

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

**APOPTOTISCHE LEISHMANIA MAJOR FÖRDERN
DIE KRANKHEITSASSOZIIERTE
IMMUNANTWORT IN BALB/C MÄUSEN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorgelegt von

Julia Barthelmann

aus Greifswald

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. univ. (Univ. Budapest) Tamás Laskay
Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz

Tag der Disputation: Lübeck, den 30.06.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.07.2011

Der Wissenschaftler weiß, dass es für den Fortschritt von allergrößter Bedeutung ist, das eigene Nichtwissen zu erkennen und Raum für Zweifel zu lassen. Der Wissensschatz der Wissenschaft besteht aus Feststellungen von unterschiedlichem Sicherheitsgrad - manche Aussagen sind höchst ungewiss, andere fast sicher, aber eine absolute Sicherheit gibt es nicht.

Richard P. Feynman (Nobelpreis für Physik, 1965)

Öffentliche Ansprache *Vom Sinn und Nutzen der Wissenschaft*
Herbsttagung der Nationalen Akademie der Wissenschaften, 1955

Danke

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben und so zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Ich danke Prof. Dr. med. Jürgen Westermann für die Bereitstellung des Themas. Prof. Dr. med. Jürgen Westermann und Dr. rer. nat. Kathrin Kalies danke ich für die Betreuung meiner Promotionsarbeit, ihr Interesse und die zahlreichen Diskussionen, die eine wissenschaftliche Arbeit erst ermöglichen. Auch Dr. med. Peter König sei an dieser Stelle für zahlreiche hilfreiche Anmerkungen gedankt.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene für jegliche Unterstützung, die die Arbeit mit Leishmanien nötig machte: Prof. Dr. rer. nat. Tamás Laskay, Dr. rer. nat. Ger van Zandbergen, Dr. rer. nat. Alexander Wenzel, Sonja Möller und Dr. rer. nat. Martina Behnen-Härer. Vielen Dank für die Tricks und Kniffe in der Arbeit mit Leishmanien und das geduldige Beantworten aller leishmanienspezifischen Fragen, die sich mir im Laufe der Promotionszeit stellten.

Meinen Laborengeln Lidija Gutjahr, Petra Lau, Marie-Luise Leppin und Karola von Lingelsheim sei für jegliche Hilfestellungen im Laboralltag gedankt. Humor, Kraftbrühe und „Du hast Hunger? Ich hätte da noch Schokolade und Kekse...“ haben über so manches (Labor)Tief hinweg geholfen. Meine Monster-Excel-Vordrucke werden Euch wohl noch eine Weile begleiten.

Großer Dank geht an meine „Mädels“: Dr. rer. physiol. Katja Bieber, Claudia Stamm, Frauke Borchering, David „Schröder“ Banczyk, Christiane Radzimski, Sarah Kretschmer, Anna Schüth, Barbara „Babsy“ Linz, Dr. rer. nat. Ilka „Oberschwester“ Braumann, Dr. rer. nat. Babett Baraniec und Claudia Bang. Vielen Dank fürs Mäusehalten, Daueroperieren, Diskutieren, Mut-machen, Ausfragen, Erklären-lassen, Ratgeben, Bienchen-annehmen-und-verteilen, Urlaub-machen, Galgenhumor-haben, Excel-Fragen-stellen, Kinder-hüten-lassen, Lobhudeln, Schulterklopfen und Sprücheklopfen. Hoch leben alle unsere Excel-Tabellen!

Danke meiner tollen Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester Eva, die immer an mich geglaubt, mich stets unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders danke ich Marek Litza: Danke für mehr als neun Jahre, Deinen Glauben an mich und Deine wundervolle (Telefon)Seelsorge, die mir Kraft zum Durchhalten gegeben hat und manches Stimmungstief und manche Sorge weniger finster aussehen ließen.

Inhaltsverzeichnis

Danke	I
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Der Entwicklungszyklus von <i>Leishmania</i>	1
1.2 Die Immunantwort gegen <i>Leishmania</i>	4
1.2.1 Rolle der angeborenen Immunantwort	4
1.2.2 Rolle der T-Zellantwort	4
1.2.3 Rolle der B-Zellantwort	7
1.3 Apoptose	8
1.3.1 <i>Leishmania</i> und Apoptose	8
1.3.2 Einfluss apoptotischer Zellen auf die Immunantwort	9
1.4 Zielsetzung	12
2 Materialien	14
2.1 Parasiten	14
2.2 Tiere	14
2.3 Oligonukleotide	14
2.4 Antikörper	16
2.5 Kits	16
2.6 Medien und Puffer	16
2.7 Chemikalien und andere Reagenzien	17
2.8 Verbrauchsmaterialien	19
2.9 Operationsmaterialien	20
2.10 Geräte	20
2.11 Software	22
3 Methoden	23
3.1 Infektionsbiologische Methoden	23
3.1.1 <i>Leishmania major</i> Parasiten	23

3.1.2	Herstellung von Leishmanienlysate	23
3.1.3	Subkutane Infektion im Fuß	24
3.1.4	Messung der Fußschwellung	24
3.1.5	Bestimmung der Parasitenlast	24
3.2	Immunologische Methoden	25
3.2.1	Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) gegen <i>L. major</i> -spezifische Serum-IgGs	25
3.2.2	Magnetic Cell Sorting (MACS) von <i>L. major</i>	26
3.2.3	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) von <i>L. major</i>	26
3.3	Molekularbiologische Methoden	27
3.3.1	Lasermikrodissektion	27
3.3.2	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	27
3.3.3	Quantitative Real-Time (RT)-PCR	28
3.4	Immunhistochemische Methoden	29
3.4.1	Kryosektion	29
3.4.2	Färbungen	29
3.4.3	Bestimmung der T-Zellproliferation im Lymphknoten	31
3.5	Tierversuche	31
3.5.1	Tierversuchsantrag	31
3.5.2	Tiere und Haltungsbedingungen	31
3.5.3	Organentnahme	32
3.6	Statistische Auswertung	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Einfluss apoptotischer PS+ <i>L. major</i> in anfälligen BALB/c	33
4.1.1	Analyse des klinischen Bildes	33
4.1.1.1	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verstärken die Fußschwellung	34
4.1.1.2	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verstärken die Parasitenlast	35
4.1.2	Analyse der Entzündung in der Haut	36
4.1.2.1	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verstärken die Akkumulation dendritischer Zellen und Neutrophiler	37
4.1.2.2	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> erhöhen die Expression der Chemokine KC und MIP1 α	38
4.1.3	Analyse des Antikörpersystems	39
4.1.3.1	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> erhöhen die Expression des IgG1-bindenden Fc γ RIII in der Haut	40
4.1.3.2	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> erhöhen IgG1 im Serum	41
4.1.4	Analyse der Zytokinantwort in Haut und Lymphknoten	42

4.1.4.1	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> erhöhen die krankheitsassozierten Zytokine IL4 und IL10 in der Haut	42
4.1.4.2	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> induzieren IL10, hemmen aber IFN γ im Lymphknoten	43
4.2	Einfluss apoptotischer PS+ <i>L. major</i> auf die frühe Immunantwort	44
4.2.1	Analyse der frühen T-Zellantwort	45
4.2.1.1	Das Ausmaß der T-Zellproliferation hängt nicht von der Zusammensetzung des Inokulates ab	45
4.2.1.2	Die Zytokinantwort zur Zeit der primären T-Zellaktivierung ist noch nicht festgelegt	46
4.2.2	Analyse der Lokalisation von <i>L. major</i> im Lymphknoten	48
4.3	Einflüsse auf die Erkrankungsrate anfälliger BALB/c	51
4.3.1	Die Reduktion der Gesamtdosis hat keinen Einfluss auf die Erkrankungsquote	51
4.3.2	FACS-Analysen von <i>L. major</i>	54
4.3.2.1	Beschreibung einer neuen PS- <i>L. major</i> -Population	54
4.3.2.2	Ein Teil der PS- FSC ^{niedrig} <i>L. major</i> -Population tritt bei Körpertemperatur in Apoptose	56
4.4	Anfälligkeit resistenter C57BL/6	58
4.4.1	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verstärken nicht die Entzündung und adaptive Immunantwort in der Haut resistenter C57BL/6	58
4.4.2	In resistenten C57BL/6 akkumulieren auch bei anhaltender Entzündung keine Neutrophilen im Infektionsgebiet	61
5	Diskussion	64
5.1	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> fördern die Entzündung im Infektionsgebiet	64
5.2	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> fördern die krankheitsassozierte T-Zellantwort	68
5.3	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> fördern die krankheitsassozierte B-Zellantwort	71
5.4	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verursachen die Lokalisation im B-Zellareal	77
5.5	Einfluss gestresster PS- <i>L. major</i> auf die Erkrankungsrate	80
5.6	Anfälligkeit resistenter C57BL/6 Mäuse	82
6	Zusammenfassung	85
	Literaturverzeichnis	87
	Abbildungsverzeichnis	99
A	Ergänzende Daten	101
B	Publikationen und Kongresse	104

C Erklärung

106

Abkürzungen

Abb.	Abbildung(en)
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
AnxV	Annexin-V
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
Ct	<i>Cycle of Threshold</i> (Schwellenwert)
DAB	Diaminobenzyl
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Gravitation (Einheit)
h	Stunde (Einheit)
HKG	<i>House Keeping Gene</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
kDa	Kilo-Dalton
kHz	Kilohertz
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i> Promastigote, Stamm MHOM/IL/81/FE/BNI
<i>Lm</i>	<i>L. major</i>
<i>Lm</i> PS-	Phosphatidylserin-negative <i>L. major</i>
<i>Lm</i> PS-/PS+	Mischung Phosphatidylserin-negativer und -positiver <i>L. major</i>
<i>Lm</i> /SD	<i>L. major</i> , Stamm MHOM/SN/74/SD
mAK	Monoklonaler Antikörper
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

min	Minute
mg	Milligramm
ml, μ l	Milliliter, Mikroliter
MLN51	<i>Metastatic Lymph Node Gene 51</i>
mm, μ m	Millimeter, Mikrometer
mM, M	Millimolar, Molar
MS	Mäuseserum
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
M Ω	Makrophage
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NNN	Novy-Nicolle-McNeal
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pM	Picomolar
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTII	Reverse Transkriptase II
s	Sekunde
S.	Seite
s.c.	<i>Subcutaneous</i> (subkutan)
SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle(n)
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TCR	<i>T-Cell Receptor</i> (T-Zellrezeptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit)
UpM	Umdrehung pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Der Entwicklungszyklus von *Leishmania*

Leishmania sind einzellige Parasiten, die durch den Biss infizierter weiblicher Sandmücken auf ihren Wirt (Säugetiere) übertragen werden. Insgesamt gibt es etwa 20 verschiedene *Leishmania*-Spezies, die Menschen infizieren und im Allgemeinen von rund 30 Spezies der Sandmücken übertragen werden. Diese Vielzahl an Spezies und Überträgern verursachen eine weite Spannbreite an Erkrankungen, die unter dem Oberbegriff Leishmaniose zusammengefasst werden. Man unterscheidet kutane, mukokutane und viszerale Formen der Leishmaniose.^{59,70} Die kutane Leishmaniose wird beispielsweise von *Leishmania major* (*L. major*) hervorgerufen.

Der Lebenszyklus von *L. major* ist zweigeteilt und richtet sich danach, ob sie in ihrem Überträgerwirt (Sandmücken) oder ihrem Endwirt (Säugetieren) vorliegen. Innerhalb der Sandmücken vermehren sich *L. major* als extrazelluläre längliche, flagellierte Promastigote im Verdauungstrakt. In diesem durchlaufen sie einen Reifungsprozess, der zwei Entwicklungsstadien umfasst und durch Zunahme der Infektiösität charakterisiert ist. Avirulente prozyklische Promastigote heften sich an das Epithel des Mitteldarms der Sandmücke und proliferieren (Abb. 1-1, Nr. 1). Im Laufe eines Reifungsprozesses (Metazyklogenese) reifen sie zu virulenten metazyklischen Promastigoten, die ihre Teilung einstellen und in den Darm freigesetzt werden (Abb. 1-1, Nr. 2). Reife, metazyklische *L. major* wandern dann in den vorderen Darm und die

Speiseröhre der Sandmücke und werden beim nächsten Blutmahl auf den Endwirt, das heißt Säugetiere übertragen (Abb. 1–1, Nr. 3).^{90,134}

An der Infektionsstelle sezernieren *L. major* einen chemotaktischen Faktor (LCF), um Neutrophile zu rekrutieren.¹⁶² Diese dienen als Primärwirt und nehmen promastigote *Leishmania* auf, die sich in ihnen aber nicht vermehren (Abb. 1–1, Nr. 4). Durch Sekretion von KC verstärken Neutrophile die Rekrutierung weiterer Neutrophiler.¹⁶³ Darüber hinaus sekretieren Neutrophile das Chemokin MIP1 β , um Makrophagen, die Endwirtszellen von *L. major*, zum Infektionsgebiet zu rekrutieren.¹⁶³ Weiterhin verstärken Makrophagen durch Sekretion des Chemokins MIP1 α ihre eigene Rekrutierung und Akkumulation im Infektionsgebiet.^{39,81,102} Wie genau *L. major* an Makrophagen weitergegeben werden, ist noch umstritten. Entweder werden *Leishmania* von Neutrophilen freigegeben und durch Phagozytose direkt von Makrophagen aufgenommen oder Makrophagen nehmen *Leishmania* durch Phagozytose infizierter Neutrophile auf (Abb. 1–1, Nr. 5).^{71,123,163}

Innerhalb von Makrophagen liegen *Leishmania* im phagosomalen Kompartiment vor, dass mit endozytischen Organellen zur sauren, parasitophoren Vakuole fusioniert. Innerhalb dieser sauren Umgebung transformieren promastigote *Leishmania* in die nicht flagellierte, unmobile amastigote Form und beginnen zu proliferieren (Abb. 1–1, Nr. 6, 7).¹⁷⁶ Es wird vermutet, dass sich die Infektion auf umgebende Makrophagen ausbreitet, der genaue Mechanismus ist aber noch nicht bekannt (Abb. 1–1, Nr. 8). Innerhalb ihres Endwirtes (Säugetiere) vermehren sich *L. major* also intrazellulär. Vom infizierten Endwirt können *L. major* wieder auf Sandmücken übertragen werden. Während einer weiteren Blutmahlzeit werden amastigote *L. major* von der Sandmücke aufgenommen (Abb. 1–1, Nr. 9). Im Mitteldarm der Sandmücke wandeln sie sich wieder in die mobile flagellierte, promastigote Form um, heften sich an die Darmwand und führen den Zyklus fort (Abb. 1–1, Nr. 10).

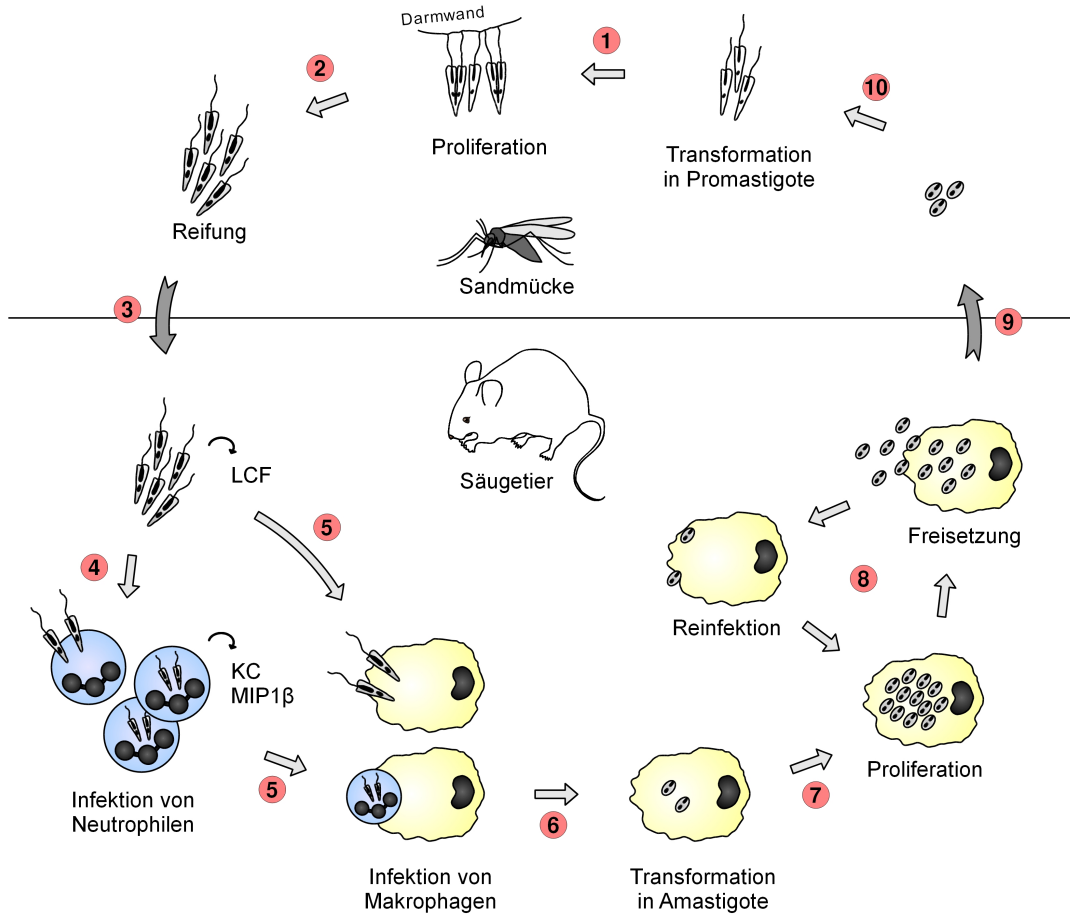


Abb. 1–1: Lebenszyklus von *L. major*. (1) Unreife (prozyklische) promastigote *L. major* heften sich an den Mitteldarm und proliferieren. (2) *L. major* durchlaufen einen Reifeprozess und werden als reife (metazyklische) *L. major* in das Darmlumen freigegeben. (3) Reife (metazyklische) promastigote *L. major* werden durch den Biss der infizierten weiblichen Sandmücke in die Haut des Wirts übertragen. Dort sezernieren sie LCF, um Neutrophile zu rekrutieren. (4) Neutrophile nehmen *L. major* auf und rekrutieren über die Sezernierung von KC weitere Neutrophile, durch MIP1 β Makrophagen. (5) *L. major* infizieren ihre Hauptwirtszellen, die Makrophagen, entweder direkt oder über infizierte, apoptotische Neutrophile. (6) In Makrophagen transformieren *L. major* in die amastigote Form um und (7) vermehren sich. (8) Amastigote *L. major* werden aus Makrophagen freigesetzt und infizieren weitere Makrophagen. (9) Amastigote *L. major* werden durch Sandmücken beim erneuten Blutmahl aufgenommen und (10) wandeln sich wieder in die promastigote Form um. Abbildung adaptiert. ^{136,172}

1.2 Die Immunantwort gegen *Leishmania*

1.2.1 Rolle der angeborenen Immunantwort

Kurz nach Infektion liegen die Parasiten im Gewebe extrazellulär vor und sind Serumkomponenten ausgesetzt, die die meisten Parasiten durch Komplement-vermittelte Lyse zerstören.¹³⁷ Essentiell für die frühe zelluläre Abwehr von Infektionen sind Neutrophile, die in Mäusen durchschnittlich etwa 15% der zirkulierenden Zellen im Blut stellen.¹²² Auch nach einer *L. major*-Infektion sind Neutrophile innerhalb weniger Minuten die ersten Entzündungszellen am Ort der Infektion.^{110,123} Diese schnelle Rekrutierung ist für den Wirt aber von Nachteil, da Neutrophile die verbleibenden *L. major* aufnehmen, sie aber nicht abtöten.^{85,123,162} Auf diese Weise werden *L. major* vor der Lyse durch Komplement geschützt. Die Bedeutung von Neutrophilen als Wirtszelle für *L. major* und ihre Funktion in der Etablierung und im Verlauf von *L. major*-Infektionen werden immer noch kontrovers diskutiert.^{124,129} Neutrophile sind kurzlebige Zellen, die nicht infiziert innerhalb von acht Stunden in Apoptose treten.^{53,54} Infizierte Neutrophile weisen dagegen eine deutlich verzögerte Apoptose auf.¹ Dies reicht aus, damit Makrophagen, die erst zwei Tage nach Infektion im Infektionsgebiet eintreffen, die infizierten apoptotischen Neutrophilen aufnehmen können.^{85,163} Auf diese Weise sind *L. major*, obwohl sie sich in Neutrophilen nicht vermehren können, die ersten Tage nach Infektion vor der Komplement-vermittelten Lyse geschützt und können bis zum Übergang in ihre Hauptwirtszellen (Makrophagen) überdauern. Eigentliches Ziel dieser frühen Zellantwort im Infektionsgebiet ist es, die aufgenommenen Parasiten zu töten und abzubauen. Internalisierte *L. major* werden aber weder in Neutrophilen noch Makrophagen getötet.^{87,123} Dies führt dazu, dass die Infektion im Infektionsgebiet Haut etabliert wird. *L. major* wandeln sich in die amastigote Form um und replizieren innerhalb der Makrophagen.

1.2.2 Rolle der T-Zellantwort

Die bisher beschriebenen Ereignisse umfassen die frühen Abwehrprozesse im Infektionsgebiet Haut während der ersten Woche nach einer Infektion. Entscheidend für

die Bekämpfung intrazellulärer *L. major* ist aber die adaptive T-Zelleffektorantwort, die als Antwort auf die *Leishmania*-Infektion induziert wird. Die Bedeutung von Zytokinen für den Verlauf einer *L. major*-Infektion zeigt sich im Mausmodell, da verschiedene Inzuchtmäuse nach Infektion mit *L. major* sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe entwickeln. Heinzel und Kollegen zeigten, dass IL-4 und IFN γ 8 Wochen nach *Leishmania*-Infektion reziprok sezerniert werden: BALB/c Mäuse exprimierten im drainierenden Lymphknoten viel IL4 aber wenig IFN γ , C57BL/6 Mäuse dagegen wenig IL4 und viel IFN γ .^{55,56} Anfällige Mausstämme wie BALB/c, welche neben IL4 auch IL10 sezernieren, können die Infektion nicht beherrschen und entwickeln innerhalb von sechs Wochen progressive Läsionen.^{55,74,117,126} Langfristig erliegen BALB/c Mäuse einer solchen Infektion. Mausstämme wie C57BL/6, die durch die Produktion von IFN γ charakterisiert sind, entwickeln zwar kleine Läsionen, die Vermehrung der Parasiten wird aber zunehmend kontrolliert und die Läsionen heilen selbst ab.^{55,144,155} Sechs Wochen nach *L. major*-Infektion sind die Läsionen der Infektionsstelle wieder auf das Niveau vor der Infektion zurückgegangen.

IFN γ ist das zentrale T-Zellzytokin, das für die Abwehr einer *L. major*-Infektion benötigt wird. IFN γ aktiviert Makrophagen und erhöht so ihre leishmanizide Funktion.⁵⁰ Die Aktivierung von Makrophagen durch IFN γ ist als klassische Aktivierung bekannt und führt dazu, dass Makrophagen internalisierte Parasiten abtöten und abbauen können.⁵⁰ Dadurch wird die Infektion erfolgreich bekämpft.¹²⁵ Darüber hinaus fördert IFN γ die weitere Prägung der protektiven IFN γ -Antwort durch T-Zellen, hemmt dagegen die Produktion des krankheitsassoziierten IL4.^{135,168} Die zentrale Bedeutung von IFN γ wurde anhand der Manipulation der IFN γ -Produktion gezeigt. So führte beispielsweise die Gabe von Antikörpern gegen IFN γ nach Infektion dazu, dass C57BL/6 Mäuse verstärkt IL4 produzierten und Läsionen nicht selbstständig ausheilen konnten.^{15,88,144}

IL4 ist das T-Zellzytokin, das mit der Anfälligkeit gegenüber *L. major*-Infektionen verbunden ist.¹³⁵ Diese Korrelation zwischen IL4-Antwort und Anfälligkeit wurde in anfälligen Mäusen gezeigt, die durch die Gabe von Antikörpern gegen IL4 die Infektion mit *L. major* kontrollieren konnten und keinen progressiven Krankheitsverlauf entwickelten.¹³⁹ Im Gegensatz zu IFN γ aktiviert IL4 nicht die klassischen, leishmaniziden

Funktionen der Makrophagen. Es führt im Gegenteil dazu, dass antiinflammatorische Makrophagen entstehen, deren eigentliche Aufgabe in der Reparatur von Gewebedefekten liegt.⁵⁰ Derartig alternativ aktivierte Makrophagen sind nicht in der Lage, aufgenommene *L. major* abzutöten.^{50,63}

IL10 ist ein regulatorisches T-Zellzytokin, das wie IL4 mit einem progressiven Infektionsverlauf einer Leishmaniose korreliert.^{74,135} So weisen IL10-defiziente BALB/c Mäuse eine geringere Parasitenlast und einen verbesserten klinischen Verlauf nach Infektion mit *L. major* auf.^{117,118} IL10 hemmt die Aktivierung von IFN γ -produzierenden T-Zellen und damit die protektive Zytokinantwort.^{105,121} Die Hauptbedeutung von IL10 liegt aber in der Hemmung der Makrophagenaktivierung, so dass diese aufgenommene *L. major* nicht abtöten können.⁷⁴ In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass durch Antikörper aktivierte Makrophagen selbst zu IL10-Produzenten werden und dies die Anfälligkeit gegenüber *L. major*-Infektionen weiterhin steigert.^{84,103} IL10 ist das Zytokin, das für die Persistenz der Parasiten verantwortlich gemacht wird, vermutlich vor allem in *Leishmania*-Stämmen, die verhältnismäßig resistent gegen das INF γ -vermittelte Abtöten sind.^{14,113,117}

Dass die T-Zellantwort essentiell für die Bekämpfung einer *L. major*-Infektion ist, ist unumstritten. Dennoch stellte sich in der Vergangenheit immer wieder die Frage, wann und wie T-Zellen ausdifferenzieren und die T-Zellantwort festgelegt wird. In zahlreichen Studien wurde die Bedeutung der frühen Zytokinproduktion *in vivo* dadurch untersucht, dass durch Modulation der Zytokinantwort zu frühen Zeitpunkten der Krankheitsverlauf anfälliger Mäuse beeinflusst werden kann. Beispielsweise induziert die Zugabe von IFN γ zum Zeitpunkt der Infektion eine protektive Immunantwort und einen verbesserten Krankheitsverlauf von BALB/c Mäusen.¹⁴⁴ Andere Studien zeigen, dass IL4, das innerhalb eines Tages nach Infektion produziert wird, essentiell ist, um eine stabile krankheitsassoziierte IL4-Produktion und darauffolgende progressive Entwicklung des Infektionsverlaufes von BALB/c Mäusen zu induzieren.^{60,89} Aus diesen Versuchen wurde geschlossen, dass Zytokine, die zum Zeitpunkt der T-Zellaktivierung vorhanden sind, die Entwicklung der T-Zellen maßgeblich steuern. Allerdings zeigte sich bereits in diesen Studien, dass es schwer ist, die vorgegebene Natur der T-zellabhängigen Zytokinantwort zu ändern. So führte die frühe IFN γ -Zugabe

in anfälligen BALB/c nur transient zu einer Verbesserung und langfristig nicht zur Kontrolle der Infektion.¹⁴⁴ Darüber hinaus mussten Antikörper gegen IL4 wenigstens während der ersten zwei Wochen nach Infektion injiziert werden, um eine deutliche Verbesserung des Infektionsverlaufes von BALB/c Mäusen zu induzieren.^{28,139} Andere Studien widersprechen der Hypothese, dass die Zytokine, die zum Zeitpunkt der T-Zellaktivierung anwesend sind, die T-Zellantwort festlegen. So konnte innerhalb von drei Tagen nach Infektion mit *L. major in vitro* kein Unterschied in der Expression des protektiven IFN γ zwischen anfälligen BALB/c und resistenten C57BL/6 Mäusen gefunden werden.^{25,127,144,167} Auch die Frequenz und Kinetik IL4-produzierender Zellen des drainierenden Lymphknotens unterschied sich kurz nach Infektion *in vitro* und *in vivo* zwischen beiden Mausstämmen nicht.^{16,145,153} Zusammenfassend ist immer noch umstritten, ob die Zytokinexpression kurz nach Infektion die T-Zellantwort prägt.

1.2.3 Rolle der B-Zellantwort

B-Zellen gehören nicht zu den Hauptwirtszellen von *L. major* und werden nicht in der direkten Abwehr der Parasiten genutzt. Sie werden funktionell aber durch die für die *L. major*-Abwehr essentielle T-Zelleffektorantwort beeinflusst. So induziert IL4 den Isotypwechsel von B-Zellen zu IgG1, das mit einem fortschreitenden Erkrankungsverlauf assoziiert wird, und IFN γ den Isotypwechsel zu IgG2.^{35,46} Da die Aktivierung und der Isotypwechsel der B-Zellen von der T-Zellantwort abhängt, wurde die Bedeutung der humoralen Immunantwort im Rahmen der *L. major*-Infektion lange Zeit als Begleiterscheinung der T-zellspezifischen Zytokinantwort behandelt. Zunehmend rücken aber auch B-Zellen und die von ihnen produzierten IgGs in den Blickpunkt des Interesses und ihre Rolle im Verlauf einer *L. major*-Infektion wird zunehmend kontrovers diskutiert. Die meisten Studien, die die Rolle von B-Zellen und Antikörpern auf den Infektionsverlauf einer *L. major*-Infektion untersuchen, nutzen entweder Mäuse, die keine B-Zellen (B-zelldefizient, B-zelldepletiert durch Antikörper) oder keine IgG-Rezeptoren (Fc γ R-defizient) besitzen. Nach Infektion mit kutanen *Leishmania*-Stämmen (z. B. *L. major*) werden B-Zellen und Antikörper in diesen Studien mit einer verstärkten krankheitsassoziierten T-Zellantwort, ausgeprägten Läsionen des Infektionsgebietes und einem progressiven Krankheitsverlauf assoziiert.^{33,61,62,79,118,138,169}

Untersuchungen von Ronet und Kollegen weisen darauf hin, dass hierbei einerseits die direkte Antigenpräsentation durch *L. major*-spezifische B-Zellen an der Anfälligkeit von BALB/c Mäusen beteiligt sein könnte, und andererseits B-Zellen die Entwicklung einer krankheitsassoziierten Zytokinantwort über die Ausschüttung von IL10 fördern könnten.^{131,132} Weiterhin wird berichtet, dass Antikörper-opsonisierte *L. major* von anderen Zellen als Komplement-opsonisierte aufgenommen werden.¹⁶⁶ Auch über eine Antikörper-vermittelte Selektion der Wirtszelle könnten B-Zellen die Ausbildung der Immunantwort gegen *L. major* beeinflussen.

