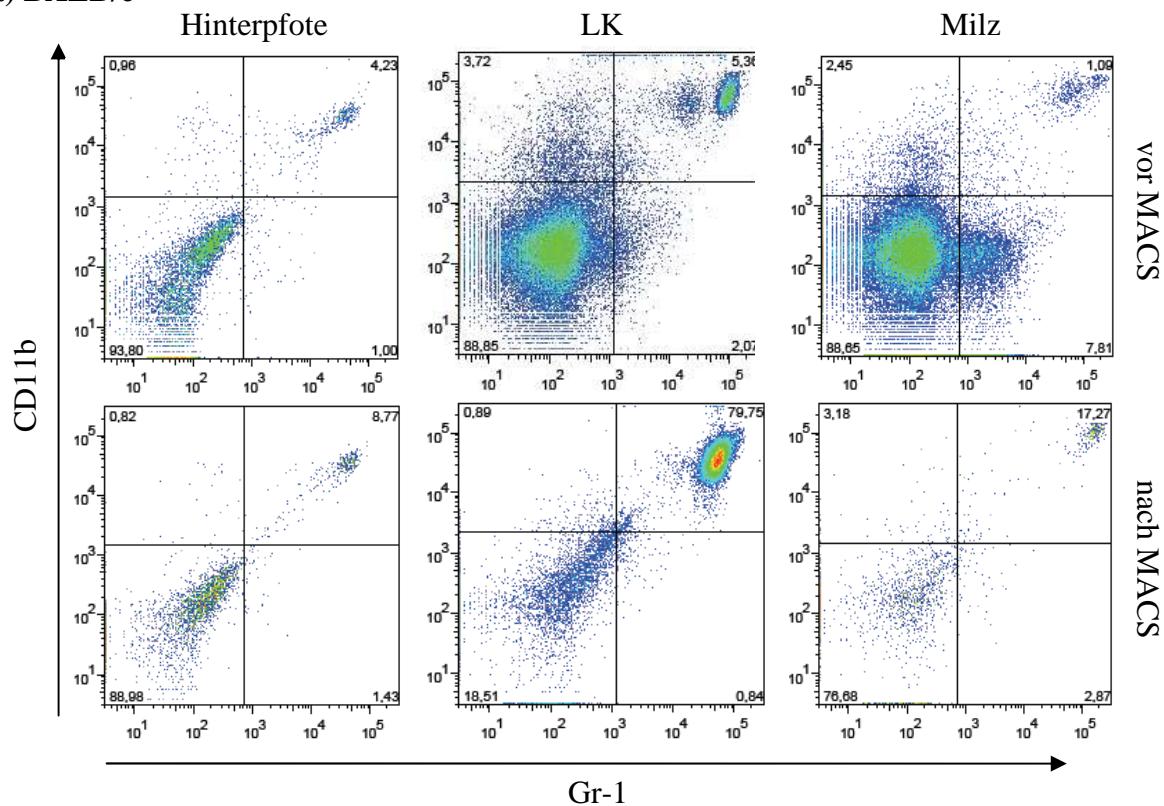
#### 4.1.2. Aufreinigung Ly-6G positiver Zellen

Ein hilfreicher Marker zur Selektion von neutrophilen Granulozyten ist das Oberflächenantigen Ly-6G, welches wie Gr-1 und Ly-6C Teil der Ly-6-Genfamilie ist. Während es sich bei Ly-6G um einen reinen Granulozytenmarker handelt, kommt Ly-6C sowohl auf Neutrophilen, DCs, sowie auf verschiedenen Formen von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten vor (Daley *et al.*, 2008). Da AK gegen Gr-1 sowohl an Ly-6G, wie auch an Ly-6C binden, kann über sie allein keine Selektion von Neutrophilen gelingen.

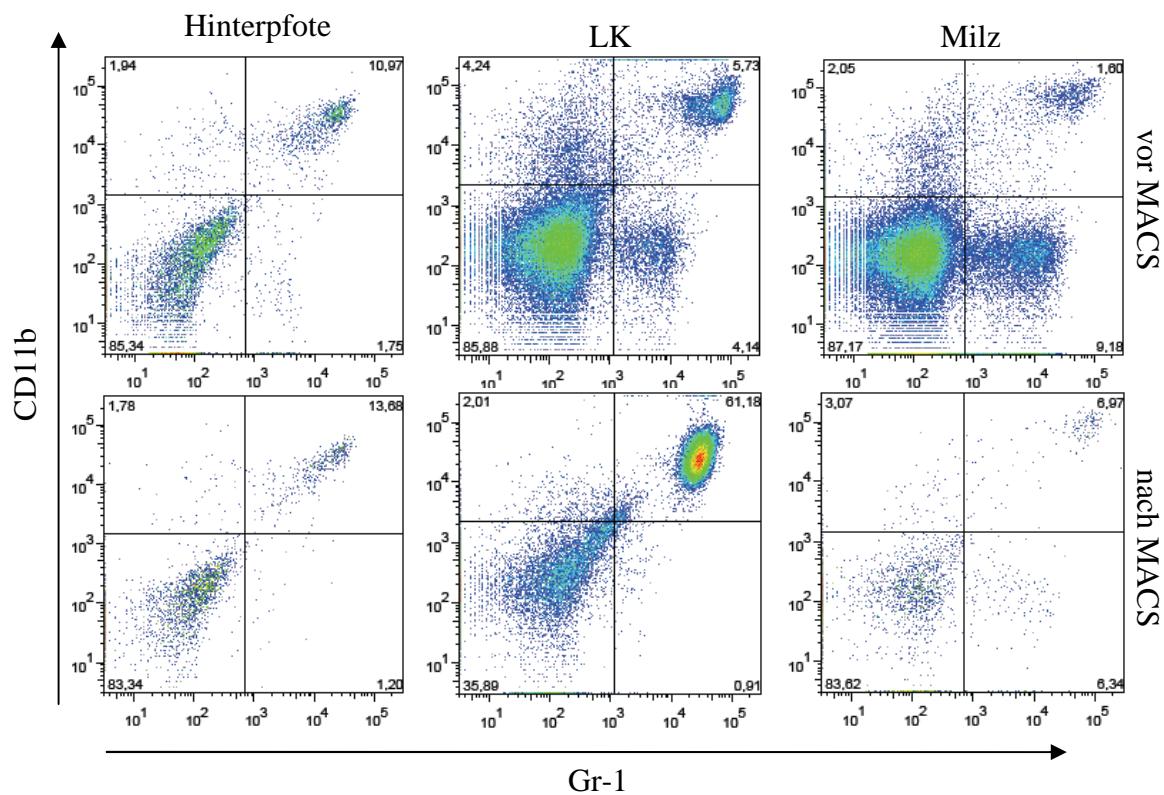
Eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung von neutrophilen Granulozyten bot sich demnach in der Magnetic Cell Separation (MACS) von Ly-6G<sup>+</sup> Zellen. Dazu wurden die Ly-6G<sup>+</sup> Zellen aus den beiden Hinterpfoten, den beiden poplitealen Lymphknoten und der Milz von je zwei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen entsprechend Punkt 3.3. magnetisch mittels AK markiert, über eine MACS-Säule angereichert und anschließend mittels FACS auf ihren Gr-1- und CD11b-Rezeptorstatus hin analysiert (vgl. Abbildung 5). Analog zum Vorgehen in Punkt 4.1.1. wurden nur solche Zellen ausgewertet, die in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich lagen.

Vor der MACS-Selektion lassen sich bei den Zellen aus den Hinterpfoten und der Milz eine deutliche Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> (Neutrophile oder MDSCs), eine Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, eine Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>, sowie eine Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> Population unterscheiden. Aus den Lymphknoten kann eine weitere Population aus Gr-1<sup>int</sup>CD11b<sup>high</sup> Zellen isoliert werden (am ehesten Makrophagen). Im Zuge der Passage durch eine MACS-Säule verändert sich der Anteil an Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus den Hinterpfoten von BALB/c von 4,23 % auf 8,77 % und bei den C57BL/6 von 10,97 % auf 13,68 % praktisch nicht. Ebenso unzureichend kann die Menge an Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus der Milz gesteigert werden: Bei den BALB/c-Tieren steigt ihr Anteil von 1,09 % auf 17,27 %, bei den C57BL/6-Tieren von 1,6 % auf 6,97 %. Bei den Isolaten aus den poplitealen Lymphknoten lässt sich hingegen eine deutliche Anreicherung feststellen. Bei den Zellen aus den BALB/c-Tieren gelingt eine Steigerung von 5,36 % auf 79,75 %, bei C57BL/6 von 5,73 % auf 61,18 %, wobei vor allem der Anteil an Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> Zellen zunimmt. Wie in der Abbildung 5 zu sehen ist, lässt sich nach der MACS bei allen Organen der Verlust einer Population von Gr-1<sup>low</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen, sowie im Lymphknoten einer Gr-1<sup>int</sup>CD11b<sup>high</sup> Population (Makrophagen) feststellen.

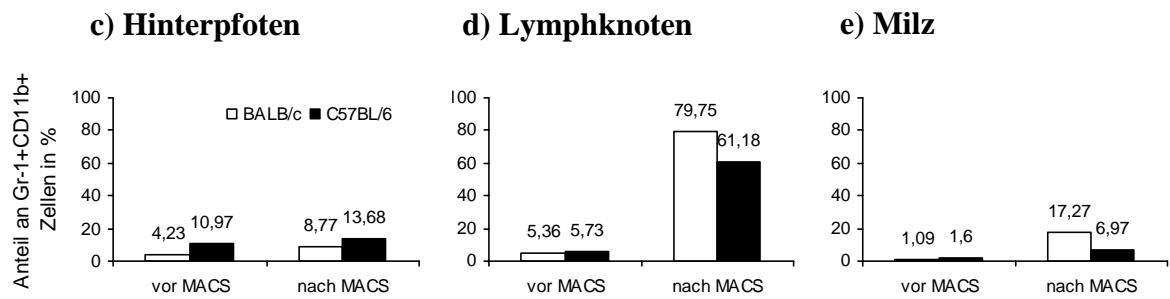
a) BALB/c



b) C57BL/6



**Abb. 5:** Eine deutliche Aufreinigung Ly-6G<sup>+</sup> Zellen gelingt mittels MACS lediglich bei den Zellpräparationen aus den Lymphknoten...  
Fortsetzung der Abbildung auf der folgenden Seite.



**Abb. 5:** Eine deutliche Aufreinigung Ly-6G<sup>+</sup> Zellen gelingt mittels MACS lediglich bei den Zellpräparationen aus den Lymphknoten. Die Zellen aus den gepoolten Hinterpfoten (linke Spalte), poplitealen Lymphknoten (mittlere Spalte) sowie Milzen aus je zwei BALB/c- (a) und C57BL/6-Mäusen (b) wurden mit AK gegen CD11b und Gr-1 gefärbt (vor MACS). Anschließend erfolgte eine Anreicherung Ly-6G-positiver Zellen mittels MACS (nach MACS). Die Figuren c), d) und e) zeigen den Anteil Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen vor und nach dem MACS. Die gezeigten Daten stammen aus einem einzelnen Experiment.

In einem weiteren Experiment sollte die Leistungsfähigkeit des MACS-Verfahrens auch bei Zellen peritonealer Herkunft nach einer Vorbehandlung der Tiere mit Thioglycollat-Medium evaluiert werden (Daten nicht gezeigt). Die gewonnenen Zellen aus 4 BALB/c- und 3 C57BL/6-Mäusen wurden jeweils gepoolt *in vitro* im Verhältnis eins zu fünf für 24 Stunden mit Leishmanien inkubiert und anschließend hinsichtlich des Oberflächenantigens Ly-6G magnetisch anreichert. Vor und nach dem MACS wurde ein Teil der Zellen entnommen und mittels FACS auf den Gr-1- und CD11b-Rezeptorstatus analysiert. Wie nach den Ergebnissen aus Punkt 4.1.1. zu erwarten ist, findet sich im Peritonealraum beider Mausstämme eine zahlenmäßig kräftige Population Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>int</sup> Zellen (Neutrophile) und eine kleinere Gruppe Gr-1<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup> Zellen (Makrophagen). Daneben lassen sich weitere Populationen aus Gr-1<sup>low</sup>CD11b<sup>-</sup>, Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>low</sup>, sowie Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen unterscheiden. Über die magnetische Anreicherung Ly-6G<sup>+</sup> Zellen erhöht sich vorwiegend der Anteil der Gr-1<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup> Zellen, während die Population der Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>int</sup> Zellen eher schwächer wird. Daneben verschwinden die Gr-1<sup>low</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen praktisch völlig. Insgesamt steigt der Anteil Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen bei den BALB/c-Tieren von 25 % auf 26 % und bei den C57BL/6-Mäusen von 23 % auf 32 % unzureichend an.

Die Gründe für das Versagen der MACS-Anreicherung von Granulozyten aus der Milz, dem Peritonealraum und vor allem dem Fuß bleiben spekulativ. Möglicherweise verhindert die Präparation der Zellen aus den Hinterpfoten mit Kollagenase eine feste Bindung der AK. Diese Beobachtungen, die sich auch in weiteren Versuchen bestätigt haben, haben dazu geführt, dass die MACS-Methode zur Anreicherung Ly-6G<sup>+</sup> Zellen (Granulozyten) nicht weiter verfolgt wurde.

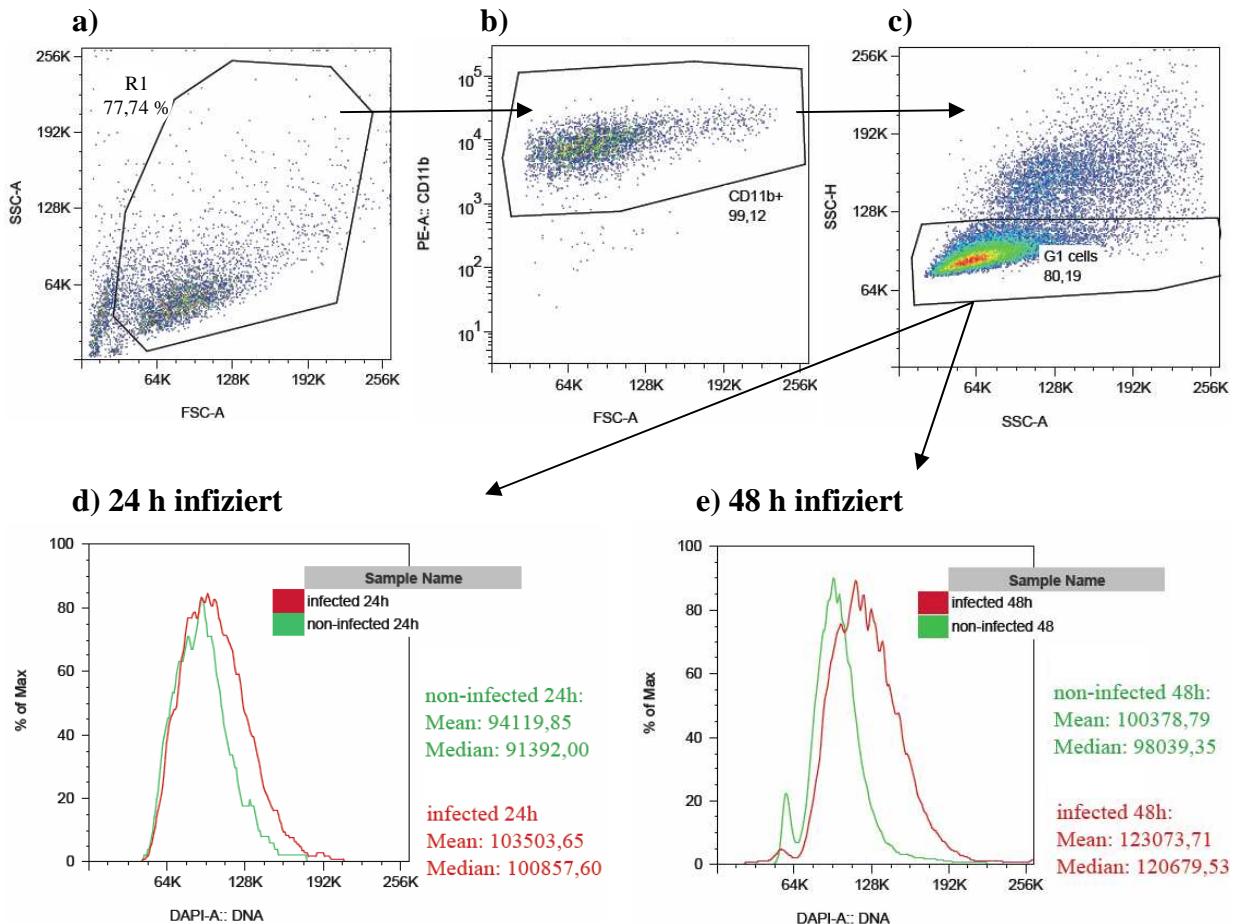
### 4.1.3. DAPI-Färbung zum Nachweis intrazellulärer Parasiten

Dem Nachweis einer stattgefundenen Infektion von Zellen mit dem Parasiten *L. major* kam in dieser Arbeit eine entscheidende Bedeutung zu. Leishmanien sollten dabei nicht nur zuverlässig, sondern auch in möglichst kleiner Zahl detektiert werden können. Eine Möglichkeit dazu bot sich im Einsatz von DAPI, einem fluoreszierenden Farbstoff, der in die RNS und DNS sowohl der Wirtszelle, wie auch der Leishmanien interkaliert. Mit zunehmender Parasitenzahl nimmt die Fluoreszenz entsprechend des DNS-Gehaltes der Leishmanien zu.

In einem ersten Versuch wurden Peritonealzellen aus einer BALB/c-Maus, der 5 Tage zuvor 2,5 ml 2-prozentiges Thioglycollat-Medium i.p. injiziert worden war, für 3 Stunden in Zellkulturmedium inkubiert und dann entsprechend Punkt 3.4. adhärierte Makrophagen gewonnen. Ein Teil von diesen wurde für 24 und 48 Stunden in einem Verhältnis von 1 zu 20 mit *L. major* inkubiert. Anschließend konnten extrazelluläre Parasiten und nicht-adhärierte Zellen mittels DPBS weggeschwemmt und die verbliebenen Zellen (Makrophagen) mit DAPI und fluorochrommarkierten AK gegen CD11b gefärbt werden (siehe Abbildung 6). Für die weitere Auswertung fanden nur solche Zellen Berücksichtigung, die in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich R1 lagen (Figur 6 a). Von diesen war erwartungsgemäß mit 99,12 % ein Großteil CD11b<sup>+</sup> (Figur 6 b). Mögliche Zelldoublets, die aufgrund des zweifachen DNS-Gehaltes die Auswertung verfälschen würden, konnten in einem Dot-Plot-Diagramm, in dem die SSC-Height gegen die SSC-Area aufgetragen war, detektiert und für die weitere Auswertung ausgeschlossen werden (Figur 6 c).

Vergleicht man die Fluoreszenzniveaus der infizierten Peritonealmakrophagen (rote Kurve) mit den nicht infizierten (grüne Kurve), so zeigt sich nach einer Infektionszeit von 24 Stunden nur ein minimaler Anstieg (Figur 6 d). Nach 48 Stunden lässt sich eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzkurve nach rechts, hin zu höheren Werten, feststellen (Figur 6 e).

Die Trennschärfe zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen ist bei Verwendung von DAPI jedoch relativ gering. Es ist nicht zu erwarten, dass sich das Fluoreszenzniveau durch die DNS weniger Leishmanien deutlich von dem nicht infizierter Zellen abhebt. Und gerade zu Beginn eines Infektionsgeschehens ist mit dem Auftreten von nur wenigen Parasiten intrazellulär zu rechnen. Aus diesem Grund musste mit der Real Time – PCR ein viel sensitiveres Verfahren zum Nachweis intrazellulärer Leishmanien etabliert werden.



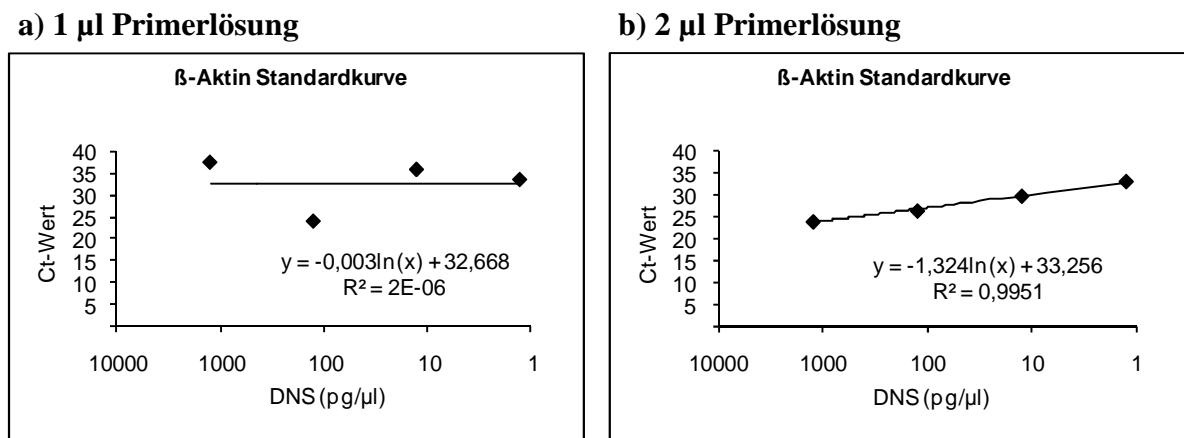
**Abb. 6:** Das interkalierende Fluorogen DAPI eignet sich nicht zur sicheren Unterscheidung von infizierten und nicht mit *L. major* infizierten Zellen in der Frühphase der Infektion. Nach einer Vorbehandlung mit Thioglycollat-Medium wurden die gewonnenen Peritonealmakrophagen einer BALB/c-Maus für 24 Stunden (d) oder 48 Stunden (e) mit *L. major* im Verhältnis 1 zu 20 Parasiten inkubiert. Für die Auswertung wurden nur solche Zellen in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich R1 berücksichtigt (a). Mögliche Zelldoublets der CD11b<sup>+</sup> Zellen (b) wurden ebenfalls aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen (c). Gezeigt werden die Daten aus einem Experiment mit einem BALB/c-Tier.

#### 4.1.4. Real Time – PCR

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mittels der Real Time – PCR möglichst geringe Mengen an Leishmanien-DNS reproduzierbar detektiert und quantifiziert werden. Am Anfang stand dabei die Etablierung zweier Standards. Die genomische DNS aus der Milz einer C57BL/6-Maus diente als erster Standard. Über diesen wurde das Gen für  $\beta$ -Aktin amplifiziert, welches als so genanntes housekeeping-Gen konstitutiv exprimiert wird. Bei dem zweiten Standard handelte es sich um ein Plasmid von Prof. Dr. Christian Drosten vom Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg als Bezug für die *L. major*-DNS. Über diesen ließ sich eine Aussage über die Anzahl der in der Probe enthaltenen Leishmanien treffen, während über den ersten Standard gleichzeitig geklärt wurde, in wie viel Mausgewebe diese Leishmanien enthalten waren. Die verwendeten

Konzentrationen und Bezeichnungen der beiden Standards sind in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

Die initialen Experimente sollten die erforderliche Menge an Primer pro Ansatz klären. Dabei zeigte sich, dass beim Einsatz von 2  $\mu$ l einer 10  $\mu$ M Primerlösung die Ct-Werte der Standardpunkte eine ihrer Konzentration entsprechende Verteilung und damit einen hohen Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,9951$  aufweisen. Dies ist bei der Verwendung von 1  $\mu$ l der Primerlösung hingegen nicht so, wie in Abbildung 7 zu erkennen ist. Hier liegen die einzelnen Messpunkte der Standardkurve nicht auf einer Geraden und es ergibt sich folglich mit  $R^2 = 2 \cdot 10^{-6}$  ein niedriger Korrelationskoeffizient. Fortan wurden für die Real Time – PCR stets 2  $\mu$ l der 10  $\mu$ M Primerlösung eingesetzt.