Alle derartigen Studien weisen auf krankheitsfördernde Effekte von B-Zellen und Antikörpern, nicht aber auf eine protektive Wirkungsweise hin. Eine eindeutige grundsätzliche Beteiligung von B-Zellen und Antikörpern an der Anfälligkeit gegenüber *L. major*-Infektionen konnte bisher dennoch nicht bewiesen werden. So wiesen in einer Studie B-zelldefiziente BALB/c keinen Unterschied im Krankheitsverlauf im Vergleich zu Wildtypmäusen auf.²³ Darüber hinaus scheint die Beteiligung von B-Zellen und Antikörpern an der Anfälligkeit gegenüber *L. major*-Infektionen vom infizierten Mausstamm und der übertragenen *L. major*-Unterart abhängig zu sein.^{65,132,173}

1.3 Apoptose

1.3.1 *Leishmania* und Apoptose

Mit Apoptose bezeichnet man den programmierten Zelltod. Im Verlauf einer Immunantwort spielt Apoptose eine wichtige Rolle, da aktivierte Zellen wie Lymphozyten beseitigt werden und so eine dauerhafte, überschießende Immunaktivierung verhindert wird.^{48,83,93,141,142} Apoptotische Zellen unterliegen einem genetisch festgelegten, wohl organisierten zeitlichen Ablauf des Zellabbaus, der ein schnelles Entfernen der Zellreste absichert, bevor diese immunogen werden. Ausgelöst wird dieser Prozess durch zytotoxische Lymphozyten, die entweder an Todesrezeptoren binden oder den Inhalt ihrer zytolytischen Granula freisetzen.^{2,95,150} Darüber hinaus kann Apoptose auch intrinsisch über die Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials, beispielsweise durch oxidativen Stress oder Hitzeschock, induziert werden.^{2,73,95,150} Zentraler Bestandteil der Apoptose ist die Aktivierung einer intrazellulären proteolytischen

Kaskade, die durch Caspasen vermittelt wird.^{2,95} Infolgedessen kommt es zur Fragmentierung von Zellorganellen und der DNA. Die Zerstörung der Mitochondrien führt zunächst zur Zerstörung des mitochondrialen elektrischen Potentials, weiterführend zum Zusammenbruch des elektrischen Potentials der gesamten Zelle.⁷⁶ Die Zelle schrumpft. Die DNA-Fragmentierung führt zur Kondensation des Zellkerns.¹⁷⁴ Letztendlich werden kleine apoptotische Körperchen abgeschnürt.⁹⁵ Bereits sehr früh im Verlauf der Apoptose wird intrazelluläres, membranständiges Phosphatidylserin (PS) auf die Membranaußenseite transloziert.^{98,164} Mit dieser Externalisierung von PS geben sterbende Zellen auch sogenannte Finde-mich-Signale (chemotaktische Faktoren) ab, um Phagozyten zu rekrutieren.⁸⁶

Apoptosemarker wurden auch in einer Vielzahl von Einzellern gefunden.³⁸ Dennoch ist die Existenz von Apoptose in *Leishmania* umstritten. In den vergangenen Jahren häuften sich aber Hinweise auf einen der Apoptose ähnlichen Zelltod von *Leishmania*. Analog zur Apoptose wird dieser Prozess in *Leishmania* auch durch oxidativen Stress oder Hitze ausgelöst.^{106,175} Darüber hinaus wurden in *Leishmania* Enzyme entdeckt, die eine den Caspasen ähnliche Funktion aufweisen.⁹² Die Aktivität dieser Enzyme wurde mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials in Verbindung gebracht und führte nachfolgend zum apoptoseähnlichen Zelltod der Parasiten.^{92,101,109,133} Ebenso konnten Zellschrumpfung und die Fragmentierung der DNA durch Nukleasen beobachtet werden.^{3,8,92,106,111,120,146,175} Auch sterbende *Leishmania* externalisieren im Verlauf ihres Zelltodes PS.^{7,8,120,159} Darüber hinaus sezernieren *Leishmania* einen chemotaktischen Faktor, um Neutrophile, ihre Primärwirtszellen, zu rekrutieren.¹⁶²

Obwohl all diese Studien auf die Existenz eines programmierten Zelltodes in *Leishmania* hinweisen, wurde der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt.

1.3.2 Einfluss apoptotischer Zellen auf die Immunantwort

Externalisiertes PS wirkt als Friss-mich-Signal und führt dazu, dass apoptotische Körperchen durch rekrutierte Phagozyten rezeptorvermittelt aufgenommen und abgebaut werden.^{9,42,43,58} Der Prozess ist einerseits durch die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL10, andererseits durch die Hemmung proinflammatorischer Zytokine wie IL12 charakterisiert.^{31,44,165} Hierbei reicht allein schon der Zell-Zellkontakt über

PS aus, um die Expression des proinflammatorischen IL12 aktivierter Makrophagen zu inhibieren, die des antiinflammatorischen IL10 zu steigern.^{31,78} Nachfolgend führt beispielsweise die verminderte Fähigkeit von Makrophagen, IL12 zu produzieren, dazu, dass auch die IFN γ -Produktion aktivierter T-Zellen verringert wird.⁷⁷ Die Inhibierung phagozytierender Zellen durch apoptotische Zellen ist ein allgemeiner Mechanismus, um eine Immunaktivierung durch Eigenantigen zu unterbinden und die Entstehung einer potentiell autoimmunen adaptiven Immunantwort zu verhindern. Apoptotische Zellen inhibieren die proinflammatorische Immunantwort und vermindern dadurch eine Entzündung. So nehmen Makrophagen apoptotische Neutrophile an Entzündungsorten auf, werden funktionell deaktiviert und tragen damit zur Eindämmung der Entzündung bei (Abb. 1–2).^{44,141,143} Eine aktuelle Studie zeigt, dass sogar Neutrophile selbst an der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt sind und von diesen funktionell inhibiert werden (Abb. 1–2).⁴²

Die Apoptose von Wirtszellen beeinflusst hierbei auch den Verlauf einer *L. major*-Infektion. Apoptotische Neutrophile modulieren über PS die Funktionalität von Makrophagen und verhindern deren Aktivierung.^{43,44,51,129} Sind solche apoptotischen Neutrophile mit *L. major* infiziert, wird es den Parasiten ermöglicht, ihre Hauptwirtszelle still zu infizieren und intrazellulär zu überleben (Abb. 1–2).^{123,163} Darüber hinaus wird diskutiert, dass *L. major* aus apoptotischen Neutrophilen freigesetzt werden und Makrophagen direkt infizieren und funktionell hemmen.^{45,71,123} Der gleichzeitige Kontakt von infizierten Makrophagen mit apoptotischen Körperchen oder nicht infizierten apoptotischen Neutrophilen hemmt auf diesem Weg den Abbau der internalisierten *L. major* durch Makrophagen (Abb. 1–2).¹²⁴ Der Parasit nutzt die körpereigenen Toleranzmechanismen, die durch apoptotische Prozesse induziert werden, für das eigene Überleben.

Aber nicht nur die Apoptose körpereigener Zellen beeinflusst die Immunantwort, auch *Leishmania* selbst bedienen sich der Apoptose, um die Immunantwort des Wirts zu ihren Gunsten zu beeinflussen. *Leishmania* nutzen die Expression des Apoptosemarkers PS, um ihre Wirtszellen zu hemmen und dadurch ihr Überleben zu ermöglichen (Abb. 1–2). Bedeutung erhält dieses Vorgehen in zwei unterschiedlichen Phasen des

Infektionsverlaufes, die sich durch unterschiedliche Mechanismen, wie die Expression von PS eingesetzt wird, auszeichnen.

Amastigote *Leishmania* liegen in der etablierten Infektion, das heißt Wochen nach Infektion vor. Sie nutzen PS, um die Infektion aufrecht zu erhalten. Lebende amastigote *L. amazonensis* exprimieren PS und verstecken sich damit durch apoptotisches Mimikry vor dem Wirt: Über PS hemmen sie die Funktionalität von Makrophagen, so dass sie nicht abgetötet werden, und erhöhen dadurch ihre Infektivität *in vivo*.^{37,171}

Promastigote *Leishmania* liegen dagegen nur zu Beginn der Infektion vor. Sie nutzen PS, um die Infektion innerhalb weniger Tage zu etablieren (Abb. 1–2). Im Gegensatz zu amastigoten *Leishmania* verstecken sich promastigote Parasiten nicht durch apoptotisches Mimikry in ihren Wirtszellen. Promastigote PS-exprimierende *Leishmania* sind tatsächlich apoptotisch, PS-negative dagegen lebendig. Die apoptotische PS+ Population promastigoter *Leishmania* ermöglicht das Überleben lebender PS- Parasiten und vermittelt die Infektivität der gesamten promastigoten *Leishmania*-Population *in vitro* und *in vivo* in anfälligen BALB/c Mäusen.^{161,170} Wanderley und Kollegen zeigten in einer dieser Studien, dass die Hauptwirtszellen von *Leishmania*, die Makrophagen, durch apoptotische PS+ *Leishmania* inhibiert werden.¹⁷⁰ Noch früher setzten van Zandbergen und Kollegen an. Sie zeigten, dass bereits Neutrophile, die Primärwirtszellen von *Leishmania* sind und lange vor Makrophagen im Infektionsgebiet einwandern, durch apoptotische PS+ *L. major* funktionell gehemmt werden.¹⁶¹ Indem sich eine Subpopulation für das Wohl der Gesamtpopulation opfert, legen promastigote *Leishmania* im Gegensatz zu amastigoten Parasiten ein altruistisches Verhalten an den Tag.

Beide zuvor erwähnten Studien untersuchten lediglich die Wirkung apoptotischer PS+ *Leishmania* auf die Funktionalität der Phagozyten im Infektionsgebiet und zeigten, dass der progressive Verlauf einer Infektion in anfälligen BALB/c gefördert wird. Für den Erfolg oder Misserfolg der Bekämpfung einer *Leishmania*-Infektion ist insbesondere die erworbene T-zellspezifische Zytokinantwort verantwortlich. Neben der angeborenen Immunantwort zu Beginn der Infektion könnten promastigote apoptotische PS+ Parasiten die krankheitsassoziierte, T-zellspezifische Zytokinexpression und die T-

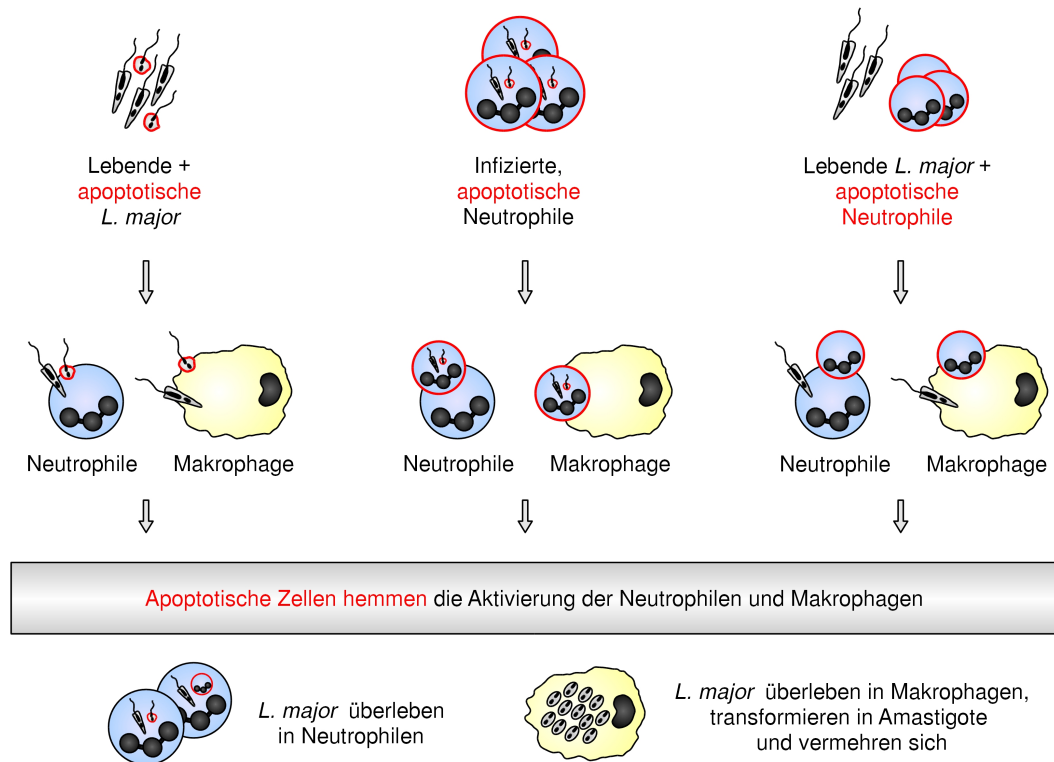


Abb. 1–2: Einfluss von Apoptose auf die Etablierung der Infektion durch promastigote *Leishmania*. Sowohl apoptotische Wirtszellen als auch apoptotische promastigote *Leishmania* fördern die Etablierung der Infektion, indem sie die Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen hemmen. Rot: apoptotische Phosphatidylserin-positive (PS+) Zellen.

zellabhängige B-Zellantwort gezielt induzieren und dadurch die Abtötung der Parasiten durch Makrophagen zusätzlich hemmen.

1.4 Zielsetzung

Apoptotische PS+ *L. major* unterstützen die Infektivität der gesamten Parasitenpopulation. Promastigote apoptotische PS+ *L. major* fördern zu Beginn die Etablierung der Infektion. Sie liegen nur zu Beginn der Infektion vor, dennoch reicht dies aus, um die Infektion zu etablieren und den Infektionsverlauf festzulegen. Bisherige Studien analysierten den klinischen Verlauf im Infektionsgebiet, welche funktionellen Konsequenzen hieraus für die Effektorantwort der angeborenen und adaptiven Immunantwort in Haut und Lymphknoten entstehen, ist nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit soll die Effektorantwort der angeborenen und adaptiven Immunantwort untersuchen, indem

promastigote lebende PS- und promastigote apoptotische PS+ *L. major* voneinander getrennt und BALB/c Mäuse mit verschiedenen Inokula infiziert werden.

Zunächst soll im Infektionsgebiet die angeborene Effektorantwort durch Analyse von Zellmarkern und Chemokinen charakterisiert werden, die mit dem progressiven klinischen Verlauf assoziiert ist, der durch promastigote apoptotische PS+ *L. major* hervorgerufen wird. Für den Erfolg oder Misserfolg der Bekämpfung einer *L. major*-Infektion ist die erworbene Effektorantwort, die im drainierenden Lymphknoten generiert wird, wichtig. In Abhängigkeit von der Anwesenheit promastigoter apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum soll daher die T-zellspezifische Zytokinantwort sowohl in der Haut als auch im drainierenden Lymphknoten sechs Wochen nach Infektion untersucht werden. Darüber hinaus wird die T-zellabhängige B-Zellantwort analysiert.

Promastigote apoptotische PS+ *L. major* liegen nur zu Beginn der Infektion vor. Es ist nachgewiesen, dass sie kurz nach Infektion die Effektorzellen der angeborenen Immunantwort, ihre Wirtszellen, hemmen. Es ist nicht bekannt, ob sich die Parasiten dadurch bereits kurz nach Infektion vermehrt in den drainierenden Lymphknoten verteilen und welchen Einfluss apoptotische PS+ *L. major* auf die erworbene Effektorantwort kurz nach Infektion ausüben. Deshalb untersucht die vorliegende Arbeit die Immunantwort des Lymphknotens drei Tage nach Infektion und vergleicht sie mit der etablierten Immunantwort sechs Wochen nach Infektion.

Im Gegensatz zur anfälligen BALB/c kontrollieren resistente C57BL/6 Mäuse die Infektion mit *L. major*. Deshalb soll in Analogie zur anfälligen BALB/c im Infektionsgebiet Haut untersucht werden, ob promastigote apoptotische PS+ *L. major* auch einen Einfluss auf die Immunantwort resistenter C57BL/6 Mäuse haben und welche Unterschiede zur anfälligen BALB/c Maus bestehen.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Parasiten

<i>L. major</i> (MHOM/IL/81/FE/BNI)	Institut für Mikrobiologie, Universität zu Lübeck
<i>L. major</i> (MHOM/SN/74/SD)	Institut für Mikrobiologie, Universität zu Lübeck

2.2 Tiere

BALB/cAnNCrI	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld
C57BL/6NCrI	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld

2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der kommerziellen Software Clone Manager 7.01 entworfen und über MWG Biotech AG (Ebersberg) oder biomers.net GmbH (Ulm) bezogen. Die Sonden sind am 5'-Ende an das Fluorophor FAM, am 3'-Ende an den Quencher TAMRA gekoppelt. for: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer.

Oligoname	Sequenz 5' > 3'	Oligo (Bp)	Produkt (Bp)	Accession-Nr.
BDNF for	cctggatgccgcaaacatgtc	21	107	NM_007540.4
BDNF Sonde	tcacacagctcagctccccacgg	24		
BDNF rev	ctgccgctgtgaccactc	19		

Oligoname	Sequenz 5' > 3'	Oligo (Bp)	Produkt (Bp)	Accession-Nr.
CD3 ϵ for	ataggaaggccaaggccaag	20	145	NM_007648.3
CD3 ϵ Sonde	ccagactatgagcccatccgcaaagg	26		
CD3 ϵ rev	tcaggccagaatacaggtc	19		
CD11c for	ccactgtctgccttcatattc	21	96	NM_021334.2
CD11c rev	gacggccatggcttagag	18		
CD19 for	gaaaatgcagatgaggagctgg	22	145	NM_009844.1
CD19 Sonde	caaccagttggcaggatgatggacttct	28		
CD19 rev	gctgcatagaggatccctctc	21		
Fc γ RI for	gaagacaccgctacacatctg	21	147	NM_010186.3
Fc γ RI rev	gtctctgcaggagcaaattc	20		
Fc γ RII for	gtcgcagccattgttattatcc	22	133	NM_001077189.1
Fc γ RII rev	gctgtctgtactcacctacttc	22		
Fc γ RIII for	gtacacagcaccagtcacaag	20	118	NM_010188.4
Fc γ RIII rev	gcaaacagaggagcacatcac	20		
Fc γ RIV for	gagggtcattggacacaaac	20	120	NM_144559.1
Fc γ RIV rev	gtcctatcagcaggcagaatg	21		
Gr1 (Ly-6G) for	gcgttgctctggagatagaag	21	128	XM_909927.2
Gr1 (Ly-6G) rev	cttcacgttgacagcattacc	21		
IFN γ for	gcaaggcgaaaaaggatgc	19	98	NM_008337.2
IFN γ Sonde	tgccaagtttgaggtaacaacccacag	28		
IFN γ rev	gaccactcggatgagctcattg	22		
IL4 for	gagactctttcggccttttcg	21	96	NM_021283.1
IL4 Sonde	cctggattcatcgataagctgcacatg	28		
IL4 rev	aggctttccaggaagtctttcag	23		
IL10 for	tccttgggtgagaagctgaag	21	96	NM_010548.1
IL10 Sonde	ctgaggcgtgtcatcgatttctccc	26		
IL10 rev	cacctgctccactgccttg	19		
KC for	cagaccatggctgggattc	19	142	NM_008176.2
KC Sonde	cctcgcgaccattcttgagtgtggctatgac	31		
KC rev	gaaccaaggagcttcag	18		
Kp for	cctattcacttacaccaa	21	116	Referenz ¹¹²
Kp rev	gggtagcgtggcgcttct	23		
Mac1 for	cttcacggcttcagagatgac	21	109	NM_001082960.1
Mac1 rev	ctgaacaggatccagaagac	21		
MIP1 α for	caactctgcaaccaagtcttc	20	138	NM_011337.2
MIP1 α Sonde	ccatattggagctgacaccccactgc	26		
MIP1 α rev	caactggctgggagcaaag	19		
MLN51 for	ccaagccagccttcattcttg	21	134	NM_138660.2
MLN51 Sonde	cacgggaacttcgaggtgtgcctaac	26		
MLN51 rev	taacgcttagctcgaccactctg	23		
RANTES for	gctgctttgctacctctcc	20	121	NM_013653.3
RANTES Sonde	caaacacgactgcaagattggagcac	26		
RANTES rev	cacacttggcggttccttcg	20		

2.4 Antikörper

APAAP, Maus, Monoklonal	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Purified anti-mouse CD45R/B220 (RA3-6B2)	BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg
Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins / Biotinylated	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Biotin-conjugated Hamster Anti-Mouse TCR β chain Monoclonal antibody	BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg
ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
ExtrAvidin®-Peroxidase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen (Clone TEC-3)	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

2.5 Kits

Annexin:FITC Apoptosis Kit I	BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg
Annexin V MicroBead Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Deoxyribonuklease I-Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
Mouse IgG1 ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA
Mouse IgG2a ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA
Mouse IgG2b ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA

2.6 Medien und Puffer

BHI-Medium	10,4 g BHI, 200 ml H ₂ O bidest, autoklaviert
Blut-Agar-Medium	2 ml Penicillin/Streptomycin, 200 ml BHI-Medium

Novy-Nicolle-McNeal (NNN) Blutagar	50 ml Kaninchenblut, 50 ml PBS, 2 ml Penicillin/Streptomycin, 200 ml BHI-Medium
ELISA Blockpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, in A. bidest, pH 8,0
ELISA Probenpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween [®] 20, in A. bidest, pH 8,0
ELISA Waschpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween [®] 20, in A. bidest, pH 8,0
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	2,5 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , in A. bidest, pH 7,25
Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640), without L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS
TBS-Tween	0,05 M TRIS, 0,05% (w/v) Tween [®] 20, 0,8% (w/v) NaCl in H ₂ O bidest, pH 7,6

2.7 Chemikalien und andere Reagenzien

Brain Heart Infusion (BHI)	DIFCO BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
5x First Strand Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aceton, 99,8%, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
APAAP-Substrat	2% (v/v) N,N-Dimethylformamid, 0,02% Naphthol AS-MX Phosphat, 0,1 mM Levamisole in 0,1 M TRIS, pH 8,2
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloroform	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DEPC-H ₂ O	0,1% DEPC (v/v) in H ₂ O bidest
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim Deutschland
Dithiothreitol (DTT) 0,1 M	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
dNTP-Mix (10 mM)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Einbettmedium, Tissue-Tek [®]	Leica Instruments GmbH, Nussloch

Eindeckmittel, AQUATEX [®]	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, 70%, 75%, 100%	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FACS Clean	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
FACS Flow [™]	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
Fast Blue BB Salt, Fast Red TR	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Foetal Bovine Serum Albumine (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Formaldehydlösung, 37%	Merck KGaA, Darmstadt
Gigasept [®] Med	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glutardialdehydlösung, 25%	Merck KGaA, Darmstadt
Levamisole	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Mastermix (reverse Transkription)	4 μ l 5x First Strand Buffer, 2 μ l DTT (0,1 M), 1 μ l dNTP-Mix (10 mM), 250 ng Random- Primer in 1 μ l DEPC-H ₂ O, 0,5 μ l Reverse Tran- skriptase (200 U/ μ l)
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Methanol, 99,9%, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl-Lösung 0,9 %, steril	Berlin-Chemie AG, Berlin
NaN ₃	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Naphtol AS-MX Phosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Natriumpyruvatlösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Normal Mouse Serum	Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
PFA 1%	1% PFA (w/v) in PBS
PFA 4%	4% PFA (w/v) in PBS
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml/10 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
qPCR [®] Mastermix Plus	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln

qPCR [®] Mastermix Plus for SYBR [®] Green I	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Random-Primer (hexamers_rand)	MWG Biotech AG, Ebersberg
Reverse Transkriptase (BD PowerS- cript [™])	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
SDS-Natriumlaurylsulfat	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Silan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Schwefelsäure, 98% zur Stickstoffbestimmung	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure, 20%	200 ml 98% Schwefelsäure, 800 ml A. bidest
Silan-Lösung, 2%	2% (v/v) Silan in Aceton 100%
Toluidinblau	Waldeck GmbH & Co., Münster
Toluidinblau-Lösung (0,1%)	0,1% (w/v) Toluidinblau, 1% (v/v) Methanol, 15% (v/v) Ethanol in DEPC-H ₂ O
Trinatrium	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva GmbH, Heidelberg
Tween [®] 20	Serva GmbH, Heidelberg
Tween [®] 20, 5%	5 ml Tween [®] 20, 95 ml A. bidest
TMB Single Solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.8 Verbrauchsmaterialien

96 Well Multiply [®] -PCR-Platten, Polypropylen mit Klebefolie	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Combitips (unsteril)	Eppendorf AG, Hamburg
Cryogefäße	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Cryoschreiber	Nalgene [®] Labware, Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Dänemark
FACS-Röhrchen (Test Tube, no cap, nonsterile)	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
Falcon [®] -Gefäße, 15 und 50 ml	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
Folienobjektträger, PALM [®] Polyethylenphthalat, 1 mm MembraneSlides	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
Glasobjektträger Superfrost Iso-Norm 8037	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig
Injektionskanüle Gr.18, 100 Sterican	B. Braun Melsung AG, Melsungen

Klebefolien, optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
MaxiSorb Mikrotiterplatten (96-well, Flachboden)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
MS, LS, LD Columns (MACS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Omnifix [®] -F, 1 ml	B. Braun Melsung AG, Melsungen
Peha-soft powderfree	Hartmann, Heidenheim
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 μ l)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe Seal 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 0,5 und 1,5 ml, Polypropylen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzenfilter PET 0,2 μ m	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.9 Operationsmaterialien

Einmalskalpelle, Klinge 11	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegspritzen, 1 ml, steril (BD Plastipak [™])	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
Injektionskanülen, 0,45 x 13 mm (BD Microlance [™] 3)	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
Einwegspritzen, 1 ml, steril (BD Plastipak [™])	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
Injektionskanülen, 0,45 x 13 mm (BD Microlance [™] 3)	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
Instrumente aus hochlegiertem Edel- stahl	Präparierschere, fein; Pinzette, anatomisch; Pinzette, chirurgisch; Uhrmacherpinzette

2.10 Geräte

ACCU BLOCK, Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Windsor, Berkshire, UK
Außenmessgerät Oditest 0-10 mm	Kroeplin GmbH, Schlichtern
Axiovert 200	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
Digitaler Blockthermostat	Axon Labortechnik, Kaiserslautern

Eppendorf Research [®] Multichannel Pipette (30 - 300 μ l)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
FACS Calibur [®] Durchflusszytometer	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg
Magnetrührer IKA-Combimag RET Midi MACS [®]	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikrodissektion, PALM [®] MicroBeam	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
Mikroskop Axiovert mit AxioCam	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Leitz Laborlux 12	Leitz, Wetzlar
μ Quant [™] Microplate Spektralphotometer	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Neubauer improved (Tiefe 0,02 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim
Objektiv NPL FLUOTAR Phaco2 40x/0.70 - 160/0.17	Leitz, Wetzlar
pH-Meter Beckman 3500 digital	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Pipetten Eppendorf Research (10, 20, 200, 1000 μ l)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Pipetman (10, 20, 200, 1000 μ l)	Gilson International B.V., Limburg-Offheim
Pipettierhilfe pipetus [®] -akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co.KG, Eberstadt
Real-Time Sequence Detection System ABI PRISM [®] 7900	Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttler, Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Serienschnittmikrotom, CM300 Kryostat	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Jung
Test Tube Shaker VWR1719	International nv/sa, Leuven, Belgien
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International GmbH, Darmstadt
UV-Licht G 30 Watt Sylvana	Bauhaus, Hamburg
Vakuumkonzentrationszentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Waage, Kern 440-51N, Messgenauigkeit 1 g	Kern & Sohn GmbH, Balingen

Waage, OHAUS [®] Adventurer [™] AR0640, Messgenauigkeit 0,1 mg	Ohaus GmbH, Gießen
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Digifuge GL 2200	Heraeus Instruments GmbH, Hannover
Zentrifuge Megafuge 1.0 R /2.0 R Heraeus	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Zentrifuge, MiniSpin [®] Plus	Eppendorf AG, Hamburg

2.11 Software

Adobe [®] Illustrator	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe [®] Photoshop [®] 6.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
AxioVision 4.8	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
CellQuest Pro [®] v4.0.2	CellQuest [™] Software, BD, Heidelberg
Clone Manager 7.01	S & D Software, Cyry, NC, USA
Foxit Reader 3.0	Foxit Software Company, Fremont, CA, USA
Ghostscript 8.63	http://www.ghostscript.com
GraphPad Prism [®] 5.0	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
GSview 4.9	http://www.ghostgum.com.au
JabRef 2.5	http://jabref.sourceforge.net
KCjunior [™] Data Analysis Software 1.41.8	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Microsoft [®] Excel, Version 2002	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
MikTeX 2.7	http://www.miktex.org
OpenOffice.org 3.1.1 Draw	http://www.openoffice.org , Sun Microsystems, Inc., Palo Alto, CA, USA
PALM [®] RoboSoftware	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
SDS 2.2.1 RQ Software	Applied Biosystems, Darmstadt
TeXnicCenter 1.0 RC1	http://www.texniccenter.org

Kapitel 3

Methoden

3.1 Infektionsbiologische Methoden

3.1.1 *Leishmania major* Parasiten

Promastigote *Leishmania major* (*L. major*) Parasiten (MHOM/IL/81/FE/BNI) (Laskay et al., 1995) wurden freundlicherweise von T. Laskay (Institut für Mikrobiologie, Universität zu Lübeck) zur Verfügung gestellt. Promastigote *L. major* vom Typ MHOM/SN/74/SD wurden zuerst von Anderson et al. beschrieben und freundlicherweise von G. v. Zandbergen (Institut für Mikrobiologie, Universität zu Lübeck; jetzt Institut für Mikrobiologie, Universität Ulm) zur Verfügung gestellt. Im Überblick: Promastigote *L. major* wurden *in vitro* auf biphasischem Novy-Nicolle-McNeal (NNN) Blutagarmedium in RPMI-Komplettmedium (27 °C, feuchte Atmosphäre, 5% CO₂) kultiviert, bis sie nach 7 Tagen die stationäre Phase erreichten. Für Infektionsversuche wurden promastigote *L. major* der stationären Phase der Passagen 3 bis 7 genutzt. Nach jeder 12. Passage wurde eine neue Leishmanienkultur aus frisch isolierten *L. major* aus Lymphknoten infizierter BALB/c Mäuse angesetzt.

3.1.2 Herstellung von Leishmanienlysats

Leishmanienlysats ist ein komplexes Gemisch degradierter Leishmanienantigene. Zur Herstellung des Lysats wurden promastigote Leishmanien der stationären Phase aus der Zellkultur geerntet und dreimal mit PBS gewaschen (2000 g/10 min). Anschließend

wurden die Parasiten mit PBS auf 10^9 /ml eingestellt und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wie folgt degradiert:

1. Einfrieren in flüssigem Stickstoff.
2. Auftauen bei 40 °C im Wasserbad.
3. Vortexen bei maximaler Leistung: 30 Sekunden.