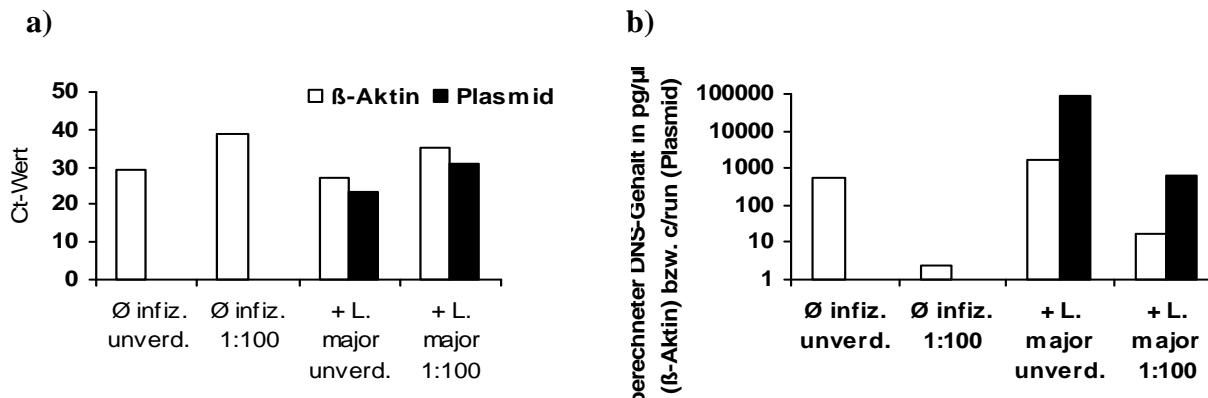


**Abb. 7:** Qualität der  $\beta$ -Aktin-Standardkurve in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Primer: In einer Real Time – PCR wurden jedem Ansatz 1  $\mu$ l (a) oder 2  $\mu$ l (b) einer 10  $\mu$ M Primerlösung zugegeben. Erst bei der Verwendung von 2  $\mu$ l Primerlösung liegen die einzelnen Messwerte auf einer Geraden und liefern eine Standardkurve mit einem hohen Korrelationskoeffizienten  $R^2$ .

Zur Sicherstellung, dass es zur Amplifikation nur eines einzigen PCR-Produktes kommt, erfolgte zusätzlich eine gelelektrophoretische Kontrolle (nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass der Plasmid-Primer auch Abschnitte aus dem Mausgenom amplifiziert, wurde in einem weiteren Versuch (dargestellt in Abbildung 8) die DNS von nicht infizierten und von *in vitro* infizierten neutrophilen Granulozyten aus einer BALB/c-Maus in einer Real Time – PCR eingesetzt. Unter Verwendung des  $\beta$ -Aktin-Primers konnte sowohl bei den infizierten, als auch bei den nicht infizierten Zellen DNS amplifiziert werden, mit Hilfe des Plasmid-Primers hingegen ausschließlich bei der infizierten Zellpopulation. Abbildung 8, Figur a zeigt die Ct-Werte, Figur b den daraus berechneten Gehalt von Maus-DNS in pg pro  $\mu$ l für  $\beta$ -Aktin bzw. die Anzahl an Leishmanien-Genkopien pro PCR-Zyklus (c/run) für das

Plasmid. Alle Proben wurden dabei unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, die sich in der Figur b schön nachvollziehen lässt: So errechnet sich für die Maus-DNS der infizierten Zellpopulation unverdünnt ein Gehalt von 1599 pg/µl, für die verdünnte Probe von 17,68 pg/µl. Dies bestätigt die quantitative Aussagekraft der Real Time – PCR.



**Abb. 8:** Über den Plasmid-Primer (schwarze Balken) gelingt der Nachweis von Leishmanien-DNS nur bei den mit *L. major* infizierten Proben, nicht jedoch bei den nicht infizierten. Bei der Verwendung des β-Aktin-Primers (weiße Balken) wird sowohl bei den infizierten, als auch bei den nicht infizierten Proben murine DNS nachgewiesen. Gezeigt werden die Messwerte eines einzelnen Experimentes, bei dem die Neutrophilen aus dem Peritonealraum einer BALB/c-Maus zur Hälfte im Verhältnis 1 zu 5 mit *L. major* infiziert (+ *L. major*), zur anderen Hälfte ohne den Parasiten inkubiert wurden (Ø infiz.). Die aus den Zellen isolierte DNS wurde unverdünnt (unverd.) sowie in einer Verdünnung 1:100 in einer RT – PCR eingesetzt: Figur a) zeigt die gemessenen Ct-Werte, Figur b) die daraus berechneten DNS-Konzentrationen in pg/µl für β-Aktin und in c/run für das Plasmid.

Umgekehrt konnte in einer anderen Real Time – PCR, in der die DNS aus einer *L. major*-Suspension eingesetzt wurde, demonstriert werden, dass es nur bei der Verwendung des Plasmid-Primers zu einer Replikation kommt, nicht aber bei Einsatz des Primers für β-Aktin (Daten nicht gezeigt). Somit war auch sichergestellt, dass es über den β-Aktin-Primer zu keiner Amplifikation der *L. major*-DNS kommt.

Abschließend wurden die PCR-Reagenzien verschiedener Hersteller auf eine mögliche Optimierung der Real Time – PCR überprüft. Die Master-Mixes aller fünf getesteten Hersteller erbrachten hinsichtlich der Standardkurve allerdings ähnlich hohe Korrelationskoeffizienten zwischen 0,9738 und 0,9964 (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurde aus Kostengründen mit dem SYBR Green Supermix der Firma BioRad gearbeitet.

## 4.2. *In vitro* – Experimente

### 4.2.1. Histologie

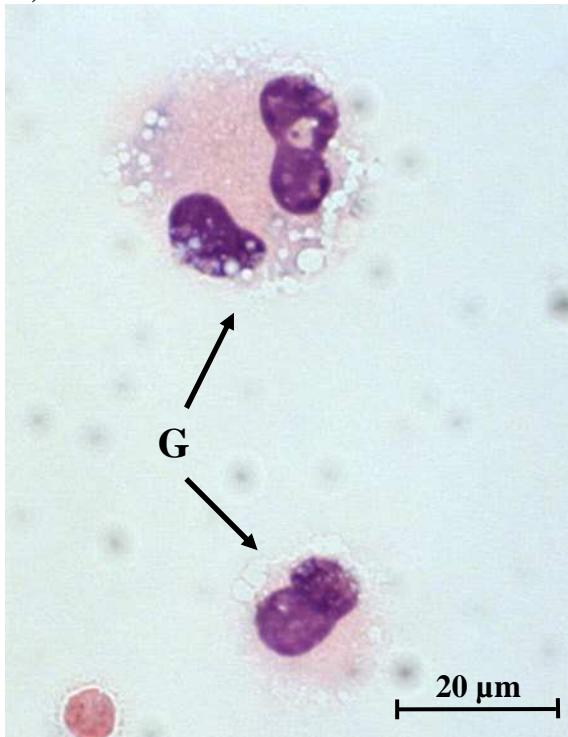
Zunächst sollten die Auswirkungen einer Infektion von *in vitro* kultivierten Zellen mit *L. major* untersucht werden. Einen ersten Schritt stellte die lichtmikroskopische Bestätigung einer erfolgreichen Infektion mit dem Erreger dar. Hierzu wurden nach einer intraperitonealen Injektion von 2-prozentigem Thioglycollat-Medium für 16 Stunden die aus je zwei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen gewonnenen Peritonealzellen jeweils gepoolt und zu einem Teil für 25 Stunden im Verhältnis eins zu fünf mit *L. major* inkubiert. Ein zweiter Teil der Zellen blieb frei von Leishmanien. Anschließend konnten die Zellen mit DPBS gewaschen, fixiert und, nach erfolgtem CytoSpin, nach Giemsa gefärbt werden. Abbildung 9 zeigt zum einen Neutrophile, die frei von Leishmanien geblieben waren, extrazelluläre Parasiten mit ihrem Zellkern und Kinetoplasten, sowie intrazelluläre *L. major*. Damit bestätigte sich die Möglichkeit einer Infektion von Zellen unter *in vitro*-Verhältnissen.

In einem zweiten Versuch sollten etwaige histologische Unterschiede zwischen infizierten Peritonealzellen aus BALB/c- und C57BL/6-Tieren zur Darstellung kommen. Von Interesse waren dabei die Morphologie der Zellen, sowie Unterschiede in der Zellzusammensetzung und der Parasitenlast je Zelle. Hierzu wurde je zwei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen 2-prozentiges Thioglycollat-Medium intraperitoneal injiziert und nach 16 Stunden ein Teil der Zellen aus der Peritoneallavage für 25 Stunden im Verhältnis 1 zu 5 mit *L. major* bei 37°C inkubiert. Die Kultur des anderen Teils der Zellen aus den C57BL/6-Mäusen blieb frei von Leishmanien. Nach einem CytoSpin erfolgte eine Färbung der Zellen nach Giemsa.

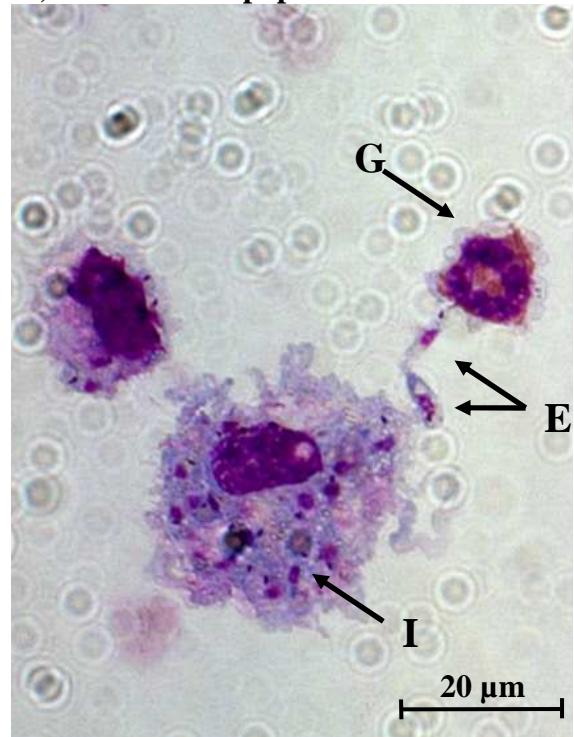
Unter dem Mikroskop ließen sich 4 verschiedene morphologische Typen von Zellen identifizieren, die in der Abbildung 10 dargestellt sind. Es handelte sich dabei um:

- Typ A kleine bis mittelgroße Zellen mit einem segmentierten Zellkern (typisch für Granulozyten),
- Typ B große Zellen mit einem unregelmäßigen Zellkern,
- Typ C große Zellen mit einem runden Zellkern, sowie
- Typ D kleine Zellen mit einem großen runden Zellkern (typisch für Lymphozyten).

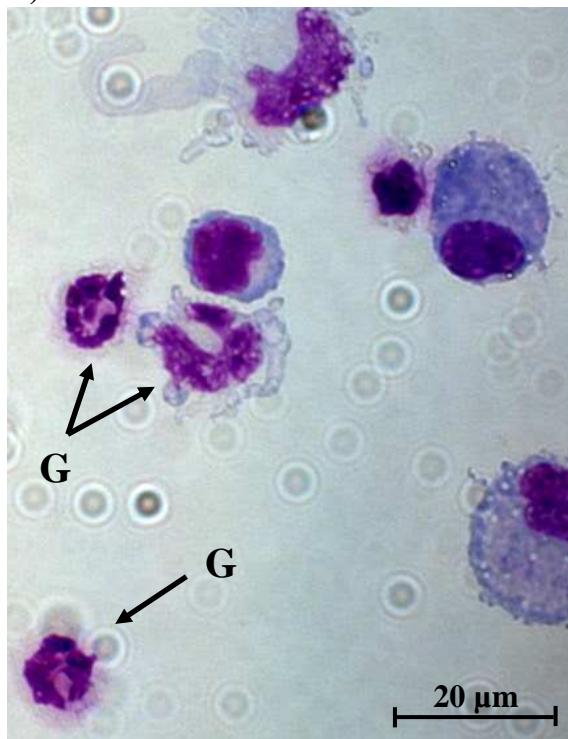
a) nicht infizierte Zellen aus BALB/c



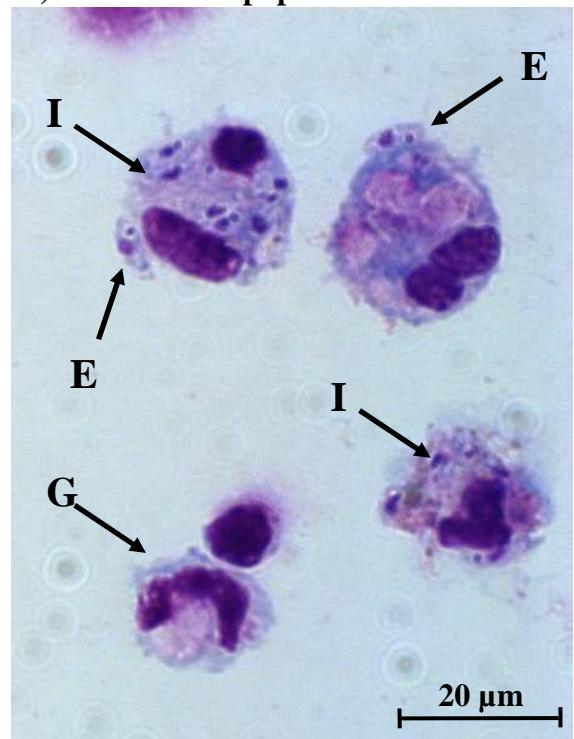
b) infizierte Zellpopulation aus BALB/c



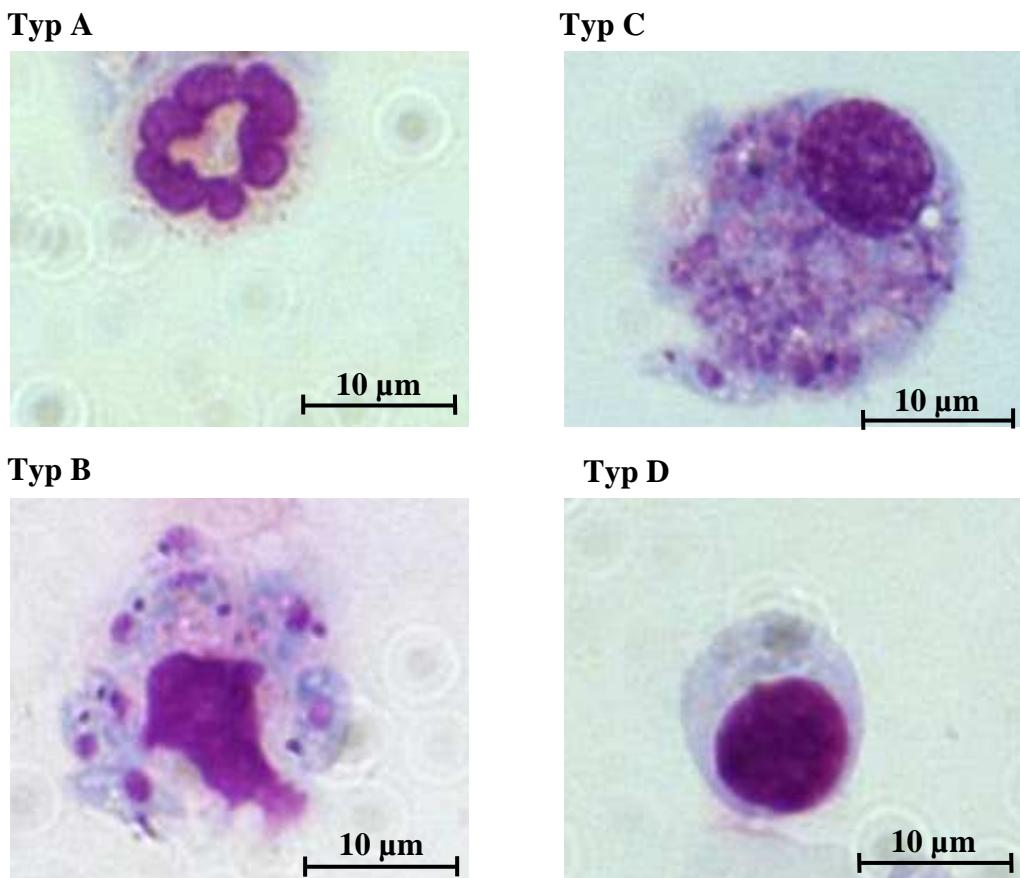
c) nicht infizierte Zellen aus C57BL/6



d) infizierte Zellpopulation aus C57BL/6



**Abb. 9:** Lichtmikroskopische Bestätigung einer erfolgreichen Infektion von Peritonealzellen mit dem Parasiten *L. major*. Die aus dem Peritonealraum je zweier BALB/c- und C57BL/6-Tiere nach vorhergehender Behandlung mit Thioglycollat-Medium stammenden Zellen wurden zu einem Teil für 25 Stunden im Verhältnis eins zu fünf mit *L. major* inkubiert (b, d), während der andere Teil frei von Leishmanien blieb (a, c). Nach einem CytoSpin erfolgte eine Färbung der Zellen nach Giemsa. Auf den Bildern fallen nicht-infizierte Granulozyten mit ihrem typisch segmentierten Zellkern (G), extrazelluläre Leishmanien mit Kern und Kinetoplast (E), sowie intrazelluläre Leishmanien (I) auf.



**Abb. 10:** Lichtmikroskopisch lassen sich unter den nach Giemsa gefärbten Peritonealzellen vier verschiedene Typen unterscheiden. Die abgebildeten Zellen sind repräsentativ aus einer Peritoneallavage nach einer i.p. Applikation von 2-prozentigem Thioglycollat-Medium und anschließender *in vitro* Infektion mit *L. major* im Verhältnis 1 zu 5 ausgewählt. Beim Zelltyp A handelt es sich um mittelgroße bis kleine Zellen mit einem segmentierten Zellkern, was der typischen Morphologie eines Granulozyten entspricht. Relativ große Zellen mit einem unregelmäßig geformten Kern bilden den Zelltyp B, während ähnlich große Zellen mit einem runden Kern den Typ C repräsentieren. Relativ kleine Zellen mit einem verhältnismäßig großen, runden Zellkern stellen den Typ D dar und entsprechen einem typischen Lymphozyten. Bedeutsam ist dabei, dass die Zelltypen B und C - wie auch in den obigen Abbildungen - meistens mit Parasiten infiziert waren.

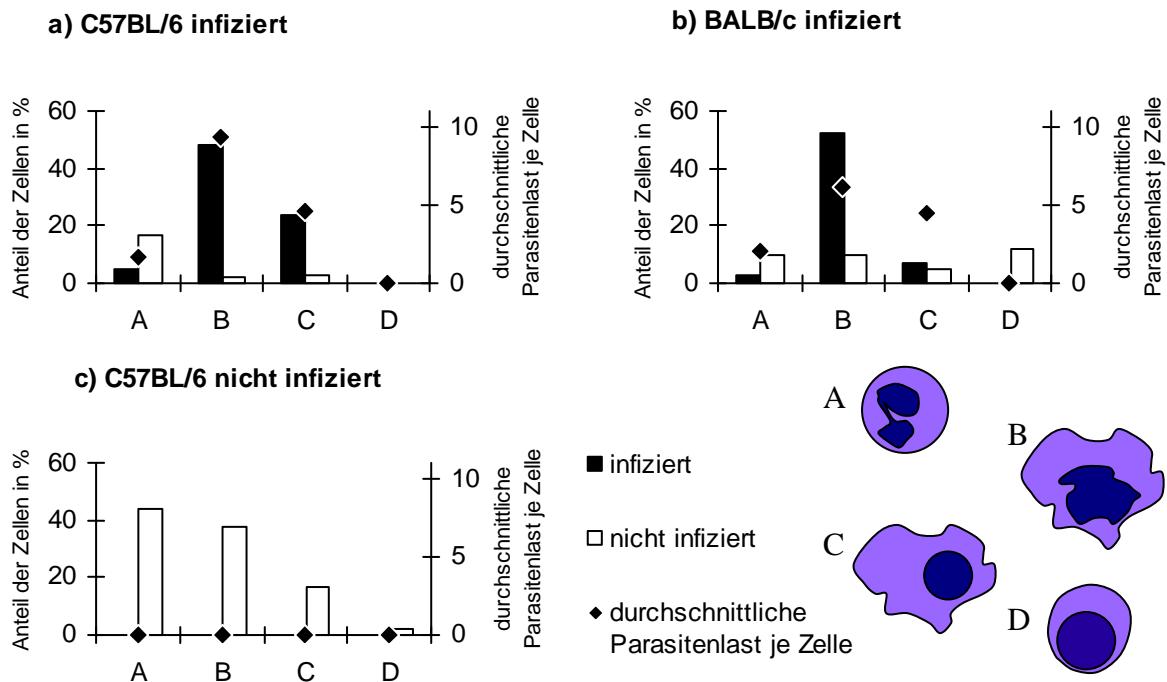
Bei dem vorliegenden Experiment wurden je Präparat mehrere zusammenhängende Gesichtsfelder mit mindestens 50 Zellen ausgezählt. Betrachtet man die Zellzusammensetzung der nicht mit *L. major* inkubierten Peritonealzellen aus den C57BL/6-Tieren, so zeigt sich eine zahlenmäßige Überlegenheit des Zelltyps A mit 44 % und der großen Zellen mit einem unregelmäßigen Kern (Zelltyp B) mit 38 %. Die Zelltypen C und D folgen mit 17 % und 2 % der ausgezählten Zellen.

Diese Verhältnisse, dargestellt in Abbildung 11, ändern sich bei den mit *L. major* inkubierten Zellen aus den C57BL/6-Mäusen. Mit 48 % aller ausgezählten Zellen dominieren nun infi-

zierte Zellen vom Typ B, mit einer durchschnittlichen Parasitenlast von 9,4 Leishmanien je Zelle. Nur 2 % der Zellen sind parasitenfreie Zellen vom Typ B. Die zweitgrößte Population bilden mit 24 % und einer durchschnittlichen Parasitenlast von 4,6 Leishmanien pro Zelle infizierte Zellen vom Typ C. Wie beim Zelltyp B, sind praktisch alle Zellen vom Typ C infiziert. Stark zurückgegangen ist im Vergleich zu der nicht mit Parasiten inkubierten Zellpopulation der Anteil an Typ A Zellen. Nicht infizierte Typ A Zellen machen nur noch 17 % aller ausgezählten Zellen aus, infizierte Typ A Zellen lediglich 5 % (mit im Mittel 1,7 Leishmanien je Zelle). Insgesamt sind 78 % der ausgezählten Zellen infiziert.

Die Bedingungen bei den mit *L. major* inkubierten Peritonealzellen aus den BALB/c-Mäusen sind recht ähnlich. Auch hier überwiegen anteilmäßig mit 52 % infizierte Zellen vom Typ B (mit 6,1 Parasiten pro Zelle), während nur 10 % parasitenfreie Zellen vom Typ B sind. Viel geringer ist indes der Anteil an infizierten Zellen vom Typ C, der bei 7 % liegt (durchschnittliche Parasitenlast beträgt 4,5 *L. major* je Zelle). 62 % der ausgezählten Zellen stellen sich infiziert dar.

Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Inkubation von Peritonealzellen mit dem Parasiten *L. major* Einfluss auf die Zellzusammensetzung nach 25 Stunden hat. So liegen in der infizierten Zellpopulation deutlich weniger Zellen vom Typ A vor, die morphologisch am ehesten Neutrophilen entsprechen. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Zellen in Anwesenheit der Leishmanien vermehrt in Apoptose gehen oder aber ihre Morphologie durch die Aufnahme von Parasiten ändern. Die meisten der infizierten Zellen sind dem Typ B zuzuordnen. Aufgrund der unregelmäßigen Kernstruktur könnte es sich dabei um Zellen handeln, die sich im Prozess der Apoptose befinden, darunter wahrscheinlich auch apoptotische Neutrophile. Der Anteil derartiger vermeintlich apoptotischer, infizierter Zellen liegt bei beiden Mausstämmen um die 50 %. Jedoch enthalten sie bei den C57BL/6-Tieren mehr Leishmanien als bei den BALB/c (9,4 vs. 6,1 *L. major* pro Zelle). Unklar bleibt, ob dies an einer höheren Phagozytosekapazität der C57BL/6-Zellen liegt.