Dieser Zyklus wurde zehnmal wiederholt. Das Lysat wurde in gebrauchsfertigen Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Subkutane Infektion im Fuß

Infektionen mit *L. major* wurden mit sterilen Einwegspritzen subkutan in die rechte, hintere Fußsohle der Versuchstiere verabreicht. In der Regel wurden 10^6 Parasiten in einem Volumen von 50 μ l RPMI-Medium, injiziert, Ausnahmen sind im Text gesondert gekennzeichnet. Zur Infektion wurden verschiedene Leishmanienpräparationen genutzt: Leishmanien der stationären Phase (*L. major*, *Lm*), lebende PS- *L. major* (*Lm* PS-), sowie die Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) (aufgereinigt wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben).

3.1.4 Messung der Fußschwellung

Um den Infektionsverlauf in Mäusen verfolgen zu können, wurde die Fußschwellung wöchentlich vermessen. Hierfür wurde mit einem Außenmesstaster die Dicke der Füße bestimmt. Die Schwellung wurde als Differenz zwischen rechtem infiziertem und linkem nicht infiziertem Fuß in Millimetern angegeben.

3.1.5 Bestimmung der Parasitenlast

Die Anzahl der Parasiten in der Läsion und im drainierenden Lymphknoten ist ein Maß dafür, wie gut die Leishmanieninfektion unter Kontrolle gebracht werden kann. Zur Bestimmung der Leishmanienlast in Haut und drainierendem poplitealem Lymphknoten wurde die zirkuläre DNA der Kinetoplasten (Kp) mittels Real-Time PCR detektiert und zum murinen Einzelkopiegen BDNF (Brain derived neurotrophic

factor) ins Verhältnis gesetzt (siehe Abschnitt 3.3.3).²⁰ Der Nachweis der Kinetoplasten-DNA erhöht die Sensitivität, da pro einzelner *L. major*-Zelle bis zu mehrere tausend Kopien der zirkulären DNA vorliegen.^{18,21,147}

3.2 Immunologische Methoden

3.2.1 Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) gegen *L. major*-spezifische Serum-IgGs

Der Nachweis der IgG-Subtypen im Serum wurde mit den Kits zur Quantifizierung der Maus-IgG-Subtypen von Bethyl nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 96-Well-Flachbodenmikrotiterplatten wurden mit 50 μl Leishmanienlysate (Äquivalent zu 10^6 *L. major*, in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet, dreimal gewaschen (100 μl Waschpuffer) und für 1 h geblockt (100 μl Blockpuffer). Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit 100 μl Waschpuffer gewaschen, dann mit 50 μl Proben pro Well für 1 h inkubiert. Die Probenverdünnungen wurden in Probenpuffer angesetzt (Verdünnungsstufen 100, 1 000, 10 000). Anschließend wurde dreimal gewaschen und 50 μl des an Horse raddish peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpers für 1 h inkubiert (Verdünnung für anti-IgG1-HRP, anti-IgG2a-HRP, anti-IgG2b-HRP jeweils 1:100 000, in Probenpuffer). Nach dreimaligem Waschen wurde der ELISA mit 50 μl TMB entwickelt und die Farbreaktion mit 20% Schwefelsäure gestoppt. Die photometrische Auswertung der Farbreaktion erfolgte bei 450 nm.

Zur Auswertung wurde die 1:1 000 Verdünnung herangezogen, weil hier im Gegensatz zur 1:100 Verdünnung die Messwerte noch nicht im Sättigungsbereich der Farbreaktion lagen. Damit auch Messungen verschiedener Platten und Messtage miteinander verglichen werden konnten, wurden zur Normierung der Messdaten pro Platte sowohl naives als auch infiziertes Referenzserum eingesetzt. Die OD-Werte wurden mit Hilfe folgender Formel normiert:

$$\frac{OD_{Probe} - OD_{Referenz\ naiv}}{OD_{Referenz\ infiziert} - OD_{Referenz\ naiv}}$$

Sowohl für das naive als auch das infizierte Referenzserum wurde das Serum von jeweils drei Tieren gepoolt.

3.2.2 Magnetic Cell Sorting (MACS) von *L. major*

Zur Trennung lebender von apoptotischen *L. major* wurde das Annexin-V MicroBead Kit genutzt. Dies macht sich zu Nutzen, dass Annexin V an den Apoptosemarker Phosphatidylserin (PS) bindet und ermöglicht dadurch die Trennung apoptotischer (Annexin-V-positiver = PS+) und lebender (Annexin-V-negativer = PS-) *L. major* mittels MACS.

$250 \cdot 10^6$ *L. major* wurden in $400 \mu\text{l}$ Bindungspuffer (aus dem Kit) mit $100 \mu\text{l}$ Annexin-V-Beads inkubiert (15 min, 4°C). Die Leishmanien wurden gewaschen (8 min, 1500 g, 4°C) und in 1 ml Bindungspuffer aufgenommen. Eine MACS LD-Säule wurde mit 2 ml Bindungspuffer gespült und im Midi-MACS platziert. Die Leishmaniensuspension wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluss in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Die Säule wurde zweimal mit 1 ml Bindungspuffer gespült und der Durchfluss in demselben Falcon gesammelt. Diese Fraktion enthielt die lebenden PS-Leishmanien. Die Säule wurde aus dem MACS-Gerät entfernt und mit warmem PBS die Annexin-V-markierten apoptotischen PS+ Leishmanien von der Säule gewaschen. Die Reinheit der MACS-gereinigten Leishmanien wurde mittels FACS-Analyse (siehe 3.2.3) verifiziert. Die Trennung lebender und apoptotischer Leishmanien mittels MACS-Aufreinigung ist nicht zu 100% effizient, weshalb die lebende Fraktion einen restlichen Anteil apoptotischer Leishmanien enthielt (maximal 10%).

3.2.3 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) von *L. major*

Die Färbung apoptotischer Leishmanien für das FACS wurde mit dem Annexin:FITC Apoptosis Kit I nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

10^6 *L. major* wurden in $100 \mu\text{l}$ Annexin-Bindungspuffer mit $5 \mu\text{l}$ AnnexinV-FITC inkubiert (15 min, 4°C , dunkel). Als Negativkontrolle wurden 10^6 *L. major* im Bindungspuffer allein inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in $300 \mu\text{l}$ 1% PFA fixiert und mittels FACS analysiert: Im FSC/SSC-Diagramm wurde ein Gate um die Leishmanienpopulation gelegt und in diesem 15 000 Ereignisse gemessen.

Zur Analyse wurde die Region, die die apoptotischen PS+ Leishmanien umfasst, anhand der Negativkontrolle so ausgerichtet, dass 0,05% der Ereignisse mit eingeschlos-

sen waren. Die aufgereinigten lebenden PS- Leishmanien wurden für Infektionsversuche eingesetzt, wenn weniger oder gleich 10% der Leishmanien apoptotisch waren.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Lasermikrodissektion

Durch den Vergleich der Toluidinblau-gefärbten mit den immunhistologisch β TCR-gefärbten Kryostatschnitten konnte die T-Zellzone eindeutig identifiziert werden. Zur Analyse wurde mit Hilfe der PALM® RoboSoftware die T-Zellzone mit aktiver Zone markiert und anschließend mit dem gepulsten, ultravioletten Laser der Mikrodissektionsanlage ausgeschnitten ($7 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$). Die Proben wurden in Verschlusskappen von Reaktionsgefäßen in inertem Mineralöl gesammelt, anschließend in 700 μl Lysis Solution RL (innuPREP RNA Mini Kit) durch einminütiges Vortexen aufgeschlossen und denaturiert. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

3.3.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die Gesamt-RNA wurde mit dem innuPREP RNA Mini Kit gemäß der Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden die Proben aufgetaut, eine Minute gevortext und 10 Sekunden bei 14500 UpM abzentrifugiert. Durch zehnmaliges Aufziehen mit einer Feindosierungsspritze (1 ml) wurde die genomische DNA geschert. Nach Zugabe von 700 μl 70% Ethanol wurden die Proben auf die Spin Filter R Säule gegeben, für zwei Minuten bei 12000 UpM zentrifugiert und das Filtrat anschließend verworfen. Waschschritte mit 500 μl Washing Solution HS und 700 μl Washing Solution LS (je 1 min, 12000 UpM) folgten, anschließend wurde die Säule getrocknet (2 min, 12000 UpM) und die RNA mit 60 μl RNase-freiem Wasser in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert (1 min, 8000 UpM). Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend verworfen, 12 μl des Eluats zur Bestimmung der Leishmanienlast abgenommen und in -20°C eingefroren. Das restliche Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge auf 8 μl konzentriert (20 min, 60°C).

Die Proben wurden bei Bedarf mit DEPC-Wasser auf 8 μl aufgefüllt. Zum Verdau genomischer DNA wurden 1 μl 10x DNase-Puffer und 1 μl DNase I (Deoxyribonuklease

I-Kit, 1 U/ μ l) eingesetzt und für 15 min bei 20 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1,5 μ l 15 mM EDTA-Stopplösung (Deoxyribonuklease I-Kit) wird die Reaktion in einer 10-minütigen Inkubation bei 70 °C gestoppt. Alle nachfolgenden Schritte folgten auf Eis: Die Proben wurden zur reversen Transkription mit 8,5 μ l Mastermix versetzt und inkubiert (50 min, 42 °C) und die Reaktion durch Inaktivierung der Reversen Transkriptase abgestoppt (15 min, 70 °C). Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20 °C eingefroren.

3.3.3 Quantitative Real-Time (RT)-PCR

Die Quantifizierung erfolgte mit dem ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System. Die verwendeten Oligonukleotide sind mit ihren Sequenzen in Tabelle 2.3 on page 14 dargestellt. Pro 20 μ l Reaktionsansatz wurden 0,5 bis 1 μ l cDNA, 1x konzentrierter qPCR Mastermix und Oligonukleotide in den in Tabelle 2.3 angegebenen Endkonzentrationen eingesetzt. Folgender PCR-Zyklus wurde verwendet: 6 min bei 95 °C, 50 Zyklen für 30 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Bei Verwendung des qPCR® Mastermix Plus for SYBR® Green I wurde zudem ein Dissoziationsschritt (15 s 95 °C, 15 s 60 °C, 15 s 95 °C) angehängt. Die Bestimmung des Ct-Wertes (cycle of threshold) erfolgte mit Hilfe der SDS 2.2.1 RQ Software. Der Schwellenwert wurde auf 0,2 gesetzt und mit dem von Applied Biosystems empfohlenen Auswertungsverfahren wurde für jede Probe die Kopienzahl eines Zytokins pro Kopie MLN51 mit der Formel

$$2^{Ct_{MLN51} - Ct_{Zytokin}}$$

bestimmt. Ausnahmen hiervon bildet das Oligonukleotid Kp (Schwellenwert 0,1), das auf das Einzelkopiegen BDNF bezogen wurde. Wurde für MLN51 ein Ct von 38 überschritten, wurden die Proben von der Auswertung ausgeschlossen, da in diesen Bereichen eine zuverlässige Detektion in dem hier angewandten System nicht mehr sichergestellt werden konnte. Werte, die als nicht detektierbar eingestuft wurden, sind in den Abbildungen auf Null gesetzt.

3.4 Immunhistochemische Methoden

3.4.1 Kryosektion

Um die Morphologie sowie das Ausmaß der durch Leishmanienlysate induzierten Proliferation im poplitealen Lymphknoten zu bestimmen, wurden immunhistologisch gefärbte Gefrierschnitte hergestellt. Die Lymphknoten wurden bei -20°C auf einem Objektisch in Einbettmedium fixiert und mit einem Serienschnittmikrotom $12\ \mu\text{m}$ dick geschnitten. Die Gefrierschnitte wurden entweder im Ganzen in ein Reaktionsgefäß mit $700\ \mu\text{l}$ Lysis Solution RL (innuPREP RNA Mini Kit) gegeben oder einzeln auf Glasobjektträger (Superfrost, für Immunhistologie) bzw. Folienobjektträger (für Mikrodissektion) aufgebracht und zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte im Puffer wurden eine Minute gevortext, abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Der Folienobjektträger wurde Toluidinblau (siehe 3.4.2) gefärbt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Alle weiteren Objektträger wurden immunhistologisch gefärbt (Abschnitt 3.4.2).

3.4.2 Färbungen

Für die immunhistologischen Färbungen kamen die in Tabelle 2.4 aufgeführten Antikörper zur Anwendung. Antikörper wurden in der Regel in TBS-T angesetzt, Ausnahmen sind gekennzeichnet. Die Färbemittel Fast Red und Fast Blue wurden in APAAP-Substrat angesetzt. Sofern nicht anderweitig gekennzeichnet, wurden Spülschritte in TBS-T und Färbungen mit Fast Red oder Fast Blue schüttelnd durchgeführt, Inkubationen mit Antikörpern erfolgten bei Raumtemperatur in der dunklen Feuchtkammer.

Toluidinblau

Für die Mikrodissektion wurden Folienobjektträger mit Toluidinblau gefärbt. Dazu wurde das Präparat zwei Minuten in 75% Ethanol fixiert, anschließend zwei Minuten in DEPC-Wasser gespült und für 10 Minuten mit 0,1% Toluidinblau inkubiert. Dann wurde zweimal für 15 Sekunden schwenkend in DEPC-Wasser gespült und zweimal

für 15 Sekunden schwenkend in 100% Ethanol entwässert. Das Präparat wurde kurz getrocknet und anschließend bei -80°C eingefroren.

TCR β /B220

Zur eindeutigen Identifikation des T-Zellkompartimentes im pLK wurde ein weiterer Glasobjektträger mit anti-TCR β (T-Zellrezeptor) und anti-B220 (B-Zellrezeptor) gefärbt. Hierzu wurde der Objektträger bei -20°C in Methanol/Aceton (1:1, v/v) fixiert und anschließend zweimal für 5 Minuten gespült. Der biotinylierte Primärantikörper gegen TCR β (1:100) wurde eine Stunde dunkel inkubiert, der Objektträger dann gespült und 30 Minuten mit ExtrAvidin®-Peroxidase (1:100) inkubiert. Der Objektträger wurde erneut gespült, für 5 Minuten mit Diaminobenzyl (DAB) die Farbreaktion entwickelt und zweimal gespült. Abschließend wurde das Präparat zur besseren Kontrastierung mit Hämalaun gegengefärbt und mit Aquatex® eingedeckt.

Ki67/B220

Zur Bestimmung proliferierender T-Zellen im Paracortex wurde Ki67, ein Protein, das während aller Phasen des aktiven Zellzyklus exprimiert wird, angefärbt.

Die Objektträger wurden aufgetaut (10 min) und fixiert: Chloroform (10 min, Raumtemperatur (RT)), Aceton (10 min, RT), spülen (2x 5 min) und abschließend 4% Paraformaldehyd (PFA) (45 min, 4°C). Der Antikörper gegen Ki67 wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert (1:100 in PBS-1%BSA-0,1%NaN₃). Die Objektträger wurden in biotinyliertem polyklonalem Antikörper (pAK) (1:500 mit 5% Mäuseserum) (30 min) inkubiert und mit ExtrAvidin®-Alkaliner Phosphatase markiert (1:100) (30 min). Die Farbentwicklung für Ki67 erfolgte mit Fast Red (25 min). Für die B220-Färbung wurde zunächst für eine Stunde mit anti-CD45R/B220 (1:100 in PBS-1%BSA-0,1%NaN₃), dann mit pAK (1:500 mit 5% Mäuseserum) (30 min) inkubiert. Die Objektträger wurden mit ExtrAvidin®-Alkaliner Phosphatase markiert (1:100) (30 min) und die Farbentwicklung mit Fast Blue (25 min) dargestellt. Zwischen den Inkubationen wurde 10 bis 15 Minuten gespült.

3.4.3 Bestimmung der T-Zellproliferation im Lymphknoten

Am Lichtmikroskop (Leitz Laborlux 12, Leitz, Wetzlar, Deutschland) wurde die Zahl proliferierender Zellen im Paracortex in einer Fläche von $1\,000\ \mu\text{m}^2$ ermittelt. Es wurde die Fläche mit der größten Dichte proliferierender Zellen ausgewertet (sogenannter Hot-Spot).

3.5 Tierversuche

3.5.1 Tierversuchsantrag

Alle Tierversuche wurden in den Räumen der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck durchgeführt.

Folgender Tierversuchsantrag wurde vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume von Schleswig-Holstein für dieses Projekt genehmigt: „Identifizierung von Molekülen und Mechanismen, die im T-Zell-Areal des Lymphknotens für die Entstehung einer TH1- bzw. TH2-Immunantwort verantwortlich sind am Beispiel der murinen Leishmaniose“ (V 312-72241.122-1 / 93-8/06).

- Gültig vom 31.12.2006 bis 31.12.2008, verlängert bis 31.12.2009
- Antragsteller: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann
- Stellvertreter: Dr. med. vet. Maïke Blessenohl

3.5.2 Tiere und Haltungsbedingungen

Für alle Versuche wurden weibliche Labormäuse vom Stamm BALB/c und C57BL/6 (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Tiere wurden in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck eingestallt, Einzelhaltung wurde durch Gruppenbildung vermieden. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Standardkäfigen (425 x 266 x 155 mm) aus transparentem Polycarbonat mit Abdeckgittern aus Edelstahl (E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland). Die Einstreu aus Holzspänen (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) wurde wöchentlich gewechselt, Wasser und standardisiertes Pelletfutter (altromin 1430, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. In den klimatisierten Räumen wurde ein

Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden (Hellphase 06:00 - 18:00) eingehalten. Nach einer Eingewöhnzeit von mindestens einer Woche wurden die Tiere im Rahmen der Injektionsversuche eingesetzt. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere 8 bis 12 Wochen alt.

3.5.3 Organentnahme

Die Tiere wurden durch Inhalation von CO₂ betäubt und anschließend getötet. Blut wurde durch einen Schnitt ins Herz entnommen. Die Fußhaut und die drainierenden poplitealen Lymphknoten wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann in Kryogefäßen bei -80 °C eingelagert. Die Eingriffe erfolgten unter sauberen, jedoch nicht sterilen Bedingungen in den für operative Eingriffe vorgesehenen Räumen der gemeinsamen Tierhaltung. Die für die Operationen benötigten Instrumente wurden vor jedem Operationstag mit 0,1% SDS und 70% Ethanol gereinigt.

3.6 Statistische Auswertung

Bei Überprüfung der Daten auf Gaußsche Normalverteilung (KOLMOGOROFF-SMIRNOV-Test) ergaben sich für die meisten der hier dargestellten Daten keine signifikanten Abweichungen. Da einige Datensätze nicht der Gaußschen Normalverteilung folgten und aufgrund der zum Teil kleinen Stichprobengröße, wurden dennoch ausschließlich nicht-parametrische Testverfahren für die Analyse herangezogen. Beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen, bei abhängigen Stichproben der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Innerhalb der Abbildungen wurde zwischen $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) als Signifikanzniveau unterschieden.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Einfluss apoptotischer PS+ *L. major* in anfälligen BALB/c

Promastigote, apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum verstärken die Infektivität von *L. major* in anfälligen BALB/c Mäusen.¹⁶¹ In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum auf die etablierte Immunantwort anfälliger BALB/c Mäuse analysiert werden.

4.1.1 Analyse des klinischen Bildes

In zwei unabhängigen Experimenten wurden lebende PS- und apoptotische PS+ *L. major* aus einer Kultur promastigoter *L. major* mittels magnetischer Zellseparation getrennt (siehe 3.2.2 und Abb. 4-1).¹⁶¹ Anschließend wurden anfällige BALB/c Mäuse entweder mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), aufgereinigten lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung aus aufgereinigten lebenden PS- und apoptotischen PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert (siehe 3.1.3). Die Gesamtinfektionsdosis betrug 10^6 Parasiten.

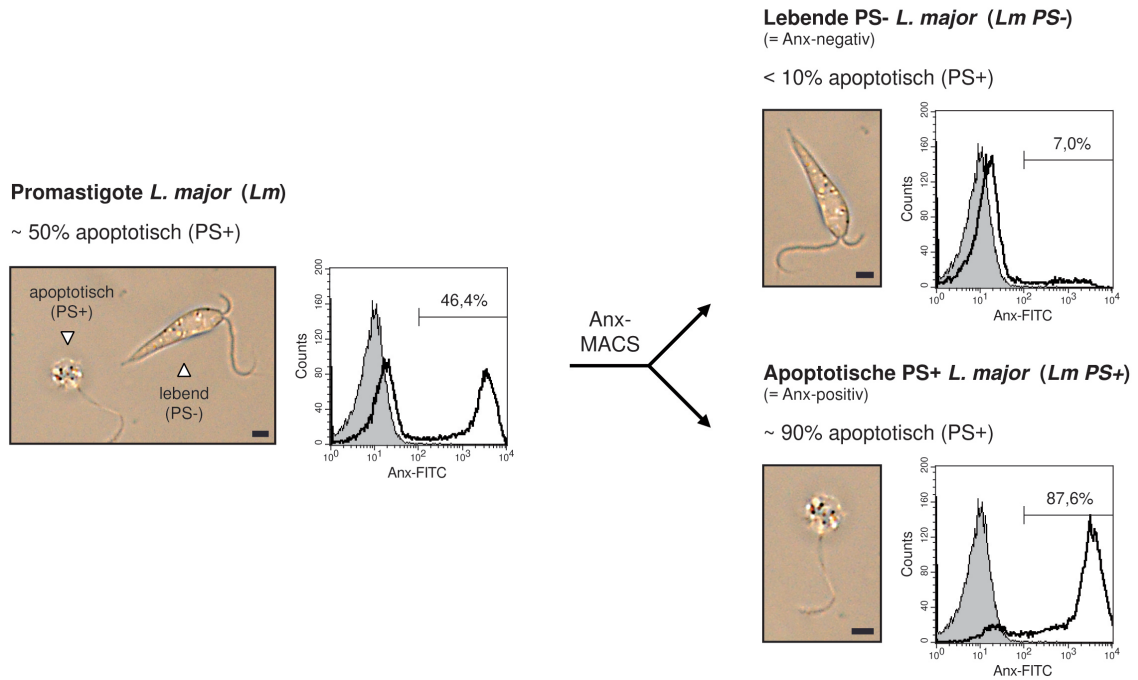


Abb. 4–1: MACS einer promastigoten *L. major*-Kultur. Durch magnetische Zellseparation über ein Annexin-V-MACS werden lebende PS- und apoptotische PS+ *L. major* voneinander getrennt. Mit Hilfe FITC-markierten Annexins (Anx-FITC) wird der Gehalt apoptotischer PS+ Zellen pro Fraktion mittels FACS bestimmt. Exemplarische Fotos und Histogramme sind gezeigt. Fotos: Matthias Klinger, Institut für Anatomie, Lübeck; Phasenkontrast, schwarzer Balken = 1 μ m. Histogramme: grau: nicht gefärbt, schwarz: Anx-gefärbt. Anx: Annexin V, PS: Phosphatidylserin.

4.1.1.1 Apoptotische PS+ *L. major* verstärken die Fußschwellung

Die Entwicklung der Fußschwellung wurde nach Infektion wöchentlich dokumentiert. Im Vergleich zur konventionellen Infektion (*Lm*) führte die Depletion apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-) zu einer Verringerung der mittleren Fußschwellung sechs Wochen nach Infektion, die Zugabe apoptotischer PS+ Parasiten zum Inokulum (*Lm* PS-/PS+) führte dagegen wieder zur vollen Fußschwellung der konventionellen Infektion (Abb. 4–2 A). In den meisten Fällen wiesen erkrankte Tiere zudem eine zunehmende Nekrotisierung des infizierten Fußes auf (Daten nicht gezeigt). Die genauere Analyse von *Lm* PS- infizierten BALB/c zeigte, dass nicht alle BALB/c eine geringere, nur mäßige Fußschwellung aufweisen, sondern sich deutlich zwei Gruppen bilden: Von 10 infizierten anfälligen Mäusen blieben 5 durch die Depletion apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum symptomfrei, die anderen 5 BALB/c entwickelten den

vollen Krankheitsverlauf (Abb. 4–2 B). Die etablierte Immunantwort dieser klinisch unauffälligen BALB/c (*Lm* PS- <1 mm) sollte im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit analysiert werden. Die nach Infektion mit lebenden PS- *L. major* dennoch erkrankten Tiere (*Lm* PS- >1 mm) wurden im Folgenden nicht weiter betrachtet.

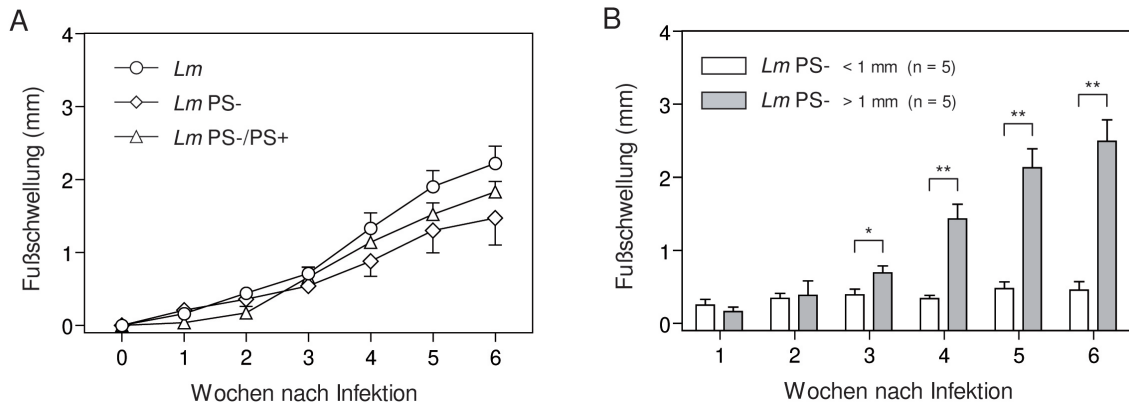


Abb. 4–2: Apoptotische PS+ *L. major* verstärken die Fußschwellung. A: Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtinfectionsdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Die Fußschwellung wurde wöchentlich vermessen. B: Lebende PS- *L. major* induzieren 2 Gruppen: klinisch unauffällig (Fußschwellung < 1 mm), klinisch erkrankt (Fußschwellung > 1 mm). Fußschwellung in mm; Mittelwert + Standardfehler; $n \geq 5$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test).

4.1.1.2 Apoptotische PS+ *L. major* verstärken die Parasitenlast

Zur genaueren Beurteilung des klinischen Zustandes sechs Wochen nach Infektion wurde die Parasitenlast in Haut und Lymphknoten mittels Real-Time RT-PCR bestimmt (siehe 3.3.3). Zum Nachweis diente die zirkuläre Mini-DNA der Kinetoplasten (Kp), die in bis zu mehreren tausend Kopien pro einzelner *L. major*-Zelle vorliegt und dadurch die Sensitivität der Detektion erhöht (siehe 3.1.5).^{18,21,147} Im Vergleich zur konventionellen Infektion (*Lm*) ging der verbesserte klinische Verlauf nach Infektion PS- *L. major* (*Lm* PS- < 1 mm) mit einer Verringerung der Leishmanienlast in Haut und Lymphknoten einher (Abb. 4–3). Wie auch für die Fußschwellung zu beobachten war, erhöhte die Zugabe apoptotischer PS+ Parasiten zum Inokulum (*Lm* PS-/PS+) die Leishmanienlast in Haut und Lymphknoten wieder. Zusammenfassend bewirkten

apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum einen verschlechterten klinischen Verlauf einer *L. major*-Infektion in anfälligen BALB/c Mäusen.

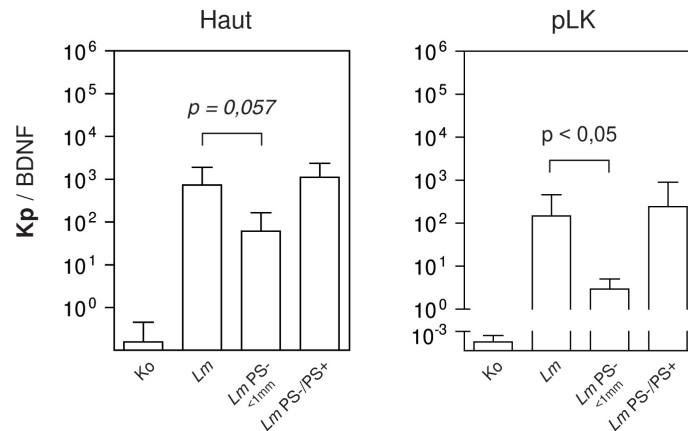


Abb. 4–3: Apoptotische PS+ *L. major* erhöhen die Leishmanienlast in Haut und Lymphknoten. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS- < 1 mm) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Haut und pLK wurden sechs Wochen nach Infektion entnommen und die Leishmanienlast mittels RT-PCR als Kopien der Kp-DNA von *L. major* (Kp) pro Kopie des Single-Copy-Gens *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) in Haut und Lymphknoten bestimmt.²⁰ Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 5$, p: Mann-Whitney-U-Test; Ko: Kontrolle.

4.1.2 Analyse der Entzündung in der Haut

Die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnitts 4.1.1 zeigen, dass die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im infektiösen Inokulum zur verstärkten Fußschwellung anfälliger BALB/c im Verlauf der Infektion führt. Aus diesem Grund sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob die durch apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum hervorgerufene, gesteigerte Fußschwellung auch mit einer Steigerung von Entzündungsmarkern der Haut einhergeht. Hierzu wurde die infizierte Haut der in Abschnitt 4.1.1 infizierten BALB/c sechs Wochen nach Infektion entnommen und hinsichtlich der mRNA-Expression von Zellmarkern und Chemokinen untersucht (siehe 3.3.2 und 3.3.3).

4.1.2.1 Apoptotische PS+ *L. major* verstärken die Akkumulation dendritischer Zellen und Neutrophiler

Um zu analysieren, ob apoptotische PS+ *L. major* auch die Akkumulation von dendritischen Zellen (CD11c) und den Wirtszellen der Parasiten, Makrophagen (Mac1) und Neutrophilen (Gr1), im Infektionsgebiet steigern, wurde die mRNA-Expression der jeweils zelltypischen Oberflächenmarker bestimmt. Zur Analyse von Neutrophilen mittels Gr1 wurde ein spezifisches Oligonukleotid gegen den Locus Ly-6G verwendet, um zu gewährleisten, dass ausschließlich Neutrophile (Ly-6G), nicht aber monozytäre Vorläuferzellen (Ly-6C) detektiert wurden.^{36,47,129} Nach Infektion mit lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS- < 1 mm) akkumulierten deutlich weniger dendritische Zellen (CD11c), aber auch weniger Neutrophile (Gr1) in der Haut als nach einer konventionellen Infektion (*Lm*) (Abb. 4-4). Das Hinzufügen apoptotischer PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion (*Lm* PS-/PS+) erhöhte die Akkumulation dendritischer Zellen und Neutrophiler wieder auf das Niveau der konventionellen Infektion (Abb. 4-4). Eine Steigerung der Akkumulation von Makrophagen wurde dagegen nicht beobachtet. Somit steigern apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum langfristig die Akkumulation dendritischer Zellen und Neutrophiler im Infektionsgebiet.

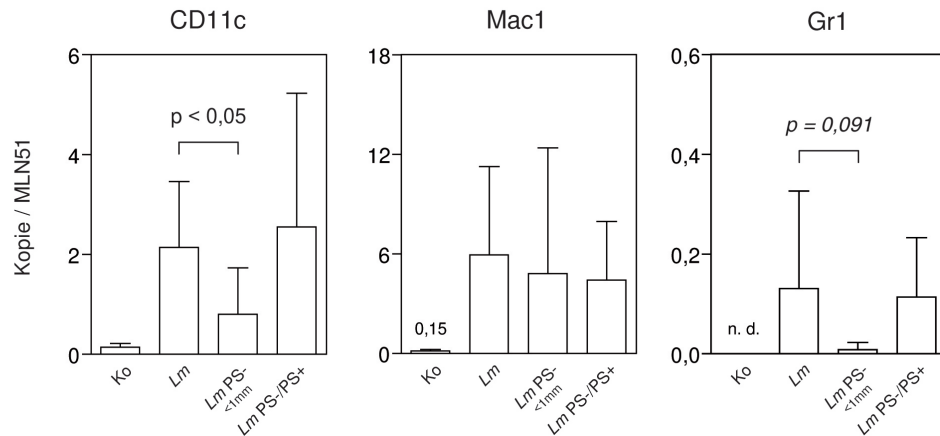


Abb. 4–4: Apoptotische PS+ *L. major* steigern die Akkumulation dendritischer Zellen und Neutrophiler in der Haut. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtinfectionsdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Die infizierte Haut wurde sechs Wochen nach Infektion entnommen und die mRNA-Expression der Zellmarker CD11c (dendritische Zellen), Mac1 (Makrophagen) und Gr1 (Neutrophile) mittels RT-PCR analysiert. Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 5$, p: Mann-Whitney-U-Test; Ko: Kontrolle, n. d.: nicht detektierbar.

4.1.2.2 Apoptotische PS+ *L. major* erhöhen die Expression der Chemokine KC und MIP1 α

Die Migration von Zellen in die Haut und damit auch die Ausprägung einer Entzündung wird über Chemokine gesteuert. Beispielsweise rekrutiert das inflammatorische Chemokin RANTES neben Monozyten und Makrophagen auch dendritische Zellen und T-Zellen.^{40,91,94} Monozyten und Makrophagen werden vor allem durch MIP1 α rekrutiert und aktiviert,^{34,40,91,99} Neutrophile durch KC.^{49,80,94,148} Deshalb sollte analysiert werden, ob apoptotische PS+ *L. major* neben der in Abschnitt 4.1.2.1 beschriebenen Zellakkumulation auch die Expression der inflammatorischen Chemokine Rantes, MIP1 α und KC verstärken. Fehlten apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum (*Lm* PS-), war die Expression der Chemokine KC und MIP1 α im Vergleich zur konventionellen Infektion (*Lm*) im Infektionsgebiet sechs Wochen nach Infektion leicht verringert (Abb. 4–5). Wie auch schon zuvor bewirkte die Zugabe apoptotischer PS+ Parasiten zum Inokulum (*Lm* PS-/PS+) einen Anstieg der Chemokinexpression auf das Niveau konventionell infizierter BALB/c. Die Expression von RANTES wurde unabhängig

von der Zusammensetzung des Inokulats nicht verändert (Abb. 4–5). Zusammen mit der Akkumulation von Entzündungszellen (siehe 4.1.2.1) zeigt die gesteigerte Expression inflammatorischer Chemokine, dass apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum in anfälligen BALB/c langfristig eine starke Entzündung des Infektionsgebietes induzieren.

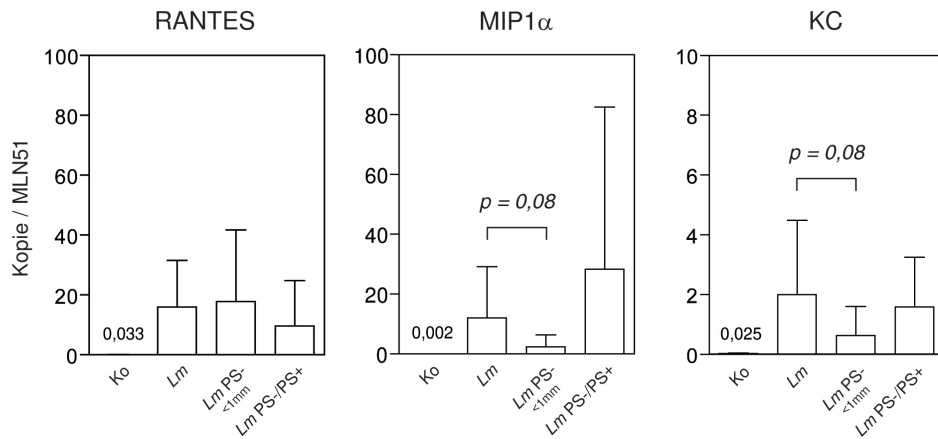


Abb. 4–5: Apoptotische PS+ *L. major* induzieren in der Haut eine leichte Erhöhung der inflammatorischen Chemokine KC und MIP1 α . Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtinfektionsdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Infizierte Haut wurde sechs Wochen nach Infektion entnommen und die Expression der Chemokine RANTES, MIP1 α und KC mittels RT-PCR analysiert. Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 5$, p: Mann-Whitney-U-Test; Ko: Kontrolle.

4.1.3 Analyse des Antikörpersystems

Fc γ -Rezeptoren werden auf allen Zellen des Immunsystems außer T- und NK-Zellen exprimiert.^{115,116} Dendritische Zellen nehmen IgG-opsonisierte Parasiten über Fc γ -Rezeptoren, insbesondere Fc γ RI und III auf.¹⁷³ Die Untersuchungen des vorhergehenden Abschnitts zeigen, dass apoptotische *L. major* die Akkumulation dendritischer Zellen in der Haut fördern (siehe 4.1.2.1). Aus diesem Grund sollte weitergehend untersucht werden, ob apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum die Expression der Fc γ RI und III in Analogie zur Akkumulation dendritischer Zellen in der Haut anfälliger BALB/c steigern. Die Wirkung der Fc γ -Rezeptoren wird durch Immunglobuline, die an sie binden, vermittelt. Deshalb wurden auch die IgG-Subtypen im Serum analysiert.

4.1.3.1 Apoptotische PS+ *L. major* erhöhen die Expression des IgG1-bindenden Fc γ RIII in der Haut

In Mäusen sind vier Fc γ R bekannt (Fc γ RI bis IV). Der inhibierende, niedrig affine Fc γ RII bindet alle IgG-Subtypen (IgG1, IgG2a, IgG2b). Die übrigen Fc γ -Rezeptoren sind aktivierende Rezeptoren und haben unterschiedliche Spezifitäten: Der hoch affine Fc γ RI bindet IgG2a, der niedrig affine Fc γ RIII bindet IgG1 und der intermediär affine Fc γ RIV bindet IgG2a und IgG2b.^{115,116} Die Haut der in Abschnitt 4.1.1 infizierten BALB/c wurde sechs Wochen nach Infektion hinsichtlich der mRNA-Expression der Fc γ RI bis IV untersucht (siehe 3.3.2 und 3.3.3). Fehlten apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum (*Lm* PS- < 1 mm) wurde der IgG1-bindende Fc γ RIII erwartungsgemäß signifikant geringer exprimiert (Abb. 4–6). Die Zugabe apoptotischer PS+ Parasiten zum Inokulum (*Lm* PS-/PS+) hob das Expressionsniveau von Fc γ RIII wieder auf das der konventionellen Infektion (*Lm*). Entgegen der Erwartung war keine Veränderung des IgG2a-bindenden Fc γ RI zu detektieren (Abb. 4–6). Auch die Expression der Fc γ -Rezeptoren II und IV wurde unabhängig von der Zusammensetzung des Inokulats nicht verändert.

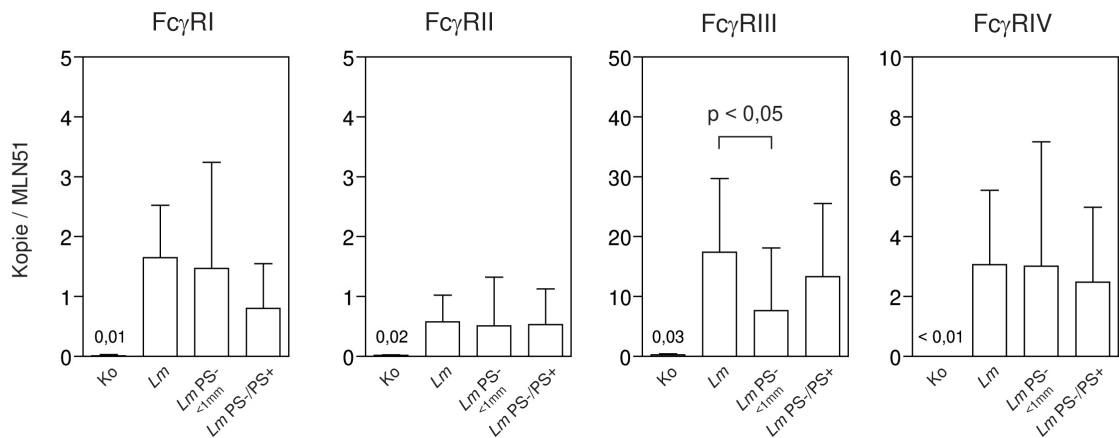


Abb. 4–6: PS+ *L. major* erhöhen die Expression des IgG1-bindenden Fc γ RIII in der Haut. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtinfektionsdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Infizierte Haut wurde sechs Wochen nach Infektion entnommen und die Expression der Fc γ R-mRNAs mittels RT-PCR bestimmt. Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 5$, p: Mann-Whitney-U-Test; Ko: Kontrolle.

4.1.3.2 Apoptotische PS+ *L. major* erhöhen IgG1 im Serum

Die Experimente in Abschnitt 4.1.3.1 konnten nicht eindeutig klären, ob apoptotische PS+ *L. major* die Wirkung von Fc γ RIII stärken, indem sie dessen Expression fördern oder ob die Akkumulation Fc γ RIII-exprimierender Zellen für den beobachteten Anstieg verantwortlich ist. Um die Wirkung von Fc γ -Rezeptoren zu beurteilen, ist die Analyse der Fc γ R-bindenden IgG-Subtypen essentiell. Immunglobuline, insbesondere das Fc γ RIII-bindende IgG1, sind mit dem progressiven Krankheitsverlauf einer Leishmaniose assoziiert.^{74,103,158} Um zu analysieren, ob apoptotische PS+ *L. major* Fc γ RIII-bindendes IgG1 erhöhen, wurde Serum sechs Wochen nach Infektion entnommen und der Gehalt der IgG-Subtypen IgG1, IgG2a und IgG2b mit Hilfe eines *L. major*-spezifischen ELISA detektiert (siehe 3.2.1). Wie erwartet war IgG1 im Serum verringert, wenn apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum fehlten (*Lm* PS-) (Abb. 4-7). Die Zugabe apoptotischer PS+ *L. major* erhöhte die IgG1-Spiegel wieder auf das Niveau der konventionellen Infektion (*Lm*). IgG2a und IgG2b wurden dagegen unabhängig vom Inokulum nicht verändert im Serum nachgewiesen (Abb. 4-7). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum die Wirkung von IgG1 sowohl durch eine erhöhte Fc γ RIII-Expression als auch eine verstärkte IgG1-Produktion erhöhen.

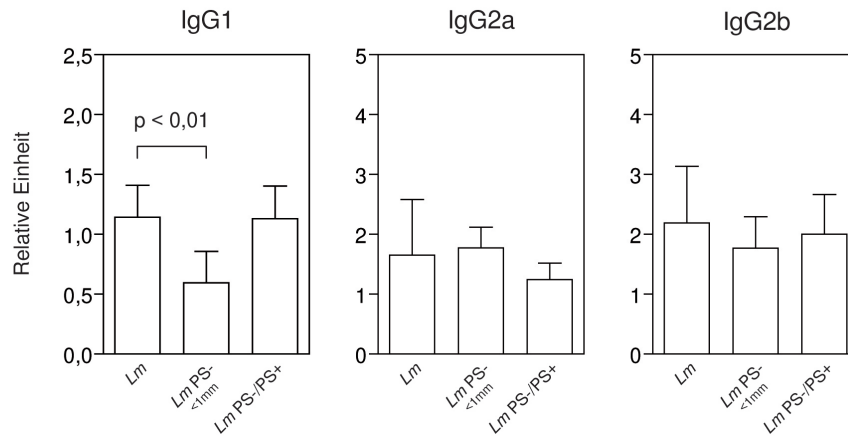


Abb. 4–7: PS+ *L. major* induzieren leishmanienspezifisches IgG1 im Serum. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtinfectionsdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Leishmanienspezifische Serum-IgG-Subtypen wurden sechs Wochen nach Infektion mittels ELISA ermittelt. Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 5$, p : Mann-Whitney-U-Test.

4.1.4 Analyse der Zytokinantwort in Haut und Lymphknoten

Im Rahmen der murinen experimentellen Leishmaniose gibt es Markerzytokine, die eng mit Erkrankung und Gesundung assoziiert sind. Hierzu gehören IL4 und IL10, die beide mit dem progressiven klinischen Verlauf in Verbindung gebracht werden, sowie das protektiv wirkende $\text{IFN}\gamma$.^{135,144} Zytokine beeinflussen weiterhin den Isotypwechsel von B-Zellen: Der Isotypwechsel zu IgG1 wird durch IL4 induziert, der zu IgG2a durch $\text{IFN}\gamma$.^{32,35,46} Da die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum zu einem verschlechterten klinischen Verlauf anfälliger BALB/c führte (siehe 4.1.1), der mit erhöhtem IgG1 im Serum einherging (siehe 4.1.3.2), sollte analysiert werden, ob auch die IL4- und IL10-Expression durch apoptotische PS+ *L. major* verstärkt wird.

4.1.4.1 Apoptotische PS+ *L. major* erhöhen die krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 in der Haut

Die Haut infizierter BALB/c wurde sechs Wochen nach Infektion hinsichtlich der mRNA-Expression der Zytokine IL4, IL10 und $\text{IFN}\gamma$ untersucht (siehe 3.3.2 und 3.3.3). Es sollte geklärt werden, ob apoptotische PS+ *L. major* die Expression krankheitsassoziierten IL4 und IL10 steigern oder die des protektiven $\text{IFN}\gamma$ verringern. Es

konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm*) zu einer Verringerung der Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 in der Haut führte (Abb. 4–8). Die Expression des protektiven IFN γ dagegen war unverändert. Wie zuvor stellte die Zugabe apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) die Zytokinniveaus der konventionellen Infektion (*Lm*) wieder her (Abb. 4–8).

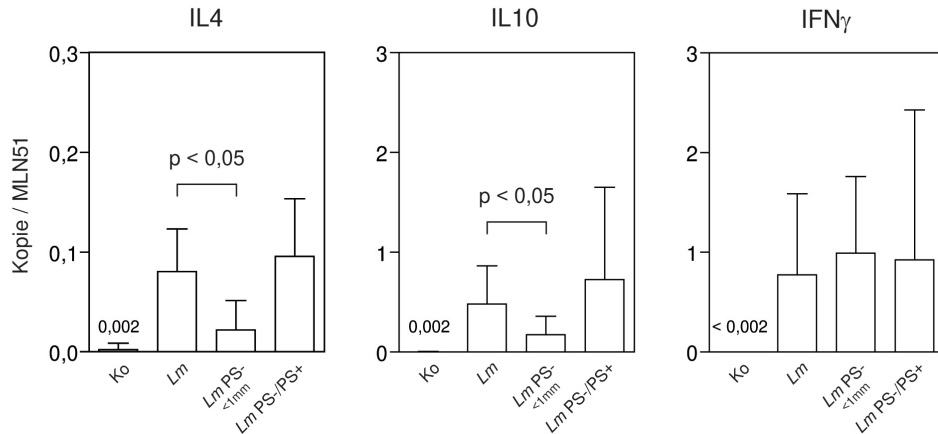


Abb. 4–8: Apoptotische PS+ *L. major* verstärken die Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 in der Haut. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Infizierte Haut wurde sechs Wochen nach Infektion entnommen und das Expressionsniveau von IL4, IL10 und IFN γ als Kopie pro Kopie des House-Keeping-Gens MLN51 mittels RT-PCR bestimmt. Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 5$, p: Mann-Whitney-U-Test; Ko: Kontrolle.

4.1.4.2 Apoptotische PS+ *L. major* induzieren IL10, hemmen aber IFN γ im Lymphknoten

Die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnitts 4.1.4.1 zeigen, dass apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum langfristig im Infektionsgebiet die Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 erhöhen. Die leishmanienspezifische Zytokinantwort wird aber im drainierenden Lymphknoten ausgebildet und erst von dort in die Haut übertragen. Deshalb wurden auch die drainierenden Lymphknoten der in Abschnitt 4.1.1 infizierten BALB/c hinsichtlich ihrer mRNA-Expression der Zytokine IL4, IL10 und IFN γ untersucht (siehe 3.3.2 und 3.3.3). Wie in der Haut beobachtet, war auch im drainierenden Lymphknoten die Expression des krankheitsassoziierten Zytokins

IL10 stark vermindert, wenn apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum fehlten (*Lm* PS- < 1 mm) (Abb. 4–9). Das Expressionsmuster des krankheitsassoziierten IL4 für die verschiedenen infektiösen Inokulate ähnelt demjenigen von IL10, es konnte aber keine signifikante Verringerung der IL4-Expression detektiert werden, wenn apoptotische PS+ *L. major* fehlten (*Lm* PS- < 1 mm). Im Gegensatz zur Haut wurde im Lymphknoten darüber hinaus die Expression des protektiven IFN γ deutlich erhöht (Abb. 4–9). Die Zugabe apoptotischer PS+ *L. major* zum Inokulum (*Lm* PS-/PS+) stellte die Zytokinexpression der konventionellen Infektion wieder her (*Lm*) (Abb. 4–9).

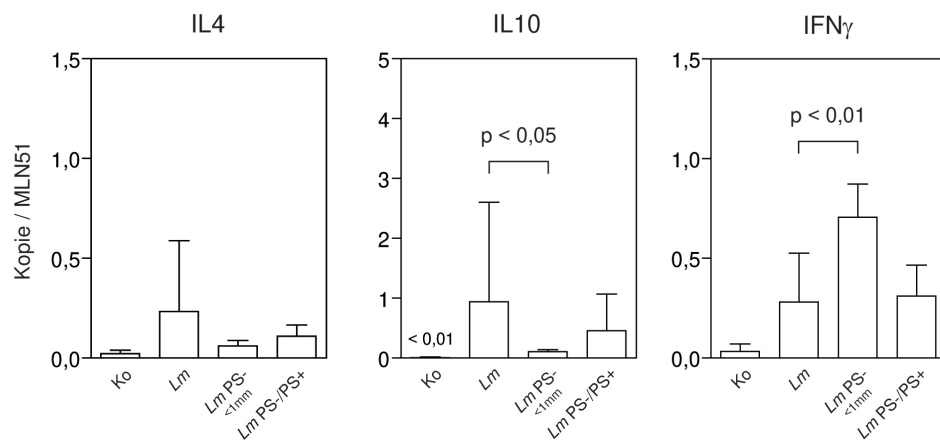


Abb. 4–9: Die Expression des krankheitsassoziierten Zytokins IL10 wird verstärkt durch PS+ *L. major*. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtinfektionsdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Lymphknoten wurden sechs Wochen nach Infektion entnommen und das Expressionsniveau von IL4, IL10 und IFN γ als Kopie pro Kopie des House-Keeping-Gens MLN51 mittels RT-PCR bestimmt. Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 5$, p: Mann-Whitney-U-Test; Ko: Kontrolle.

4.2 Einfluss apoptotischer PS+ *L. major* auf die frühe Immunantwort anfälliger BALB/c Mäuse

Wie die Experimente des vorhergehenden Abschnitts 4.1.4 zeigen, fördert die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum die Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10, hemmt aber die Expression des protektiven Zytokins IFN γ

sechs Wochen nach Infektion im Lymphknoten. Gleichzeitig verschlechtern apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum die klinische Ausprägung einer *L. major*-Infektion.

Promastigote apoptotische PS+ *L. major* liegen nur zu Beginn der Infektion vor. Es ist gezeigt, dass sie kurz nach Infektion die Effektorzellen der angeborenen Immunantwort, ihre Wirtszellen, hemmen und sich dadurch verstärkt vermehren. Es ist nicht bekannt, ob sich die Parasiten dadurch bereits kurz nach Infektion vermehrt in den drainierenden Lymphknoten verteilen und welchen Einfluss apoptotische PS+ *L. major* auf die erworbene Effektorantwort kurz nach Infektion ausüben. So könnten apoptotische PS+ *L. major* im Lymphknoten die T-Zellproliferation verstärken oder die Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 bereits direkt nach der Infektion fördern. Da die T-zellspezifische Zytokinantwort maßgeblich über den klinischen Verlauf entscheidet,^{55,117} wurden anfällige BALB/c mit verschiedenen *L. major* Inokulaten infiziert (*Lm*, *Lm* PS-, *Lm* PS-/PS+) und die drainierenden Lymphknoten drei Tage nach Infektion untersucht. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhergesagt werden kann, welche BALB/c nach Infektion lebender PS- *L. major* klinisch unauffällig bleiben, sind alle Daten dieser Infektion in der Gruppe *Lm* PS- zusammengefasst.

4.2.1 Analyse der frühen T-Zellantwort

4.2.1.1 Das Ausmaß der T-Zellproliferation hängt nicht von der Zusammensetzung des Inokulates ab

Bisherige Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass T-Zellen drei Tage nach Infektion mit *L. major* zum ersten Mal stark im drainierenden Lymphknoten proliferieren.¹¹⁴ Um zu untersuchen, ob apoptotische PS+ *L. major* die initiale T-Zellproliferation im Lymphknoten nach Infektion verstärken, wurde die T-Zellproliferation im T-Zellareal des Lymphknotens drei Tage nach Infektion anfälliger BALB/c und resistenter C57BL/6 mit verschiedenen *L. major* Inokulaten untersucht. Drei Tage nach Infektion waren T-Zellen im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens aktiviert und proliferierten (Abb. 4-10 A und B). Im Vergleich zu konventionell infizierten BALB/c (*Lm*) zeigte die Verringerung apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum (*Lm* PS-)

keinen Einfluss auf das Ausmaß der T-Zellproliferation, die Infektion von BALB/c mit der Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ Parasiten (*Lm* PS-/PS+) einen nicht signifikanten Anstieg der T-Zellproliferation (Abb. 4–10 B). Zusammengefasst hängt die Stärke der T-Zellproliferation nicht vom Anteil apoptotischer PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion ab und ist demnach vermutlich nicht die Ursache des progressiven klinischen Krankheitsverlaufs, der in Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* zu beobachten ist.

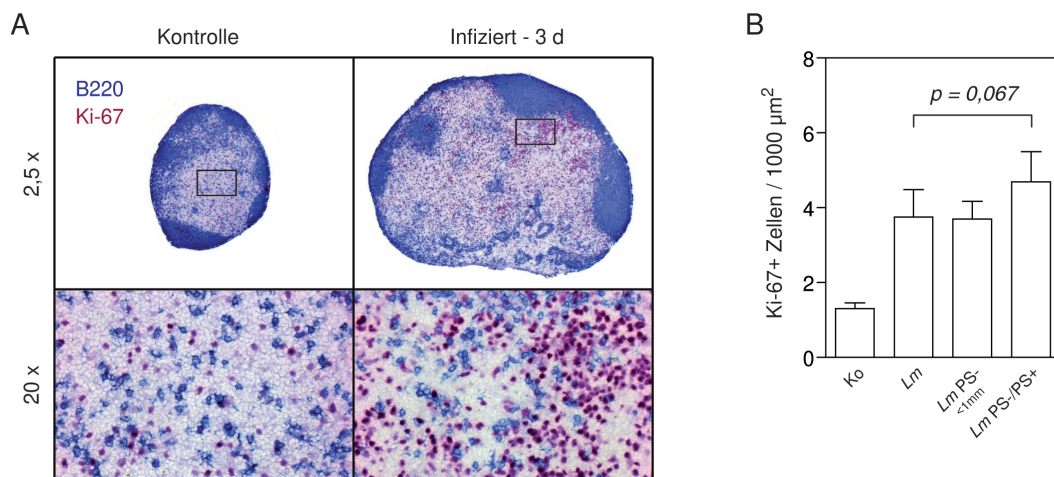


Abb. 4–10: Ki-67+ T-Zellen proliferieren im T-Zellareal nach 3 Tagen unabhängig von der Zusammensetzung des Inokulums. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtinfektionsdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Lymphknoten wurden 3 Tage nach Infektion entnommen und mit B220 und Ki-67 gefärbt. A: Exemplarisch sind typische Färbungen dargestellt. B: Die Zahl proliferierender T-Zellen wurde im T-Zellareal in einer Fläche von $1000 \mu\text{m}^2$ quantifiziert; Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 4$, p: Mann-Whitney-U-Test.

4.2.1.2 Die Zytokinantwort zur Zeit der primären T-Zellaktivierung ist noch nicht festgelegt

Bisher konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der T-Zellaktivierung im Lymphknoten nicht von der Zusammensetzung des Inokulates beeinflusst ist. Verstärken apoptotische PS+ *L. major* die Produktion der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 im T-Zellareal des Lymphknotens drei Tage nach Infektion und legen damit die spätere Zytokinantwort fest? Um diese Frage zu beantworten, wurde das T-Zellareal drei

Tage nach Infektion mit Hilfe der Lasermikrodissektion isoliert und die Expression der Zytokine IL4, IL10 und IFN γ analysiert. Durch Lasermikrodissektion können Kompartimente präzise voneinander getrennt werden, ohne die Mikroarchitektur des Lymphknotens zu zerstören. Die anschließende Real-Time PCR ermöglicht es, die mRNA-Expression sensitiv kompartimentspezifisch *ex vivo* zu quantifizieren. Abbildung 4-11 zeigt anhand des T-Zellmarkers CD3 ϵ und des B-Zellmarkers CD19, dass diese Methode geeignet ist, um die T-Zellzone sauber von der B-Zellzone zu trennen. Der T-Zellmarker CD3 ϵ wurde vorwiegend im T-Zellareal, der B-Zellmarker CD19 im B-Zellareal detektiert.

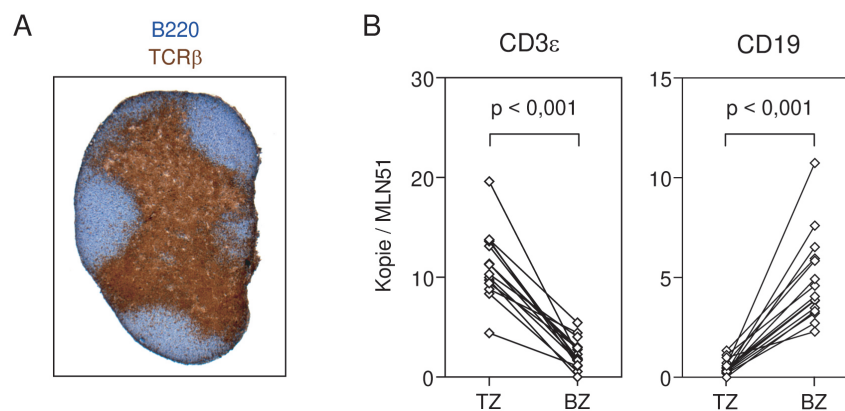


Abb. 4-11: Lasermikrodissektion ermöglicht die saubere Trennung von T- und B-Zellzone. A: Exemplarische Morphologie eines infizierten pLK 3d nach Infektion mit *L. major*; TCR β : T-Zellen, B220: B-Zellen. B: Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Die Lymphknoten wurden drei Tage nach Infektion entnommen, die T- und B-Zellzone mittels Lasermikrodissektion isoliert und jeweils der T-Zellmarker CD3 ϵ und der B-Zellmarker CD19 mittels RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, die Werte eines Tieres sind miteinander verbunden; $n \geq 15$. TZ: T-Zellzone, BZ: B-Zellzone; p: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Drei Tage nach Infektion war in der anfälligen BALB/c für alle Inokulate die Expression von IL4-, IL10- und IFN γ -mRNA detektierbar (Abb. 4-12). Zwischen konventionell infizierten BALB/c (*Lm*) und denen nach Infektion lebender PS- *L. major* (*Lm* PS-) gab es keine Unterschiede in der Expression von IL4, IL10 und IFN γ (Abb. 4-12). Dies steht im Gegensatz zur IL4- und IL10-Expression in klinisch unauffälligen BALB/c sechs Wochen nach Infektion mit lebenden PS- *L. major* (vgl. *Lm* PS-

< 1 mm, Abb. 4–9). Auch die Zytokinexpression nach Infektion von BALB/c mit der Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ Parasiten (*Lm* PS-/PS+) war gleich (Abb. 4–12). Insgesamt korrelierte das Zytokinexpressionsmuster anfälliger BALB/c drei Tage nach Infektion nicht mit demjenigen nach sechs Wochen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass apoptotische PS+ *L. major* die Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 nicht bereits drei Tage nach Infektion von BALB/c Mäusen festlegen.

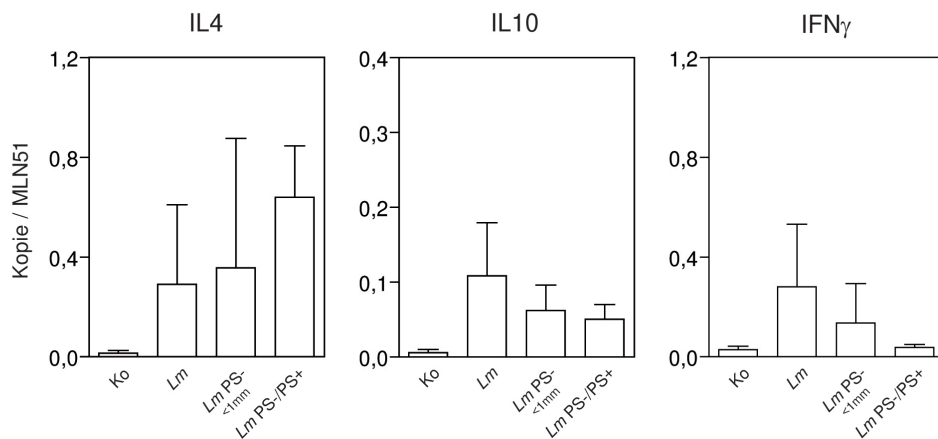


Abb. 4–12: Die Zytokinexpression in der T-Zellzone ist drei Tage nach Infektion noch nicht festgelegt. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtinfektionsdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Lymphknoten wurden drei Tage nach Infektion entnommen, die T-Zellzone mittels Laser-mikrodissektion isoliert und IL4-, IL10- und IFN γ -mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen. Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 4$, p: Mann-Whitney-U-Test. TZ: T-Zellzone, BZ: B-Zellzone.