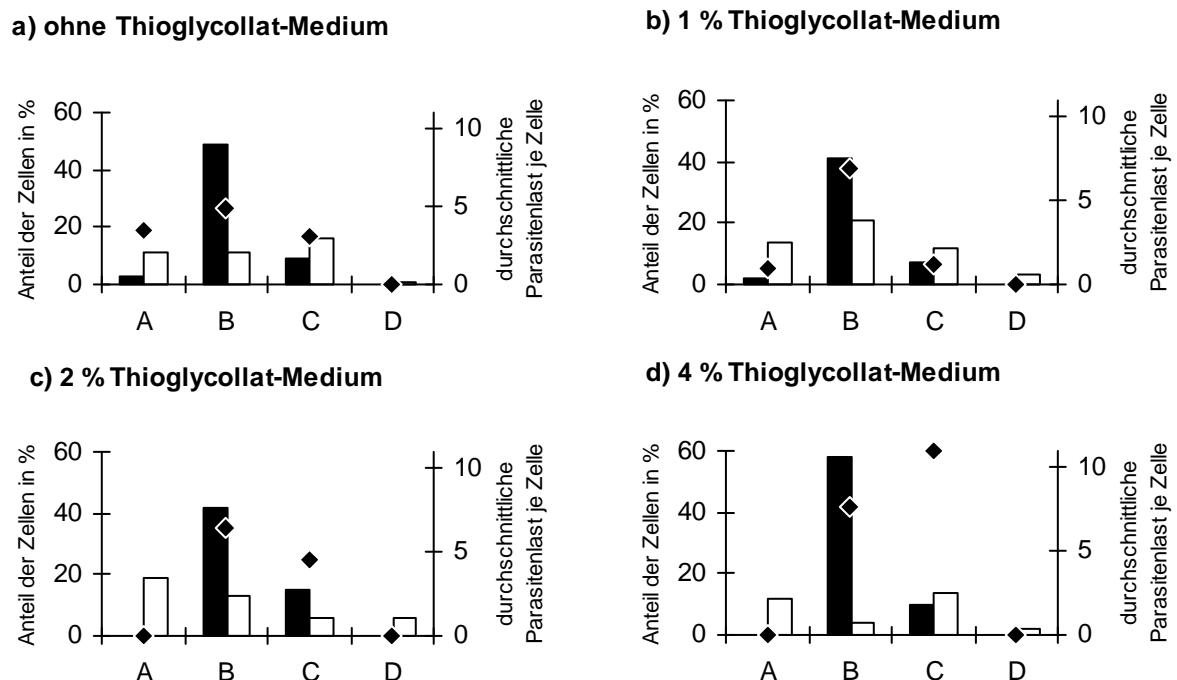
**Abb. 11:** Charakterisierung von *in vitro* infizierten Peritonealzellen hinsichtlich ihrer Morphologie (Zuordnung zu den Zelltypen A, B, C oder D), ihres Infektionsstatus (schwarzer Balken = infizierte Zelle, weißer Balken = nicht infizierte Zelle) und der durchschnittlichen Parasitenlast in den infizierten Zellen (◆). Die Zellen stammen aus dem Peritonealraum zweier C57BL/6- (a, c) und BALB/c-Mäuse (b) nach vorhergehender Applikation von Thioglycollat-Medium. Sie wurden für 25 Stunden *in vitro* im Verhältnis 1 zu 5 mit *L. major* infiziert und anschließend nach Giemsa gefärbt; ein Teil der Zellen aus den C57BL/6-Tieren wurde nicht mit Leishmanien inkubiert und dient als Vergleich (c). Gezeigt werden die Daten aus einem Experiment, bei dem die Peritonealzellen aus je zwei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen zusammengefasst wurden.

Zuletzt sollte der Einfluss der Konzentration an Thioglycollat-Medium auf die Zellzusammensetzung der Peritoneallavage beurteilt werden. Je einer C57BL/6-Maus wurden dazu 2 ml Thioglycollat-Medium der Konzentration 1 %, 2 %, sowie 4 % intraperitoneal injiziert. Einem weiteren Tier wurden als Nullkontrolle lediglich 2 ml DPBS appliziert. Die anschließend gewonnenen Peritonealzellen wurden dann für 22 Stunden in einem Verhältnis von 1 zu 5 mit *L. major* inkubiert und nach dem CytoSpin nach Giemsa gefärbt. Auch in diesem Versuch wurden die Zellen den oben genannten vier Zelltypen zugeordnet und mindestens 50 Zellen pro Objektträger ausgezählt.

Wie in Abbildung 12 gezeigt, bleiben auch hier infizierte Zellen vom Typ B die dominierende Population. Mit Ausnahme der Zellen aus dem mit Thioglycollat-Medium der Konzentration 4 % behandelten Tier, ist die Parasitenlast in diesen Zellen am höchsten. Zellen vom Typ D sind nie infiziert, solche vom Typ A nur selten. Das Zellprofil im Peritonealraum ändert sich

durch die Gabe von verschiedenen Konzentrationen an Thioglycollat-Medium morphologisch wenig.

Die Resultate aus dem Versuch 4.1.1. zeigen, dass die Konzentration der Thioglycollatlösung Einfluss auf den Anteil  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  Zellen und damit der Neutrophilen hat und bei Verwendung der 2-prozentigen Lösung eine optimale Ausbeute gewährleistet ist. Der Anteil der Zellen vom Typ A unterscheidet sich bei den verschiedenen konzentrierten Thioglycollatlösungen jedoch kaum. Dies mag einerseits daran liegen, dass sich Neutrophile auch unter den Zelltypen B und C finden: Bedingt durch den Volumenbedarf eingedrungener Leishmanien oder durch die Einleitung der Apoptose ändert sich die Morphologie der Neutrophilen. Möglicherweise führt auch eine verstärkte Apoptose der Neutrophilen während der Infektion dazu, dass der Zelltyp A nach den 22 Stunden nur noch spärlich vorhanden ist.

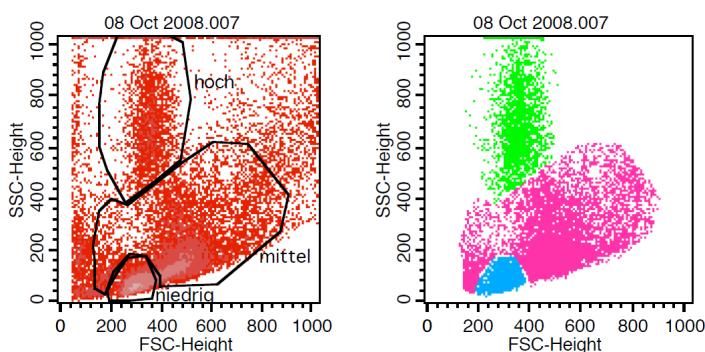


**Abb. 12:** Beurteilung von *in vitro* infizierten Peritonealzellen hinsichtlich ihrer Morphologie (Zelltypen A, B, C oder D), ihres Infektionsstatus (schwarzer Balken = infiziert, weißer Balken = nicht infiziert) und der durchschnittlichen Parasitenlast in den infizierten Zellen (◆). Die Zellen wurden aus je einer C57BL/6-Maus gewonnen, der 16 Stunden vor der Lavage entweder 2 ml DPBS (a), oder aber 2 ml einer 1- (b), 2- (c) oder 4-prozentigen Thioglycollatlösung (d) i.p. appliziert worden waren. Die gewonnenen Zellen wurden für 22 Stunden *in vitro* im Verhältnis 1 zu 5 mit *L. major* infiziert und anschließend nach Giemsa gefärbt. Dabei zeigt sich, dass vor allem Zellen vom Typ B mit dem Parasiten infiziert sind und mit Ausnahme der Zellen aus dem mit Thioglycollat-Medium der Konzentration 4 % behandelten Tier die höchste Parasitenlast pro Zelle aufweisen. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse aus einem Experiment.

#### 4.2.2. Infektionskinetik und Apoptoseverhalten *in vitro* – infizierter Granulozyten

Neutrophile Granulozyten fungieren als erste Wirtszellen für den obligat intrazellulären Parasiten *L. major* (Peters *et al.*, 2008, Müller *et al.*, 2001). In ihnen ist er geschützt vor anderen Komponenten des Immunsystems wie Komplement und NK-Zellen. Studien haben gezeigt, dass *L. major* die Aktivierung der Caspase-3 in humanen Neutrophilen verhindert und damit deren Apoptose verzögert (Aga *et al.*, 2002). Dadurch verlängert sich die durchschnittliche Lebenszeit der Neutrophilen von 6 bis 10 Stunden auf 2 bis 3 Tage. Bis kurz vor dem Einwandern der endgültigen Wirtszellen, der Makrophagen, können sie den Leishmanien damit als sichere Zufluchtmöglichkeit dienen (Peters *et al.*, 2008).

Das folgende *in vitro*-Experiment sollte zum einen die Infektionskinetik von *L. major* beleuchten und klären, wie viel Prozent der murinen neutrophilen Granulozyten in den ersten 24 Stunden infiziert werden. Zum anderen stand der Vergleich der Apoptoseraten von infizierten und nicht infizierten Zellen im Mittelpunkt des Interesses. Dazu wurden die Peritonealzellen aus je 3 BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach einer Vorbehandlung mit Thioglycollat-Medium jeweils vereinigt und hälftig mit CFSE markierten Leishmanien (*L. major*<sup>CFSE</sup>) inkubiert. Um auszuschließen dass das Thioglycollat-Medium selbst einen Einfluss auf die Infektionskinetik und das Apoptoseverhalten hat, wurden analog dazu die Peritonealzellen aus ebenfalls 3 BALB/c- und 3 C57BL/6-Tieren behandelt, die entsprechend Punkt 3.2. mit Caseinhydrolysat vorbehandelt worden waren. 3, 6 und 23 Stunden nach Beginn der Inkubation mit *L. major* wurde ein Teil der Zellen entnommen und in getrennten Ansätzen zum einen gegen Annexin V, einen Apoptosemarker, zum anderen gegen Gr-1 und CD11b gefärbt.

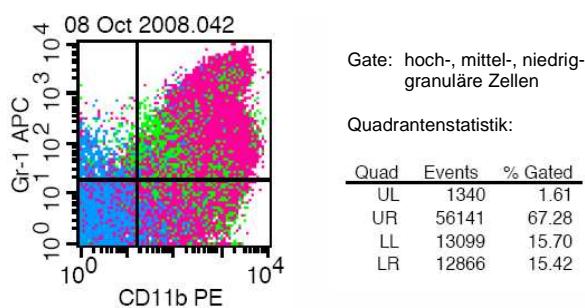


**Abb. 13:** Repräsentatives dot-plot-Diagramm mit Vorliegen dreier Zellpopulationen unterschiedlicher Granularität: hoch- (grün), mittel- (violett), und niedriggranulär (blau).

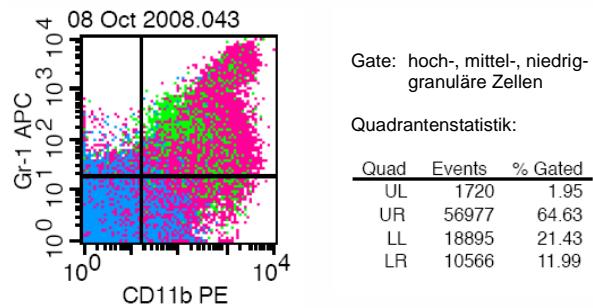
Um die Zellzusammensetzung im Peritonealraum nach der Behandlung der Tiere mit Thioglycollat-Medium beziehungsweise Caseinhydrolysat zu prüfen erfolgte direkt nach der Bauchraumspülung eine FACS-Analyse der Lavage. Die Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives dot-

plot-Diagramm, in dem das Vorliegen dreier Zellpopulationen auffällt, die sich hinsichtlich ihrer Seitwärtsstreuung SSC und damit Granularität unterscheiden: Es liegen eine hoch-, eine mittel-, sowie eine niedriggranuläre Population vor. Für die folgende Auswertung finden nur solche Zellen Berücksichtigung, die Teil einer dieser Populationen sind. In Bezug auf ihren Gr-1- und CD11b-Rezeptorstatus unterscheiden sich die über Thioglycollat-Medium und Caseinhydrolysat generierten Zellen praktisch nicht, wie Abbildung 14 verdeutlicht. 67 % der hoch-, mittel- und niedriggranulären Zellen aus den C57BL/6-Mäusen sind nach der Gabe von Thioglycollat-Medium  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$ , bei den BALB/c sind es 52 %. Nach Applikation von Caseinhydrolysat sind 65 % der Zellen aus den schwarzen C57BL/6-Tieren und 44 % aus den BALB/c  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$ . Bei differenzierterer Betrachtung handelt es sich bei den niedriggranulären Zellen zum überwiegenden Teil um  $\text{Gr-1}^- \text{CD11b}^-$  Zellen (mutmaßlich unter anderem Lymphozyten). Bei den  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  Zellen, die hauptsächlich von den mittel- und hochgranulären Zellpopulationen gebildet werden, lassen sich eine Population aus  $\text{Gr-1}^{\text{high}} \text{CD11b}^{\text{high}}$  Zellen (Neutrophile und MDSCs) und eine weitere aus  $\text{Gr-1}^{\text{low}} \text{CD11b}^{\text{high}}$  Zellen (wahrscheinlich Makrophagen) unterscheiden. Es fällt auf, dass aus dem Peritonealraum der BALB/c-Tiere etwa 15-20 % weniger  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  Zellen isoliert werden konnten, als aus den C57BL/6-Mäusen. Dafür fällt der Anteil an  $\text{Gr-1}^- \text{CD11b}^-$  und  $\text{Gr-1}^- \text{CD11b}^+$  Zellen etwas höher aus (vgl. Abb. 14 e, f).

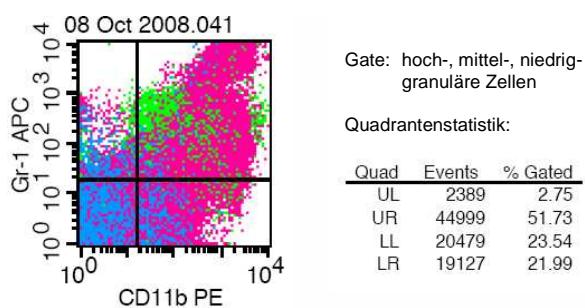
### a) C57BL/6, Thioglycollat-Medium



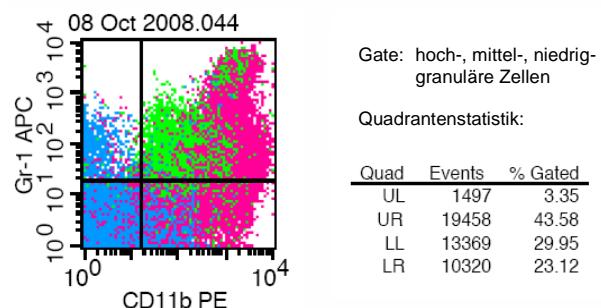
### b) C57BL/6, Caseinhydrolysat



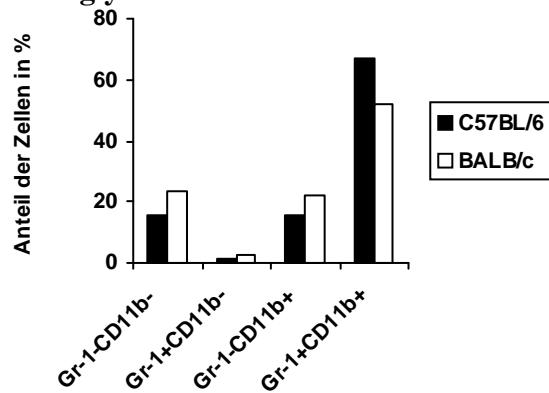
### c) BALB/c, Thioglycollat-Medium



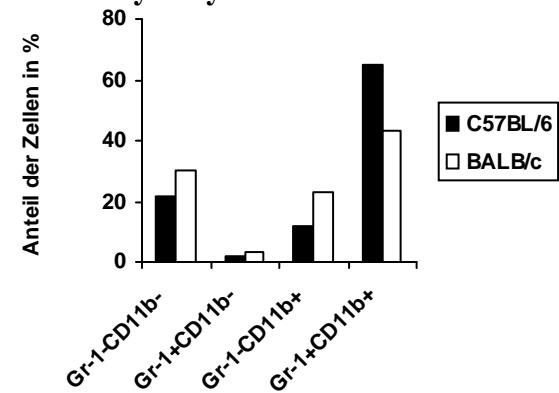
### d) BALB/c, Caseinhydrolysat



### e) Zellzusammensetzung nach Thioglycollat-Medium



### f) Zellzusammensetzung nach Caseinhydrolysat



**Abb. 14:** Das peritoneale Zellinfiltrat ist nach der Applikation von Thioglycollat-Medium und Caseinhydrolysat hinsichtlich der Oberflächenantigene Gr-1 und CD11b sehr ähnlich. Je 3 C57BL/6- (a, b) und BALB/c-Mäusen (c, d) wurde entweder Thioglycollat-Medium oder Caseinhydrolysat i.p. injiziert und die Peritonealzellen anschließend separat für jeden Mausstamm und jedes applizierte Medium vereinigt. Die gewonnenen Zellen wurden mit AK gegen Gr-1 und CD11b gefärbt und in eine hoch- (grün), mittel- (violett), und niedrig-granuläre Population (blau) unterteilt (vgl. Abb. 13). Die Figuren e) und f) zeigen die Verteilung der Oberflächenantigene Gr-1 und CD11b innerhalb der untersuchten Zellen. Gezeigt werden die Daten aus einem einzelnen Experiment (UL = upper left, UR = upper right, LL = lower left, LR = lower right quadrant).

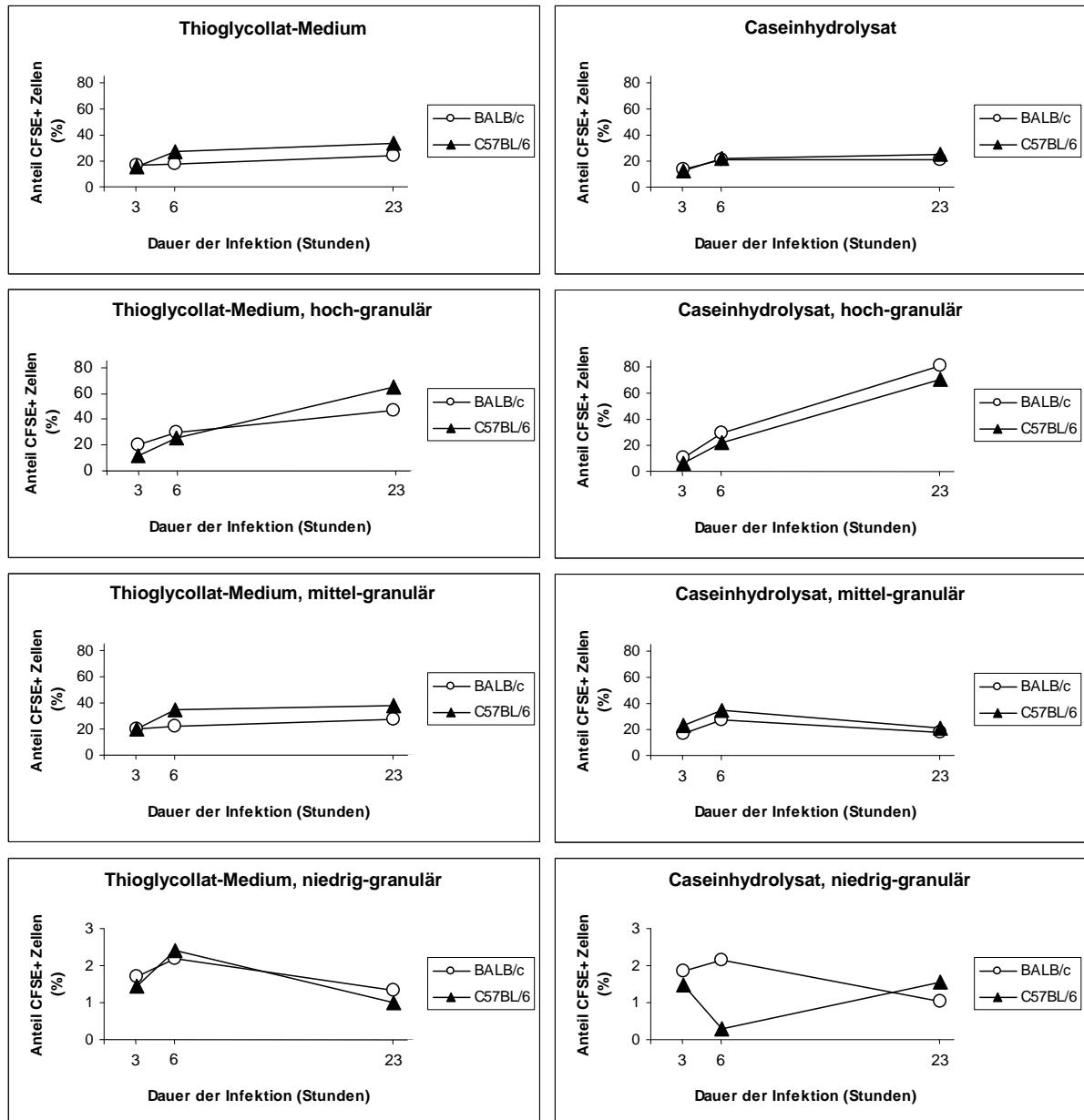
Im Folgenden soll nun betrachtet werden wie viele Zellen im Laufe der ersten Stunden mit dem Parasiten infiziert werden. Der prozentuale Anteil von CFSE<sup>+</sup> Zellen, das heißt solchen, die mit *L. major*<sup>CFSE</sup> infiziert sind, an allen Zellen der jeweiligen Population ist in Abbildung 15 im zeitlichen Verlauf zu sehen. Kritischerweise muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass nicht nur infizierte Zellen CFSE positiv erscheinen, sondern auch solche, an deren Oberfläche *L. major*<sup>CFSE</sup> gebunden haben. Es ergeben sich somit etwas zu hohe Infektionsraten. Da dieser Fehler nach den Erfahrungen aus den Histologie-Experimenten für beide Mausstämme gleichermaßen angenommen wird, bleiben die beobachteten Unterschiede gleichwohl aussagekräftig.

Betrachtet man alle ausgewerteten Zellen aus den BALB/c-Tieren nach der Behandlung mit Thioglycollat-Medium, das heißt solche, die entweder in der hoch-, der mittel- oder der niedriggranulären Population zu finden sind, so nimmt der Anteil infizierter Zellen kontinuierlich von 16 % nach 3 Stunden Infektionszeit auf 18 % nach 6 Stunden und 24 % nach 23 Stunden zu. Zellen von niedriger Granularität sind dabei praktisch nicht infiziert - es könnte sich bei diesen um Lymphozyten wie auch um Zellfragmente handeln. Parasiten finden sich vor allem in hochgranulären Zellen: Nach 3 Stunden zeigen sich 20 %, nach 23 Stunden sogar 47 % von *L. major* befallen. Auch in Zellen von mittlerer Granularität befinden sich zunehmend Leishmanien (19 % nach 3 Stunden und 27 % nach 23 Stunden).

Einen analogen Infektionsverlauf offenbaren die Zellen aus den C57BL/6-Tieren. Liegt der Anteil infizierter Zellen anfangs bei 16 %, so ist er nach weiteren 3 Stunden auf 27 % und nach 23 Stunden auf 33 % angestiegen. Zwar fällt der Anstieg damit etwas stärker als in der BALB/c-Population aus, jedoch ist dieser Unterschied gering und lässt sich in der Caseinhydrolysat-Population kaum feststellen. Diese Zunahme an infizierten Zellen findet ihren Niederschlag hauptsächlich in Zellen von hoher Granularität, bei denen initial nur 11 % Parasiten aufweisen, nach 6 Stunden 25 % und nach 23 Stunden 65 %. Die niedriggranuläre Zellpopulation ist mit 1 bis 2 % wiederum kaum infiziert, während solche Zellen von mittlerer Granularität zunehmend von Leishmanien infiziert werden: Nach 3 Stunden sind 20 % befallen, nach 6 Stunden 34 % und nach 23 Stunden sind es 38 %.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Zahl infizierter Peritonealzellen bei beiden Mausstämmen im zeitlichen Verlauf zunimmt. Tendenziell sind C57BL/6-Zellen häufiger von *L. major*<sup>CFSE</sup> befallen, wobei dieser Unterschied vor allem innerhalb der mit Caseinhydrolysat erzeugten Zellen äußerst gering ausfällt. Dabei können Leishmanien vorwiegend in den hochgranulären Zellen nachgewiesen werden, die sich hauptsächlich aus Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen und damit Neutrophilen, MDSCs und Makrophagen zusammensetzen. Gerade in dieser interes-

santen Population haben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen heraus kristallisiert. Praktisch keine Parasiten sind dagegen in niedriggranulären Zellen zu finden.



**Abb. 15:** Der Anteil CFSE<sup>+</sup> Peritonealzellen aus BALB/c- und C57BL/6-Tieren nimmt in den ersten 23 Stunden einer Inkubation mit *L. major*<sup>CFSE</sup> kontinuierlich zu, wobei Zellen aus C57BL/6-Mäusen allenfalls minimal häufiger infiziert werden. Die Peritonealzellen wurden nach einer Vorbehandlung von je 3 BALB/c und C57BL/6-Tieren mit Thioglycollatlösung (linke Spalte) oder mit Caseinhydrolysat (rechte Spalte) gewonnen, jeweils vereinigt und im Verhältnis eins zu fünf mit *L. major*<sup>CFSE</sup> inkubiert. Die beiden oberen Figuren zeigen den Verlauf CFSE<sup>+</sup> Zellen in der Gesamtpopulation, die weiteren Figuren zeigen ihn separat für die Zellen von hoher, mittlerer und niedriger Granularität. Gezeigt werden die Daten aus einem einzelnen Versuch.

Der zweite Teil des Experimentes beschäftigt sich mit der Fragestellung ob und inwiefern sich die Apoptoseraten von infizierten und nicht infizierten Zellen unterscheiden. Die Abbildung 16 vergleicht innerhalb der mit Leishmanien inkubierten Zellkultur den Anteil apoptotischer Zellen unter den CFSE<sup>+</sup> (und damit infizierten) Zellen (linker Balken) mit dem apoptotischen Zellen unter den nicht infizierten Zellen (mittlerer Balken). Zusätzlich wird der Prozentsatz an apoptotischen Zellen innerhalb einer nicht mit *L. major* inkubierten Zellkultur (rechter Balken) aufgeführt, um eine mögliche Beeinflussung des Apoptoseverhaltens von Zellen bereits durch die extrazelluläre Präsenz von Leishmanien anzuzeigen.