4.2.2 Analyse der Lokalisation von *L. major* im Lymphknoten

Wie bereits die Ergebnisse in Abschnitt 4.1 zeigen, wird durch die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum langfristig die Produktion krankheitsassoziierten IgG1 in anfälligen BALB/c verstärkt, das heißt die B-Zellantwort wird gefördert. Die Experimente des vorherigen Abschnitts 4.2.1 zeigen, dass die T-Zellantwort drei Tage nach Infektion noch nicht festgelegt ist. Dies lässt den Schluss zu, dass apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum möglicherweise nicht die T-Zellantwort, sondern die B-Zellantwort frühzeitig nach Infektion beeinflussen. Der Prozess der B-Zellaktivierung

umfasst mehrere Schritte, ein wesentlicher besteht in der Kreuzvernetzung membranständiger B-Zellrezeptoren durch natives Antigen. So könnten freie *L. major*, die frühzeitig nach Infektion in die B-Zellzone gelangen, B-Zellen aktivieren und damit die Entwicklung der B-Zellantwort fördern. Es ist denkbar, dass apoptotische PS+ *L. major* die B-Zellantwort im Lymphknoten früh nach Infektion beeinflussen, indem sie die Lokalisation der Parasiten im B-Zellareal fördern. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die Leishmanienlast durch Analyse der Kp-DNA in T- und B-Zellzone drei Tage nach Infektion untersucht.

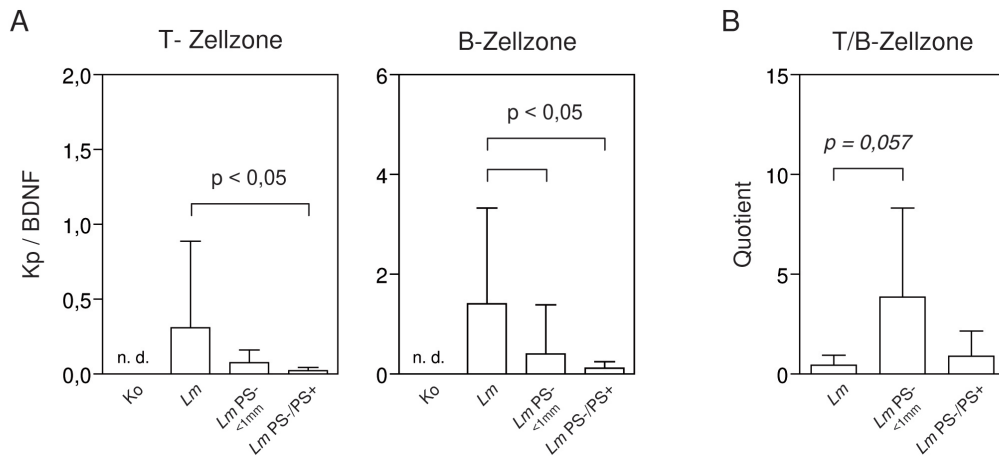


Abb. 4–13: Apoptotische PS+ *L. major* verschieben die relative Leishmanienlokalisation in anfälligen BALB/c nach drei Tagen zugunsten der B-Zellzone. Anfällige BALB/c wurden mit *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*), lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Die Gesamtdosis betrug $10^6/50 \mu\text{l}$. Die Lymphknoten wurden drei Tage nach Infektion entnommen, die T- und B-Zellzone mittels Lasermikrodissektion isoliert und Kp-DNA mittels RT-PCR nachgewiesen. A: Absolute Leishmanienlokalisation in T- und B-Zellzone. B: Relative Leishmanienlokalisation als Verhältnis von T- zu B-Zellzone. Mittelwert + Standardabweichung, $n \geq 6$, p: Mann-Whitney-U-Test. TZ: T-Zellzone, BZ: B-Zellzone.

Unabhängig von der Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulat war Kp-DNA von *L. major* drei Tage nach Infektion sowohl im T- als auch im B-Zellareal detektierbar (Abb. 4–13 A). Anfällige BALB/c, die mit lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) infiziert wurden, wiesen in der T- und B-Zellzone eine geringere Leishmanienlast als konventionell infizierte Tiere (*Lm*) auf. Die geringste Leishmanienlast wurde sowohl in T- als auch B-Zellzone nach Infektion mit einer Mischung lebender PS- und

apoptotischer PS+ Parasiten (*Lm* PS-/PS+) detektiert (Abb. 4-13 A). Durch die Analyse der absoluten Kp-DNA-Werte kann demnach nicht beurteilt werden, ob die Lokalisation von Kp-DNA im Lymphknoten durch apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum zu Gunsten der B-Zellzone verschoben wird. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Leishmanienlast der T-Zellzone ins Verhältnis zur Leishmanienlast der B-Zellzone gesetzt. Auf diese Weise wird deutlich, dass in anfälligen BALB/c im Verhältnis mehr Kp-DNA in der B- als in der T-Zellzone lokalisierten, wenn apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum vorhanden waren (*Lm* und *Lm* PS-/PS+, Abb. 4-13 B). Fehlten dagegen apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum (*Lm* PS-), verschob sich die Lokalisation der Kp-DNA zu Gunsten der T-Zellzone. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die detektierte Kp-DNA von zerstörten *L. major* abstammt, wurde durch Ultraschall Lysat aus $2 \cdot 10^6$ *L. major* hergestellt und anfälligen BALB/c Mäuse subkutan in die Fußsohle injiziert. Das Antigen zerstörter *L. major* war nur 8 h nach Infektion deutlich nachweisbar (Abb. 4-14). Danach wurde die Kp-DNA schnell beseitigt und war bereits drei Tage nach Infektion im Lymphknoten kaum noch nachweisbar. Die Kp-DNA, die in den bisher gezeigten Infektionsexperimenten nach drei Tagen detektiert wurde, stammt demnach zum Großteil nicht von zerstörten Zellen. Zusammenfassend zeigen die Daten dieses Abschnittes, dass apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum die bevorzugte Lokalisation der Parasiten im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens fördern.

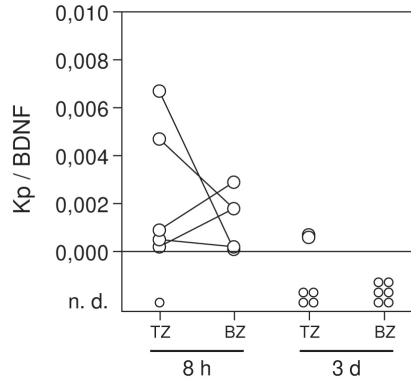


Abb. 4–14: Leishmanientrümmen werden im pLK schnell beseitigt. Antigen von zerstörten *L. major* ist im pLK bereits drei Tage nach Infektion kaum noch nachweisbar. Lysat wurde aus $2 \cdot 10^6$ *L. major* durch Ultraschall hergestellt und BALB/c Mäusen injiziert. pLK wurden acht Stunden und drei Tage nach Infektion entnommen, die T- und B-Zellzone mittels Lasermikrodissektion isoliert und Kp-DNA mittels RT-PCR nachgewiesen. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, die Werte eines Tieres sind miteinander verbunden. n. d.: nicht detektiert, TZ: T-Zellzone, BZ: B-Zellzone, h: Stunden, d: Tage.

4.3 Einflüsse auf die Erkrankungsrate anfälliger BALB/c

Wie die Experimente in Abschnitt 4.1 zeigen, führte die Reduktion apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum nicht in 100% der Fälle zu einem unauffälligen klinischen Verlauf der Infektion. Über die Apoptose von *L. major* und deren genaue Auswirkung auf den Verlauf der Infektion ist noch wenig bekannt (siehe 1.3, 1.3.2 und persönliche Mitteilung von G. van Zandbergen). Deshalb wurde in Experimenten des folgenden Abschnitts zunächst die Gesamtinfektionsdosis von *L. major in vivo* in anfälligen BALB/c reduziert und die Effekte auf die Fußschwellung dokumentiert (siehe 4.3.1). Weiterhin wurden weiterführende FACS-Analysen von promastigoten *L. major* vor (*Lm*) und nach Aufreinigung lebender PS- Parasiten (*Lm* PS-) durchgeführt (siehe 4.3.2).

4.3.1 Die Reduktion der Gesamtinfektionsdosis hat keinen Einfluss auf die Erkrankungsquote nach Infektion mit lebenden PS- *L. major*

Das Inokulat von 10^6 lebenden PS- *L. major* enthält maximal 10% apoptotische Zellen. Dies sind noch 10^5 Parasiten. Möglicherweise reicht diese absolute Menge aus, die

Erkrankung auszulösen. Die Reduktion der Gesamtinfektionsdosis könnte durch die Verringerung der absoluten Menge apoptotischer PS+ *L. major* eine Verbesserung der Quote klinisch unauffälliger Infektionsverläufe bewirken. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden lebende PS- und apoptotische PS+ *L. major* mittels magnetischer Zellseparation getrennt (siehe 3.2.2 und Abb. 4-15 A, C). Anfällige BALB/c Mäuse wurden anschließend entweder mit lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder mit einer Mischung aus lebenden PS- und apoptotischen PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Pro Gruppe wurde drei anfälligen BALB/c Mäusen subkutan entweder eine hohe Dosis von 10^6 oder eine niedrige Dosis von 10^5 *L. major* in die hintere Fußsohle injiziert. Anschließend wurde der klinische Verlauf durch Messung der Fußschwellung dokumentiert.

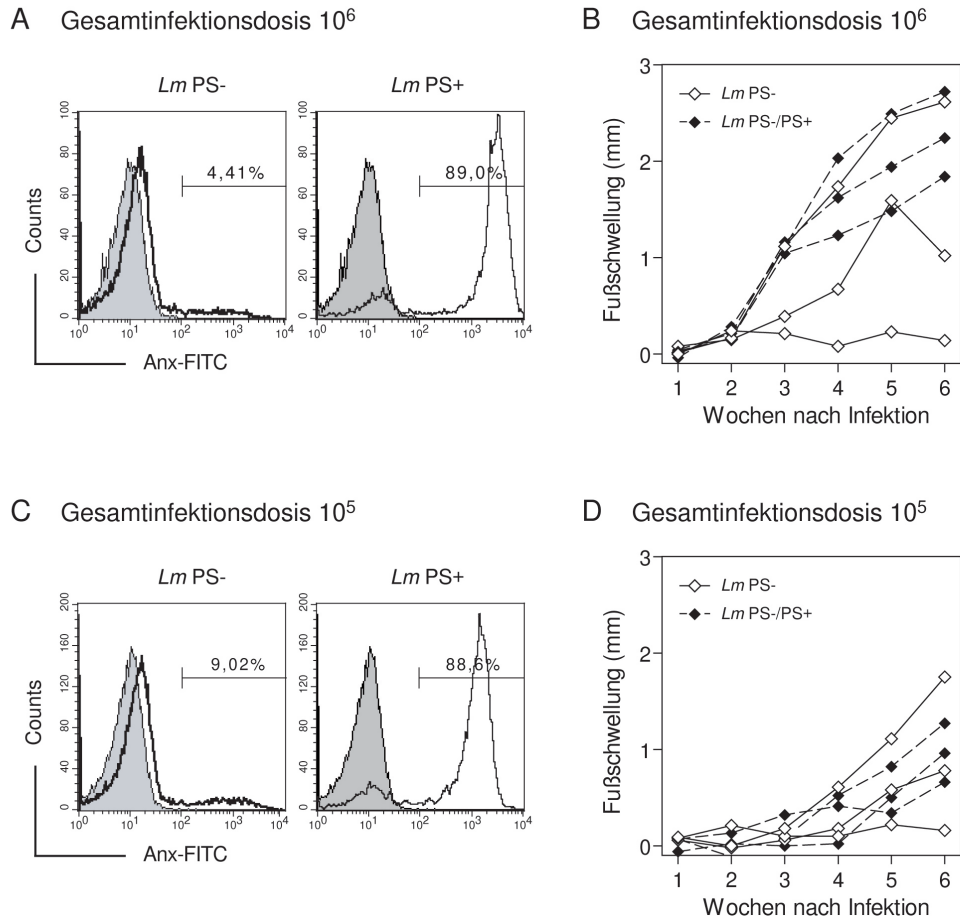


Abb. 4–15: Die Reduktion der Gesamtinfectionsdosis hat keinen Einfluss auf die Erkrankungsquote nach Infektion mit lebenden PS- *L. major*. A, C: Lebende PS- und apoptotische PS+ *L. major* wurden über ein Annexin-V-MACS aus promastigoten *L. major* der stationären Phase aufgereinigt; grau: nicht gefärbt, schwarz: Annexin V gefärbt. B, D: BALB/c wurden entweder mit einer hohen Dosis von 10^6 (B) oder einer niedrigen Dosis von 10^5 (D) lebenden PS- *L. major* (*Lm PS-*) oder einer 1:1 Mischung aus lebenden PS- und apoptotischen PS+ Parasiten (*Lm PS-/PS+*) infiziert und die Fußschwellung wöchentlich gemessen (in mm). Dargestellt sind die Einzelwerte pro Tier, n = 3.

Fehlten apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum (*Lm PS-*), blieb sowohl nach Hochdosis- als auch nach Niedrigdosisinfektion nur eine von drei BALB/c symptomfrei (Abb. 4–15 B, D). Somit führt die Reduktion der Gesamtinfectionsdosis nicht zu einer Verbesserung der Quote klinisch unauffälliger Infektionsverläufe in anfälligen BALB/c. Der relative Anteil apoptotischer PS+ *L. major* von maximal 10% reicht auch bei Niedrigdosis aus, in einigen BALB/c einen vollen Krankheitsverlauf zu induzieren. Die Anwesenheit apoptotischer PS+ Parasiten im Inokulum führte dagegen sowohl

bei Hochdosis- als auch bei Niedrigdosisinfektion in allen Fällen zum vollständigen Krankheitsverlauf (Abb. 4–15 B, D). Eine Steigerung des Anteils apoptotischer PS+ *L. major* über 50% hinaus konnte keine weitere Verschlechterung des klinischen Verlaufs einer *L. major*-Infektion anfälliger BALB/c bewirken (siehe Anhang Abb. A–2).

4.3.2 FACS-Analysen von *L. major*

Bisher wurde in dieser Arbeit der Einfluss apoptotischer PS+ *L. major in vivo* untersucht. Es ist allerdings weiterhin unklar, warum nicht alle BALB/c einen klinisch unauffälligen Infektionsverlauf aufweisen, wenn apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum fehlen. Möglicherweise verändern sich aufgereinigte, lebende PS- *L. major* bereits während der Infektion *in vivo* schnell. Beispielsweise könnte die Körpertemperatur der Versuchsmäuse zu einer verstärkten Apoptose der injizierten, lebenden Parasiten führen und damit die Entwicklung eines progressiven Krankheitsverlaufes in einigen BALB/c Mäusen begünstigen. Um diese Frage zu klären, wurden promastigote *L. major* der stationären Phase vor (*Lm*) und lebende PS- *L. major* nach MACS-Aufreinigung (*Lm* PS-) *in vitro* mittels FACS-Analyse untersucht (siehe 3.2.3).

4.3.2.1 Beschreibung einer neuen PS- *L. major*-Population

Apoptotische *L. major* unterscheiden sich von lebenden *L. major* nicht nur hinsichtlich ihrer PS-Expression, sondern auch hinsichtlich ihrer Größe. Im Gegensatz zu den länglichen lebenden *L. major* sind apoptotische *L. major* klein und rundlich. Dies ermöglicht es, die beiden *L. major*-Populationen einer promastigoten *L. major*-Kultur (*Lm*) anhand des Vorwärtsstreulichtes (FSC) in der FACS-Analyse voneinander zu unterscheiden (Abb. 4–16 A, links). Die apoptotische FSC^{niedrig} Population liegt im FSC-SSC-Konturdiagramm links von derjenigen der lebenden FSC^{hoch} Population und ist deutlich von ihr getrennt. Durch ein Annexin-V-MACS können apoptotische PS-exprimierende *L. major* depletiert werden. Die daraus resultierende Präparation lebender PS- *L. major* (*Lm* PS-) weist im FSC-SSC-Konturdiagramm kaum noch apoptotische FSC^{niedrig} Parasiten auf (Abb. 4–16 A, rechts). Der Erfolg einer Aufreinigung wird über den Nachweis der PS-Expression mittels FACS verifiziert. *L. major* vor Aufreinigung (*Lm*) enthalten 52,28% apoptotische PS+ Parasiten, *L. major* nach

Aufreinigung (*Lm* PS-) nur noch 4,41% (Abb. 4-16 B). Bisher wurde demnach der Erfolg einer Aufreinigung durch die getrennte Analyse der PS-Expression und der Größe der *L. major*-Populationen bewertet. Nicht berücksichtigt wurde dagegen die kombinierte Auswertung beider Parameter. Deshalb wurden die in Abbildung 4-16 A und B gezeigten promastigoten *L. major* der stationären Phase vor (*Lm*) und nach MACS-Aufreinigung (*Lm* PS-) hinsichtlich ihres PS-Gehaltes und der Größe der Zellen (FSC) kombiniert analysiert.

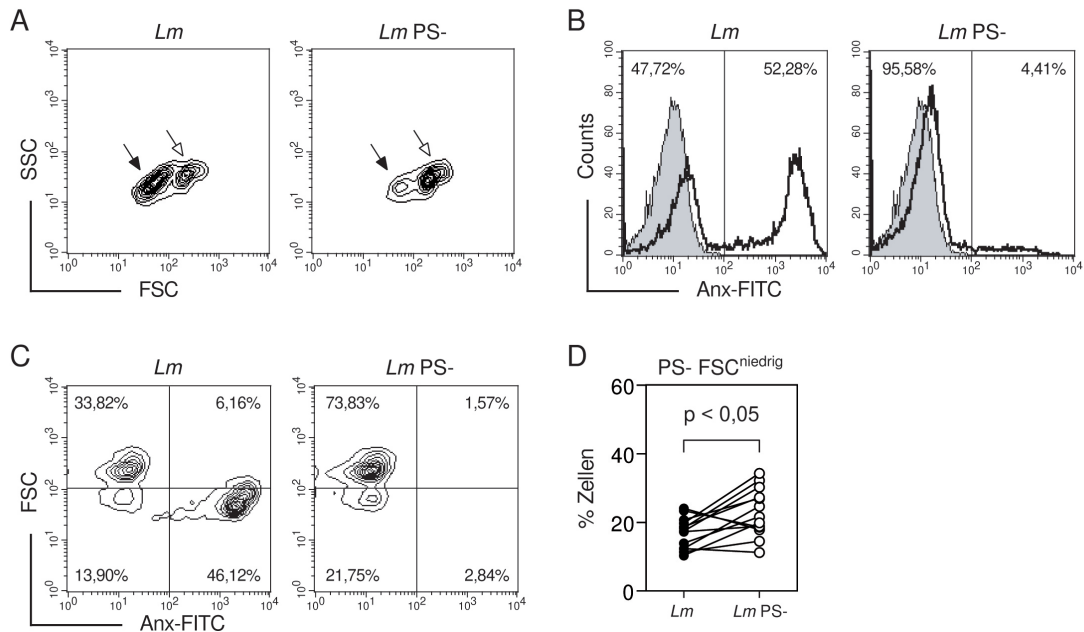


Abb. 4-16: PS- *L. major* unterteilen sich in eine FSC^{hoch} und eine FSC^{niedrig} Population. Promastigote *L. major* der stationären Phase wurden direkt aus der Kultur (*Lm*) oder nach MACS-Aufreinigung (*Lm* PS-) mittels FACS analysiert. A: Exemplarische Konturdiagramme; Größe (FSC) gegen Granularität (SSC). 10% der Ereignisse (*linear density*) sind gezeigt. Schwarzer Pfeil: apoptotisch, weißer Pfeil: lebend. B: Exemplarische Histogramme der PS-Expression der in A markierten *L. major*-Populationen. C: Exemplarische Konturdiagramme Größe (FSC) gegen PS-Expression (Anx-FITC) der in A markierten *L. major*-Populationen. D: Prozentualer Anteil der morphologisch veränderten PS- FSC^{niedrig} Population mehrerer *L. major*-Chargen vor (*Lm*) und nach Aufreinigung (*Lm* PS-). Die Werte einer *L. major*-Charge vor und nach Aufreinigung sind miteinander verbunden, n = 13; p: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Interessanterweise ließen sich auf diese Weise sowohl vor als auch nach Aufreinigung nicht nur die zwei Populationen lebender PS- FSC^{hoch} und apoptotischer PS+ FSC^{niedrig} *L. major* detektieren, sondern außerdem noch eine zusätzliche PS- FSC^{niedrig} Population (Abb. 4-16 C). Wie lebende *L. major* exprimierte auch diese Population kein PS,

wies aber dagegen nicht die Größe lebender, sondern die apoptotischer *L. major* auf (Abb. 4-16 C). Die Quantifizierung mehrerer Leishmanienpräparationen zeigte, dass diese PS- FSC^{niedrig} Population nach Aufreinigung (*Lm* PS-) zunahm (Abb. 4-16 D). Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die PS- Population lebender *L. major*, so wie sie bisher definiert wurde, nicht nur lebende Parasiten sondern auch morphologisch veränderte *L. major* umfasst.

4.3.2.2 Ein Teil der PS- FSC^{niedrig} *L. major*-Population tritt bei Körpertemperatur in Apoptose

Die FACS-Analysen von *L. major* wurden an eisgekühlten Parasiten vorgenommen, weil sich der Anteil apoptotischer Zellen so nur minimal ändert und sich der gemessene Anteil apoptotischer *L. major* auch für die Infektion garantieren lässt. Während der Infektion sind *L. major* aber einem Temperaturschock in der Maus ausgesetzt, der neben dem pH-Wert als Reiz für die Umwandlung in die amastigote Form dient.¹⁷⁶ Dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass durch diesen Temperaturreiz auch vermehrt *L. major* in die Apoptose eintreten. Aus diesem Grund wurde die Temperatursensitivität der verwendeten aufgereinigten *L. major* bezüglich der Apoptose untersucht. Zu diesem Zweck wurden promastigote *L. major* nach MACS-Aufreinigung (*Lm* PS-) dahingehend untersucht, wie sich die in Abschnitt 4.3.2.1 beschriebenen Populationen auf Eis oder bei Körpertemperatur (37°C) verhalten. Unter Einfluss von Kälte veränderte sich die Größe der einzelnen *L. major*-Populationen nur unwesentlich. Der prozentuale Anteil lebender PS- FSC^{hoch} *L. major* (Quadrant 1), morphologisch veränderter PS- FSC^{niedrig} *L. major* (Quadrant 2) und apoptotischer PS+ FSC^{niedrig} *L. major* (Quadrant 3) war nach 30 Minuten auf Eis vergleichbar groß wie direkt nach Aufreinigung (Kreis, Abb. 4-17 A, B). Körpertemperatur dagegen führte dazu, dass sich die prozentuale Zusammensetzung der einzelnen Parasitenpopulationen änderte. Bei Körpertemperatur traten vermehrt *L. major* in Apoptose (PS+ FSC^{niedrig}, Quadrant 3) (Dreieck, Abb. 4-17 A, B). Dieser Anstieg apoptotischer Parasiten wurde nicht durch eine Abnahme lebender PS- FSC^{hoch} *L. major* (Quadrant 1) hervorgerufen (Dreieck, Abb. 4-17 A, B). Ganz im Gegenteil nahm die Population lebender PS- FSC^{hoch} *L. major* bei Körpertemperatur sogar zu. Somit treten lebende PS- FSC^{hoch}

Parasiten bei Körpertemperatur nicht vermehrt in Apoptose. Interessanterweise nahm bei Körpertemperatur die morphologisch veränderte PS- Parasitenpopulation (PS- $FSC^{niedrig}$, Quadrant 2) stark ab (Dreieck, Abb. 4–17 A, B). Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Population morphologisch veränderter, PS- $FSC^{niedrig}$ *L. major*, nicht aber die lebender PS- FSC^{hoch} Parasiten, ist vermutlich dafür verantwortlich, dass der Anteil apoptotischer PS+ $FSC^{niedrig}$ *L. major* bei Körpertemperatur ansteigt. Sie könnte demnach dafür verantwortlich sein, dass der Gehalt apoptotischer Zellen nach Infektion unkontrolliert ansteigt und der Erfolg der Infektion mit *Lm* PS- nicht mehr planbar ist.

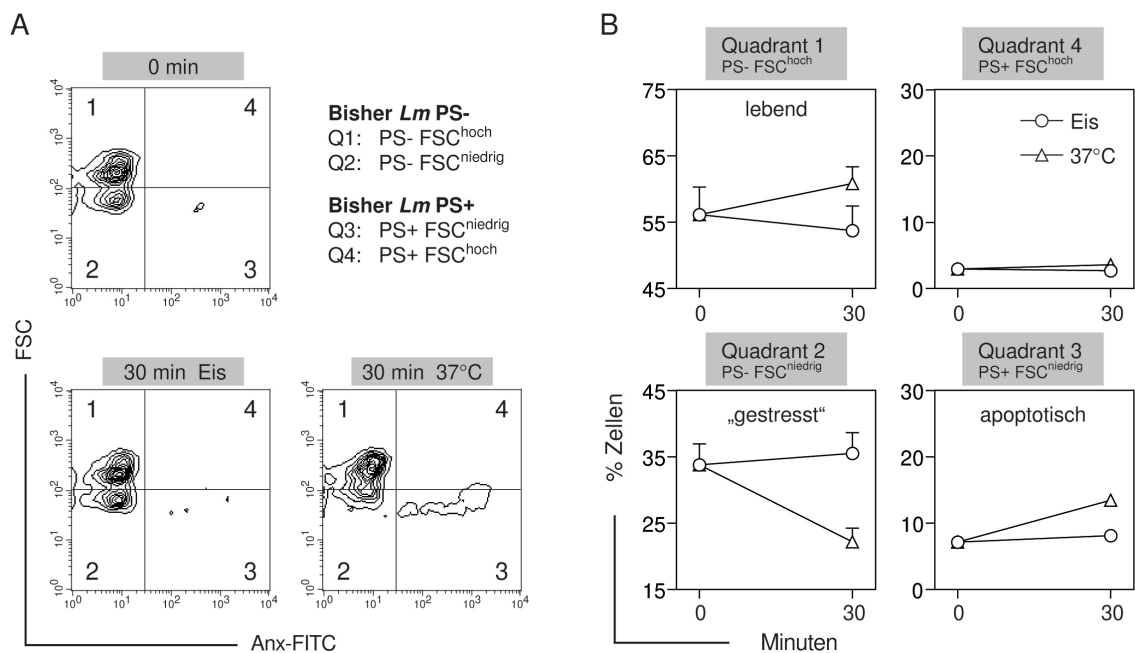


Abb. 4–17: Ein Teil der gestressten PS- $FSC^{niedrig}$ *L. major*-Population tritt bei Körpertemperatur in Apoptose. Lebende PS- *L. major* (*Lm* PS-) wurden über ein Annexin-V-MACS aus promastigoten *L. major* der stationären Phase aufgereinigt, für 30 min auf Eis oder bei 37°C inkubiert und mittels FACS analysiert. A: Exemplarische Konturdiagramme für 0 min nach Aufreinigung, sowie 30 min nach Aufreinigung auf Eis und bei 37°C ; PS-Expression (Anx-FITC) gegen Größe (FSC). 10% der Ereignisse (*linear density*) sind gezeigt. B: Prozentuale Anteile der nach PS-Expression und Größe analysierten Populationen einer aufgereinigten PS- *L. major*-Präparation (*Lm* PS-). % Zellen gegen Inkubationszeit (min), Mittelwert + Standardfehler, n = 3. Die Graphen sind in der Reihenfolge der Quadranten im Konturdiagramm angeordnet (siehe A).

4.4 Anfälligkeit resistenter C57BL/6

Die Daten aus Abschnitt 4.1 zeigen, dass die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum sowohl die krankheitsassoziierte Entzündung und Fußschwellung als auch die krankheitsassoziierte adaptive Immunantwort in der infizierten Haut anfälliger BALB/c fördert (Abb. 4-2 bis 4-8). Resistente C57BL/6 dagegen reagieren auf eine *L. major*-Infektion grundsätzlich nur mit einer leichten Fußschwellung und können die Infektion letztendlich kontrollieren. Es stellt sich die Frage, ob die Depletion apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum dazu führt, dass sich selbst diese geringe Fußschwellung nicht ausbildet. Deshalb sollten weiterführende Experimente die Anfälligkeit resistenter C57BL/6 gegenüber apoptotischen PS+ *L. major* untersuchen.

4.4.1 Apoptotische PS+ *L. major* verstärken nicht die Entzündung und adaptive Immunantwort in der Haut resistenter C57BL/6

Lebende PS- und apoptotische PS+ *L. major* wurden mittels magnetischer Zellseparation getrennt (siehe 3.2.2) und anschließend resistente C57BL/6 mit einer Gesamtinfektionsdosis von 10^6 lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung aus aufgereinigten lebenden PS- und apoptotischen PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert (siehe 3.1.3). Durch die Depletion apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum (*Lm* PS-) konnte der klinische Verlauf und die Entzündung nach einer *L. major*-Infektion resistenter C57BL/6 nicht weiter verbessert werden (Abb. 4-18). Fußschwellung, Leishmanienlast, Akkumulation von Entzündungszellen sowie Chemokinexpression der infizierten Haut unterschieden sich nicht zwischen der Infektion mit lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) und der Mischung aus lebenden PS- und apoptotischen PS+ Parasiten (*Lm* PS-/PS+). Somit fördern apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum nicht die Entzündung des Infektionsgebietes resistenter C57BL/6.

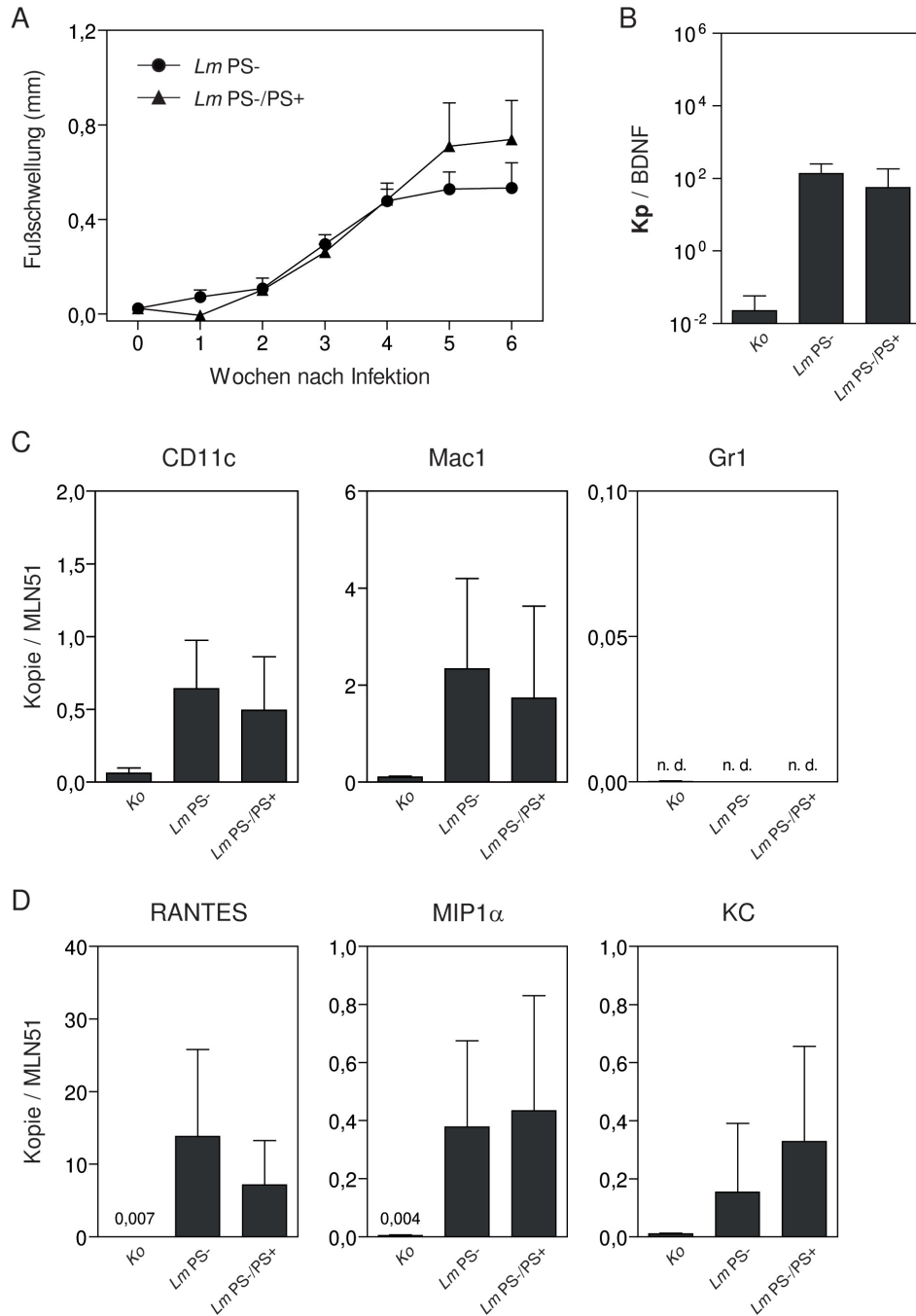


Abb. 4–18: Apoptotische PS+ *L. major* verstärken nicht die Schwellung und Entzündung des infizierten Fußes in resistenten C57BL/6. Resistente C57BL/6 wurden mit 10⁶ lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Infizierte Haut wurde sechs Wochen nach Infektion entnommen und mittels RT-PCR analysiert (Mittelwert + Standardabweichung; n = 6; Ko: Kontrolle, n. d.: nicht detektierbar). A: Fußschwellung in mm. Mittelwert + Standardfehler. B: Leishmanienlast als Kopien der Kp-DNA von *L. major* (Kp) pro Kopie des Single-Copy-Gens BDNF. C: Expression der Zellmarker CD11c, Mac1 und Gr1 als Kopien pro Kopie des House-Keeping-Gens MLN51. D: Expression der Chemokine Rantes, MIP1 α und KC als Kopien pro Kopie des House-Keeping-Gens MLN51.

Obwohl Fußschwellung und Entzündung nicht durch apoptotische PS+ *L. major* beeinflusst wurden, könnte sich die adaptive Immunantwort im Infektionsgebiet resistenter C57BL/6 dennoch unterscheiden. Deshalb wurden die Fc γ R- und Zytokinexpression der infizierten Haut analysiert. Da der IgG-Subtyp IgG2a nicht von C57BL/6 gebildet wird, wurden im Serum nur IgG1 und IgG2b bestimmt. Im Gegensatz zu anfälligen BALB/c induzierten apoptotische PS+ *L. major* in der Haut resistenter C57BL/6 weder die krankheitsassoziierte Expression von IL4, IL10 oder Fc γ RIII, noch erhöhten sie krankheitsassoziiertes IgG1 im Serum (Abb. 4–19).

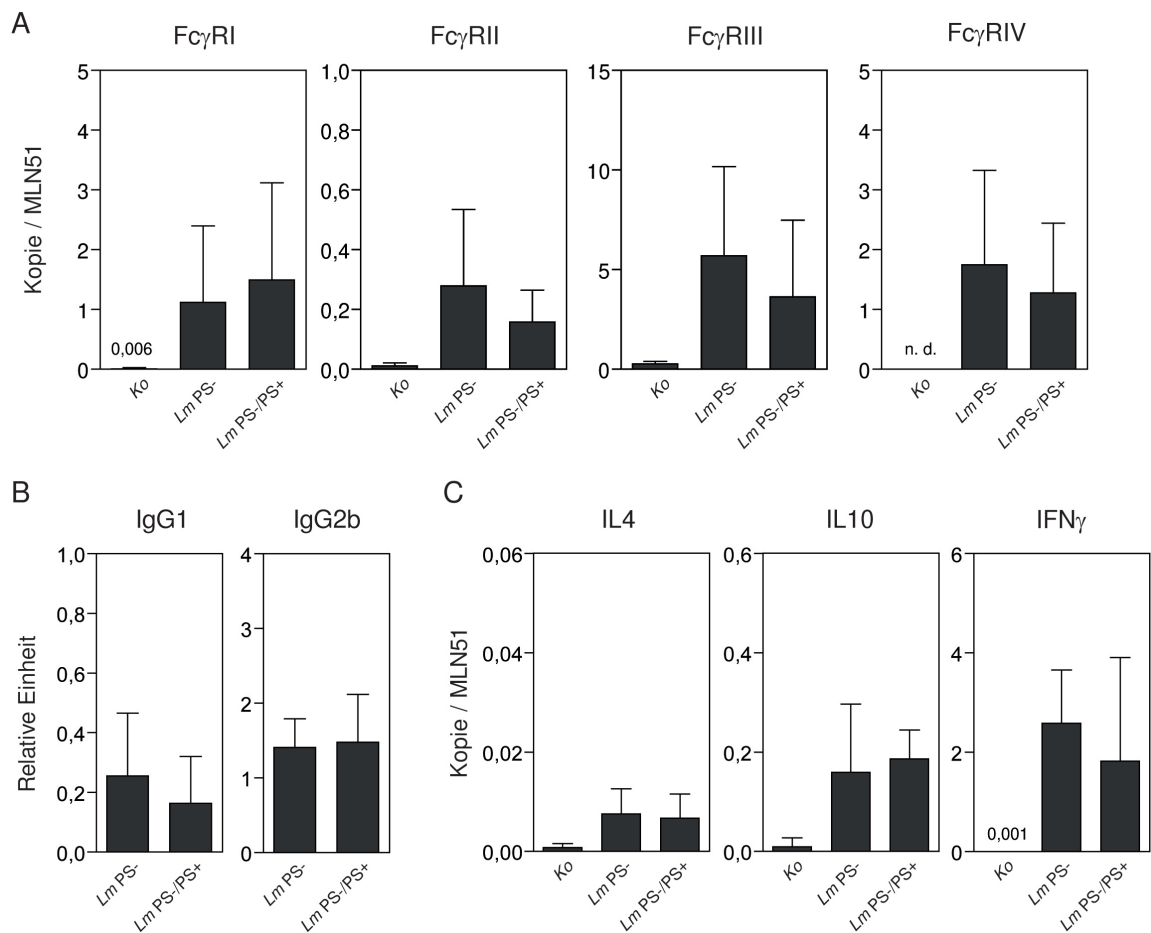


Abb. 4–19: Apoptotische PS+ *L. major* verstärken nicht die Fc γ R-Expression und adaptive Immunantwort in der infizierten Haut resistenter C57BL/6. Resistente C57BL/6 wurden mit 10^6 lebenden PS- *L. major* (*Lm* PS-) oder einer Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* (*Lm* PS-/PS+) infiziert. Infizierte Haut wurde sechs Wochen nach Infektion entnommen und mittels RT-PCR analysiert, Serum wurde sechs Wochen nach Infektion mittels ELISA analysiert. Mittelwert + Standardabweichung; n = 6; Ko: Kontrolle, n. d.: nicht detektierbar. A: Expression der Fc γ -Rezeptoren I bis IV. B: IgG1- und IgG2b-Spiegel im Serum. C: Expression der Zytokine IL4, IL10 und IFN γ .

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass apoptotische PS+ *L. major* die krankheitsassoziierte adaptive Immunantwort und Entzündung im Infektionsgebiet resistenter C57BL/6 nicht fördern. Dennoch gibt es in der Immunantwort auf eine Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* einen markanten Unterschied zwischen resistenter C57BL/6 und anfälliger BALB/c. Im Gegensatz zur BALB/c konnten in der Haut infizierter C57BL/6 keine Neutrophilen detektiert werden (vgl. Gr1 in Abb. 4-18 und 4-4).

4.4.2 In resistenten C57BL/6 akkumulieren auch bei anhaltender Entzündung keine Neutrophilen im Infektionsgebiet

Die Experimente des vorherigen Abschnittes 4.4.1 zeigen, dass in der infizierten Haut resistenter C57BL/6 keine Neutrophilen zu finden sind. Dies könnte zum einen bedeuten, dass Neutrophile bereits aus der infizierten Haut abgewandert sind, zum anderen, dass keine Neutrophilen rekrutiert werden. Diese Möglichkeiten sollten mit Hilfe des *L. major*-Stamm MHOM/SN/74/SD (*Lm/SD*) untersucht werden. Das Isolat *Lm/SD* wurde aus einem chronisch erkrankten Patienten isoliert und induziert in resistenten C57BL/6 Mäusen eine chronische Erkrankung, die auch 14 Wochen nach Infektion noch durch eine deutliche Fußschwellung und erhöhte Parasitenlast in der Haut charakterisiert ist (Abb. 4-20 A, B).⁵ Die chronische Infektion resistenter C57BL/6 mit *Lm/SD* geht im Infektionsgebiet hierbei mit einer Erhöhung von IL10 und IFN γ , nicht aber von IL4 einher (Abb. 4-20 C).⁵

Mit Hilfe des chronischen Stammes *Lm/SD* sollte die Infiltration der infizierten Haut durch dendritische Zellen, Makrophagen und Neutrophile näher untersucht werden. Resistente C57BL/6 wurden deshalb entweder mit dem in dieser Arbeit verwendeten *L. major*-Stamm (*Lm*) oder dem chronischen Stamm *Lm/SD* infiziert und die Haut nach 3, 6 und 14 Wochen hinsichtlich der Zellmarker CD11c, Mac1 und Gr1 analysiert. Nach Infektion mit beiden *L. major*-Stämmen war das Infektionsgebiet 3 Wochen nach Infektion deutlich geschwollen und die Leishmanienlast so hoch wie nach sechs Wochen (Abb. 4-20 A, B). Zu diesem Zeitpunkt war für den in dieser Arbeit verwendeten Stamm *Lm* bereits eine deutliche, für den chronischen Stamm *Lm/SD*

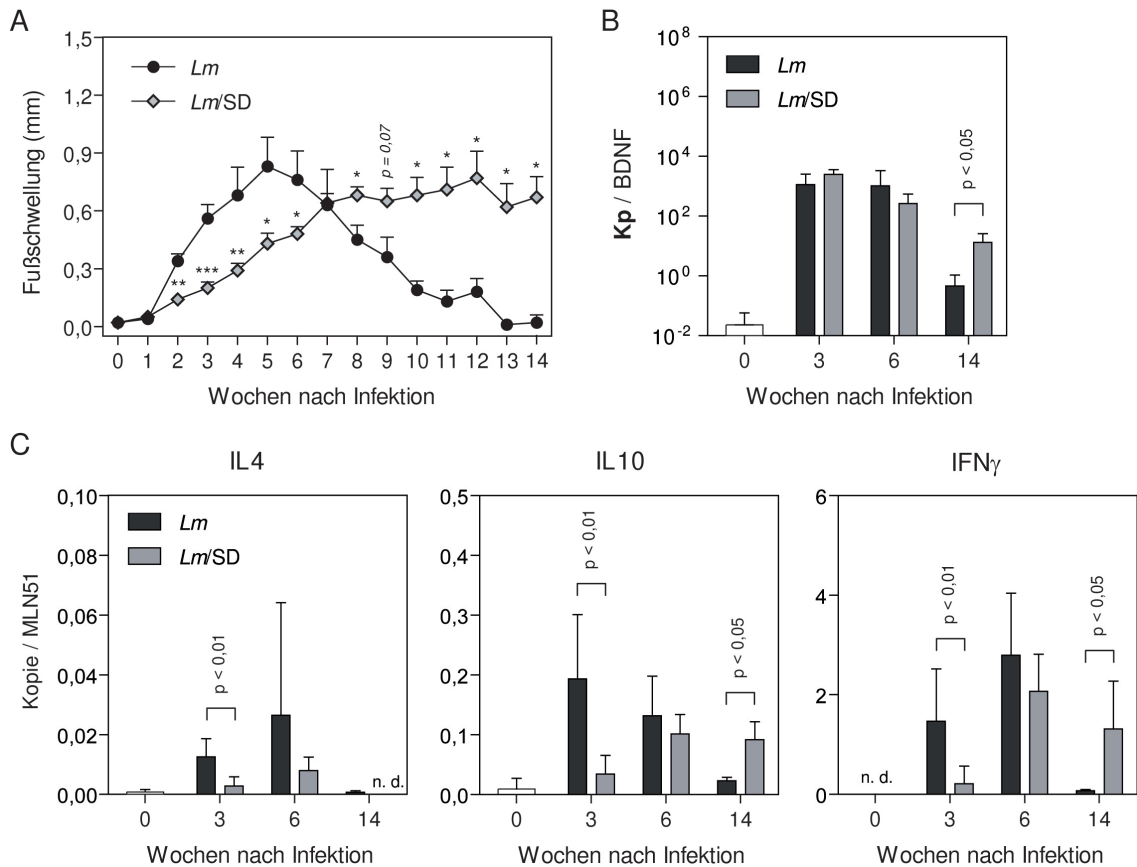


Abb. 4–20: Der *L. major* Stamm *Lm*/5D persistiert im Infektionsgebiet und induziert einen chronischen Verlauf. Resistente C57BL/6 wurden mit $2 \cdot 10^6$ *L. major* (*Lm*, MHOM/IL/81/FE/BNI) oder $2 \cdot 10^6$ *L. major* des Stammes MHOM/SN/74/SD (*Lm* SD) infiziert. Die Fußschwellung wurde wöchentlich bestimmt und infizierte Haut 3, 6 und 14 Wochen nach Infektion entnommen und mittels Real-Time PCR analysiert (Mittelwert + Standardabweichung, $n = 3-8$, p : Mann-Whitney-U-Test, Ko: Kontrolle). A: Fußschwellung in mm; Mittelwert + Standardfehler, $n = 3-15$, Mann-Whitney-U-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. B: Leishmanienlast als Kopien Kp-DNA (Kp) pro Kopie BDNF. C: Expression der Zytokine IL4, IL10, IFN γ .

eine schwache Akkumulation von dendritischen Zellen (CD11c) und Makrophagen (Mac1) zu beobachten (Abb. 4-21). Dennoch konnten für beide *L. major*-Stämme keine Neutrophilen (Gr1) detektiert werden. In resistenten C57BL/6 erfolgt somit die frühzeitige Immigration von Neutrophilen in das Infektionsgebiet wahrscheinlich vor der dritten Woche und ist im Gegensatz zu derjenigen der anfälligen BALB/c transient. Vierzehn Wochen nach Infektion war die Fußschwellung der C57BL/6 nach Infektion mit dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm *Lm* wieder auf das Kontrollniveau zurückgegangen (Abb. 4-20 A) und es waren auch deutlich weniger dendritische

Zellen (CD11c) und Makrophagen (Mac1) als nach sechs Wochen zu detektieren (Abb. 4–21). Die chronische Infektion von C57BL/6 mit *Lm*/SD führte dagegen dazu, dass die Akkumulation von dendritischen Zellen (CD11c) und Makrophagen (Mac1) auf dem 6-Wochen-Niveau erhalten blieb. Allerdings waren weder 6 noch 14 Wochen nach Infektion Neutrophile (Gr1) im Infektionsgebiet zu beobachten (Abb. 4–21). Somit rekrutieren resistente C57BL/6 auch bei chronischem Entzündungsreiz keine Neutrophilen.

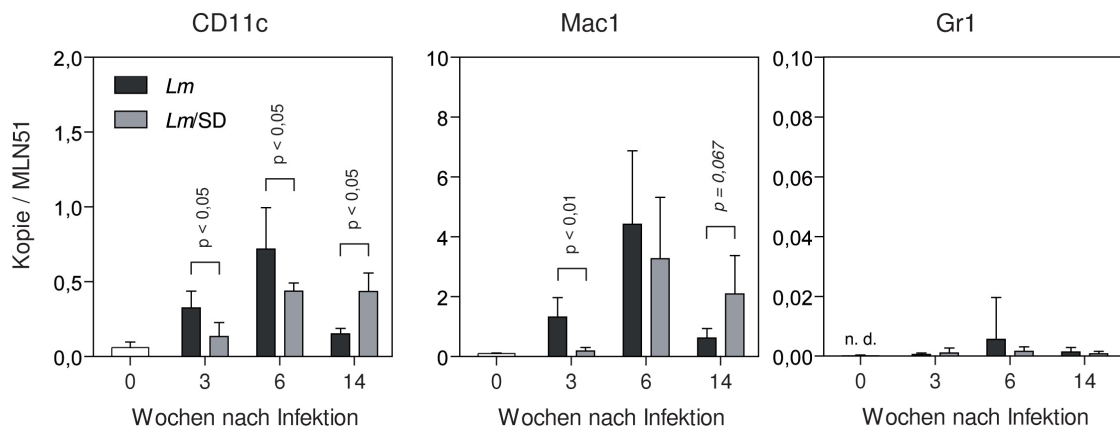


Abb. 4–21: Der *L. major* Stamm *Lm*/SD rekrutiert langfristig keine Neutrophilen in das Infektionsgebiet. Resistente C57BL/6 wurden mit $2 \cdot 10^6$ *L. major* (*Lm*, MHOM/IL/81/FE/BNI) oder $2 \cdot 10^6$ *L. major* des Stammes MHOM/SN/74/SD (*Lm* SD) infiziert. Haut wurde 3, 6 und 14 Wochen nach Infektion entnommen und die mRNA-Expression der Zellmarker CD11c (dendritische Zellen), Mac1 (Makrophagen) und Gr1 (Neutrophile) mittels Real-Time PCR analysiert. Mittelwert + Standardabweichung, n = 3–8, p: Mann-Whitney-U-Test; Ko: Kontrolle

Die Ergebnisse des vorliegenden Abschnittes zeigen deutlich, dass auch resistente C57BL/6 grundsätzlich in der Lage sind, auf eine *Leishmania*-Infektion mit einer stärkeren Fußschwellung und Entzündung zu reagieren. Im Gegensatz zu anfälligen BALB/c geht eine stärkere Fußschwellung in resistenten C57BL/6 aber nicht mit einer Akkumulation von Neutrophilen im Infektionsgebiet einher.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Apoptotische PS+ *L. major* fördern die Entzündung im Infektionsgebiet

Akkumulation von Effektorzellen der angeborenen Immunantwort im Infektionsgebiet

Gegenstand dieser Arbeit war es, den Einfluss apoptotischer PS+ *L. major* auf die Immunantwort in Haut und Lymphknoten sechs Wochen nach Infektion zu untersuchen. Die Anwesenheit apoptotischer *L. major* zu Beginn der Infektion ist für die gesteigerte Infektiösität der Parasiten in anfälligen BALB/c Mäusen verantwortlich. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass apoptotische PS+ Parasiten zu Beginn der Infektion eine starke, meist nekrotisierende Fußschwellung infizierter BALB/c Mäuse induzieren (siehe Abschnitt 4.1.1.1). Dies ist ein Zeichen für eine starke Entzündung im Infektionsgebiet. Eine Entzündung ist ein örtlich begrenzter Abwehrprozess als Reaktion auf eine Gewebeschädigung, dessen Ziel es ist, schädliche Einflüsse lokal zu begrenzen und zu beseitigen. Charakterisiert wird eine Entzündung unter anderem durch Ödembildung und die chemokinvermittelte Rekrutierung von Effektorzellen der angeborenen Immunantwort.¹⁰⁰ Effektorzellen der angeborenen Immunantwort, die im Laufe einer Entzündung rekrutiert werden, sind dendritische Zellen, Makrophagen und Neutrophile.⁶⁷ Diese Zelltypen dienen auch als Wirtszellen für *L. major*.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Fußschwellung, die durch apoptotische PS+ *L. major* induziert wird, mit der Akkumulation dendritischer Zellen (CD11c)

einhergeht (Abb. 4-4; Übersicht in Abb. 5-1, S. 75). Dendritische Zellen wurden als eine von vielen möglichen Ursachen für die Anfälligkeit von BALB/c Mäusen diskutiert. So akkumulieren in der Haut anfälliger BALB/c Mäuse zehnmal mehr dendritische Zellen als in resistenten C57BL/6 Mäusen.¹⁰ Die durch apoptotische PS+ *L. major* verstärkte Rekrutierung dendritischer Zellen an den Infektionsort könnte daher den progressiven Krankheitsverlauf anfälliger BALB/c Mäuse unterstützen. Neben der Zahl der rekrutierten Zellen könnte auch der Subtyp der dendritischen Zellen die Prägung der erworbenen Immunantwort und den Krankheitsverlauf beeinflussen. So zeigt eine Studie, dass es von der Unterart der dendritischen Zellen abhängt, wie gut diese *L. major* aufnehmen können.⁵⁷ Darüber hinaus wurde diskutiert, dass es auch von Bedeutung sein könnte, wieviele verschiedene Subtypen dendritischer Zellen *L. major* über einen längeren Zeitraum hinweg enthalten. Im Lymphknoten anfälliger BALB/c Mäuse wurden mehrere Subtypen dendritischer Zellen Parasiten detektiert, im Lymphknoten resistenter C57BL/6 Mäuse dagegen nur ein Subtyp.¹⁰

Die vorliegende Arbeit zeigt weiterhin, dass Makrophagen, die Hauptwirtszellen, unabhängig von der Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion, sechs Wochen nach Infektion gleich stark rekrutiert werden (Abb. 4-4; Übersicht in Abb. 5-1, S. 75). Dies macht grundsätzlich Sinn, da Makrophagen nicht allein Wirtszellen sind, sondern auch die zentrale Abwehrzellen zur Beseitigung der Parasiten. Unabhängig von der Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* müssen Makrophagen also vorliegen, um im Idealfall die Beseitigung der Parasiten gewährleisten zu können. Da apoptotische PS+ *L. major* Makrophagen funktionell hemmen, dient die durch apoptotische PS+ *L. major* erhöhte Rekrutierung von Makrophagen vermutlich dazu, den Nachschub an Wirtszellen für den Parasiten aufrecht zu erhalten.²⁶

Darüber hinaus zeigt die vorliegende Arbeit, dass apoptotische PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion dazu führen, dass die Akkumulation von Neutrophilen zum Höhepunkt der Infektion tendentiell erhöht ist (Gr1, Abb. 4-4; Übersicht in Abb. 5-1, S. 75). Da die vorliegende Arbeit den Neutrophilen-spezifischen Locus Ly-6G von Gr1 detektierte, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der hier beobachteten Akkumulation Gr1-positiver Zellen um monozytäre Vorläuferzellen handelt.^{36,47,129} Dies weist darauf hin, dass Neutrophile auch in der etablierten Infektion eine Rolle spielen.

Grundsätzlich wird die Bedeutung von Neutrophilen als Wirtszelle für *L. major* und ihre Funktion in der Etablierung und im Verlauf von *L. major*-Infektionen immer noch kontrovers diskutiert.^{124,129} Einerseits sind Neutrophile kurzlebige Zellen, andererseits werden sie durch apoptotische PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion gehemmt, so dass die Parasiten in ihnen überleben.^{53,54,161} Darüber hinaus zeigt eine aktuelle Studie, dass Neutrophile, wie es bereits von Makrophagen bekannt ist, an der Beseitigung anderer apoptotischer Zellen beteiligt sind.⁴² Damit eröffnet sich über die Aufnahme infizierter Neutrophiler die Möglichkeit einer stillen Weitergabe der Infektion mit *L. major* auch zu späteren Zeitpunkten, zu denen möglicherweise keine freien apoptotischen Parasiten mehr vorliegen. Da Neutrophile nach einer Infektion die ersten Zellen am Infektionsort sind, die auch apoptotische PS+ *L. major* aufnehmen und von ihnen gehemmt werden, liegt die Vermutung nahe, dass Neutrophile für die Etablierung der Infektion, möglicherweise auch für den Fortgang und die Beeinflussbarkeit des Infektionsverlaufes durch apoptotische PS+ *L. major* essentiell sind.^{85,110,123,123,161,162} Die starke Entzündung, die durch apoptotische PS+ *L. major* ausgelöst wird und sich in starken Schwellungen und Gewebnekrosen äußert (Abb. 4–2), erschwert hierbei aber die Analyse gering exprimierter Marker wie Gr1 (Abb. 4–4). Durch die Isolation und Quantifizierung von Neutrophilen aus infizierter Haut oder durch Aktivitätsassays könnten daher die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in weiteren Experimenten gefestigt werden.

Zusammenfassend bewirken apoptotische PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion, dass die Akkumulation von Effektorzellen der angeborenen Immunantwort nachhaltig induziert wird (Übersicht in Abb. 5–1, S. 75). Dies gewährleistet, dass die Infektion aufrecht erhalten werden kann.

Gesteigerte Expression von Chemokinen im Infektionsgebiet

Chemokine vermitteln die Migration von Zellen und führen zu ihrer Akkumulation im Infektionsgebiet.^{107,130} Die vorliegende Arbeit zeigt, dass apoptotische PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion dazu führen, dass auf dem Höhepunkt des Infektionsverlaufes verstärkt MIP1 α exprimiert wird (Abb. 4–5; Übersicht in Abb. 5–1, S. 75). Das inflammatorische MIP1 α ist im Verlauf einer *L. major*-Infektion wichtig, da es Makro-

phagen, die Hauptwirtszellen der Parasiten rekrutiert.^{34,40,81,91,99} Infizierte aktivierte Makrophagen sezernieren selbst MIP1 α und verstärken dadurch ihre eigene Rekrutierung.^{34,39,99,102} Obwohl MIP1 α durch apoptotische PS+ *L. major* verstärkt wird, ist die Akkumulation von Makrophagen unabhängig davon gleich stark ausgeprägt (Mac1, Abb. 4–4). Die gesteigerte MIP1 α -Expression ist demnach nicht einfach durch eine größere Zahl an Makrophagen zu erklären. MIP1 α rekrutiert nicht nur Makrophagen, es aktiviert sie auch.^{34,40,91,99} Makrophagen werden aber durch apoptotische PS+ *L. major* gehemmt.¹⁷⁰ Die gesteigerte MIP1 α -Expression könnte demnach ein Ausdruck dafür sein, diese Hemmung durch eine gesteigerte Expression des Chemokins zu kompensieren und zu überwinden. In diesem Zusammenhang ist nicht bekannt, ob Makrophagen, die funktionell durch apoptotische PS+ *L. major* gehemmt wurden, überhaupt MIP1 α exprimieren können. Neben Makrophagen wird die Produktion von MIP1 α aber auch Th1-fördernden dendritischen Zellen, die die protektive Immunantwort fördern, und *L. major*-infizierten Neutrophilen zugeordnet.^{26,91} Beide Zelltypen akkumulierten sechs Wochen nach Infektion verstärkt, wenn apoptotische PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion anwesend waren (Abb. 4–4). Sowohl dendritische Zellen als auch Neutrophile könnten demnach für die verstärkte MIP1 α -Expression verantwortlich sein. Zusammenfassend dient die MIP1 α -vermittelte Rekrutierung von Makrophagen dazu, die Infektion zu erhalten.²⁶ Das Ziel weitergehender Experimente könnte es sein, herauszufinden, ob Makrophagen, Neutrophile oder bestimmte Subtypen dendritischer Zellen die Quelle für das durch apoptotische PS+ *L. major* erhöhte MIP1 α sind.

Apoptotische PS+ *L. major*, die zu Beginn der Infektion vorliegen, steigern nicht nur die Akkumulation von Neutrophilen, sondern erhöhen tendenziell auch die Expression von KC sechs Wochen nach Infektion (Abb. 4–5; Übersicht in Abb. 5–1, S. 75). KC ist ein Chemokin, das von Endothelzellen gebildet wird und Neutrophile rekrutiert und aktiviert.^{49,94,148} Die Änderungen in der Expression von KC sind, wie zuvor für Gr1 beobachtet (Abb. 4–4), nicht signifikant. Zusammen bilden sie dennoch ein starkes Indiz dafür, dass apoptotische PS+ *L. major* die Akkumulation und Aktivierung von Neutrophilen fördern. Die durch apoptotische PS+ *L. major* erhöhte KC-Expression ist hierbei wahrscheinlich für die beobachtete Akkumulation Neutrophiler verantwortlich.

Bereits zu Beginn der Infektion beeinflussen *L. major* die Rekrutierung Neutrophiler durch Chemokine. So induzieren sie zum einen die Expression von KC, zum anderen sezernieren sie selbst Chemokine, um Neutrophile zu rekrutieren.^{110,162} Es ist nicht bekannt, ob diese Effekte zu Beginn der Infektion durch alle *L. major* vermittelt werden, oder ob sie spezifisch durch apoptotische PS+ *L. major* induziert werden. Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass apoptotische PS+ *L. major* für die Induktion von KC zu Beginn der Infektion verantwortlich sein könnten. Weitere Experimente sind notwendig, um diesen Punkt im Detail zu klären.