Das Apoptoseverhalten der Zellen, die nach der Caseinhydrolysat-Vorbehandlung aus den Mäusen isoliert wurden (Abb. 16, Figur b), stellt sich dabei folgendermaßen dar: Bei den BALB/c-Zellen nimmt der Anteil der Apoptose unter den infizierten Zellen von 8 % nach 3 Stunden auf 11 % nach 6 Stunden und dann sprunghaft auf 45 % nach 23 Stunden kontinuierlich zu. Der programmierte Zelltod der nicht infizierten Zellen bleibt stets darunter: Nach 3 Stunden sind 4 % der nicht-infizierten Zellen apoptotisch, nach 6 Stunden sind es 5 % und nach 23 Stunden 20 %. Ordnet man das Apoptoseverhalten den unterschiedlich granulierten Zellpopulationen zu (Daten nicht gezeigt), dann fällt auf, dass vorwiegend die hochgranulären Zellen in Apoptose gehen. Also genau diejenigen Zellen, die auch am häufigsten von *L. major* infiziert werden: Nach 3 Stunden sind 37% der infizierten und 32 % der nicht infizierten Zellen apoptotisch, während es nach 23 Stunden 57 % bzw. 75 % sind. Dies lässt an die nur kurze Überlebenszeit von neutrophilen Granulozyten denken. Zellen niedriger Granularität sind dagegen praktisch nicht apoptotisch (nur 6 % der infizierten Zellen nach 23 Stunden) und solche von mittlerer Granularität nehmen mit 31 % der infizierten und 32 % der nicht infizierten Population nach 23 Stunden eine Mittelstellung ein.

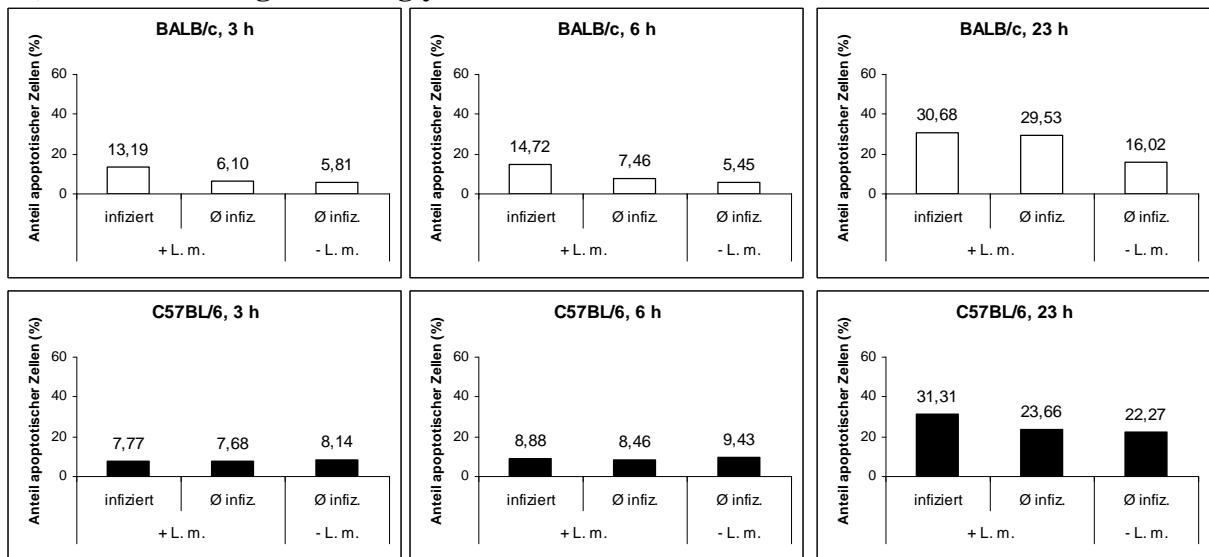
Im Falle der C57BL/6-Zellen zeigt sich ein ähnlicher Hergang. Auch hier nimmt der Anteil an sterbenden Zellen innerhalb der infizierten Population von 12 % nach 3 Stunden über 16 % nach 6 Stunden auf 51 % nach 23 Stunden zu. Ebenso innerhalb der nicht-infizierten Zellen: Hier steigt der Anteil von 11 % über 14 % auf 35 % an. Und ebenso wenig offenbart der Blick auf die Unterschiede zwischen den verschiedenen granulierten Zellpopulationen: Auch bei den C57BL/6-Zellen gehen vornehmlich die hochgranulären Zellen in den programmierter Zelltod – nach 23 Stunden sind dies 71 % der infizierten und 73 % der nicht infizierten Zellen.

Die Versuche mit den über Thioglycollat-Medium gewonnenen Zellen liefern ganz ähnliche Ergebnisse (Abb. 16, Figur a). Unterschiede ergeben sich lediglich bei vergleichender Be trachtung der beiden Mausstämme: Liegt die Apoptoserate bei Verwendung von Caseinhydro-

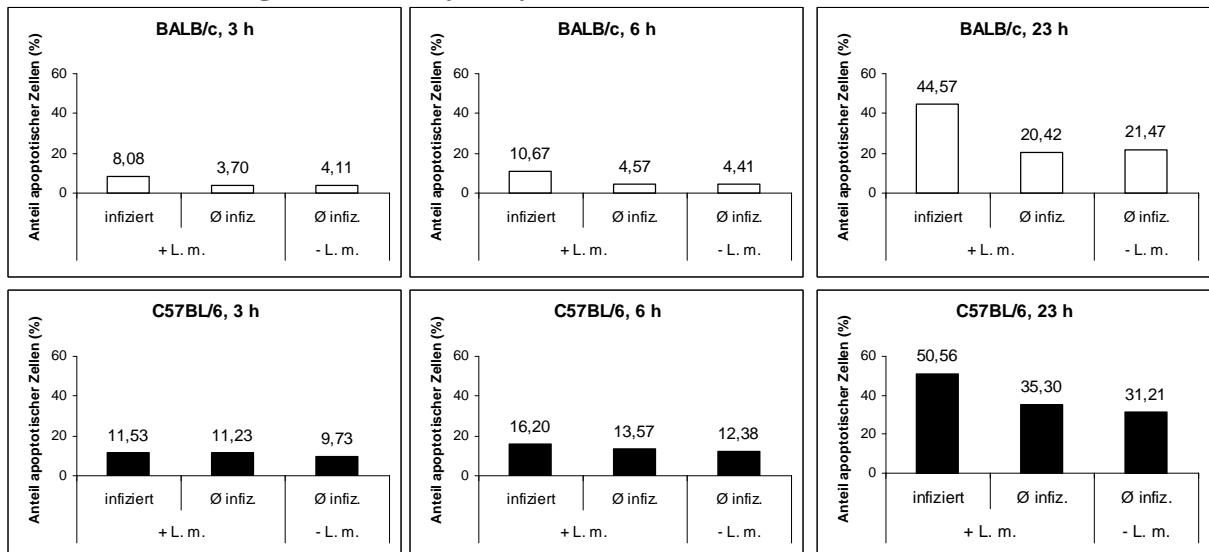
lysat bei den infizierten C57BL/6-Zellen um etwa 4 bis 5 % höher als bei den infizierten BALB/c-Zellen, so ist es nach Thioglycollat-Medium genau anders herum. Die infizierten Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Tieren scheinen somit ähnlich rasch in Apoptose zu gehen. Die Gegenüberstellung der Zelltodrate der nicht infizierten Population mit der Zellkultur, die gar nicht mit Leishmanien inkubiert worden ist, zeigt indes keine Differenzen - mit Ausnahme der BALB/c-Zellen nach Gabe von Thioglycollat-Medium und einer Infektionsdauer von 23 Stunden, was allerdings als Ausreißer gewertet wurde. Dies macht eine Verzerrung der Versuchsergebnisse durch eine Beeinflussung der Apoptoserate über die extrazelluläre Präsenz der Parasiten unwahrscheinlich.

Damit lässt sich festhalten, dass die Zelltodrate bei beiden Mausstämmen und bei beiden verwendeten Medien in den ersten 23 Stunden der Infektion ansteigt. Es sind vor allem Zellen von hoher Granularität, bei denen es sich mutmaßlich um Neutrophile, MDSCs und Makrophagen handelt, die am stärksten infiziert werden und auch am schnellsten in den programmierten Zelltod gehen. Unter Berücksichtigung aller Zellen ist hierbei die Apoptoserate der infizierten Zellen höher, als die der nicht infizierten. Betrachtet man hingegen die Apoptoserate nach einer Infektionsdauer von 23 Stunden separat für die hochgranulären Zellen, so ist diese für die nicht infizierten Zellen höher: um 6 bis 18 % bei den BALB/c-Tieren und um 2 bis 14 % bei den C57BL/6. Diese Beobachtung stützt die zuvor erwähnte These, dass Leishmanien die Apoptose von Neutrophilen verzögern können. Zellen von niedriger Granularität werden praktisch nicht infiziert und haben mit Abstand die niedrigste Zelltodrate. Solche Zellen von mittlerer Granularität nehmen eine Mittelstellung ein: Sie zeigen sich mäßig stark infiziert und gehen auch zunehmend in den programmierten Zelltod, wenngleich in geringerem Maße wie die hochgranulären Zellen.

### a) Vorbehandlung mit Thioglycollat-Medium



### b) Vorbehandlung mit Caseinhydrolysat



**Abb. 16:** Die Apoptoserate der infizierten und nicht infizierten Peritonealzellen beider Mausstämme nimmt in den ersten 23 Stunden der Inkubation mit *L. major* zu. Die Zellen stammen aus je 3 BALB/c- und C57BL/6-Tieren, die zuvor entweder mit Thioglycollat-Medium (a) oder Caseinhydrolysat (b) i.p. vorbehandelt worden waren, und wurden im Verhältnis 1 zu 5 mit *L. major*<sup>CFSE</sup> inkubiert (+ L. m.). Nach 3, 6 und 23 Stunden wurde der Anteil Annexin V<sup>+</sup> Zellen unter den infizierten Zellen (jeweils linker Balken) mit dem Anteil Annexin V<sup>+</sup> Zellen unter den nicht infizierten Zellen verglichen (mittlerer Balken). Ebenso wurde der Prozentsatz an apoptotischen Zellen einer Zellkultur ohne Leishmanien (- L. m.) bestimmt (rechter Balken). Die gezeigten Daten stammen aus einem einzelnen Experiment.

## 4.3. *In vivo* – Experimente

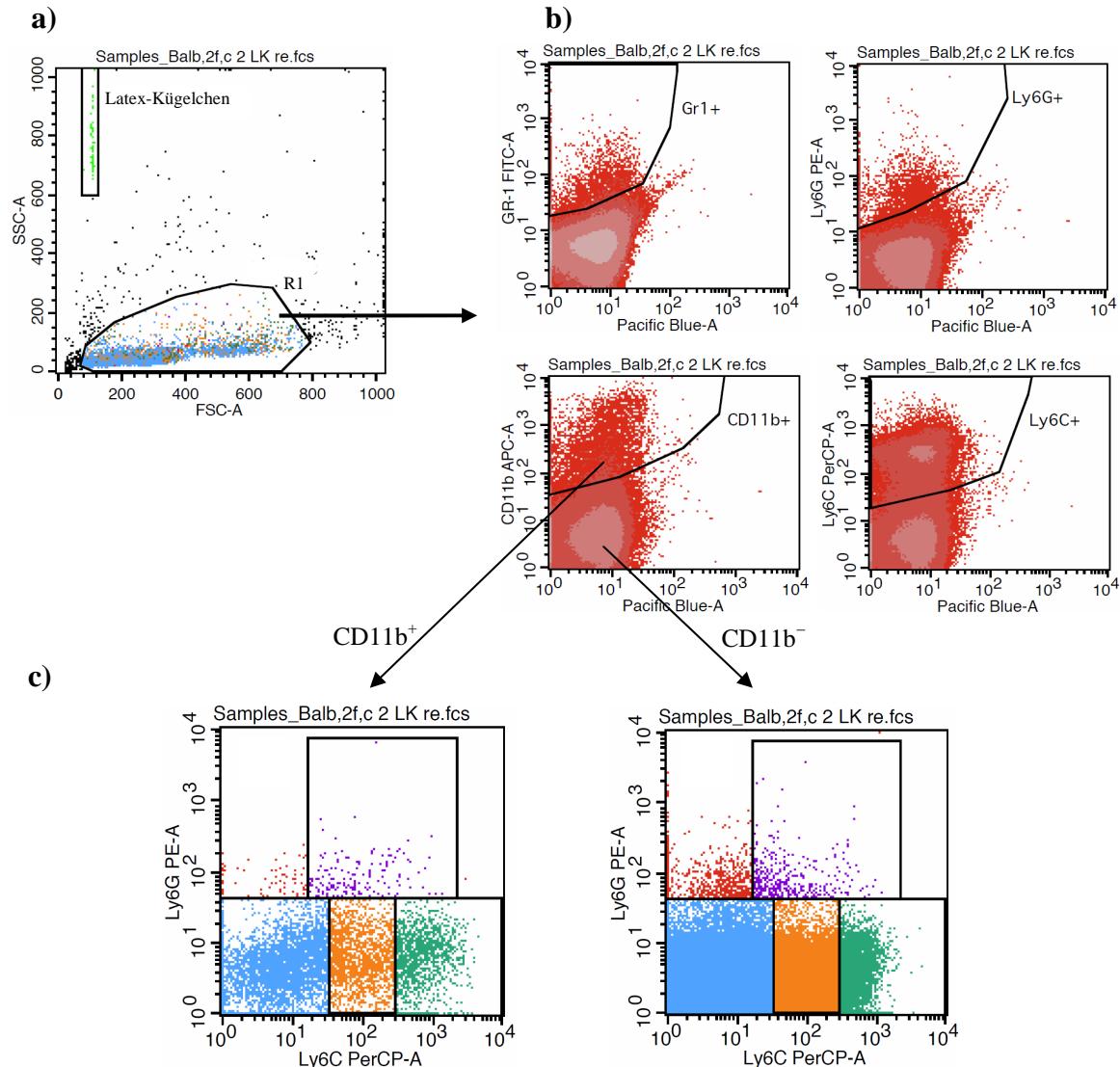
### 4.3.1. Zellcharakterisierung des dermalen Infiltrates und des drainierenden poplitealen Lymphknotens im zeitlichen Verlauf

Polymorphekernige neutrophile Granulozyten (PMNs) stellen einen der ersten Abwehrmechanismen bei akuten, infektionsbedingten Entzündungsgeschehen dar (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). So sind auch im Rahmen der Leishmaniasis Neutrophile die erste Leukozytenpopulation, welche die Inokulationsstelle erreicht (Müller *et al.*, 2001). Nach 2 oder 3 Tagen wandern dann zunehmend Monozyten und Makrophagen in das infizierte Gewebe ein (Sunderkötter *et al.*, 1993, Müller *et al.*, 2001) und nach 6 bis 7 Tagen sind die Leishmanien vorwiegend in den CD11b<sup>+</sup> Makrophagen lokalisiert (Peters *et al.*, 2008). Die Zellzusammensetzung ändert sich also im Laufe des Infektionsgeschehens.

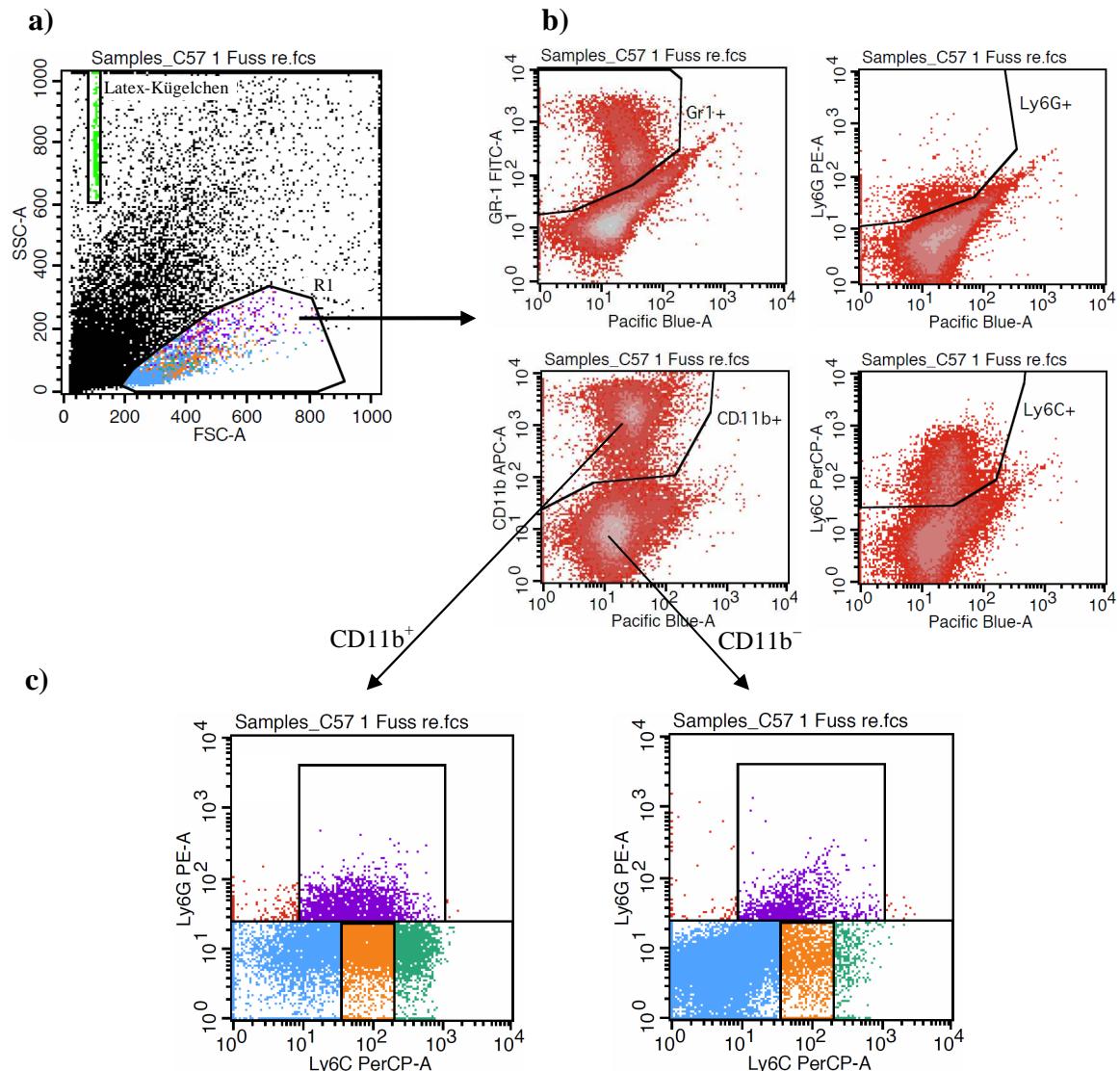
Eine genaue Charakterisierung der an der Infektion mit *L. major* beteiligten Zellpopulationen in den verschiedenen Organen im zeitlichen Verlauf sollte in dem folgenden Experiment indes näher untersucht werden. Dazu wurden für jeden untersuchten Zeitpunkt 4 BALB/c- und 4 C57BL/6-Mäuse in den rechten Hinterpfoten mit *L. major* infiziert und nach 1, 2, 4, 7 und 14 Tagen die Zellen aus den Hinterpfoten sowie den poplitealen Lymphknoten mit AK gegen die Oberflächenantigene Gr-1, CD11b, Ly-6G und Ly-6C gefärbt. Durch die Zugabe einer bekannten Menge an Latexkügelchen in jeden Ansatz vor der Färbung war es möglich bei Verlust von Zellmaterial durch die einzelnen Waschschritte auf die ursprüngliche Anzahl von Zellen zurückzurechnen. Insofern konnte nicht nur eine qualitative Auswertung des Versuches, nämlich eine Zellcharakterisierung des dermalen Infiltrates und des drainierenden poplitealen Lymphknotens im zeitlichen Verlauf, sondern auch eine quantitative durchgeführt werden.

Da bei der Präparation von Zellen gerade aus dem Fuß auch vermehrt nicht zelluläre Partikel und Zellfragmente mit aufgereinigt werden, wurden für die weitere Auswertung lediglich solche Zellen weiter berücksichtigt, die hinsichtlich ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich R1 lokalisiert waren. Diese Selektion von definierten Zellpopulationen, das sogenannte „Gating“, welche für die einzelnen Organe einheitlich durchgeführt wurde, ist anhand der Abbildungen 17 und 18 nachzuvollziehen. In beiden Abbildungen ist unter Figur b die Einteilung in Gr-1, Ly-6G, Ly-6C und CD11b positive und negative Populationen zu erkennen. In Figur c werden die CD11b<sup>+</sup> und CD11b<sup>-</sup> Zellen noch in die folgenden Subpopulationen unterteilt: Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> (violett), Ly-6C<sup>-</sup>Ly-6G<sup>-</sup> (blau), Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>-</sup> (orange) und Ly-6C<sup>high</sup>Ly-6G<sup>-</sup> (grün). Bei den Neutrophilen handelt es sich um CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>high</sup> Zellen (violett) (Sawanobori *et al.*, 2008, Sunderkötter *et al.*, 2004). Unreife Makrophagen finden sich nach Sawanobori und

Sunderkötter innerhalb der  $CD11b^+Ly-6C^{\text{high}}Ly-6G^-$  Zellen (grün), reife Makrophagen unter den  $CD11b^+Ly-6C^{\text{int}}Ly-6G^-$  Zellen (orange), wobei zur exakten Abgrenzung zu nicht-Makrophagen noch eine Färbung mit F4/80, einem Makrophagenmarker, nötig wäre (Sawanobori *et al.*, 2008, Sunderkötter *et al.*, 2004).



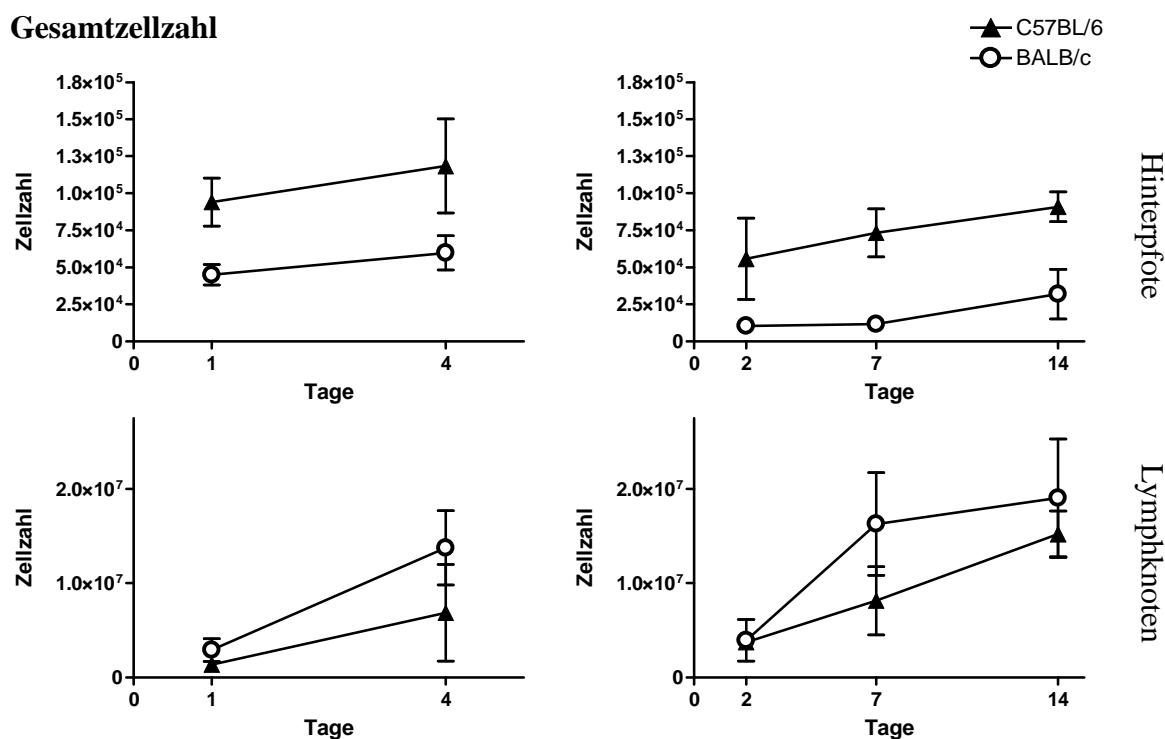
**Abb. 17:** Selektion („Gating“) der Zellen aus den **poplitealen Lymphknoten** am Beispiel eines BALB/c-Tieres. Für die weitere Auswertung wurden nur solche Zellen berücksichtigt, die hinsichtlich ihrer Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) in einem für lebendige Leukozyten typischen Bereich R1 liegen. Ferner sind in Graphik a) die Latex-Kügelchen zu erkennen, deren verbliebene Anzahl für die quantitative Auswertung relevant war. Graphik b) zeigt die Differenzierung in Gr-1, Ly-6G, Ly-6C und CD11b positive und negative Populationen, während Graphik c) die einzelnen Subpopulationen von  $CD11b^+$  und  $CD11b^-$  Zellen aufzeigt:  $Ly-6C^{\text{int}}Ly-6G^+$  (violett),  $Ly-6C^-Ly-6G^-$  (blau),  $Ly-6C^{\text{int}}Ly-6G^-$  (orange) und  $Ly-6C^{\text{high}}Ly-6G^-$  (grün).