5.2 Apoptotische PS+ *L. major* fördern die krankheitsassoziierte T-Zellantwort

Gesteigerte Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10

Die Ausbildung einer protektiven T-Zellantwort ist entscheidend für die Abwehr einer *L. major* Infektion und ihre Bedeutung für den weiteren Verlauf einer *Leishmania*-Infektion unumstritten.^{74,117,126,144,155} Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass apoptotische *L. major* die Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 *in vivo* in der Haut sechs Wochen nach Infektion erhöhen (Abb. 4–8; Übersicht in Abb. 5–1, S. 75). IL4 ist ein T-Zelleffektorzytokin, das die humorale Antwort über B-Zellen fördert.^{28,35,75,82,160} Gleichzeitig aktiviert es alternativ auch Makrophagen, diese wirken aber antiinflammatorisch und können intrazelluläre Erreger wie *L. major* nicht abbauen.^{50,63} IL10 ist ein regulatorisches Zytokin, das wie IL4 den Abbau intrazellulärer *L. major* durch Makrophagen hemmt. IL10 wird von T-Zellen aber auch Makrophagen gebildet und fördert das Überleben und die Proliferation von B-Zellen einerseits, inhibiert aber Makrophagen und Neutrophile andererseits.^{14,50,74,105,173} Zusammenfassend bewirken apoptotische *L. major* im Inokulum, dass langfristig die krankheitsassoziierte Zytokinantwort über IL4 und IL10 induziert wird, um das Überleben der Parasiten in Makrophagen zu fördern.

Die in der Haut nachgewiesene T-zellvermittelte Zytokinantwort hat ihren Ursprung im Lymphknoten und wird von dort durch Migration der T-Effektorzellen in die peripheren Gewebe übertragen.^{68,152} Daher wurde in Abhängigkeit apopto-

tischer *L. major* auch die Zytokinexpression im drainierenden Lymphknoten näher untersucht. Ähnlich wie im Infektionsgebiet, erhöhen apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum die Expression von krankheitsassoziiertem IL4 im Lymphknoten tendentiell, die von krankheitsassoziiertem IL10 stark erhöhen (Abb. 4–9). Im Großen und Ganzen stimmt die Expression von IL10 im Lymphknoten mit derjenigen im Infektionsgebiet überein. Darüber hinaus ist im Unterschied zur Haut in Anwesenheit apoptotischer *L. major* auch eine Hemmung der IFN γ -Expression zu beobachten (Abb. 4–9; Übersicht in Abb. 5–2, S. 76). Damit wird im Lymphknoten nicht nur die Ausbildung der krankheitsassoziierten Antwort gefördert, sondern gleichzeitig die protektive Antwort gehemmt. Es stellt sich nun die Frage, warum sich die Zytokinprofile in Haut und Lymphknoten unterscheiden. Die Analysen, die in dieser Arbeit vorgenommen wurden, sind Momentaufnahmen der Situation im Organismus. Lymphknoten und Haut kommunizieren miteinander, diese Kommunikation mittels Zellmigration benötigt aber Zeit und führt so zu kinetischen Verschiebungen zwischen beiden Organen. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Hemmung der IFN γ -Expression im Lymphknoten ist vermutlich die Reaktion auf die verstärkte Entzündung und antiinflammatorische Immunantwort der infizierten Haut, die durch apoptotische Parasiten induziert wurde. Dies ist auch insofern plausibel, als im Serum noch keine Verringerung des mit IFN γ assoziierten IgG2a zu detektieren ist (Abb. 4–7; Übersicht in Abb. 5–1, S. 75). Mit einer solchen Änderung wäre erst zeitverzögert zu rechnen. Um die kinetischen Zusammenhänge der Zytokinexpression zwischen Haut und Lymphknoten besser beurteilen zu können, müssten in weiterführenden Versuchen verschiedene Zeitpunkte vor und nach dem in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkt analysiert werden.

Keine Prägung der frühen Immunantwort im Lymphknoten durch apoptotische PS+ *L. major*

Wie zuvor schon erwähnt, ist die Art der T-zellvermittelten Zytokinantwort essentiell für den Erfolg der *L. major*-Abwehr. Anhand der Beobachtungen an Langzeit-T-Zellkulturen wurde deshalb das Konzept aufgeworfen, dass bereits T-zellspezifische Zytokine, die kurz nach Infektion zur Zeit der T-Zellaktivierung anwesend sind, die T-zellabhängige Zytokinantwort prägen und nachhaltig festlegen.^{55,108,144} Diese

Hypothese wurde kontrovers diskutiert.^{16,127,140,145,151,153} In der vorliegenden Arbeit reicht die Anwesenheit promastigoter, apoptotischer PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion aus, um eine krankheitsassoziierte Zytokinantwort und den progressiven Verlauf *in vivo* zu induzieren. Es ist darüber hinaus bekannt, dass Antigene über die Lymphe sehr schnell in den drainierenden Lymphknoten gelangen und zur frühen T-Zellaktivierung beitragen.^{64,66,104} Da apoptotische PS+ *L. major* nur zu Beginn der Infektion vorliegen, ist es also plausibel zu vermuten, dass sie auch frühzeitig in den drainierenden Lymphknoten gelangen und dort die Prägung der T-Zellantwort beeinflussen könnten.

Bisherige Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass T-Zellen drei Tage nach Infektion mit *L. major* zum ersten Mal stark im drainierenden Lymphknoten proliferieren.^{12,114} Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Ausmaß der Aktivierung von T-Zellen in der T-Zellzone des drainierenden Lymphknotens durch apoptotische PS+ *L. major* nicht beeinflusst wird (Abb. 4–10). Somit fördern apoptotische PS+ *L. major* die T-Zellantwort nicht, indem sie die frühe Proliferationsrate von T-Zellen erhöhen. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit der allgemeine Proliferationsmarker Ki67 analysiert wurde, der von allen proliferierenden Zellen während aller Phasen des Zellzyklus exprimiert wird.²² Die Daten der vorliegenden Arbeit können daher nicht ausschließen, dass in Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* andere T-Zellsubtypen aktiviert werden als in ihrer Abwesenheit. Weitergehende Experimente müssten analysieren, inwiefern die Aktivierung verschiedener T-Zellsubtypen von apoptotischen PS+ *L. major* abhängt.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob apoptotische PS+ *L. major* die Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 im T-Zellareal des Lymphknotens bereits drei Tage nach Infektion induzieren und dieses Zytokinprofil dem nach sechs Wochen ähnelt. Unabhängig von der Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulat wurde die Zytokinexpression im Lymphknoten bereits drei Tage nach Infektion induziert, es konnten aber keine Unterschiede in der Zytokinexpression des T-Zellareals beobachtet werden (Abb. 4–12). Dies unterscheidet die frühe Zytokinexpression des Lymphknotens von derjenigen der etablierten Infektion in Haut und Lymphknoten (vgl. Abb. 4–8, 4–9 und 4–12; Übersichten in Abb. 5–1 und 5–2, S. 75

und 76). Damit zeigt sich, dass auch apoptotische PS+ *L. major* die T-Zellantwort noch nicht kurz nach Infektion festlegen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bisherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe und zahlreichen Studien, die darauf hinweisen, dass Zytokine, die zur Zeit der T-Zellaktivierung vorhanden sind, keinen entscheidenden Einfluss auf die Prägung der resultierenden T-Zellantwort haben. [12,16,114,127,140,145,151,153](#)

Zusammengenommen weisen die vorliegenden Daten darauf hin, dass apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum durch die Induktion der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 das Überleben der *L. major*-Population im Verlauf der Infektion unterstützen, wodurch die anhaltende Entzündung und der progressive Verlauf der Infektion verursacht werden. Für die Prägung dieser Antwort ist wahrscheinlich nicht die frühe T-zellvermittelte Zytokinantwort des Lymphknotens verantwortlich.

5.3 Apoptotische PS+ *L. major* fördern die krankheitsassoziierte B-Zellantwort

Im Gegensatz zur Rolle der T-Zelleffektorantwort wird die Rolle der B-Zellen und Antikörper im Verlauf der murinen Leishmaniose kontrovers diskutiert. Studien zeigen, dass anfällige B-zelldefiziente BALB/c einen verbesserten Krankheitsverlauf nach *L. major*-Infektion aufweisen. [61,62,79,103,138,149](#) Andere Studien konnten dagegen keine Unterschiede aufzeigen oder lassen vermuten, dass die B-zellvermittelte Anfälligkeit von BALB/c vom *L. major*-Stamm, der zur Infektion genutzt wird, abhängt. [23,132](#) Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss apoptotischer *L. major* auch auf die IgG-Subtypen im Serum und die Expression der Fc γ -Rezeptoren in der infizierten Haut analysiert. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum neben der Schwere der Erkrankung und der Expression von IL4 und IL10 im Infektionsgebiet auch mit der Menge an IgG1 im Serum korreliert (Abb. 4–7; Übersicht in Abb. 5–1, S. 75). IgG1 ist in BALB/c der Antikörpersubtyp, der *L. major* am stärksten opsonisiert und über den sie von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden. [52,173](#) Apoptotische Parasiten im Inokulum fördern demnach wahrscheinlich die Aufnahme von *L. major* durch antigenpräsentierende Zellen und damit die Ausbildung einer lokalen Immunantwort in der

Haut, indem sie den Isotypwechsel zu IgG1 induzieren. Die Bedeutung von Antikörpern für die Ausbildung einer lokalen Immunantwort in der Haut und dem progressiven Verlauf der Infektion zeigt sich in antikörperdefizienten Mäusen, die nach einer Infektion mit verschiedenen *Leishmania*-Stämmen weniger Monozyten in die Haut rekrutieren und einen verbesserten klinischen Verlauf der Infektion aufweisen.^{33,79,118}

Die Wirkung einzelner IgG-Subtypen zu beurteilen, ist anspruchsvoll, da das gesamte System sehr komplex ist und von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird. Neben der Spezifität der IgG-Subtypen muss auch die Spezifität und das Expressionsniveau ihrer Fc γ -Rezeptoren berücksichtigt werden. Darüber hinaus spielen auch die Affinität der Fc γ R, die Koexpression der aktivierenden Fc γ R untereinander und/oder mit dem inhibierenden Fc γ RII auf einer Zelle, der Zelltyp, auf dem die Fc γ R exprimiert werden, und nicht zuletzt auch Zytokine, die sowohl den Isotypwechsel der B-Zellen als auch die Fc γ R-Expression der anderen Zellen beeinflussen, eine Rolle.^{115,116} Die vorliegende Arbeit zeigt, dass apoptotische PS+ *L. major* analog zum Serum-IgG1 auch die Expression von Fc γ RIII in der Haut anfälliger BALB/c verstärken (Abb. 4–6; Übersicht in Abb. 5–1, S. 75). Da Fc γ RIII der einzige aktivierende IgG1-bindende Fc γ R ist, wird dadurch die Wirkung von IgG1 gesteigert.¹¹⁶ Diese durch apoptotische *L. major* im Inokulum hervorgerufene Steigerung der Fc γ RIII-Expression könnte einerseits durch eine Herunterregulation der Fc γ RIII-Expression, andererseits durch eine verminderte Einwanderung Fc γ RIII-exprimierender Zellen verursacht sein. Fc γ RIII wird auf verschiedenen Zellen exprimiert, so auch auf den für die Etablierung und den Erhalt der *Leishmania*-Infektion besonders bedeutenden dendritischen Zellen, Makrophagen und Neutrophilen.^{115,116} Die vorliegende Arbeit zeigt, dass apoptotische PS+ *L. major* die Akkumulation dendritischer Zellen und Neutrophiler in der Haut anfälliger BALB/c fördern (Abb. 4–4). Zusammen mit der erhöhten Fc γ RIII-Expression weist dies darauf hin, dass die gesteigerte Expression des Fc γ RIII auf eine erhöhte Akkumulation dieser Zellen zurückzuführen sein könnte. Dafür spricht, dass beispielsweise die Einwanderung dendritischer Zellen in das Infektionsgebiet *in vivo* mit dem Auftreten von Antikörpern im Serum zusammenfällt.¹⁷³ Apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum könnten demnach über die erhöhte Fc γ RIII-Expression und die verstärkte IgG1-Produktion die Aufnahme der Parasiten durch dendritische Zellen erhöhen, und damit zum Ausbau

und Erhalt des progressiven Erkrankungsverlaufs anfälliger BALB/c beitragen. Nicht ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, dass die Expression von Fc γ RIII auf Zellen moduliert wird und dadurch die beobachtete Erhöhung der Fc γ RIII-Expression zu Stande kommt.

Die Opsonisierung von *L. major* mit IgG1 und deren Aufnahme über Fc γ RIII spielt in der Induktion einer krankheitsassoziierten Immunantwort anfälliger BALB/c eine bedeutende Rolle. Darauf weist eine Studie hin, die beobachtet, dass Fc γ R-/- BALB/c eine Infektion mit *L. major* kontrollieren.¹¹⁸ Dies spricht dafür, dass die Aufnahme opsonisierter *L. major* über Fc γ R mit der progressiven Krankheitsentwicklung korreliert. Die Fc γ R-vermittelte Aufnahme IgG-opsonisierter Parasiten erfolgt hierbei nicht nur durch dendritische Zellen, wie bereits zuvor diskutiert wurde, sondern auch durch Makrophagen.^{14,74,173} Makrophagen, die IgG-opsonisierte Parasiten aufnehmen, sind darüber hinaus neben T-Zellen als Quelle von IL10 bekannt. Ein Teil der in dieser Arbeit beobachteten IL10-Expression, die durch apoptotische *L. major* induziert wird, könnte demnach auch von Makrophagen stammen (Abb. 4–8). Speziell Fc γ RIII konnte für die IgG-vermittelte Induktion von IL10 in Makrophagen und die dadurch bedingten chronischen Läsionen während einer *L. mexicana*-Infektion verantwortlich gemacht werden.¹⁵⁸ Über die Induktion von IgG1 und Fc γ RIII fördern apoptotische *L. major* demnach vermutlich die IL10-Produktion von Makrophagen, was infolgedessen zu deren funktioneller Hemmung und dem Überleben der Parasiten in Makrophagen führt.

Neben IgG1 und Fc γ RIII könnten auch die Antikörper IgG2a und IgG2b über ihre Fc γ -Rezeptoren die Immunantwort beeinflussen. Die vorliegende Arbeit zeigt aber, dass weder die Sezernierung von IgG2a und IgG2b noch die Expression ihrer aktivierenden Fc γ -Rezeptoren I und IV durch apoptotische PS+ *L. major* beeinflusst werden (Abb. 4–7 und 4–6). Darüber hinaus könnte man argumentieren, dass IgG2a und IgG2b indirekt über Fc γ RIII wirken, da bekannt ist, dass Fc γ RIII neben IgG1 auch IgG2a und IgG2b bindet.¹¹⁵ Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da beide Subtypen bevorzugt an die für sie höher affinen Fc γ RI (IgG2a) und Fc γ RIV (IgG2a, IgG2b) binden.¹¹⁵

Ein weiterer Faktor, der die Wirkung aller untersuchten IgG-Subtypen beeinflusst, ist deren Wirkung über den inhibierenden Fc γ RII, der alle in dieser Arbeit untersuchten IgG-Subtypen (IgG1, IgG2a, IgG2b) bindet. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass apoptotische *L. major* keine gesteigerte Expression dieses inhibitorischen Fc γ RII induzieren (Abb. 4-6). Da apoptotische *L. major* den IgG1-bindenden aktivierenden Rezeptor Fc γ RIII induzieren, wird dadurch die Wirkung von IgG1 indirekt zusätzlich gestärkt. Gerade für IgG1 wurde beschrieben, dass eine solche Verschiebung des Verhältnisses aktivierender zu inhibierenden Rezeptoren die Wirkung von IgG1 stark beeinflusst.¹¹⁵

Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass apoptotische PS+ *L. major* in BALB/c Mäusen die Wirksamkeit von IgG1 fördern, indem sie zum einen die Produktion von IgG1 fördern, zum anderen die Expression des einzigen IgG1-bindenden, aktivierenden Fc γ RIII erhöhen (Übersicht in Abb. 5-1, S. 75). Die erhöhten IgG1-Spiegel führen vermutlich zu einer gesteigerten Opsonisierung der Parasiten und gesteigerten Aufnahme durch Makrophagen und dendritische Zellen. Über die Induktion von IgG1 tragen apoptotische PS+ *L. major* damit zum Erhalt der Infektion bei. Weitere Experimente müssen klären, ob neben der in dieser Arbeit beobachteten Erhöhung von IgG1 im Serum auch eine Erhöhung im Infektionsgebiet festzustellen ist. Weiterhin ist es von Interesse herauszufinden, ob die durch apoptotische *L. major* erhöhte Wirkung von IgG1 über Fc γ RIII durch eine verstärkte Akkumulation Fc γ RIII-tragender Zellen, oder durch eine verstärkte Fc γ RIII-Expression auf einzelnen Zellpopulationen bestimmt wird. Ziel solcher Untersuchungen könnte außerdem sein, zu untersuchen, ob die Depletion des krankheitsassoziierten IgG1 den Krankheitsverlauf von BALB/c Mäusen verbessert.

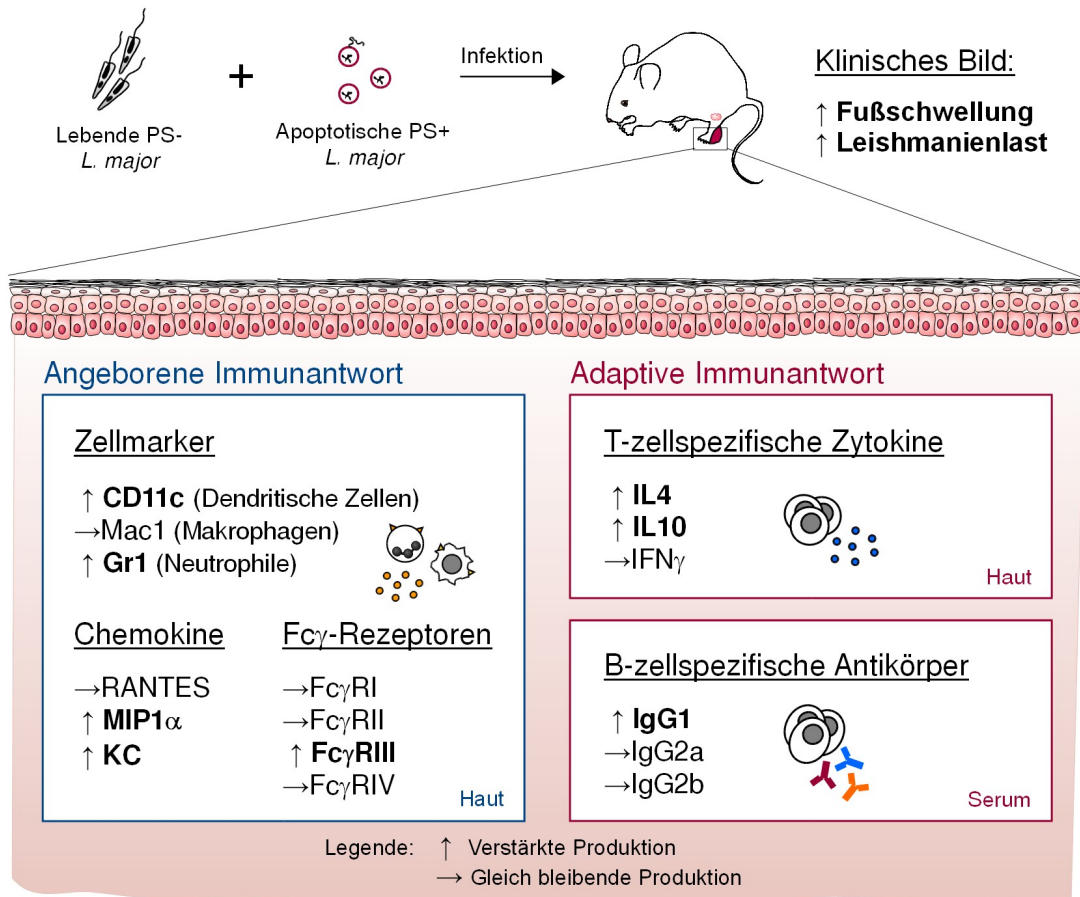


Abb. 5–1: Überblick über den Einfluss apoptotischer PS+ *L. major* während der Infektion auf die Immunantwort im Infektionsgebiet und Serum. Sind neben lebenden PS- *L. major* auch apoptotische PS+ *L. major* während der Infektion anfälliger BALB/c vorhanden, führt dies sechs Wochen nach Infektion zu einer verstärkten Akkumulation von dendritischen Zellen und Neutrophilen und einer verstärkten Expression der inflammatorischen Chemokine MIP1 α und KC in der Haut. Weiterhin werden die krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10, sowie der IgG1-bindende Fc γ RIII verstärkt exprimiert. Im Serum liegt eine erhöhte Konzentration an krankheitsassoziiertem IgG1 vor. Insgesamt fördert die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion anfälliger BALB/c Mäuse die Entwicklung einer krankheitsassoziierten Immunantwort im Infektionsgebiet.

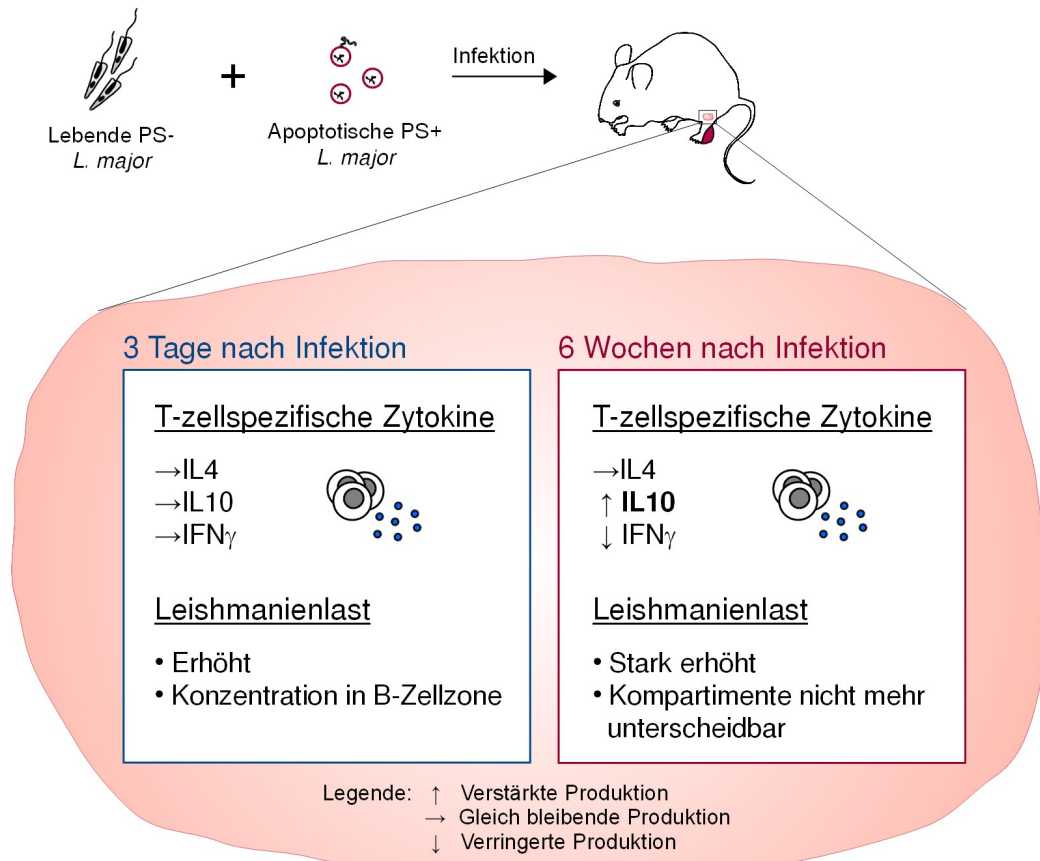


Abb. 5–2: Überblick über den Einfluss apoptotischer PS+ *L. major* während der Infektion auf die Immunantwort im Lymphknoten. Sind neben lebenden PS-*L. major* auch apoptotische PS+ *L. major* während der Infektion anfälliger BALB/c vorhanden, führt dies sechs Wochen nach Infektion wie in der Haut zu einer verstärkten Expression des krankheitsassoziierten Zytokins IL10 und zu einer verringerten Expression des protektiven Zytokines IFN γ . Drei Tage nach Infektion ist die Zytokinexpression nach Infektion mit apoptotischen PS+ *L. major* nicht verändert im Vergleich zur Infektion ohne apoptotische PS+ *L. major*. Die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* während der Infektion führt dazu, dass vermehrt *L. major* in der B-Zellzone akkumulieren. Insgesamt fördert die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion anfälliger BALB/c Mäuse die Entwicklung einer krankheitsassoziierten Immunantwort im drainierenden Lymphknoten.

5.4 Apoptotische PS+ *L. major* verursachen die frühe Lokalisation der Parasiten im B-Zellareal des Lymphknotens

Wie in Abschnitt 5.2 diskutiert wurde, induzieren apoptotische *L. major* im Verlauf der Infektion die krankheitsassoziierten T-Zellzytokine IL4 und IL10. Die T-zellabhängige IL4- und IL10-Expression ist dafür verantwortlich, dass *L. major* in Makrophagen überleben und den progressiven Krankheitsverlauf verursachen. Zu Beginn der Infektion wurde aber noch keine Veränderung der Expression dieser Zytokine beobachtet. Für die Etablierung und Festlegung der adaptiven Immunantwort scheinen sie daher keine Rolle zu spielen. Da sechs Wochen nach Infektion auch krankheitsassoziiertes IgG1 induziert wurde (Abb. 4–7 und Abschnitt 5.3) und die Anwesenheit apoptotischer *L. major* zu Beginn der Infektion ausreicht, um den gesamten Erkrankungsverlauf zu prägen, ist es plausibel zu vermuten, dass B-Zellen eine größere Rolle in der Prägung der erworbenen Immunantwort spielen könnten.

B-Zellen benötigen zu ihrer vollständigen Aktivierung die Kreuzvernetzung membranständiger B-Zellrezeptoren durch natives Antigen.⁶⁹ Zugrunde liegt die Frage, ob apoptotische *L. major* die Lokalisation der Parasiten im Lymphknoten zugunsten der B-Zellzone ändern und damit die Induktion der B-Zellantwort beeinflussen könnten. Um die Möglichkeit einer frühen Beeinflussung von B-Zellen durch *Leishmania*-Antigene zu untersuchen, wurde die Lokalisation von *L. major* in der T- und B-Zellzone durch Analyse der leishmaniellen Kp-DNA drei Tage nach Infektion untersucht. Um unterschiedlich infizierte Mäuse standardisiert miteinander vergleichen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit der Quotient aus der Last der T-Zellzone und derjenigen der B-Zellzone untersucht. Auf diese Weise zeigt die vorliegende Arbeit erstmals, dass die Anwesenheit apoptotischer *L. major* im Inokulum die bevorzugte Akkumulation der Parasiten in der B-Zellzone des Lymphknotens anfälliger BALB/c kurz nach Infektion fördert (Abb. 4–13 B; Übersicht in Abb. 5–2, S. 76). Da die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum mit einem progressiven Krankheitsverlauf und erhöhter IgG1-Produktion von BALB/c Mäusen korreliert (Abb. 4–2, 4–7), ist es denkbar, dass die Lokalisation der Parasiten in der B-Zellzone frühzeitig die B-Zellantwort aktiviert

und den Isotypwechsel zu IgG1 festlegt. Damit würden apoptotische Parasiten die Entwicklung der krankheitsassoziierten, humoralen Immunantwort begünstigen und entscheidend prägen.

Die kompartimentspezifische quantitative Analyse der Parasitenlast im Lymphknoten wird drei Tage nach Infektion von einigen Faktoren erschwert: Über alle Infektionsgruppen hinweg, unterscheidet sich die absolute Menge an Kp-DNA zwischen verschiedenen Versuchstieren. Diese biologischen Schwankungen erschweren den direkten Vergleich der kompartimentspezifischen Parasitenlast anhand absoluter Werte (Abb. 4–13 A). Das Einzelkopiegen POLA, das eine genauere Aussage über die Quantität der Parasitenlast zulässt als die pro einzelner *L. major*-Zelle variabel exprimierte Kp-DNA,^{18,21,147} liegt drei Tage nach Infektion noch unter der Detektionsgrenze der Real-Time-PCR (Daten nicht gezeigt). Andere etablierte Methoden zur Bestimmung der Leishmanienlast (z. B. limitierende Verdünnung durch Anzucht in der Kulturschale) sind nicht einsetzbar, weil diese die Last in Gesamtorganen bestimmen und eine Trennung der Kompartimente, wie bei der in dieser Arbeit genutzten Mikrodissektion nach Kryosektion der Lymphknoten, nicht möglich ist. Mikroskopische Techniken wären hier ein möglicher Ansatzpunkt, die Verteilung von *L. major* oder *L. major*-Antigen in den Kompartimenten des Lymphknotens drei Tage nach Infektion detaillierter zu untersuchen. Darüber hinaus müssen weitere Studien klären, ob die Lokalisation von *L. major* in der B-Zellzone die B-Zellantwort aktivieren und den Isotypwechsel zu IgG1 festlegen kann.

Der genaue Mechanismus, mit dem apoptotische *L. major* die Lokalisation der Parasiten in der B-Zellzone des Lymphknotens bewirken könnten, ist nicht bekannt. *L. major* könnten beispielsweise direkt in das B-Zellareal gelangen und B-Zellen aktivieren. So belegen Studien, dass Antigen einerseits über den subkapsulären Sinus direkt in die B-Zellfollikel von Lymphknoten fließt oder im Netz subkapsulärer Makrophagen gefangen wird, andererseits B-Zellen des Lymphknotens aktiv an der Drainage von Antigen und ihrem Transport in den B-Zellfollikel beteiligt sind.^{6,24,72,119} Freie *L. major* könnten so direkt Einfluss auf die B-Zellaktivierung nehmen. Hierbei üben apoptotische *L. major* möglicherweise eine andere Wirkung auf B-Zellen aus als lebende Parasiten. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass apoptotische PS+ *L. major* die Akkumulation von

Parasiten in der B-Zellzone fördern, die Analyse der Kp-DNA liefert aber keine Aussage darüber, ob sie von apoptotischen oder lebenden *L. major* stammt. Darüber geht aus der Analyse der Kp-DNA nicht hervor, in welcher Form *L. major* im Lymphknoten vorliegen. Kp-DNA könnte in intakten Parasiten, aber auch außerhalb von *L. major* frei im Gewebe oder innerhalb von Kinetoplasten vorliegen. Die unterschiedlichen Antigene, die auf diese Art exponiert würden, könnten unterschiedlich auf die Induktion der B-Zellantwort wirken. Dass die durch apoptotische PS+ *L. major* erhöhte Kp-DNA im B-Zellareal durch extrazelluläres, freies *Leishmania*-Antigen hervorgerufen wird, ist unwahrscheinlich, da dieses schnell beseitigt wird und drei Tage nach Infektion im Lymphknoten kaum noch detektiert werden kann (Abb. 4–14).