**Abb. 18:** Selektion („Gating“) der Zellen aus den **Hinterpfoten** am Beispiel einer C57BL/6-Maus. Die Lage der einzelnen Gates ist repräsentativ für die Auswertung aller Zellen aus den beiden Hinterpfoten. Ansonsten gelten die näheren Erläuterungen aus Abb. 17.

Da nicht alle verwendeten Tiere zum gleichen Zeitpunkt infiziert wurden, sondern erst all jene Mäuse für die Zeitpunkte 2, 7 sowie 14 Tage und getrennt davon einige Zeit später für die Zeitpunkte 1 und 4 Tage, müssen fortan die einzelnen Ergebnisse der Teilexperimente getrennt voneinander betrachtet werden. Dies liegt daran, dass sich die zu unterschiedlichen Terminen gewonnenen Leishmanien hinsichtlich ihrer Vitalität und Pathogenität unterscheiden, so dass auch der Infektionsverlauf in den Mäusen differieren kann. So erklärt sich, dass nach 1 und 4 Tagen doch deutlich mehr Zellen aus den Hinterpfoten isoliert werden konnten, als beispielsweise nach einer Infektionsdauer von 7 Tagen.

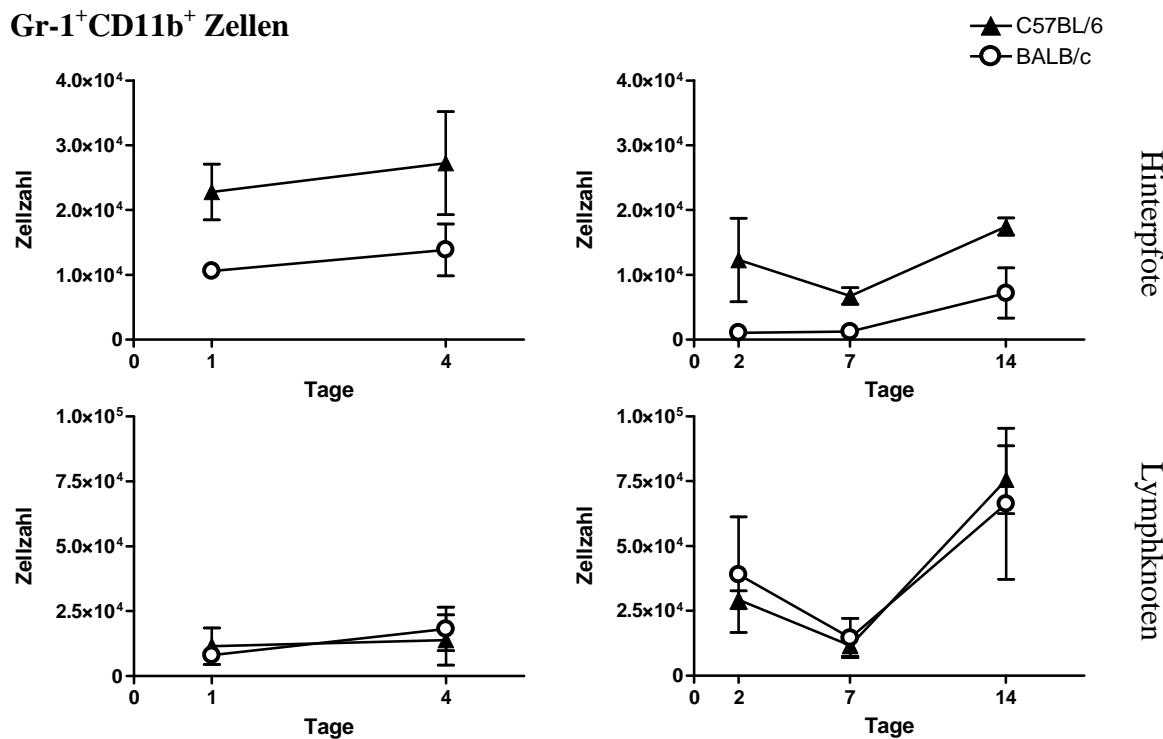
Den zeitlichen Verlauf der Gesamtzellzahl stellt Abbildung 19 dar. Deutlich ist zu sehen, dass aus den infizierten Hinterpfoten der C57BL/6-Tiere stets signifikant mehr Zellen isoliert werden konnten, als aus den BALB/c. Bei den Lymphknoten der infizierten Seite verhielt es sich indes genau andersherum, wenngleich die Differenz nicht signifikant war. Ferner lässt sich für beide Mausstämme und Organe eine Zunahme der Gesamtzellzahl feststellen. Sie ist Ausdruck einer progredienten Einwanderung von Entzündungszellen. Diese Zunahme fällt mit einer Versechsfachung innerhalb der ersten 2 Wochen in den Lymphknoten am stärksten aus.



**Abb. 19:** Die Gesamtzellzahl nimmt im Laufe der Infektion von BALB/c- (weiße Kreise) und C57BL/6-Mäusen (schwarze Dreiecke) in den infizierten Hinterpfoten (obere Graphen) und den drainierenden poplitealen Lymphknoten (untere Graphen) zu. Gezeigt werden die Daten aus einem einzelnen Experiment, bei dem zu jedem Zeitpunkt 4 BALB/c- und 4 C57BL/6-Tiere untersucht wurden (gilt für die Abbildungen 19 - 22).

Im Folgenden sollen die  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  Zellen betrachtet werden, unter denen sich Neutrophile, MDSCs, wie auch Makrophagen befinden und deren Verlauf in der Abbildung 20 dargestellt ist. In der ersten Woche nimmt ihre Zahl in den infizierten Hinterpfoten der C57BL/6-Mäuse ab, während sie in den BALB/c-Tieren konstant niedrig bleibt. Jedoch liegen stets signifikant mehr  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  Zellen in den C57BL/6- als in den BALB/c-Tieren vor. Im Anschluss daran kommt es zu einem deutlichen Anstieg bei beiden Mausstämmen. Man könnte dies über eine initial rasche Abnahme der neutrophilen Granulozyten mit einer später einsetzenden zu-

nehmenden Einwanderung von Makrophagen erklären. Auch in den poplitealen LK nimmt die Anzahl an Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen bis Tag 7 in beiden Mausstämmen eher ab, um anschließend deutlich anzusteigen. Signifikante Unterschiede der Zellzahlen zwischen den einzelnen Tieren lassen sich hier indes nicht feststellen.

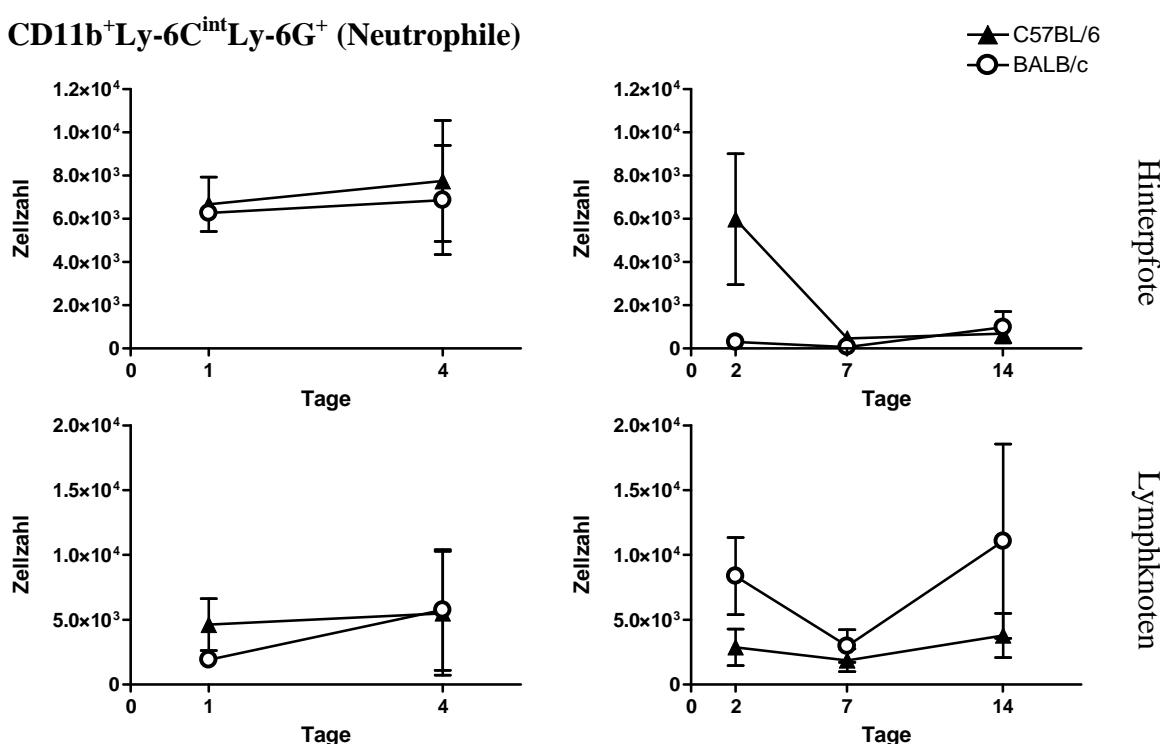


**Abb. 20:** Verlauf der Anzahl Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in den infizierten Hinterpfoten (oben) und den drainierenden poplitealen Lymphknoten (unten).

Um zwischen Neutrophilen und Makrophagen unterscheiden zu können, müssen mit Ly-6G und Ly-6C zwei weitere Marker herangezogen werden. Die Neutrophilen befinden sich unter den CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> Zellen. In den infizierten Hinterpfoten der schwarzen C57BL/6-Mäuse befinden sich am Tag 2 der Infektion deutlich mehr Neutrophile als in den BALB/c. Dann nimmt deren Zahl von Tag 2 bis Tag 7 der Infektion rapide ab, während der Wert in den BALB/c konstant niedrig bleibt (siehe dazu Abbildung 21). In der zweiten Infektionswoche bleibt die Zahl an neutrophilen Granulozyten bei den C57BL/6-Tieren niedrig, während sie bei den BALB/c-Mäusen leicht zunimmt und, wenn auch nicht signifikant, nach 14 Tagen höhere Werte erreicht, als in den C57BL/6-Tieren. Das heißt, dass in der Frühphase der Infektion signifikant mehr Neutrophile in den infizierten Hinterpfoten der C57BL/6-Mäuse vorhanden sind als in den BALB/c. In den folgenden Tagen nimmt diese Zahl jedoch rasant ab, was durch die kurze Lebensdauer der Neutrophilen und deren Apoptose zu erklären ist. Im weite-

ren Verlauf der Infektion bleibt ihre Zahl bei den C57BL/6-Mäusen niedrig, während sie bei den suszeptiblen BALB/c-Tieren langsam weiter zunimmt.

In den poplitealen LK indes liegen ab dem zweiten Tag der Infektion mehr Neutrophile bei den BALB/c-Tieren vor als bei den C57BL/6. Deren Zahl nimmt aber im Verlauf der ersten Infektionswoche bei den BALB/c ab, wohingegen sie bei den C57BL/6 fortwährend niedrig bleibt. In der zweiten Woche nehmen die Neutrophilen in den Lymphknoten der BALB/c-Mäuse dann wieder zu. Signifikante Unterschiede zu den C57BL/6-Tieren bestehen nicht.

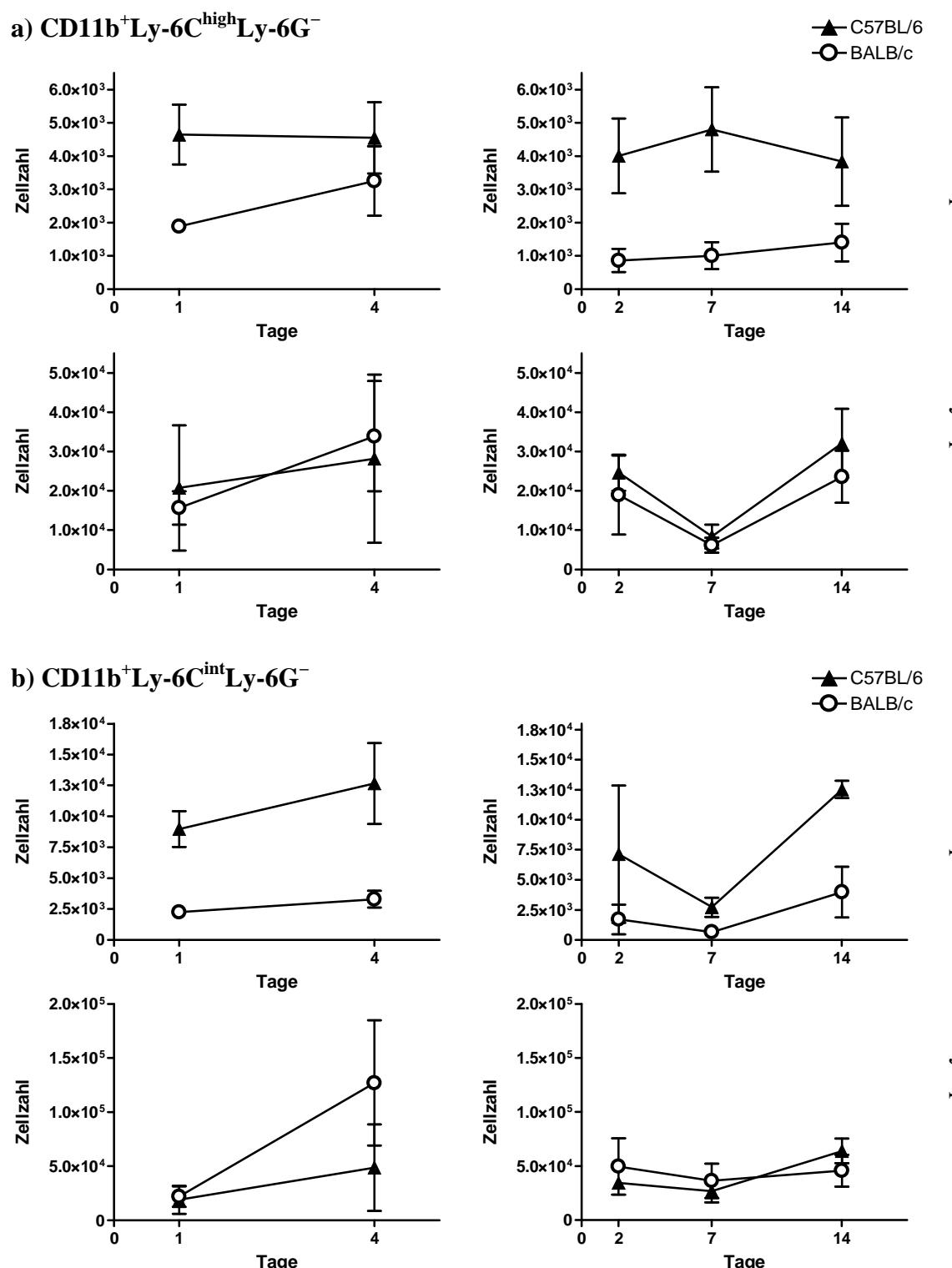


**Abb. 21:** Verhalten der  $CD11b^+Ly-6C^{int}Ly-6G^+$  Zellen (neutrophile Granulozyten) im Verlauf der ersten beiden Wochen der Infektion in den infizierten Hinterpfoten (oben) und den poplitealen Lymphknoten (unten).

Zuletzt soll noch der Verlauf der Makrophagen beurteilt werden (Abbildung 22), die sich nach Sawanobori und Sunderkötter innerhalb der  $CD11b^+Ly-6C^{int-high}Ly-6G^-$  Zellpopulation finden (Sawanobori *et al.*, 2008, Sunderkötter *et al.*, 2004). Zur exakten Abgrenzung zu nicht-Makrophagen wäre zwar eine Färbung mit F4/80 nötig, dennoch soll im Folgenden von Makrophagen die Rede sein. Es ist dabei zwischen unreifen  $CD11b^+Ly-6C^{high}Ly-6G^-$  Makrophagen, die an den Ort der Infektion auswandern, und den daraus entstehenden reifen  $CD11b^+Ly-6C^{int}Ly-6G^-$  Makrophagen zu unterscheiden (Sunderkötter *et al.*, 2004). In den Hinterpfoten der C57BL/6-Mäuse liegen stets signifikant mehr unreife Makrophagen vor als bei den BALB/c. Es zeichnen sich im Verlauf der Infektion ein allenfalls diskreter Rückgang

ihrer Anzahl in den C57BL/6-Tieren und eine schwache, kontinuierliche Zunahme in den BALB/c ab. Auch reife Makrophagen sind in den infizierten Hinterpfoten der C57BL/6-Mäuse signifikant häufiger anzutreffen. Ihre Zahl sinkt bei den C57BL/6 stärker als bei den BALB/c in der ersten Woche der Infektion ab, um dann aber besonders deutlich bei den C57BL/6 steil anzusteigen. In den immunkompetenten C57BL/6-Mäusen liegen damit gerade diejenigen Zellen, die für die erfolgreiche Abwehr von *L. major* entscheidend sind, in weitaus größerem Maße vor, als bei den BALB/-Tieren. Bei letzteren nimmt die Zahl an Makrophagen im weiteren Verlauf der Leishmaniasis zwar ebenfalls zu, jedoch kommt es nichtsdestotrotz zu einem progredienten und letztlich letalen Verlauf. Dies mag auch darin begründet liegen, dass Makrophagen durch die in Punkt 1.3.2. beschriebenen Mechanismen als Wirtszellen ausgenutzt werden können.

In den drainierenden, poplitealen Lymphknoten lassen sich bei den Makrophagen indessen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen erkennen. Die Zahl an unreifen Makrophagen liegt bei den C57BL/6-Mäusen, wenngleich nicht signifikant, über der bei den BALB/c-Tieren. Innerhalb der ersten Woche kommt es bei beiden Stämmen zu einem Abfall der unreifen Makrophagen, in der zweiten Woche dann zu einem deutlichen Wiederanstieg. In den poplitealen Lymphknoten beider Mausstämme liegen initial gleich viele reife Makrophagen vor. Deren Zahl steigt bei den BALB/c-Tieren rascher an als bei den C57BL/6-Mäusen, um dann nach zwei bis vier Tagen zu stagnieren. Die reifen Makrophagen bei den C57BL/6 steigen im Verlauf der Infektion zwar langsamer, aber kontinuierlich an und übertreffen die Zahl der reifen Makrophagen in den BALB/c-Mäusen nach einer Infektionsdauer von zwei Wochen, wenngleich dieser Unterschied nicht signifikant ist. Dennoch ist das Überwiegen dieser Zellen, gerade vor dem Hintergrund der höheren Gesamtzellzahl in den Lymphnoten der BALB/c-Tieren, bemerkenswert. Im Verlauf der Konfrontation der Tiere mit dem Parasiten wird damit die Zahl an immunkompetenten, reifen Makrophagen sowohl in den infizierten Hinterpfoten, als auch in den poplitealen Lymphknoten, als erste zentrale Immunstation, in den resistenten Mäusen höher als in den empfindlichen BALB/c-Tieren.

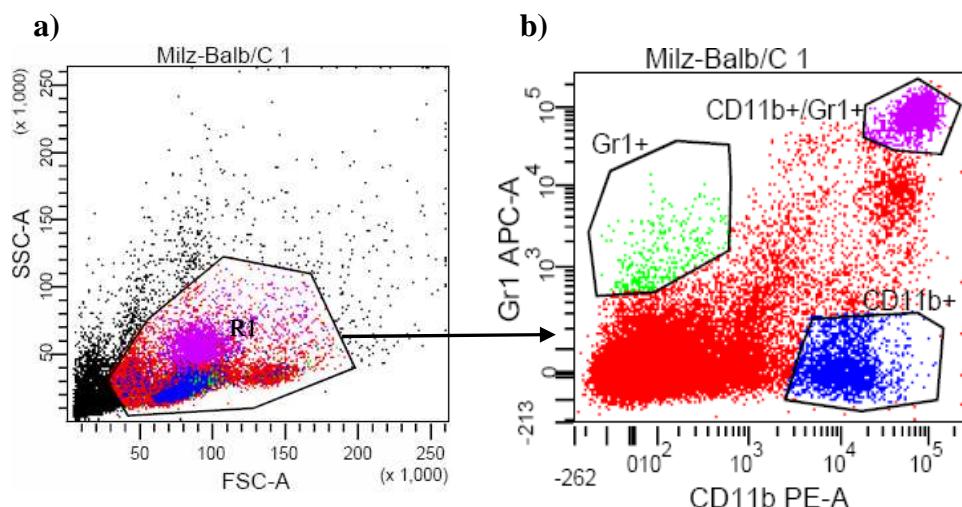


**Abb. 22:** Verlauf der Anzahl an  $CD11b^+Ly-6C^{high}Ly-6G^-$  Zellen (mutmaßlich unreife Makrophagen, Figur a) und  $CD11b^+Ly-6C^{int}Ly-6G^-$  Zellen (wahrscheinlich reife Makrophagen, Figur b) innerhalb der ersten zwei Wochen einer Infektion mit dem Parasiten *L. major*.

### 4.3.2. Quantifizierung der Leishmanienlast in Milz, poplitealem Lymphknoten und Fuß mittels Real Time – PCR

Infiziert man BALB/c- und C57BL/6-Mäuse mit dem Parasiten *L. major*, so unterscheiden sich beide Tierstämme deutlich in ihrem Krankheitsverlauf. Während die C57BL/6-Tiere nach einer akuten Leishmaniasis wieder genesen, breitet sich die Erkrankung bei den BALB/c aus und führt unbehandelt zum Tode. Ob diese gegensätzliche Entwicklung ein Korrelat in der Infektionslast verschiedener Organe und Subpopulationen von Zellen aufweist, sollte im folgenden Versuch geklärt werden.

Dazu wurden je 3 BALB/c- und C57BL/6-Mäuse in beiden Hinterpfoten infiziert und jeweils nach 3 Tagen und 1 Woche die Zellen aus den beiden Hinterpfoten, den beiden poplitealen, drainierenden Lymphknoten und der Milz isoliert und mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene Gr-1 und CD11b gefärbt. Die erhaltenen Zellen konnten über ein FACS ARIA II entsprechend Abbildung 23 in drei verschiedene Populationen getrennt werden: Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (grün), Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> (blau) und Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen (violett). Um die Zerstörung der DNS durch eine beginnende Apoptose zu verhindern, mussten die Zellen für die Triage lebendig bleiben. Anschließend konnte die aus den einzelnen Zellpopulationen isolierte DNS über eine Real Time-PCR auf den Gehalt an Leishmanien-DNS untersucht werden. Die Quantifizierung der Leishmanienlast erfolgt in der Anzahl an Leishmanien-Genkopien pro Pikogramm Maus-DNS (c/pg DNS). Dieser Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander mit je 3 Tieren pro Stamm durchgeführt.



**Abb. 23:** Repräsentatives dot-plot-Diagramm mit Einteilung der Zellen in eine Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (grün), eine Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> (blau) und eine Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellpopulation (violett). Für diese Auswahl wurden nur solche Zellen innerhalb eines für lebendige Leukozyten typischen Bereichs R1 (Figur a) berücksichtigt. Die gezeigten Zellen stammen aus der Milz einer BALB/c-Maus. Die Selektion der drei Zellpopulationen erfolgte für alle anderen untersuchten Organe und Tiere identisch.

Zunächst soll der Infektionsablauf in den infizierten **Hinterpfoten** betrachtet werden. In den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen (Makrophagen, MDSCs und Neutrophile) lassen sich bei beiden Mausstämmen Leishmanien nachweisen, wobei tendenziell in den BALB/c-Mäusen die Parasitenlast höher ist als in den C57BL/6. Beträgt die durchschnittliche Parasitenlast in den C57BL/6-Tieren nach einer Infektionsdauer von 3 Tagen noch ca. 0,1 c/pg DNS und bei den BALB/c 0,3 c/pg DNS, so steigt diese nach einer Woche auf ca. 5 c/pg DNS und 8 c/pg DNS. Damit lässt sich nicht nur festhalten, dass Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen im Laufe des Krankheitsprozesses zunehmend mit *L. major* infiziert sind, sondern auch, dass diese Infektionslast tendenziell in den suszeptiblen BALB/c-Mäusen höher ausfällt.

Bei den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen in den Hinterpfoten lassen sich mit Ausnahme eines, als Ausreißer zu wertenden BALB/c-Tieres, nach 3 Tagen in beiden Mausstämmen keine Leishmanien nachweisen. Nach 7 Tagen jedoch ist in beiden Stämmen mit durchschnittlich 0,1 c/pg DNS gleichermaßen Parasiten-Erbgut nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen den beiden Tieren nicht.

Betrachtet man zuletzt die Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in den Hinterpfoten, so lässt sich nach 3 Tagen mit etwa 0,5 c/pg DNS eine nahezu identische Parasitenlast in beiden Stämmen dokumentieren, die nach 7 Tagen vor allem bei den C57BL/6-Mäusen auf Werte um 13 c/pg DNS ansteigt. Diese Zunahme fällt bei den BALB/c-Tieren deutlich geringer auf ca. 4 c/pg DNS aus. Der Unterschied in der Leishmanienlast zwischen den beiden Mausstämmen fällt in einem der beiden separat durchgeführten Experimente sogar signifikant aus, jedoch in der Zusammenfassung beider Versuche mit einem p-Wert von 0,10 nicht. Mit 13 c/pg DNS sind die Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus den C57BL/6-Mäusen die am stärksten infizierten Zellen innerhalb dieses Experimentes.

Die erste zentrale Struktur des Immunsystems, auf die Erreger aus den Hinterpfoten treffen, ist der drainierende, **popliteale Lymphknoten**. In den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen lassen sich mit zwei Ausreißern weder nach 3, noch nach 7 Tagen *L. major* nachweisen. Es lässt sich damit vermuten, dass Neutrophile, MDSCs und Makrophagen, die an der Inokulationsstelle mit dem Parasiten infiziert werden, innerhalb einer Woche nicht nachweisbar in den drainierenden Lymphknoten gelangen.

Aber sowohl die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, als auch die Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus den C57BL/6 enthalten zu beiden Zeitpunkten mehr Leishmanien-Erbgut, als die aus den BALB/c-Mäusen. Bei den Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen am Tag drei der Infektion fällt dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,06 gerade nicht signifikant aus. Wie auch bei den Zellen aus den Füssen, sind die

Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus den poplitealen Lymphknoten mit 0,2 c/pg DNS bei den C57BL/6 und 0,05 c/pg DNS bei den BALB/c die am stärksten infizierten Zellen innerhalb des Organs. Neben dem drainierenden LK ist die **Milz** das entscheidende lymphatische Organ, dem eine wichtige Rolle in der Immunabwehr zukommt. Wie schon in den infizierten Hinterpfoten, so zeigen sich auch in diesem Organ die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in den BALB/c-Mäusen stärker infiziert als in den C57BL/6-Tieren, wenngleich dieser Unterschied nicht signifikant ausfällt. Mit Ausnahme eines Tieres lassen sich nach drei Tagen in den C57BL/6-Mäusen keine infizierten Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in der Milz nachweisen. In den BALB/c-Tieren finden sich zu diesem Zeitpunkt Leishmanien in vier der sechs Tiere, mit einer durchschnittlichen Infektionslast von 0,003 c/pg DNS. Nach einer Woche lassen sich mit circa 0,002 c/pg DNS auch in den meisten C57BL/6-Tieren Parasiten nachweisen, während sich in den BALB/c die Zellen mit 0,005 c/pg DNS nur geringfügig stärker infiziert zeigen. Die Menge an nachgewiesenem Leishmanienerbgut ist damit in den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen der Milz deutlich geringer als in den Hinterpfoten.

In den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen aus der Milz kann 3 Tage nach der Infektion nur in zwei der sechs BALB/c-Tieren Leishmanien-DNS mit durchschnittlich 0,18 c/pg DNS detektiert werden; keine dagegen in den Zellen aus den sechs C57BL/6-Tieren. Nach einer Woche lässt sich das Erbgut des Parasiten kaum mehr nachweisen. In drei C57BL/6-Mäusen gelingt dies mit 0,004 c/pg DNS, in der BALB/c-Population nur bei einem Individuum ebenfalls mit 0,004 c/pg DNS.

Innerhalb der Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen gelingt der Nachweis von nur geringen Mengen an DNS von *L. major* und es bestehen praktisch keine Differenzen zwischen den beiden Mausstämmen. Sieht man nach drei Tagen von einem BALB/c-Tier ab, in dem 0,005 c/pg DNS nachgewiesen werden können, so liegt bei beiden Mausstämmen die durchschnittliche Infektionslast bei etwa 0,001 c/pg DNS. Nach einer Woche nimmt diese leicht auf durchschnittlich 0,002 bis 0,003 c/pg DNS zu.

Um zusammenfassend die klarsten Unterschiede der Leishmanienlast der einzelnen Zellpopulationen in den verschiedenen Organen herauszustellen, lässt sich Folgendes festhalten:

- i) Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen, zu denen neutrophile Granulozyten, MDSCs und Makrophagen zählen, sind in den Hinterpfoten der BALB/c-Mäuse mir *L. major* infiziert, als in den C57BL/6-Tieren. Die Menge an nachgewiesenem Leishmanien-Erbgut nimmt dabei vom dritten auf den siebten Tag bei beiden Stämmen deutlich zu. Während sich in den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>

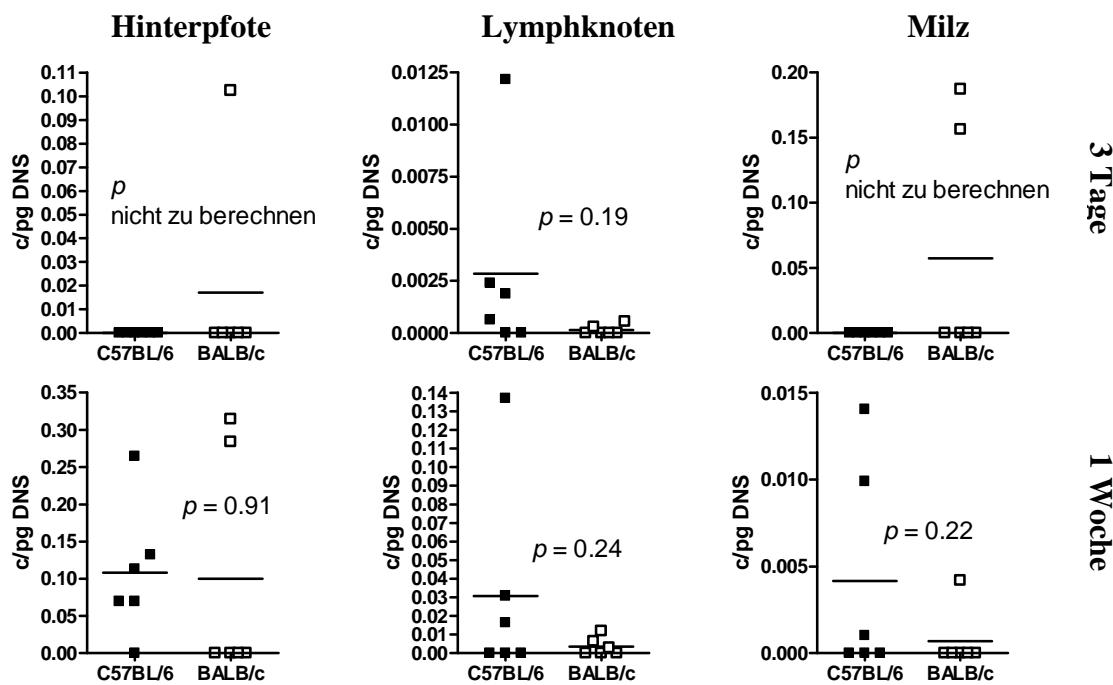
Zellen der poplitealen Lymphknoten keine Parasiten nachweisen lassen, finden sie sich in der Milz in sehr geringen Mengen, wiederum stärker in den BALB/c-Tieren.

ii) Die am stärksten von *L. major* infizierten Zellen innerhalb des Experimentes stellen die Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus den Hinterpfoten der C57BL/6-Mäuse dar. Auch in den poplitealen Lymphknoten befinden sich in den C57BL/6-Tieren nach drei und nach sieben Tagen mehr Leishmanien in diesen Zellen, als in den BALB/c, wenngleich auch, verglichen mit den Hinterpfoten, in deutlich geringerer Menge. Mit einem p-Wert von 0,06 ist dieser Unterschied nach drei Tagen fast signifikant. In der Milz hingegen lassen sich kaum Leishmanien in diesem Zelltyp nachweisen. Es kann nur spekuliert werden, um welche Zellen es sich dabei handelt. CD11b ist ein Marker für myeloide Zellen und findet sich auf Granulozyten (die aber zusätzlich Gr-1<sup>+</sup> sind), Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, NK-Zellen und sogar verschiedenen Lymphozyten (Lai *et al.*, 1998, Iwasaki, 2003).

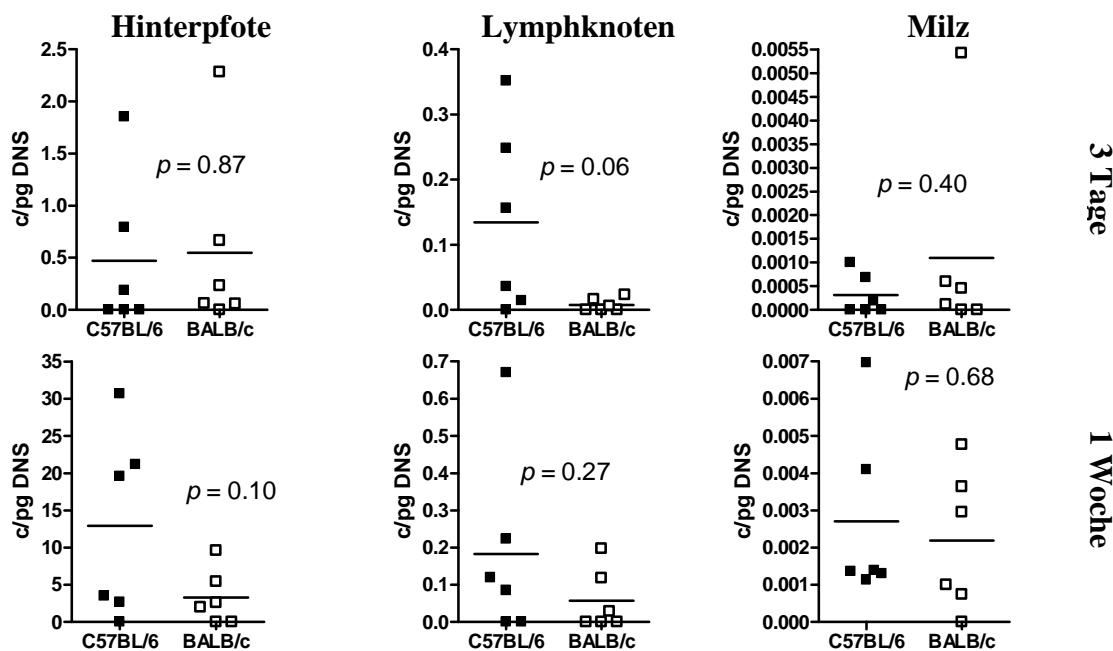
iii) In den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen der Hinterpfoten befinden sich initial keine Parasiten. Nach einer Woche lassen sich in beiden Tierstämmen gleich viele Leishmanien detektieren. Sie stellen die am schwächsten infizierte Zellpopulation in den Hinterpfoten in diesem Versuch dar. In den Lymphknoten können in diesem Zelltyp nur wenige Leishmanien nachgewiesen werden, tendenziell aber mehr in den C57BL/6-Tieren. In der Milz zeigen sich nach drei Tagen nur in zwei BALB/c-Mäusen infizierte Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen. Nach einer Woche lassen sich dann in beiden Mausstämmen kaum mehr Parasiten nachweisen. Wie bereits erwähnt binden AK gegen Gr-1 sowohl an Ly-6G, ein reiner Granulozytenmarker, wie auch an Ly-6C, welches auf Neutrophilen, DCs, sowie auf verschiedenen Formen von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten zu finden ist (Daley *et al.*, 2008).

Kritischerweise muss angemerkt werden, dass in der Zusammenschau beider durchgeföhrter Experimente keiner der gemessenen Unterschiede in der Menge an Leishmanien-DNS signifikant ist und, wie in Abbildungen 24 zu sehen, in vielen Proben überhaupt keine Leishmanien-DNS nachgewiesen werden kann. Dies lässt sich allerdings durch die oftmals sehr geringen Zellzahlen erklären, aus denen die DNS für den Nachweis der Parasiten gewonnen wurde – zum Teil wurde die DNS aus nur 1000 Zellen extrahiert. Die Leistungsfähigkeit der Real Time-PCR scheint hier an ihre Grenzen zu gelangen. Und dennoch zeichnen sich bei genauer Betrachtung zwischen den BALB/c- und den C57BL/6-Mäusen leichte Unterschiede in der Infektionslast verschiedener Zellpopulationen ab.

**a)  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^-$  Zellen**



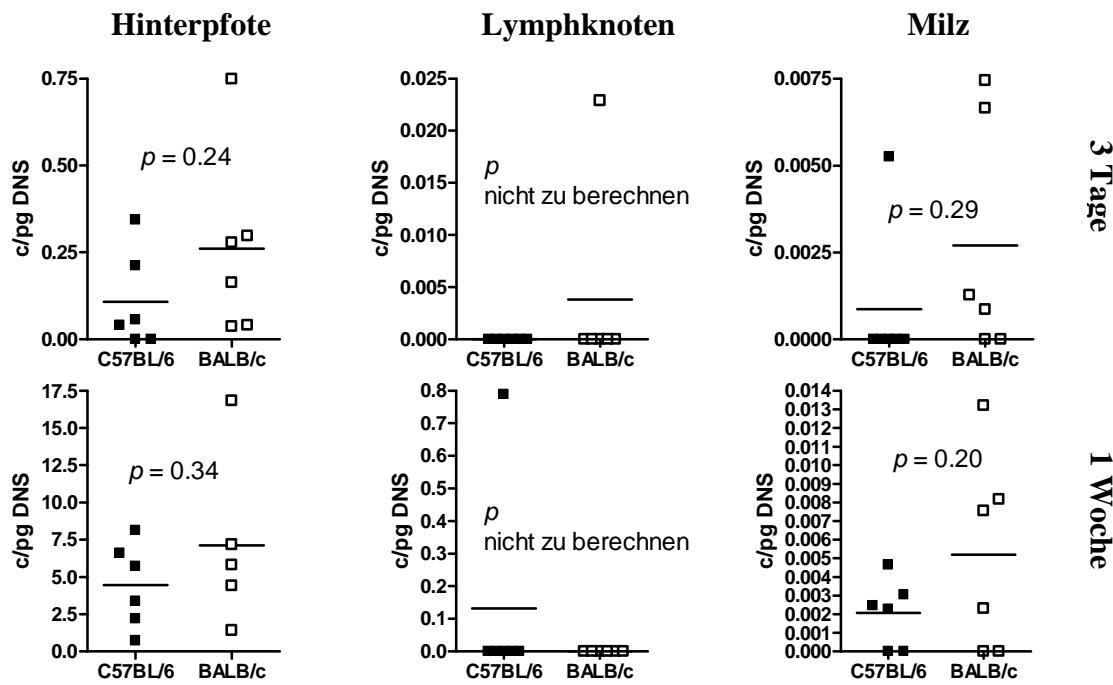
**b)  $\text{Gr-1}^- \text{CD11b}^+$  Zellen**



**Abb. 24:** Unterschiede in der Menge an Leishmanien-DNS in den  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^-$  (a),  $\text{Gr-1}^- \text{CD11b}^+$  (b) und  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  Zellen (c) in den infizierten Hinterpfoten, den poplitealen Lymphknoten sowie der Milz. Jeweils drei BALB/c- und C57BL/6-Tiere wurden dazu für 3 Tage in beiden Hinterpfoten mit *L. major* infiziert und die Zellen aus den beiden Hinterpfoten, den beiden poplitealen Lymphknoten und der Milz entsprechend Abb. 23 sortiert...

Fortsetzung der Abbildung auf der folgenden Seite.

c)  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  Zellen



**Abb. 24:** Unterschiede in der Menge an Leishmanien-DNS in den  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^-$  (a),  $\text{Gr-1}^- \text{CD11b}^+$  (b) und  $\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$  Zellen (c) in den infizierten Hinterpfoten, den poplitealen Lymphknoten sowie der Milz. Jeweils drei BALB/c- und C57BL/6-Tiere wurden dazu für 3 Tage in beiden Hinterpfoten mit *L. major* infiziert und die Zellen aus den beiden Hinterpfoten, den beiden poplitealen Lymphknoten und der Milz entsprechend Abb. 23 sortiert. Anschließend konnte über eine Real Time-PCR aus der gewonnenen DNS der Gehalt an Leishmanien-DNS, angegeben in Anzahl an *L. major*-Genkopien pro Pikogramm Maus-DNS (c/pg DNS), bestimmt werden. Analog wurde nach einer Infektion der Tiere für 1 Woche verfahren. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander mit je drei Tieren je Stamm durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Zusammenschau beider Experimente. Über einen Mann-Whitney-Test werden die C57BL/6- mit den BALB/c-Tieren verglichen, der resultierende p-Wert ist angegeben.

## 5. Diskussion

Um potenzielle Differenzen in der Infektionskinetik zwischen BALB/c- und C57BL/6-Tieren aufzudecken, wurde in dieser Arbeit die Zellzusammensetzung in den infizierten Hinterpfoten, sowie den drainierenden poplitealen Lymphknoten innerhalb der ersten zwei Wochen einer *in vivo*-Infektion mit *L. major* untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Rekrutierung und dem Verhalten neutrophiler Granulozyten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gesamtzellzahl in den infizierten Hinterpfoten der C57BL/6-Tiere die in den BALB/c-Mäusen innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 2 Wochen stets signifikant übertraf, während in den drainierenden poplitealen Lymphknoten tendenziell mehr Zellen in den BALB/c-Tieren registriert wurden (Abb. 19). Bei beiden Tieren fand sich in beiden untersuchten Geweben ferner eine kontinuierliche Zunahme der Zellzahl. Letzteres erklärt sich aus der akuten Entzündungsreaktion, die in den Tieren abläuft. In der Literatur wird bereits 2 Stunden nach der Infektion das Einwandern von Leukozyten an der Inokulationsstelle und nach 8 Stunden das Vorliegen eines dichten Infiltrates lichtmikroskopisch beschrieben (Beil *et al.*, 1992). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine fortgesetzte Rekrutierung von Leukozyten in den ersten 2 Wochen der Infektion hin. Auch für den drainierenden Lymphknoten wird das Einwandern verschiedener Leukozytenspezies im Rahmen der Infektion mit *L. major* geschildert (dos Santos *et al.*, 2008, Ritter *et al.*, 2007). Eine genauere Differenzierung und Diskussion der beteiligten Zellpopulationen findet sich im Folgenden.

In Hinblick auf die Neutrophilen ( $CD11b^+Ly-6C^{int}Ly-6G^+$ ) zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen (Abb. 21). In den Hinterpfoten der schwarzen C57BL/6-Tiere lagen bereits ab dem zweiten Tag der Infektion deutlich mehr Neutrophile vor als in den BALB/c-Mäusen. Bis zum siebten Tag nahm deren Zahl dann deutlich ab und näherte sich dem Niveau in den BALB/c-Tieren an. Während in der zweiten Woche die Zahl an Neutrophilen in den C57BL/6-Tieren konstant niedrig blieb, nahm sie in den BALB/c leicht zu und übertraf am Tag 14 sogar die in den C57BL/6. Untersuchungen von Charmoy *et al.* konnten kürzlich bestätigen, dass in resistenten Mäusen Neutrophile innerhalb von wenigen Stunden in großer Zahl an die Inokulationsstelle gelockt werden, deren Zahl aber nach 3 Tagen auf 1 bis 2 % des Spitzenwertes wieder abfällt, während in den suszeptiblen BALB/c-Tieren noch nach 10 Tagen Neutrophile in großer Zahl vorliegen und weiter zunehmen (Charmoy *et al.*, 2010). Offensichtlich werden Neutrophile in den C57BL/6-Tieren viel

rascher an der Inokulationsstelle rekrutiert als dies in den BALB/c-Mäusen geschieht. Gleichwohl wird ihre Zahl im Laufe der ersten Woche der Infektion auch wieder schnell herunter reguliert.

Verschiedene Faktoren beeinflussen das Einwandern von Neutrophilen an den Inokulationsort des Parasiten: die mechanische Verletzung von Gewebe durch den Stich der Sandmücke, beziehungsweise die Nadel im Rahmen der Infektion (Peters *et al.*, 2008), die Freisetzung Granulozyten-chemotaktischer Substanzen durch Promastigote (van Zandbergen *et al.*, 2002, Müller *et al.*, 2001) oder auch der Speichel des Vektors (Teixeira *et al.*, 2005). Neben ihrem größeren Aufgebot in der Frühphase der Infektion sind die Neutrophilen aus einem weiteren Grund in den C57BL/6-Tieren bemerkenswert: Verglichen mit den BALB/c-Mäusen produzieren sie in den C57BL/6-Tieren in etwa die doppelte bis dreifache Menge an Neutrophiler Elastase (NE), welche der Aktivierung infizierter Makrophagen über TLR 4 dient und diese in deren antimikrobiellen Aktivität verstärkt (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007, Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Neutrophile aus BALB/c-Tieren werden dagegen deutlich langsamer in den infizierten Hinterpfoten rekrutiert und produzieren weniger NE, was den C57BL/6-Mäusen eventuell einen Vorteil hinsichtlich einer frühen Elimination von Parasiten verschafft.

Die rasche Abnahme der Neutrophilen im Laufe der ersten Woche mag der kurzen Halbwertszeit dieses Zelltyps von nur wenigen Stunden geschuldet sein. Zwar wird in der Literatur eine Verzögerung der Apoptose von humanen Neutrophilen durch Koinkubation mit *L. major*-Promastigoten beschrieben (Aga *et al.*, 2002), doch weisen andere Untersuchungen darauf hin, dass durch Zugabe von Makrophagen die Apoptoserate infizierter neutrophiler Granulozyten beachtlich ansteigt (Allenbach *et al.*, 2006, Allenbach *et al.*, 2008). Makrophagen können demnach über membranständiges TNF Apoptose in neutrophilen Granulozyten induzieren. Dieser Vorgang wird durch das Vorliegen von *L. major* in der Zellkultur verstärkt, wobei wiederum die C57BL/6-Mäuse im Vorteil zu sein scheinen. Deren Makrophagen sind viel effektiver in der Induktion der Apoptose, als die aus BALB/c-Tieren (Allenbach *et al.*, 2006) und werden zudem rascher am Infektionsort rekrutiert.

Der Rückgang der Neutrophilen in den infizierten Hinterpfoten der C57BL/6-Tiere wird mutmaßlich also auch durch eine Makrophagen-getriggerte Induktion der Apoptose der Neutrophilen mit bedingt. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Dezimierung der Neutrophilen die Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Mediatoren hemmt, sowie die Bildung antiinflammatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$  fördert (Huynh *et al.*, 2002). Dies erklärt möglicherweise die rasche Abheilung entzündeter Hautareale in C57BL/6-Tieren im Rahmen der Rekonvaleszenz nach einer kutanen Leishmaniasis (Allenbach *et al.*, 2006).

Neutrophile scheinen gerade am Anfang der Konfrontation mit dem Parasiten eine wichtige Rolle in der Abwehr zu spielen. Doch durch die Bildung zahlreicher toxischer Metaboliten wie NO, Sauerstoffradikale und Enzymen wie die NE, die NADPH-Oxidase oder auch die Myeloperoxidase schädigen sie zu einem gewissen Teil auch umliegendes, gesundes Gewebe (Segal, 2005, Nathan, 2006). Daher macht es Sinn, die Anzahl Neutrophiler am Infektionsort möglichst rasch nach dem Initiiieren geeigneter alternativer Abwehrmechanismen wie Makrophagen, NK-Zellen oder AK auch wieder zu verringern. In BALB/c-Mäusen trat die Rekrutierung der Neutrophilen nur verzögert ein und setzte sich auch 2 Wochen nach Beginn der Infektion fort. BALB/c-Tieren gelingt es damit scheinbar nicht, anfangs Neutrophile in ausreichender Zahl und leishmanizider Wirkung bereit zu stellen, und ebenso wenig, deren „Kollateralschäden“ in der Spätphase der Infektion zu minimieren.

In den drainierenden poplitealen Lymphknoten zeigten sich hingegen tendenziell mehr Neutrophile in den BALB/c-Tieren (Abb. 21). Während in den C57BL/6-Mäusen deren Zahl relativ konstant niedrig blieb, nahm sie in den BALB/c in der ersten Woche leicht ab, um dann bis zum Tag 14 anzusteigen. Neutrophile haben nicht allein eine Abwehr-, sondern auch eine immunoregulative Funktion: In BALB/c-Tieren entwickelt sich nach der Depletion von neutrophilen Granulozyten keine  $T_{H2}$ -Antwort, sondern, wie in den resistenten C57BL/6-Mäusen, eine  $T_{H1}$ -Immunantwort (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Möglicherweise ist die große Zahl neutrophiler Granulozyten in den Lymphknoten der BALB/c-Mäuse für die Etablierung einer  $T_{H2}$ -Antwort mit verantwortlich.

Bemerkenswert ist zudem, dass sich Neutrophile und myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) hinsichtlich ihrer Oberflächenantigene recht ähnlich sind. Bei MDSCs handelt es sich um eine heterogene Gruppe myeloider Zellen, die in der Lage sind sowohl die angeborene, wie auch die adaptive Immunantwort zu inhibieren (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2009). Sie befinden sich üblicherweise im Knochenmark, der Milz, aber auch den Lymphknoten. Sie sind  $CD11b^+Ly-6C^{low/high}Ly-6G^{+/-}$  und könnten sich demnach innerhalb der Population  $CD11b^+Ly-6C^{int}Ly-6G^+$  Zellen in den Lymphknoten der BALB/c-Mäuse befinden (Abb. 17 c). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass unter anderem Trypanosomen, die genau wie Leishmanien zu den Protozoen gehören, die Zahl an MDSCs in lymphatischem Gewebe erhöhen, um von der immunsuppressiven Wirkung zu profitieren (Ribechini *et al.*, 2010, Goñi *et al.*, 2002). Eventuell gelingt *L. major* genau dies verstärkt in den BALB/c-Tieren und nur in geringerem Maße auch in den C57BL/6-Mäusen, in denen die Population  $CD11b^+Ly-6C^{int}Ly-6G^+$  Zellen in den Lymphknoten kleiner ist (Abb. 21).

Hinsichtlich der Makrophagen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in den infizierten Hinterpfoten der resistenten C57BL/6-Mäuse im Laufe der ersten zwei Wochen der Infektion mehr unreife ( $CD11b^+Ly-6C^{high}Ly-6G^-$ ) und reife Makrophagen ( $CD11b^+Ly-6C^{int}Ly-6G^-$ ) vorlagen, als dies in den BALB/c-Tieren der Fall war (vgl. Abb. 22). Vor allem reife Makrophagen wurden ab dem siebten Tag vermehrt in den C57BL/6-Tieren rekrutiert. In den drainierenden poplitealen Lymphknoten ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen, wenngleich auch hier eine stärkere Zunahme an reifen Makrophagen in der zweiten Infektionswoche in den resistenten C57BL/6-Tieren beobachtet werden konnte.

Es ist bekannt, dass sich nach der Infektion der C57BL/6-Tiere mit *L. major* eine  $T_{H1}$ -Antwort entwickelt. Via IL-12 werden  $CD4^+ T_{H1}$ -Zellen aktiviert, die über IFN- $\gamma$  die induzierbare NO-Synthase (iNOS) der Makrophagen stimulieren können (Bogdan *et al.*, 1990). Dies befähigt die Makrophagen, reaktive Stickstoffmetabolite zu bilden, die intrazelluläre Parasiten effizient abzutöten vermögen (Diefenbach *et al.*, 1998). Während in einer solchen  $T_{H1}$ -Immunantwort Makrophagen also aktiviert werden, führt die  $T_{H2}$ -Antwort in den BALB/c-Tieren sogar zu einer Hemmung deren Funktion (Bogdan, 2008).

Die Zunahme an reifen Makrophagen in der zweiten Infektionswoche ist bei den C57BL/6-Mäusen Ausdruck der beginnenden  $T_{H1}$ -Antwort. Es werden dabei nicht nur vermehrt Makrophagen an der Inokulationsstelle rekrutiert, sondern sie weisen im Gegensatz zu den BALB/c-Zellen dank der aktivierten iNOS auch eine erhöhte antimikrobizide Kompetenz auf. Die Makrophagen können die Leishmanien in den C57BL/6-Mäusen somit in großer Zahl phagozytieren und kompetent abtöten. Gleichzeitig sind sie, wie bereits erwähnt, in der Lage über membranständiges TNF Apoptose in Neutrophilen zu induzieren. Dieser Vorgang wird durch die Anwesenheit von *L. major* und einem zunehmenden Verhältnis von Makrophagen zu Neutrophilen verstärkt. Studien haben gezeigt, dass ein rascheres Einwandern reifer Makrophagen für eine erfolgreiche Abwehr der Leishmanien von großer Bedeutung ist (Sunderkötter *et al.*, 1993).

Makrophagen liegen in resistenten C57BL/6-Mäusen folglich in den infizierten Hinterpfoten in größerer Zahl vor, sind besser gegen den Parasiten gewappnet und können in Neutrophilen effizienter Apoptose induzieren als in den BALB/c-Tieren. Diese Befunde legen nahe, dass die Makrophagen aus den C57BL/6-Mäusen Leishmanien wirksamer eliminieren können.

Ungeachtet aller Abwehrmechanismen finden sich rasch einige Leishmanien, die diese erfolgreich umgehen und, nach Erreichen des intrazellulären Kompartiments der Neutrophilen, lebendig bleiben (Peters *et al.*, 2008). In den histologischen Experimenten, die in der vor-

liegenden Arbeit durchgeführt wurden, konnte die Möglichkeit einer Infektion von Neutrophilen beider Mausstämme *in vitro* bestätigt werden (Abb. 9). Dabei war der Wechsel der promastigoten in die amastigote Form der Leishmanien nachzuvollziehen. Im Rahmen der Infektion nahm der Anteil derjenigen Zellen, die morphologisch Neutrophilen entsprechen, stark ab. Mutmaßlich waren diese Zellen bereits abgestorben oder es hat sich die Morphologie durch das Eindringen und den Volumenbedarf der Parasiten sowie durch das Einleiten der Apoptose mit beginnender Karyorrhexis und Karyopyknose geändert.

Angesichts der genannten Differenzen in der Rekrutierung und dem Abwehrverhalten der Neutrophilen beider Mausstämme stellt sich nun die Frage, ob sie unterschiedlich rasch infiziert werden und in Apoptose gehen. Dazu wurden in dieser Arbeit Peritonealzellen mit CFSE-markierten *L. major* (*L. major*<sup>CFSE</sup>) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 24 Stunden untersucht. Wie sich zeigte, nahm die Zahl infizierter Zellen in beiden Mausstämmen kontinuierlich zu (Abb. 15). Dabei konnten Leishmanien vorwiegend in hochgranulären Zellen nachgewiesen werden, die sich vor allem aus Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen, und damit Neutrophilen, MDSCs und Makrophagen zusammensetzten. Dies legt nahe, dass eben diese Neutrophilen und Makrophagen die bevorzugten Wirtszellen von *L. major* darstellen, wobei in der Literatur auch dendritische Zellen und Fibroblasten als potenzielle Ziele beschrieben werden (Laskay *et al.*, 2003, Bogdan *et al.*, 2000). Innerhalb von 23 Stunden wurden 47-81 % der hochgranulären Zellen aus BALB/c-Tieren und 65-71 % aus C57BL/6-Mäusen infiziert. Niedriggranuläre Zellen waren indes praktisch nicht befallen. Es konnten aber keine deutlichen Unterschiede zwischen den Infektionsraten beider Mausstämme beobachtet werden. Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus BALB/c-Tieren scheinen damit nicht stärker infiziert zu sein, als solche aus C57BL/6-Mäusen und umgekehrt. Allerdings lässt der Nachweis von CFSE in einer Zelle nicht zwingend auf eine Infektion schließen. Es ist auch möglich, dass ein Phagozyt Parasiten aufgenommen hat und im Begriff ist diese in Phagolysosomen zu eliminieren.

Wie bereits erwähnt, wird in der Literatur eine Verzögerung der Apoptose von Neutrophilen durch intrazelluläre *L. major* über eine Hemmung der Caspase-3 beschrieben (Aga *et al.*, 2002). Andere Untersuchungen wiederum weisen eine Induktion der Apoptose infizierter Granulozyten durch membranständiges TNF auf Makrophagen nach (Allenbach *et al.*, 2006, Allenbach *et al.*, 2008). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei den infizierten Zellen beider Mausstämme eine ähnlich hohe Apoptoserate von 31-45 % unter den BALB/c- und 31-51 % unter den C57BL/6-Tieren nach einer Infektionszeit von 23 Stunden

(Abb. 16). Bei den nicht infizierten Zellen der BALB/c-Tiere lag sie indes bei 20-30 %, beziehungsweise innerhalb der C57BL/6 bei 24-35 %. Betrachtet man dagegen ausschließlich die hochgranulären Zellen, in denen die Neutrophilen, Makrophagen und MDSCs vermutet werden dürfen, so zeigte sich bei den infizierten Zellen aus den BALB/c eine um 6 bis 18 %, bei den C57BL/6 eine um 2 bis 14 % niedrigere Apoptoserate. Damit scheint die Beobachtung von Aga *et al.* bestätigt. Leishmanien profitieren von der verzögerten Apoptose der Neutrophilen dadurch, dass sie länger intrazellulär geschützt verweilen und auf das Einwandern ihrer Zielpopulation, der Makrophagen, warten können (van Zandbergen *et al.*, 2004, Laskay *et al.*, 2003). Vergleicht man die Apoptoserate der infizierten Zellen beider Mausstämme miteinander, so ergeben sich keine auffälligen Unterschiede. Infizierte wie auch nicht infizierte hochgranuläre Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Tieren scheinen demnach ähnlich rasch in Apoptose zu gehen.

Die von Allenbach *et al.* beschriebene Induktion der Apoptose von mit *L. major* infizierten Zellen benötigt ein Überangebot von Makrophagen: Das Verhältnis von Makrophagen zu Neutrophilen muss bei den C57BL/6- mindestens 2:1 und bei den BALB/c-Tieren sogar 5:1 betragen (Allenbach *et al.*, 2006). Ein solch hoher Anteil an Makrophagen hat im vorliegenden Versuch nicht bestanden, da nach Verwendung von Thioglycollat-Medium wie auch Caseinhydrolysat großteils Neutrophile im Peritonealraum vorlagen. Andererseits wurde bereits gezeigt, dass *in vivo* in den Hinterpfoten der C57BL/6-Mäuse der Anteil an Neutrophilen im Laufe der Infektion rasch wieder absinkt, während die Makrophagen zunehmen (Abb. 21, 22). So lag nach 14 Tagen der Infektion das Verhältnis aus reifen Makrophagen zu Neutrophilen in den Hinterpfoten der C57BL/6-Mäuse bei etwa 18:1, bei den BALB/c-Tieren hingegen nur bei 4:1. Folglich bestand bei den C57BL/6-Tieren ein ausreichend hoher Anteil an Makrophagen, der für die rasche Abnahme der Neutrophilen in der zweiten Woche der Infektion mutmaßlich mitverantwortlich war, wohingegen bei den BALB/c-Mäusen verhältnismäßig wenig Makrophagen vorlagen, die zudem weniger effektiv in der Induktion der Apoptose sind (Allenbach *et al.*, 2006).

Die Bedeutung einer raschen Minderung der Zahl neutrophiler Granulozyten zur Prävention von Sekundärschäden durch deren toxisches Arsenal wurde bereits erörtert. Doch vielleicht erfüllt sie noch eine weitere Funktion: Neutrophile werden in der Literatur als erste Wirtszellen für den Parasiten *L. major* beschrieben (Müller *et al.*, 2001). Jedoch können sie sich in diesen nicht vermehren. Ihre wahren Zielzellen stellen vielmehr die Makrophagen dar. Eben diese sind aber im aktivierte Zustand in der Lage, intrazellulär eingedrungene Leishmanien

effizient abzutöten (Bogdan *et al.*, 2000, Diefenbach *et al.*, 1998, Louis *et al.*, 1998). Die Parasiten müssen demzufolge eine Strategie entwickeln, unbemerkt in diejenigen Zellen einzudringen, die ihnen mit am gefährlichsten werden können.

Neutrophilen scheint bei diesem Unterfangen eine Schlüsselrolle zuzukommen. In einem ersten Schritt locken die Leishmanien aktiv Neutrophile an den Ort der Infektion ohne deren Abwehrmechanismen zu initiieren (Peters *et al.*, 2009). Dazu sezernieren sie einen *Leishmania* chemotactic factor (LCF), der zugleich die Freisetzung des Proteins IP-10 hemmt, welches NK-Zellen aktivieren kann (van Zandbergen *et al.*, 2002), und der mit dem Lipoxin A4 Rezeptor (ALX) auf der Oberfläche der Neutrophilen wechselwirkt, woraus eine verstärkte unbemerkte Aufnahme von Leishmanien in Neutrophile, eine Inhibierung der neutrophilen Abwehrmechanismen (Godson *et al.*, 2000), sowie eine höhere Überlebensrate intrazellulärer Parasiten resultiert (Wenzel *et al.*, 2009). Zusätzlich erreichen bei der Infektion des Wirts neben lebendigen, infektiösen Leishmanien auch apoptotische Promastigote das Gewebe (van Zandbergen *et al.*, 2006). Diese tragen auf ihrer Zelloberfläche Phosphatidylserin, das im Wirtstier ein Zeichen für die Apoptose einer Zelle darstellt. In einem Organismus werden permanent Zellen apoptotisch und müssen von Phagozyten abgeräumt werden. Da von diesen in der Regel keine Gefahr ausgeht, ist eine Aktivierung toxischer Abwehrmechanismen in diesem Fall unnötig (Voll *et al.*, 1997). So induziert nun aber auch das Phosphatidylserin auf den apoptotischen Promastigoten die Freisetzung von entzündungshemmendem TGF- $\beta$  und IL-10, sowie die Hemmung des proinflammatorischen TNF (van Zandbergen *et al.*, 2006). In der Summe werden die Abwehrmechanismen der Neutrophilen durch apoptotische Promastigote gehemmt und infektiöse Leishmanien erreichen unbehelligt das intrazelluläre Kompartiment. Hier sind sie geschützt vor toxischen Serumbestandteilen und warten auf die Ankunft der Makrophagen. Dafür verzögern sie die Apoptose der Neutrophilen, die sie beherbergen.

Die Arbeitsgruppe um T. Laskay hatte die Theorie aufgestellt, dass die Leishmanien in den Neutrophilen persistieren und sich nach deren Apoptose von den einwandernden Makrophagen phagozytieren lassen (van Zandbergen *et al.*, 2004, Laskay *et al.*, 2003). Geschützt, wie in dem berühmten Trojanischen Pferd, erreichen sie unbemerkt das Innere ihrer Zielzellen, denn auch die apoptotischen Neutrophilen hemmen die Abwehrmaschinerie der Makrophagen (Meagher *et al.*, 1992, Savill *et al.*, 1989).

Die Versuche von Peters *et al.* konnten bestätigen, dass *L. major* an der Inokulationsstelle rasch in Neutrophile eindringen und nach 6 bis 7 Tagen vorwiegend in Makrophagen zu finden sind (Peters *et al.*, 2008). Sie zeigen ferner, dass sie zum Zeitpunkt der Phagozytose der Neutrophilen durch die Makrophagen das intrazelluläre Kompartiment bereits wieder verlas-

sen haben. Die momentane Vorstellung ist die, dass die Leishmanien die Neutrophilen kurz vor deren Phagozytose verlassen und sich sozusagen „neben diesen verstecken“. Analog zu ihrem Eintritt in die Neutrophilen, der ihnen durch apoptotische Promastigote gegeben wird, führt nun das Phosphatidylserin auf der Oberfläche der apoptotischen Neutrophilen zu einer „Entschärfung“ der Makrophagen, so dass sie die extrazellulären Leishmanien unbehelligt infizieren können. In Anlehnung an den Film „Monty Python and the Holy Grail“ spricht man von der Trojan Rabbit-Theorie (Ritter *et al.*, 2009). Welchen Vorteil den Leishmanien das Verlassen der Neutrophilen bringt, bleibt unklar.

Neutrophile können von *L. major* also ausgenutzt werden, um sicher in ihre eigentlichen Wirtszellen, die Makrophagen, zu gelangen. Vor diesem Hintergrund mag eine rasche Reduzierung deren Zahl an der Inokulationsstelle bei den C57BL/6-Tieren vorteilhaft sein. Durch die prolongierte Rekrutierung von Neutrophilen in den BALB/c-Mäusen steht den Leishmanien auch lange Zeit diese sichere Rückzugsmöglichkeit vor toxischen Serumbestandteilen und mögliche Eintrittskarte in die Makrophagen zur Verfügung. Zu klären bleibt die Frage, ob Neutrophile aus C57BL/6- und BALB/c-Tieren gleichermaßen als sichere Zuflucht verwendet werden können.

Experimente, in denen Neutrophile durch Verwendung von Antikörpern depletiert werden, zeigen unterschiedliche Folgen für die beiden Mausstämme. Die Depletion der Neutrophile führt in den C57BL/6-Tieren zu einer verstärkten Infektion der Makrophagen und Replikation von *L. major* (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). In den BALB/c-Mäusen hingegen resultiert eine verringerte Parasitenzahl und eine insgesamt kleinere Primärläsion an der Inokulationsstelle (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Der in derartigen Experimenten häufig verwendete Antikörper RB6-8C5 richtet sich dabei gegen das Antigen Gr-1 und damit nicht ausschließlich gegen Neutrophile (Daley *et al.*, 2008). Vielmehr ist es denkbar, dass durch den Antikörper auch MDSCs depletiert werden, die, wie beschrieben, eine immunsuppressive Wirkung ausüben. Wie bereits diskutiert, kommen diese in den Lymphknoten der BALB/c-Tiere unter Umständen in größerer Zahl vor, als in den C57BL/6-Mäusen, so dass deren Depletion hier eine deutlich verringerte Hemmung der Immunabwehr zur Folge haben könnte. Derart immunkompetentere BALB/c-Tiere wären vermutlich effektiver in der Abwehr der Leishmanien, was den günstigeren klinischen Verlauf erklären könnte. Ferner wird in den BALB/c-Tieren ohne Neutrophile die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort beobachtet, vergleichbar mit den resistenten C57BL/6-Tieren (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Scheinbar spielen die Neutrophilen eine immunregulatorische Rolle in der Induktion einer T<sub>H</sub>2-Antwort in den suszeptiblen BALB/c-Mäusen.

Wie bereits mehrfach in dieser Arbeit beschrieben, unterscheiden sich die beiden Tierstämme im Verlauf der Leishmaniasis. Während sich bei den resistenten C57BL/6-Tieren eine lokal begrenzte, kutane Leishmaniasis ausbildet, die nach etwa 6 Wochen spontan ausheilt, schreitet die Infektion bei den BALB/c-Mäusen fort, greift auf innere Organe über und endet nach 30 bis 40 Wochen letal (Sacks *et al.*, 2002, Beil *et al.*, 1992). Um potenzielle Unterschiede in der frühen Parasitenlast verschiedener Organe aufzudecken, wurden in dieser Arbeit die infizierten Hinterpfoten, die drainierenden poplitealen Lymphknoten, sowie die Milz während der ersten Woche der Infektion auf ihren Gehalt an Leishmanien untersucht.

In den infizierten Hinterpfoten ließ sich innerhalb der Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen beider Stämme eine Zunahme der Parasitenzahl und eine tendenziell höhere Infektionslast in den BALB/c-Tieren feststellen (Abb. 24 c). Nach einer Infektionsdauer von drei Tagen enthielten die Zellen in den BALB/c-Tieren, verglichen mit den C57BL/6, bereits dreimal mehr Leishmanien-DNS. Es handelt sich bei diesen Zellen wahrscheinlich um Neutrophile, MDSCs und Makrophagen, die über die beiden Oberflächenmarker in dem vorliegenden Experiment nicht von einander unterschieden werden können. Die tendenziell, wenngleich nicht signifikant, höhere Parasitenlast in den BALB/c-Tieren könnte darauf hinweisen, dass die Neutrophilen, MDSCs und Makrophagen in diesen eher als Wirtszellen für *L. major* fungieren, als in den C57BL/6. Ebenso wäre es denkbar, dass sie Leishmanien in größerem Maße phagozytieren, wie die C57BL/6-Zellen, denn auch dann ließen sich über die RT-PCR größere Mengen an Parasiten-DNS intrazellulär nachweisen. Dagegen sprechen aber die anderen, bereits dargelegten Befunde dieser Arbeit.

In den lokal drainierenden Lymphknoten konnten in den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen hingegen keine Parasiten innerhalb der ersten Infektionswoche nachgewiesen werden, in der Milz nur in sehr kleiner Menge und tendenziell wieder stärker in den BALB/c-Mäusen (Abb. 24 c). Offensichtlich gelangen so früh weder infizierte Makrophagen, MDSCs oder Neutrophile über die Lymphe in den drainierenden Lymphknoten. Ob die geringfügig höhere Parasitenlast in den Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in der Milz der BALB/c-Tiere Ausdruck einer beginnenden systemischen Verbreitung des Erregers über infizierte Makrophagen ist, oder einfach eine stärkere Präsenz von Makrophagen mit abgetöteten *L. major* darstellt, bleibt unklar.

Überraschenderweise stellten sich die Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen als die am stärksten infizierte Population heraus. In allen drei Organen konnte in diesen *L. major* nachgewiesen werden, dabei tendenziell mehr in den C57BL/6-Tieren (Abb. 24 b). CD11b ist ein Marker für myeloide Zellen und findet sich auf Granulozyten (die aber zusätzlich Gr-1<sup>+</sup> sind), Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, NK-Zellen und sogar verschiedenen

Lymphozyten (Lai *et al.*, 1998, Iwasaki, 2003). Peters *et al.* beschreiben, dass *L. major* außer in Neutrophile und Makrophagen auch in dendritische Zellen (DCs) gelangt (Peters *et al.*, 2009). DCs stellen potente antigenpräsentierende Zellen (APCs) dar und fungieren damit als Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort (von Stebut, 2007). Sie liegen in verschiedenen Zustandsformen vor: Unreife DCs reifen nach dem Kontakt und der Aufnahme von Antigen (AG) zu reifen DCs heran, die sich daraufhin als professionelle APCs aufgrund ihrer hohen Dichte an MHC-II Molekülen und weiterer kostimulatorischer Liganden in besonderem Maße zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen eignen (Banchereau *et al.*, 1998). In Hinblick auf ihre Oberflächenmarker müssen DCs innerhalb der Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen vermutet werden.

Es wird beschrieben, dass dermale DCs Stunden nach der Infektion mit dem Parasiten *L. major* Leishmanien-AG aufnehmen, in den äußeren Parakortex des drainierenden Lymphknotens wandern und dort als APCs naiven T-Zellen über MHC-II Leishmanien-AG präsentieren (Ritter *et al.*, 2007, Moll *et al.*, 1993). Auf diese Weise reifen *L. major*-spezifische CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen heran, die an den Inokulationsort des Parasiten migrieren, um über IFN- $\gamma$  Makrophagen zu aktivieren (Lemos *et al.*, 2004). Interessanterweise scheinen die DCs der BALB/c-Tiere dabei in geringerem Maße zur Bildung von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen beizutragen (Filippi *et al.*, 2003). Möglicherweise ist der Nachweis von (fast signifikant) größeren Mengen an Leishmanien-DNS in den Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen der Lymphknoten von C57BL/6-Tieren (Abb. 24 b) Ausdruck einer stärkeren Präsenz von DCs, die *L. major* aufgenommen haben. Diese DCs in den Lymphknoten könnten eine entscheidende Rolle in der Etablierung einer protektiven T<sub>H</sub>1-Antwort einnehmen. Ein Befund der eventuell durch die Beobachtung gestützt wird, dass sich in C57BL/6-Mäusen ohne drainierende Lymphknoten eine T<sub>H</sub>2-Antwort ausbildet (Ehrchen *et al.*, 2008). Auch in den Hinterpfoten der C57BL/6-Tiere fanden sich nach einer Woche größere Mengen an Leishmanien-DNS in den Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen. Vermutlich liegen auch hier mehr DCs oder auch NK-Zellen vor, die Leishmanien phagozytieren und so den resistenten C57BL/6-Mäusen einen Vorteil gegenüber den suszeptiblen BALB/c-Tieren verschaffen.

## 6. Zusammenfassung

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Infektion mit dem Parasiten *L. major* ist nach momentanem Stand der Forschung abhängig vom Mausstamm: Ihnen kommt bei den suszeptiblen BALB/c- und den resistenten C57BL/6-Tieren eine unterschiedliche Bedeutung zu. Während ihre Zahl am Infektionsort der C57BL/6-Mäuse in den ersten Tagen der Infektion rasch ansteigt und im weiteren Verlauf auch wieder schnell abnimmt, nimmt sie bei den BALB/c-Mäusen nur langsam, aber fortdauernd zu. Die Neutrophilen beider Mausstämme werden von Leishmanien als Wirtszellen genutzt, wenngleich sie vor allem bei den C57BL/6-Tieren aufgrund ihrer größeren Anzahl und potenteren leishmaniziden Wirkung auch kompetent der Dezimierung des Parasiten dienen. In den drainierenden Lymphknoten erscheinen hingegen mehr Neutrophile in den BALB/c-Tieren, die möglicherweise gemeinsam mit MDSCs und dermalen DCs für die Etablierung der fatalen T<sub>H</sub>2-Immunantwort mit verantwortlich sind. Makrophagen, die nach ihrer Aktivierung effizient Leishmanien abtöten können, finden sich in größerer Zahl bei den C57BL/6-Tieren.

*In vitro* werden vor allem hochgranuläre Zellen (Neutrophile, Makrophagen und MDSCs) zunehmend von Leishmanien infiziert. Dabei zeigen derart infizierte, hochgranuläre Zellen eine niedrigere Apoptoserate als die nicht infizierten. Dieser Befund spricht dafür, dass *L. major* die Apoptose seiner Wirtsgranulozyten verzögert, um diese bis kurz vor dem Eintreffen der Makrophagen als sichere Zuflucht nutzen zu können. Insgesamt nimmt der Anteil apoptotischer Zellen bei beiden Mausstämmen in den ersten 23 Stunden der Infektion kontinuierlich zu. Signifikante Unterschiede zwischen den BALB/c- und C57BL/6-Tieren lassen sich hinsichtlich der Infektionskinetik sowie der Apoptoserate *in vitro* nicht feststellen.

*In vivo* allerdings zeigen sich Differenzen in der Parasitenlast beider Mausstämme. So lässt sich innerhalb der ersten Woche einer Infektion tendenziell mehr *L. major*-DNS in Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus den infizierten Hinterpfoten von BALB/c-Tieren nachweisen. Dies spricht für eine stärkere Infektion dieser Zellen, unter denen sich Neutrophile, Makrophagen und MDSCs befinden. Auch in der Milz von BALB/c-Tieren beinhalten diese Zellen mehr Leishmanien-erbgut. Mutmaßlich lässt sich daraus schließen, dass Neutrophile und Makrophagen in den BALB/c-Tieren eher als Wirtszellen ausgenutzt werden. Frei von Parasiten sind dagegen die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in den drainierenden Lymphknoten beider Mausstämme, was darauf hinweist, dass innerhalb der ersten Infektionswoche keine infizierten Neutrophilen und Makrophagen die lokalen Lymphknotenstationen erreichen. Eine höhere Parasitenlast in den Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen der C57BL/6-Mäuse ist möglicherweise Ausdruck einer verstärkten Prä-

senz von DCs, die in den infizierten Hinterpfoten Leishmanien aufnehmen und in den Lymphknoten der Etablierung einer protektiven  $T_{H1}$ -Antwort dienen.

Es lässt sich festhalten, dass *L. major* in BALB/c-Tieren über einen längeren Zeitraum Neutrophile an der Infektionsstelle in steigender Zahl vorfindet und diese infiziert. Die Apoptose derart infizierter Wirtszellen wird in beiden Mausstämmen verzögert, um den Leishmanien länger Schutz zu gewähren. Dieser „Escape-Mechanismus“ ist angesichts größerer Mengen an *L. major*-DNS in  $Gr-1^+CD11b^+$  Zellen bei den BALB/c-Mäusen stärker ausgeprägt. Der Parasit *L. major* profitiert demnach in den suszeptiblen BALB/c-Tieren mehr von Neutrophilen und Makrophagen als dies in den C57BL/6-Mäusen der Fall ist. Neben der möglichen Beeinflussung durch DCs, Makrophagen und MDSCs lässt sich der ungleiche Krankheitsverlauf von BALB/c- und C57BL/6-Tieren demzufolge auch auf die unterschiedliche Bedeutung der neutrophilen Granulozyten zurückführen.

## 7. Anhang

### 7.1. Literaturverzeichnis

**Aga E., Katschinski D.M., van Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Müller K., Solbach W., Laskay T.** (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* 169, 898–905

**Agrawal S., Rai M., Sundar S.** (2005) Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. *J Postgrad Med.* 51 Suppl 1, 53-57

**Allenbach C., Zufferey C., Perez C., Launois P., Mueller C., Tacchini-Cottier F.** (2006) Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. *J Immunol.* 176 (11), 6656-6664

**Allenbach C., Launois P., Mueller C., Tacchini-Cottier F.** (2008) An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol.* 38 (3), 720-731

**al Tuwaijri A.S., al Mofleh I.A., Mahmoud A.A.** (1990) Effect of *Leishmania major* on human polymorphonuclear leucocyte function in vitro. *J Med Microbiol.* 32 (3), 189-193

**Amato V.S., Tuon F.F., Siqueira A.M., Nicodemo A.C., Neto V.A.** (2007) Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 77 (2), 266-274

**Antoine J.C., Prina E., Lang T., Courret N.** (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends Microbiol.* 6 (10), 392-401

**Awasthi A., Mathur R.K., Saha B.** (2004) Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res.* 119 (6), 238-258

**AWMF online** (2006) Diagnostik und Therapie der viszeralen Leishmaniasis (Kala-Azar), Internetseite: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/042-004\\_S1\\_Diagnose\\_und\\_Therapie\\_der\\_viszeralen\\_Leishmaniasis\\_\\_Kala-Azar\\_\\_02-2006\\_02-2011.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/042-004_S1_Diagnose_und_Therapie_der_viszeralen_Leishmaniasis__Kala-Azar__02-2006_02-2011.pdf), aufgerufen am 07.01.2011

**Banchereau J., Steinman R.M.** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (6673), 245-252

**Bañuls A.L., Hide M., Prugnolle F.** (2007) Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 64, 1-109

**Bates P.A., Rogers M.E.** (2004) New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Curr Mol Med.* 4 (6), 601-609

**Beil W.J., Meinardus-Hager G., Neugebauer D.C., Sorg C.** (1992) Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol.* 52 (2), 135-142

**Belosevic M., Finbloom D.S., Van Der Meide P.H., Slayter M.V., Nacy C.A.** (1989) Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol.* 143 (1), 266-274

**Beverley S.M., Turco S.J.** (1998) Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite Leishmania. *Trends Microbiol.* 6 (1), 35-40

**Boecken G., Weitzel T., Sunderkötter C., Fischer M., von Stebut-Borschitz E., Bogdan C., Pietras M., Anders G., Harms-Zwingenberger G., Burchard G., Bialek R., Lippert U., Grobusch M., Erkens K., Fleischer B., Löbermann M., Schunk M., Sterzik B.** (2009) S1-Leitlinie Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland, *J Dtsch Dermatol Ges.* 7 Suppl 7, 1-38

**Bogdan C., Moll H., Solbach W., Röllinghoff M.** (1990) Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol.* 20 (5), 1131-1135

**Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W., Röllinghoff, M.** (1996) Invasion, control, and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 517–525

**Bogdan C., Röllinghoff M.** (1998) The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol.* 28 (1), 121-134

**Bogdan C., Röllinghoff M.** (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today* 15 (1), 22-28

**Bogdan C., Donhauser N., Döring R., Röllinghoff M., Diefenbach A., Rittig M.G.** (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med.* 191 (12), 2121-2130

**Bogdan C., Röllinghoff M., Diefenbach A.** (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 173, 17-26

**Bogdan C., Schönian G., Bañuls A.L., Hide M., Pratlong F., Lorenz E., Röllinghoff M., Mertens R.** (2000) Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 32 (2), 302-306. Epub 2000 Dec 29

**Bogdan C.** (2008) Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol.* 1(6), 1221-1234. Epub 2008 Mar 17

**Brittingham A., Morrison C.J., McMaster W.R., McGwire B.S., Chang K.P., Mosser D.M.** (1995) Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 155 (6), 3102-3111

**Carvalho E.M., Barral A., Costa J.M., Bittencourt A., Marsden P.** (1994) Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 56 (4), 315-325

**Chappuis F., Rijal S., Soto A., Menten J., Boelaert M.** (2006) A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 7, 333 (7571), 723. Epub 2006 Aug 1

**Charmoy M., Auderset F., Allenbach C., Tacchini-Cottier F.** (2010) The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol.* 719361. Epub 2009 Oct 25

**Croft S.L., Sundar S., Fairlamb A.H.** (2006) Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 19 (1), 111-126

**Cruz I., Morales M.A., Noguer I., Rodriguez A., Alvar J.** (2002) Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 359, 1124-1125

**Daley J.M., Thomay A.A., Connolly M.D., Reichner J.S., Albina J.E.** (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice *J Leukoc Biol.* 83 (1), 64-70. Epub 2007 Sep 20

**Dey A., Singh S.** (2006) Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol.* 24 (3), 165-170

**Diefenbach A., Schindler H., Donhauser N., Lorenz E., Laskay T., MacMicking J., Röllinghoff M., Gresser I., Bogdan C.** (1998) Type 1 interferon (IFN $\alpha$ /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 8 (1), 77-87

**Domínguez M., Moreno I., Aizpurua C., Toraño A.** (2003) Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect.* 5 (6), 507-513

**dos Santos M.S., Vaz Cardoso L.P., Nascimento G.R., Lino Rde S. Jr, Dorta M.L., de Oliveira M.A., Ribeiro-Dias F.** (2008) *Leishmania major*: Recruitment of Gr-1+ cells into draining lymph nodes during infection is important for early IL-12 and IFN $\gamma$  production. *Exp Parasitol.* 119 (3), 403-410. Epub 2008 May 22

**Ehrchen J.M., Roth J., Roebrock K., Varga G., Domschke W., Newberry R., Sorg C., Müller-Tidow C., Sunderkötter C., Kucharzik T., Spahn T.W.** (2008) The absence of cutaneous lymph nodes results in a Th2 response and increased susceptibility to *Leishmania major* infection in mice. *Infect Immun.* 76 (9), 4241-4250. Epub 2008 Jul 14

**el-On J., Zvillich M., Sarov I.** (1990) *Leishmania major*: inhibition of the chemiluminescent response of human polymorphonuclear leukocytes by promastigotes and their excreted factors. Parasite Immunol. 12 (3), 285-295

**El Sawaf B.M., Doha S.A., Kamel K.E., Emam M.I.** (2008) Attachment of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* in the midgut of their respective sand fly vectors *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). J Egypt Soc Parasitol. 38 (3), 833-842

**Farah F.S., Malak J.A.** (1971) Cutaneous leishmaniasis. Arch Dermatol. 103 (5), 467-474

**Filippi C., Hugues S., Cazareth J., Julia V., Glaichenhaus N., Ugolini S.** (2003) CD4<sup>+</sup> T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. J Exp Med. 198 (2), 201-209. Epub 2003 Jul 14

**Godson C., Mitchell S., Harvey K., Petasis N.A., Hogg N., Brady H.R.** (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. J Immunol. 164 (4), 1663-1667

**Goñi O., Alcaide P., Fresno M.** (2002) Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1<sup>+</sup>)CD11b<sup>+</sup> immature myeloid suppressor cells. Int Immunol. 14 (10), 1125-1134

**Heinzel F.P., Sadick M.D., Holaday B.J., Coffman R.L., Locksley R.M.** (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J Exp Med. 169 (1), 59-72

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

**Heinzel 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(5), 505-509

**Heinzel F.P., Rerko R.M., Ahmed F., Pearlman E.** (1995) Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol.* 155(2), 730-739

**Hepburn N.C.** (2003) Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J Postgrad Med.* 49 (1), 50-54

**Herwaldt B.L.** (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354 (9185), 1191-1199

**Huynh M.L., Fadok V.A., Henson P.M.** (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 109 (1), 41-50

**Iwasaki A.** (2003) The importance of CD11b<sup>+</sup> dendritic cells in CD4<sup>+</sup> T cell activation in vivo: with help from interleukin 1. *J Exp Med.* 198 (2), 185-190. Epub 2003 Jul 14

**Kamijo R., Shapiro D., Le J., Huang S., Aguet M., Vilcek J.** (1993) Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon gamma receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (14), 6626-6630

**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 (1-2), 105-108

**Killick-Kendrick R., Molyneux D.H., Ashford R.W.** (1974) Ultrastructural observations on the attachment of Leishmania in the sandfly. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68, 269

**Kima P.E.** (2007) The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol.* 37 (10), 1087-1096. Epub 2007 Apr 29

**Kuhlman M., Joiner K., Ezekowitz R.A.** (1989) The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med.* 169 (5), 1733-1745

**Lai L., Alaverdi N., Maltais L., Morse H.C. 3rd** (1998) Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol.* 160 (8), 3861-3868

**Laskay T., van Zandbergen G., Solbach W.** (2003) Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *TRENDS in Microbiology* Vol.11 No.5, 210-214

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

**Launois P., Maillard I., Pingel S., Swihart K.G., Xénarios 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 (5), 541-549

**Lemos M.P., Esquivel F., Scott P., Laufer T.M.** (2004) MHC class II expression restricted to CD8 $\alpha$ + and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. *J Exp Med.* 199 (5), 725-730

**Lessa M.M., Lessa H.A., Castro T.W., Oliveira A., Scherifer A., Machado P., Carvalho E.M.** (2007) Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol.* 73 (6), 843-847

**Liese J., Schleicher U., Bogdan C.** (2008) The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213 (3-4), 377-387. Epub 2008 Mar 4

**Liew F.Y., Li Y., Millott S.** (1990) Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 145 (12), 4306-4310

**Louis J., Himmelrich H., Parra-Lopez C., Tacchini-Cottier F., Launois P.** (1998) Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. *Curr Opin Immunol.* 10 (4), 459-464

**Marsden P.D.** (1986) Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 80 (6), 859-876

**Martín-Fontecha A., Sebastiani S., Höpken U.E., Uguccioni M., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F.** (2003) Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med.* 198 (4), 615-621

**Meagher L.C., Savill J.S., Baker A., Fuller R.W., Haslett C.** (1992) Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol.* 52 (3), 269-273

**Meinecke C.K., Schottelius J., Oskam L., Fleischer B.** (1999) Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala-Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics* 104, 1-5

**Mendonca, M.G., de Brito, M.E.F., Rodrigues, E.H.G., Bandeira, V., Jardim, M.L., Abath, F.G.C.** (2004) Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J. Infect. Dis.* 189, 1018–1023

**Minodier P, Parola P.** (2007) Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis.* 5 (3), 150-158. Epub 2006 Oct 31

**Mirkovich A.M., Galelli A., Allison A.C., Modabber F.Z.** (1986) Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin Exp Immunol.*, 64 (1), 1-7

**Moll H., Fuchs H., Blank C., Röllinghoff M.** (1993) Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol.* 23 (7), 1595-1601

**Mosser D.M., Brittingham A.** (1997) Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 115 Suppl, 9-23

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

**Nathan C.** (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 6 (3), 173-182

**Naucke T.J., Menn B., Massberg D., Lorentz S.** (2008) Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res.* 103 Suppl 1, 65-68. Epub 2008 Nov 23

**Niedrig M., Reinhardt B., Burchard G.D., Schmitz H., Tannich E., Tintelnot K., Laude G., Alpers K., Stark K., Mehlhose J.** (2006) Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten, Robert-Koch-Institut, Berlin, aufgerufen von der Internetseite [http://www.rki.de/cln\\_169/nn\\_468482/DE/Content/InfAZ/Steckbriefe/Steckbriefe\\_120606.templatetId=raw,property=publicationFile.pdf/Steckbriefe\\_120606.pdf](http://www.rki.de/cln_169/nn_468482/DE/Content/InfAZ/Steckbriefe/Steckbriefe_120606.templatetId=raw,property=publicationFile.pdf/Steckbriefe_120606.pdf) am 1.4.2010

**Ostrand-Rosenberg S., Sinha P.** (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 182 (8), 4499-4506

**Ota H., Takashima Y., Matsumoto Y., Hayashi Y., Matsumoto Y.** (2008) Pretreatment of macrophages with the combination of IFN-gamma and IL-12 induces resistance to *Leishmania major* at the early phase of infection. *J Vet Med Sci.* 70 (6), 589-593

**Peters N.C., Egen J.G., Secundino N., Debrabant A., Kimblin N., Kamhawi S., Lawyer P., Fay M.P., Germain R.N., Sacks D.** (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-974

**Peters N.C., Sacks D.L.** (2009) The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* 11 (9), 1290-1296. Epub 2009 Jun 22

**Pimenta P.F., Modi G.B., Pereira S.T., Shahabuddin M., Sacks D.L.** (1997) A novel role for the peritrophic matrix in protecting Leishmania from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115 (Pt 4), 359-369

**Ramesh V., Singh R., Salotra P.** (2007) Short communication: post-kala-azar dermal leishmaniasis – an appraisal. *Trop Med Int Health.* 12 (7), 848-851

**Reithinger R., Dujardin J.C.** (2007) Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 45 (1), 21-25. Epub 2006 Nov 8

**Ribechini E., Greifenberg V., Sandwick S., Lutz M.B.** (2010) Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol.* [Epub ahead of print]

**Ribeiro-Gomes F.L., Otero A.C., Gomes N.A., Moniz-De-Souza M.C., Cysne-Finkelstein L., Arnholdt A.C., Calich V.L., Coutinho S.G., Lopes M.F., DosReis G.A.** (2004) Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 172 (7), 4454-4462

**Ribeiro-Gomes F.L., Moniz-de-Souza M.C., Alexandre-Moreira M.S., Dias W.B., Lopes M.F., Nunes M.P., Lungarella G., DosReis G.A.** (2007) Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol.* 179 (6), 3988-3994

**Ritter U., Moll H.** (2000) Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol.* 30 (11), 3111-3120

**Ritter U., Mattner J., Rocha J.S., Bogdan C., Körner H.** (2004) The control of *Leishmania* (*Leishmania*) *major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes Infect.* 6 (6), 559-565

**Ritter U., Osterloh A.** (2007) A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 196 (1), 51-59. Epub 2006 Jun 20

**Ritter U., Lechner A., Scharl K., Kiafard Z., Zwirner J., Körner H.** (2007) TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Med Microbiol Immunol.* 197 (1), 29-37. Epub 2007 Jul 28

**Ritter U., Frischknecht F., van Zandbergen G.** (2009) Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* 25 (11), 505-510. Epub 2009 Sep 15

**Robert Koch-Institut** (2003) Epidemiologisches Bulletin Nr. 33, 261-263, aufgerufen von der Internetseite [http://www.rki.de/cln\\_169/nn\\_468482/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2003/33\\_03,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/33\\_03.pdf](http://www.rki.de/cln_169/nn_468482/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2003/33_03,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/33_03.pdf) am 1.4.2010

**Robert Koch-Institut** (2009) Epidemiologisches Bulletin Nr. 39, 392-393, aufgerufen von der Internetseite [http://www.rki.de/cln\\_169/nn\\_468482/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/39\\_09,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/39\\_09.pdf](http://www.rki.de/cln_169/nn_468482/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/39_09,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/39_09.pdf) am 1.4.2010

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

**Salotra P., Singh R.** (2006) Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123 (3), 295-310

**Savill J.S., Wyllie A.H., Henson J.E., Walport M.J., Henson P.M., Haslett C.** (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest.* 83 (3), 865-875

**Sawanobori Y., Ueha S., Kurachi M., Shimaoka T., Talmadge J.E., Abe J., Shono Y., Kitabatake M., Kakimi K., Mukaida N., Matsushima K.** (2008) Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* 111 (12), 5457-6546. Epub 2008 Mar 28

**Schleicher U., Liese J., Knippertz I., Kurzmann C., Hesse A., Heit A., Fischer J.A., Weiss S., Kalinke U., Kunz S., Bogdan C.** (2007) NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J Exp Med.* 204 (4), 893-906. Epub 2007 Mar 26

**Schlein Y., Jacobson R.L., Shlomai J.** (1991) Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc Biol Sci.* 245 (1313), 121-126

**Schubach, A., Haddad, F., Neto, M.P.-O., Degrave, W., Pirmez, C., Grimaldi, G., Fernandes, O.** (1998) Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J. Infect. Dis.* 178, 911-914

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

**Singh S., Chaudhry V.P., Wali J.P.** (1996) Transfusion-transmitted kala-azar in India. *Transfusion* 36, 848-849

**Singh S.** (2006) New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123 (3), 311-330

**Singh R.K., Pandey H.P., Sundar S.** (2006) Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res.* 123 (3), 331-344

**Solbach W., Forberg K., Röllinghoff M.** (1986) Effect of T-lymphocyte suppression on the parasite burden in *Leishmania major*-infected, genetically susceptible BALB/c mice. *Infect Immun.* 54 (3), 909-912

**Solbach W., Forberg K., Kammerer E., Bogdan C., Röllinghoff M.** (1986) Suppressive effect of cyclosporin A on the development of *Leishmania tropica*-induced lesions in genetically susceptible BALB/c mice. *J Immunol.* 137 (2), 702-707

**Stark K., Niedrig M., Biederbick W., Merkert H., Hacker J.** (2009) Die Auswirkungen des Klimawandels. Welche neuen Infektionskrankheiten und gesundheitlichen Probleme sind zu erwarten? *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 52 (7), 699-714

**Sunderkötter C., Kunz M., Steinbrink K., Meinardus-Hager G., Goebeler M., Bildau H., Sorg C.** (1993) Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol.* 151, 4891-4901

**Sunderkötter C., Nikolic T., Dillon M.J., Van Rooijen N., Stehling M., Drevets D.A., Leenen P.J.** (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol.* 172 (7), 4410-4417

**Symmers W.S.** (1960) Leishmaniasis acquired by contagion: A case of marital infection in Britain. Lancet 1, 127-132

**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 (6), 1797-1802

**Tacchini-Cottier F., Zweifel C., Belkaid Y., Mukankundiye C., Vasei M., Launois P., Milon G., Louis J.A.** (2000) An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4<sup>+</sup> Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. J Immunol. 165 (5), 2628-2636

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

**Trinchieri G.** (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 3 (2), 133-146

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

**van Zandbergen G., Klinger M., Mueller A., Dannenberg S., Gebert A., Solbach W., Laskay T.** (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. J Immunol. 173 (11), 6521-6525

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

**Vercelli D., Jabara H.H., Lauener R.P., Geha R.S.** (1990) IL-4 inhibits the synthesis of IFN-gamma and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J Immunol.* 144 (2), 570-573

**Voll R.E., Herrmann M., Roth E.A., Stach C., Kalden J.R., Girkontaite I.** (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390 (6658), 350-351

**von Stebut E., Udey M.C.** (2004) Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect.* 6 (12), 1102-1109

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

**von Stebut E., Sunderkötter C.** (2007) Kutane Leishmaniasis. *Der Hautarzt* 58, 445-459

**Weigle K.A., Valderrama L., Arias A.L., Santrich C., Saravia N.G.** (1991) Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg.* 44 (3), 260-271

**Wenzel A., van Zandbergen G.** (2009) Lipoxin A4 receptor dependent leishmania infection. *Autoimmunity* 42 (4), 331-333

**WHO** (2007) Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection, Addis Ababa, Ethiopia, 20 – 22 March 2007, Internetseite: [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis\\_hiv\\_coinfection5.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf), aufgerufen am 22.08.2009

**WHO** (2009) Magnitude of the problem, Internetseite: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html), aufgerufen am 09.04.2009

**WHO** (2010) Control of the leishmaniases, Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010, Internetseite: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf), aufgerufen am 17.02.2011

**Wiese M., Kuhn D., Grünfelder C.G.** (2003) Protein Kinase Involved in Flagellar-Length Control. *Eukaryot Cell* 2(4), 769-777

**Wilhelm P., Ritter U., Labbow S., Donhauser N., Röllinghoff M., Bogdan C., Körner H.** (2001) Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol.* 166 (6), 4012-4019

**Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L.** (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 80, 617-653

**Zhu B., Bando Y., Xiao S., Yang K., Anderson AC., Kuchroo VK., Khoury SJ.** (2007) CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> Suppressive Monocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 179, 5228-5237

**Zilberstein D., Shapira M.** (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol.* 48, 449-470

## **7.2. Danksagung**

In erster Linie bedanke ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Uwe Ritter für die Überlassung eines reizvollen Themas sowie die stets tatkräftige und vor allem geduldige Unterstützung während des mehrjährigen Schaffensprozesses. Die hervorragende Betreuung, das herzliche und motivierende Arbeitsklima und nicht zuletzt die freundlichen Korrekturen des Manuskriptes haben die Arbeit an der Dissertation enorm vereinfacht.

Dr. Sven Mostböck danke ich herzlich für die exzellente Unterweisung in die verschiedenen Arbeitstechniken sowie die zahlreichen Tipps und Tricks für den Laboralltag. Die andauernde Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Problemen hat mein Leben im Labor sehr erleichtert.

Mein Dank gilt ferner Frau Catherine Botteron für deren tatkräftige Unterstützung beim FACS Sort.

Bei Prof. Dr. Hohenleutner bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Funktion als Zweitgutachter.

Nicht zuletzt danke ich allen Helfern, die mich bei der Planung und Durchführung der Experimente und deren Auswertung unterstützt und damit zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Damit möchte ich explizit auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Immunologie für die große Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung danken.

Meiner Familie, die mir mein Studium ermöglicht hat und mich stets unterstützt, danke ich dafür von ganzem Herzen.

### **7.3. Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.