Antigene gelangen nicht nur als freies Antigen über die Lymphe in den drainierenden Lymphknoten, sondern insbesondere auch durch Zellen. Neuere Studien zeigen, dass nicht nur dendritische Zellen, sondern interessanterweise auch Neutrophile in den Lymphknoten einwandern, wo sie zunächst im subkapsulären Sinus lokalisieren, ihr Antigen direkt an B-Zellen weitergeben und auch dendritische Zellen aktivieren können.^{19,30,41,97} Da apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum nicht nur das Abtöten lebender Parasiten durch Neutrophile verhindern, sondern darüber hinaus das Überleben der Neutrophilen verlängern, ist es vorstellbar, dass mehr Neutrophile in der Lage sind, in den Lymphknoten einzuwandern.^{161,163} In der vorliegenden Arbeit wurde die B-Zellzone zusammen mit dem subkapsulären Sinus isoliert. Ein Teil der nachgewiesenen *L. major* könnte also von infizierten Neutrophilen des subkapsulären Sinus stammen und dadurch die Steigerung der Leishmanienlokalisation im B-Zellareal drei Tage nach Infektion erklären (Abb. 4–13 B). Da insbesondere Neutrophile durch apoptotische PS+ *L. major* moduliert werden, könnte Neutrophilen über die Verteilung des Antigens im Lymphknoten eine wichtige Rolle in der Prägung der erworbenen Immunantwort zukommen. So führt die Depletion von Neutrophilen in anfälligen BALB/c zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufs nach *L. major*-Infektion.¹⁵⁶ Das Ziel weiterführender Analysen könnte es sein, zu untersuchen, ob Neutrophile in Abhängigkeit apoptotischer *L. major* tatsächlich die Verteilung der Parasiten in den Kompartimenten des drainierenden Lymphknotens beeinflussen und ob eine solche Mo-

dulation die Produktion von IgG1 und den Krankheitsverlauf nach *L. major*-Infektion verändert.

5.5 Einfluss gestresster PS- *L. major* auf die Erkrankungsrate

Die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum führte in anfälligen BALB/c immer zur Ausprägung des vollen Krankheitsverlaufes (4-2). Im Gegensatz zur Studie von van Zandbergen et al.¹⁶¹ zeigten aber auch etliche BALB/c nach Infektion mit lebenden PS- *L. major* den vollen Krankheitsverlauf und blieben nicht klinisch unauffällig. Auch eine andere Arbeit zeigt, dass die Depletion apoptotischer promastigoter *L. major* im Inokulum nicht in jedem Fall zu einem vollständig unauffälligen Verlauf führt.¹⁷ Eine wichtige Frage, die sich deshalb stellte, war, warum sich der klinische Verlauf nicht in allen BALB/c verbesserte, wenn apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum fehlten. Die vorliegende Arbeit schließt aus, dass es sich bei dieser Ambivalenz im klinischen Verlauf um einen Dosiseffekt handelt, der bei geringerer Gesamtdosis verschwindet (Abb. 4-15). Die Ursache für den unterschiedlichen Infektionsverlauf nach Depletion apoptotischer PS+ *L. major* musste demnach woanders begründet sein.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die Population lebender PS- *L. major*, so wie sie bisher definiert wurde, neben länglichen, lebenden Parasiten (FSC^{hoch}) auch solche umfasst, die morphologisch die Größe apoptotischer PS+ Parasiten (FSC^{niedrig}) aufweisen (Abb. 4-16). Der Prozess der Apoptose in *Leishmania* umfasst auch morphologische Änderungen wie Zellschrumpfung, die noch vor PS-Expression eintreten.⁸ Daher umfasst die Population der PS- FSC^{niedrig} *L. major* vermutlich gestresste Zellen, die sich zunächst nur morphologisch ändern, aber noch nicht über die Expression von PS charakterisiert sind. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei Körpertemperatur diese morphologisch veränderte Population die einzige ist, die deutlich abnimmt, wogegen die der lebenden PS- FSC^{hoch} *L. major* und apoptotischen PS+ FSC^{niedrig} *L. major* zunehmen (Abb. 4-17). Der Wärmereiz scheint demnach entweder als Überlebenssignal zu wirken, so dass die morphologisch veränderten Zellen wieder zu ihrer ursprünglichen Morphologie zurückkehren (PS- FSC^{hoch}), oder aber, wenn die Zelle

schon zu sehr gestresst ist, endgültig durch Expression von PS in die Apoptose zu führen (PS+ FSC^{niedrig}) (Übersicht in Abb. 5–3, S. 81).

Die Annahme, dass Wärme nicht ausschließlich zur Apoptose von *L. major* führt, macht durchaus Sinn, da bei Infektion der Temperaturreiz die Umwandlung in die amastigote Form der *Leishmania* auslöst, also nicht per se schädlich für das weitere Überleben einer Leishmanie ist.¹⁷⁶ Erst wenn das Zellprogramm bereits nachhaltig gestört wäre, würden *Leishmania* durch einen hohen Temperaturreiz endgültig in die Apoptose eintreten.^{3,4,11} Bei Infektion anfälliger BALB/c Mäuse mit aufgereinigten PS- *L. major* kann nicht vorhergesehen werden, ob und welcher Anteil morphologisch veränderten PS- FSC^{niedrig} Parasiten in Apoptose tritt. Der Anteil apoptotischer *L. major* im Inokulat kann sich dadurch auch im aufgereinigten Inokulat lebender PS- *L. major* unvorhersehbar erhöhen und die Etablierung der Infektion begünstigen. Dies wäre eine Erklärung, warum einige BALB/c in der vorliegenden Arbeit wie erwartet klinisch unauffällig blieben, wenn apoptotische PS+ *L. major* während der Infektion fehlten, andere aber dennoch das volle Krankheitsbild entwickelten. Weiterführende Experimente, die den Beitrag der morphologisch gestressten PS- FSC^{niedrig} *L. major* Population an der Infektiösität des Inokulats im Detail klären, sind notwendig.

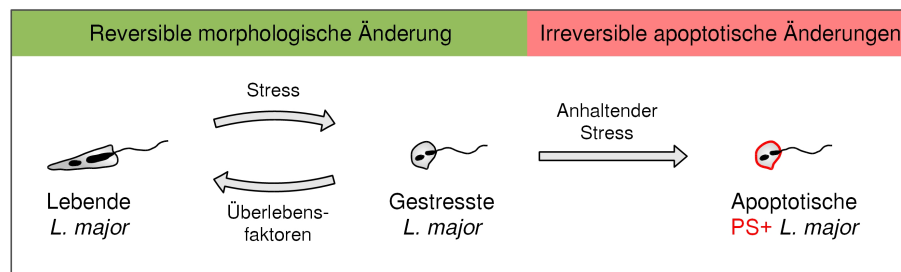


Abb. 5–3: Modell der Apoptose promastigoter *L. major*. Sind promastigote *L. major* zellulärem Stress wie Hitze ausgesetzt, ändert sich zunächst ihre Morphologie. Dieser Prozess ist reversibel, solange das Zellprogramm von *L. major* noch nicht nachhaltig gestört ist und geeignete Überlebensfaktoren vorliegen. Hält der zelluläre Stress an, geht *L. major* endgültig in Apoptose. Dieser Schritt ist irreversibel. Rot: Phosphatidylserin.

5.6 Anfälligkeit resistenter C57BL/6 Mäuse

Im Gegensatz zu anfälligen BALB/c Mäusen reagieren resistente C57BL/6 Mäuse auf eine *L. major*-Infektion grundsätzlich nur mit einer leichten Fußschwellung und können die Infektion letztendlich kontrollieren. Die vorliegende Arbeit stellte sich die Frage, ob die Depletion apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum dazu führt, dass sich selbst diese geringe Fußschwellung nicht ausbildet. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit apoptotischer PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion weder einen Einfluss auf die Fußschwellung und Leishmanienlast resistenter C57BL/6 Mäuse, noch auf die Expression von Chemokinen und Akkumulation von Effektorzellen der angeborenen Immunantwort im Infektionsgebiet hat (Abb. 4–18). Analog dazu induzierten apoptotische PS+ *L. major* in der Haut resistenter C57BL/6 Mäuse weder die krankheitsassoziierte Expression von IL4, IL10 oder Fc γ RIII, noch erhöhten sie krankheitsassoziiertes IgG1 im Serum (Abb. 4–19). Apoptotische PS+ *L. major* fördern demnach nicht die krankheitsassoziierte adaptive Immunantwort und Entzündung im Infektionsgebiet resistenter C57BL/6 Mäuse.

Dennoch gibt es in der Immunantwort auf eine Mischung lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* einen markanten Unterschied zwischen resistenten C57BL/6 und anfälligen BALB/c Mäusen. Im Gegensatz zur BALB/c konnten im Infektionsgebiet von C57BL/6 keine Neutrophilen detektiert werden (vgl. Gr1 in Abb. 4–18 und 4–4). In den vergangenen Jahren ist die Bedeutung von Neutrophilen als Wirtszelle für *L. major* und ihre Funktion in der Etablierung und im Verlauf von *L. major*-Infektionen gewachsen.^{42,124,129,161} Auch für einen viszeralen *Leishmania*-Stamm wurde nach Infektion eine Infiltration von Neutrophilen beobachtet, die vermutlich das Überleben der Parasiten begünstigt.¹⁵⁷ Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass insbesondere Neutrophile für die Etablierung der Infektion sowie den Fortgang und die Beeinflussbarkeit der Entzündung verantwortlich sind, also eine essentielle Voraussetzung für die Beeinflussbarkeit des Infektionsverlaufes durch apoptotische PS+ *L. major* bilden. Gestützt wird diese Annahme in der vorliegenden Arbeit durch Experimente an resistenten C57BL/6 Mäusen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass im Gegensatz zu

anfälligen BALB/c die Immunantwort in der Haut resistenter C57BL/6 sechs Wochen nach Infektion nicht verändert ist, wenn apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum vorhanden sind (4-18, 4-19). Die Analyse von Zellmarkern und Chemokinen zeigt aber, dass resistente C57BL/6 grundsätzlich in der Lage sind, auf eine Infektion entzündlich zu reagieren (Abb. 4-20, 4-21). Besonders auffällig ist, dass resistente C57BL/6 Mäuse weder nach einer konventionellen Infektion noch nach einer Infektion mit einem chronischen *L. major*-Stamm Neutrophile in die Haut zu rekrutieren (vergleiche Gr1-Expression in Abb. 4-4, 4-18 C, 4-21). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Parasiten in C57BL/6 Mäusen sehr schnell beseitigt werden und die Infektion früh im Keim erstickt wird, so dass keine dauerhafte Rekrutierung von Neutrophilen notwendig ist. Ursache hierfür könnte sein, dass Neutrophile resistenter C57BL/6 Mäuse von denen anfälliger BALB/c Mäuse verschieden sind und nicht durch apoptotische PS+ *L. major* beeinflusst werden können. Hierfür sprechen Studien, die beschreiben, dass die Wirkungsweise von Neutrophilen vom genetischen Hintergrund des Wirts abhängt. So zeigt eine Studie, dass sich Neutrophile von BALB/c und C57BL/6 genetisch hinsichtlich von Oberflächenintegrinen, Toll-Like-Rezeptoren und Zytokinen unterscheiden.²⁷ Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass Neutrophile in anfälligen BALB/c und resistenten C57BL/6 Mäusen unterschiedlich rekrutiert werden. So dominieren Neutrophile das Infiltrat anfälliger BALB/c während der ersten 12 Tage nach Infektion^{13,154} und eine Depletion zur Zeit der Infektion vermittelt partielle Resistenz.¹⁵⁶ Das Infiltrat resistenter C57BL/6 wird dagegen nur innerhalb der ersten Tage nach Infektion durch Neutrophile charakterisiert¹³ und eine Depletion von Neutrophilen zum Zeitpunkt der Infektion verstärkt das frühe Parasitenwachstum und die Pathologie der Läsionen.^{29,96,128,156} Da Neutrophile durch apoptotische PS+ *L. major* funktionell gehemmt werden,¹⁶¹ sind sie für apoptotische PS+ *L. major* essentiell, um auf die Entwicklung einer *L. major*-Infektion Einfluss nehmen zu können. Somit ist es denkbar, dass die in resistenten C57BL/6 Mäusen fehlende oder transiente Immigration von Neutrophilen in das Infektionsgebiet dafür verantwortlich ist, dass diese Mäuse durch apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum nicht beeinflusst werden.

Die vorliegenden Daten resistenter C57BL/6 Mäuse werfen darüber hinaus weitere Fragen auf. Beispielsweise stellt sich die Frage, inwiefern Neutrophile resistenter

C57BL/6 durch apoptotische PS+ *L. major* beeinflusst werden. Spannend ist auch, ob eine Infektion resistenter C57BL/6 mit *L. major* progressiv verlief, wenn Neutrophile anfälliger BALB/c in resistente C57BL/6 transferiert würden. In welcher Hinsicht Neutrophile resistenter C57BL/6 durch apoptotische PS+ Parasiten beeinflusst werden und welchen Einfluss der genetische Hintergrund auf die Wirkung apoptotischer *L. major* hat, müssen weitere Studien klären.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Leishmania major (*L. major*) ist ein in Säugetieren obligat intrazellulärer Parasit, der das wirtseigene System zur Beseitigung apoptotischer Zellen ausnutzt, um die eigene Infektion zu etablieren. Apoptotische Phosphatidylserin-positive (PS+) *L. major* hemmen *in vitro* die Aktivität von Neutrophilen und Makrophagen, ihren Wirtszellen, und sind *in vivo* für die gesteigerte Infektivität der gesamten Parasitenpopulation und den progressiven Infektionsverlauf anfälliger BALB/c Mäuse verantwortlich. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Fußschwellung anfälliger BALB/c Mäuse, die sich in Anwesenheit promastigoter apoptotischer PS+ *L. major* im Inokulum entwickelt, *in vivo* durch die gesteigerte Expression inflammatorischer Chemokine und die Einwanderung von dendritischen Zellen und Neutrophilen, nicht aber Makrophagen charakterisiert ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die Anwesenheit promastigoter apoptotischer PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion *in vivo* die IL4- und IL10-Expression in der Haut und dem drainierenden Lymphknoten sechs Wochen nach Infektion fördert. Da IL4 und IL10 sowohl die Ausbildung der protektiven IFN γ -Antwort als auch die Aktivierung der Makrophagen hemmen, sind diese Zytokine für den Erhalt der Infektion verantwortlich. Auch die Konzentration des mit IL4 assoziierten B-zellspezifische Antikörpers IgG1 im Serum wird durch promastigote apoptotische PS+ *L. major* sechs Wochen nach Infektion verstärkt. Promastigote apoptotische PS+ *L. major*

verstärken die Wirkung von IgG1 *in vivo* darüber hinaus, indem sie die Expression des IgG1-bindenden Fc γ RIII im Infektionsgebiet erhöhen.

Obwohl die T-zellspezifische Zytokinantwort entscheidend für den Ausgang einer *L. major*-Infektion ist, wird drei Tage nach Infektion *in vivo* weder das Ausmaß der erhöhten T-Zellproliferation in der T-Zellzone, noch die Expression der T-Zellzytokine IL4, IL10 und IFN γ durch promastigote apoptotische PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass die frühe Zytokinantwort keine Rolle in der Prägung der T-zellabhängigen Zytokinantwort der etablierten Infektion spielt. Dagegen führen promastigote apoptotische PS+ *L. major* zu Beginn der Infektion dazu, dass die Parasiten drei Tage nach Infektion bevorzugt im B-Zellareal des Lymphknotens lokalisieren. Möglicherweise führt dies bereits kurz nach Infektion dazu, dass B-Zellen aktiviert werden und ihren Antikörperisotyp zum krankheitsassoziierten IgG1 wechseln.

Die vorliegende Arbeit zeigt weiterhin, dass promastigote apoptotische PS+ *L. major in vivo* keine Auswirkung auf die Immunantwort der Haut resistenter C57BL/6 Mäuse haben. Im Vergleich zu anfälligen BALB/c Mäusen besteht der größte Unterschied darin, dass eine erhöhte Fußschwellung in C57BL/6 Mäusen nicht durch die Akkumulation von Neutrophilen charakterisiert ist. Da promastigote apoptotische PS+ *L. major* Neutrophile funktionell hemmen, ist die Infiltration der infizierten Haut mit Neutrophilen vermutlich die Ursache dafür, dass BALB/c Mäuse durch apoptotische PS+ *L. major* im Inokulum beeinflusst werden, C57BL/6 Mäuse dagegen nicht.

Literaturverzeichnis

1. AGA, E., KATSCHINSKI, D. M., VAN ZANDBERGEN, G., LAUFS, H., HANSEN, B., MÜLLER, K., SOLBACH, W., LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169, 2 (2002), 898–905.
2. ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., Hrsg. *Molecular Biology of the Cell*, 4. Aufl. Garland Science, 2002, Kap. 17 The Cell Cycle and Programmed Cell Death, 990–1026.
3. ALZATE, J. F., ALVAREZ-BARRIENTOS, A., GONZÁLEZ, V. M., JIMÉNEZ-RUIZ, A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis* 11, 2 (2006), 161–171.
4. ALZATE, J. F., ARIAS, A. A., MORENO-MATEOS, D., ALVAREZ-BARRIENTOS, A., JIMÉNEZ-RUIZ, A. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 152, 2 (2007), 192–202.
5. ANDERSON, C. F., MENDEZ, S., SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol* 174, 5 (2005), 2934–2941.
6. ANGELI, V., GINHOUX, F., LLODRÀ, J., QUEMENEUR, L., FRENETTE, P. S., SKOBE, M., JESSBERGER, R., MERAD, M., RANDOLPH, G. J. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity* 24, 2 (2006), 203–215.
7. ARAÚJO-SANTOS, J. M., GAMARRO, F., CASTANYS, S., HERRMANN, A., POMORSKI, T. Rapid transport of phospholipids across the plasma membrane of *Leishmania infantum*. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 1 (2003), 250–255.
8. ARNOULT, D., AKARID, K., GRODET, A., PETIT, P. X., ESTAQUIER, J., AMEISEN, J. C. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* 9, 1 (2002), 65–81.
9. ARROYO, A., MODRIANSKÝ, M., SERINKAN, F. B., BELLO, R. I., MATSURA, T., JIANG, J., TYURIN, V. A., TYURINA, Y. Y., FADEEL, B., KAGAN, V. E. NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance. *J Biol Chem* 277, 51 (2002), 49965–49975.
10. BALDWIN, T., HENRI, S., CURTIS, J., O'KEEFFE, M., VREMEC, D., SHORTMAN, K., HANDMAN, E. Dendritic cell populations in *Leishmania major*-infected skin and draining lymph nodes. *Infect Immun* 72, 4 (2004), 1991–2001.
11. BARCINSKI, M. A., SCHECHTMAN, D., QUINTAO, L. G., DE A COSTA, D., SOARES, L. R., MOREIRA, M. E., CHARLAB, R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of *Leishmania amazonensis* by protecting promastigotes from heat-induced death. *Infect Immun* 60, 9 (1992), 3523–3527.

12. BARTHELMANN, J., NIETSCH, J., BLESSENOHL, M., LASKAY, T., VAN ZANDBERGEN, G., WESTERMANN, J., KALIES, K. The protective Th1 response in mice is induced in the T-cell zone only three weeks after infection with *Leishmania major* and not during early T-cell activation. *Med Microbiol Immunol* (2011).
13. BEIL, W. J., MEINARDUS-HAGER, G., NEUGEBAUER, D. C., SORG, C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol* 52, 2 (1992), 135–142.
14. BELKAID, Y., HOFFMANN, K. F., MENDEZ, S., KAMHAWI, S., UDEY, M. C., WYNN, T. A., SACKS, D. L. The role of interleukin IL-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 194, 10 (2001), 1497–1506.
15. BELOSEVIC, M., FINBLOOM, D. S., MEIDE, P. H. V. D., SLAYTER, M. V., NACY, C. A. 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 (1989), 266–274.
16. BIEDERMANN, T., ZIMMERMANN, S., HIMMELRICH, H., GUMY, A., EGETER, O., SAKRAUSKI, A. K., SEEGMÜLLER, I., VOIGT, H., LAUNOIS, P., LEVINE, A. D., WAGNER, H., HEEG, K., LOUIS, J. A., RÖCKEN, M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol* 2, 11 (2001), 1054–1060.
17. BOLLINGER, A. *Leishmania major* promastigotes use phosphatidylserine for silencing of polymorphonuclear neutrophils. Doktorarbeit, University of Lübeck, Institute for Medical Microbiology and Hygiene, 2005.
18. BORST, P., HOEIJMAKERS, J. H. Kinetoplast DNA. *Plasmid* 2, 1 (1979), 20–40.
19. BOUDALY, S. Activation of dendritic cells by polymorphonuclear neutrophils. *Front Biosci* 14 (2009), 1589–1595.
20. BRETAGNE, S., DURAND, R., OLIVI, M., GARIN, J. F., SULAHIAN, A., RIVOLLET, D., VIDAUD, M., DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 4 (2001), 828–831.
21. BREWSTER, S., ASLETT, M., BARKER, D. C. Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitol Today* 14, 11 (1998), 437–438.
22. BROWN, D. C., GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40, 1 (2002), 2–11.
23. BROWN, D. R., REINER, S. L. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. *Infect Immun* 67, 1 (1999), 266–270.
24. CARRASCO, Y. R., BATISTA, F. D. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 1 (2007), 160–171.
25. CARRERA, L., GAZZINELLI, R. T., BADOLATO, R., HIENY, S., MULLER, W., KUHN, R., SACKS, D. L. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 183, 2 (1996), 515–526.
26. CHARMOY, M., BRUNNER-AGTEN, S., AEBISCHER, D., AUDERSET, F., LAUNOIS, P., MILON, G., PROUDFOOT, A. E. I., TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog* 6, 2 (2010), e1000755.

27. CHARMOY, M., MEGNEKOU, R., ALLENBACH, C., ZWEIFEL, C., PEREZ, C., MONNAT, K., BRETON, M., RONET, C., LAUNOIS, P., TACCHINI-COTTIER, F. Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol* 82, 2 (2007), 288–299.
28. CHATELAIN, R., VARKILA, K., COFFMAN, R. L. IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice. *J Immunol* 148, 4 (1992), 1182–1187.
29. CHEN, L., ZHANG, Z.-H., WATANABE, T., YAMASHITA, T., KOBAYAKAWA, T., KANEKO, A., FUJIWARA, H., SENDO, F. The involvement of neutrophils in the resistance to Leishmania major infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int* 54, 2 (2005), 109–118.
30. CHTANOVA, T., SCHAEFFER, M., HAN, S.-J., VAN DOOREN, G. G., NOLLMANN, M., HERZMARK, P., CHAN, S. W., SATIJA, H., CAMFIELD, K., AARON, H., STRIPEP, B., ROBEY, E. A. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29, 3 (2008), 487–496.
31. CHUNG, E. Y., KIM, S. J., MA, X. J. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res* 16, 2 (2006), 154–161.
32. COFFMAN, R. L., SAVELKOUL, H. F., LEBMAN, D. A. Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. *Semin Immunol* 1, 1 (1989), 55–63.
33. COLMENARES, M., CONSTANT, S. L., KIMA, P. E., MCMAHON-PRATT, D. Leishmania pifanoi pathogenesis: selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. *Infect Immun* 70, 12 (2002), 6597–6605.
34. COOK, D. N. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 59, 1 (1996), 61–66.
35. CROFT, M., SWAIN, S. L. B cell response to T helper cell subsets. II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extent and nature of helper activity. *J Immunol* 147, 11 (1991), 3679–3689.
36. DALEY, J. M., THOMAY, A. A., CONNOLLY, M. D., REICHNER, J. S., ALBINA, J. E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83, 1 (2008), 64–70.
37. DE FREITAS BALANCO, J. M., MOREIRA, M. E., BONOMO, A., BOZZA, P. T., AMARANTE-MENDES, G., PIRMEZ, C., BARCINSKI, M. A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 11, 23 (2001), 1870–1873.
38. DEPONTE, M. Programmed cell death in protists. *Biochim Biophys Acta* 1783, 7 (2008), 1396–1405.
39. DIPIETRO, L. A., BURDICK, M., LOW, Q. E., KUNKEL, S. L., STRIETER, R. M. MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest* 101, 8 (1998), 1693–1698.
40. DORNER, B. G., SCHEFFOLD, A., ROLPH, M. S., HUSER, M. B., KAUFMANN, S. H. E., RADBRUCH, A., FLESCH, I. E. A., KROCZEK, R. A. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9 (2002), 6181–6186.
41. DOS SANTOS, M. S. T., CARDOSO, L. P. V., NASCIMENTO, G. R., DE SOUSA LINO, R., DORTA, M. L., DE OLIVEIRA, M. A. P., RIBEIRO-DIAS, F. 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 (2008), 403–410.

42. ESMANN, L., IDEL, C., SARKAR, A., HELLBERG, L., BEHNEN, M., MÖLLER, S., VAN ZANDBERGEN, G., KLINGER, M., KÖHL, J., BUSSMEYER, U., SOLBACH, W., LASKAY, T. Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells. *J Immunol* 184, 1 (2010), 391–400.
43. FADOK, V. A., BRATTON, D. L., FRASCH, S. C., WARNER, M. L., HENSON, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5, 7 (1998), 551–562.
44. FADOK, V. A., BRATTON, D. L., KONOWAL, A., FREED, P. W., WESTCOTT, J. Y., HENSON, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 4 (1998), 890–898.
45. FARIA, M. S., REIS, F. C. G., AZEVEDO-PEREIRA, R. L., MORRISON, L. S., MOTTRAM, J. C., LIMA, A. P. C. A. Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. *J Immunol* 186, 1 (2011), 411–422.
46. FINKELMAN, F. D., HOLMES, J., KATONA, I. M., URBAN, J. F., BECKMANN, M. P., PARK, L. S., SCHOOLEY, K. A., COFFMAN, R. L., MOSMANN, T. R., PAUL, W. E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 8 (1990), 303–333.
47. FLEMING, T. J., FLEMING, M. L., MALEK, T. R. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151, 5 (1993), 2399–2408.
48. GAO, Y., HERNDON, J. M., ZHANG, H., GRIFFITH, T. S., FERGUSON, T. A. Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med* 188, 5 (1998), 887–896.
49. GILLITZER, R., GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69, 4 (2001), 513–521.
50. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 1 (2003), 23–35.
51. GREGORY, C. D., DEVITT, A. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology* 113, 1 (2004), 1–14.
52. GUY, R. A., BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of Leishmania major amastigotes into macrophages. *Infect Immun* 61, 4 (1993), 1553–1558.
53. HASLETT, C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin Sci (Lond)* 83, 6 (1992), 639–648.
54. HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br Med Bull* 53, 3 (1997), 669–683.
55. HEINZEL, F. P., SADICK, M. D., HOLADAY, B. J., COFFMAN, R. L., LOCKSLEY, R. M. 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 (1989), 59–72.
56. HEINZEL, F. P., SADICK, M. D., MUTHA, S. S., LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 16 (1991), 7011–7015.
57. HENRI, S., CURTIS, J., HOCHREIN, H., VREMEC, D., SHORTMAN, K., HANDMAN, E. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by Leishmania major: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun* 70, 7 (2002), 3874–3880.

58. HENSON, P. M., BRATTON, D. L., FADOK, V. A. The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 8 (2001), 627–633.
59. HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 9185 (1999), 1191–1199.
60. HIMMELRICH, H., LAUNOIS, P., MAILLARD, I., BIEDERMANN, T., TACCHINI-COTTIER, F., LOCKSLEY, R. M., RÖCKEN, M., LOUIS, J. A. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J Immunol* 164, 9 (2000), 4819–4825.
61. HOERAUF, A., RÖLLINGHOFF, M., SOLBACH, W. Co-transfer of B cells converts resistance into susceptibility in T cell-reconstituted, *Leishmania major*-resistant C.B-17 scid mice by a non-cognate mechanism. *Int Immunol* 8, 10 (1996), 1569–1575.
62. HOERAUF, A., SOLBACH, W., LOHOFF, M., RÖLLINGHOFF, M. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. *Int Immunol* 6, 8 (1994), 1117–1124.
63. HOLSCHER, C., ARENDSE, B., SCHWEGMANN, A., MYBURGH, E., BROMBACHER, F. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol* 176, 2 (2006), 1115–21.
64. IEZZI, G., FROHLICH, A., ERNST, B., AMPENBERGER, F., SAELAND, S., GLAICHENHAUS, N., KOPF, M. Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection. *J Immunol* 177, 2 (2006), 1250–6.
65. INIESTA, V., CORRALIZA, I., CARCELÉN, J., GORDO, L. G., FERNÁNDEZ-COTRINA, J., PAREJO, J. C., CARRIÓN, J., SOTO, M., ALONSO, C., NIETO, C. G. *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite. *Parasitol Res* 102, 5 (2008), 887–893.
66. ITANO, A. A., MCSORLEY, S. J., REINHARDT, R. L., EHST, B. D., INGULLI, E., RUDENSKY, A. Y., JENKINS, M. K. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19, 1 (2003), 47–57.
67. JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. J. *Immunobiology*. Garland Publishing, 2004, Kap. 2 Innate Immunity, 37–102.
68. JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. J. *Immunobiology*, 6. Aufl. Garland Publishing, 2004, Kap. 1 Basic Concepts in Immunology, 1–36.
69. JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. J. *Immunobiology*, 6. Aufl. Garland Publishing, 2004, Kap. 6 Signaling Through Immune System Receptors, 203–240.
70. JHINGRAN, A., CHATTERJEE, M., MADHUBALA, R. *Leishmania: After the Genome*, 1. Aufl. Caister Academic Press, 2008, Kap. 1 Leishmaniasis: Epidemiological Trends and Diagnosis, 1–14.
71. JOCHIM, R. C., TEIXEIRA, C. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol* 25, 4 (2009), 145–147.
72. JUNT, T., MOSEMAN, E. A., IANACONE, M., MASSBERG, S., LANG, P. A., BOES, M., FINK, K., HENRICKSON, S. E., SHAYAKHMETOV, D. M., PAOLO, N. C. D., VAN ROOIJEN, N., MEMPEL, T. R., WHELAN, S. P., VON ANDRIAN, U. H. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 7166 (2007), 110–114.

73. KAGAN, V. E., GLEISS, B., TYURINA, Y. Y., TYURIN, V. A., ELENSTRÖM-MAGNUSSON, C., LIU, S.-X., SERINKAN, F. B., ARROYO, A., CHANDRA, J., ORRENIUS, S., FADEEL, B. A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 169, 1 (2002), 487–499.
74. KANE, M. M., MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 166, 2 (2001), 1141–7.
75. KEHRY, M. R., HODGKIN, P. D. Helper T cells: delivery of cell contact and lymphokine-dependent signals to B cells. *Semin Immunol* 5, 6 (1993), 393–400.
76. KERR, J. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 4 (1972), 239–257.
77. KIM, S., CHUNG, E. Y., MA, X. Immunological consequences of macrophage-mediated clearance of apoptotic cells. *Cell Cycle* 4, 2 (2005), 231–234.
78. KIM, S., ELKON, K. B., MA, X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 21, 5 (2004), 643–653.
79. KIMA, P. E., CONSTANT, S. L., HANNUM, L., COLMENARES, M., LEE, K. S., HABERMAN, A. M., SHLOMCHIK, M. J., MCMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 191, 6 (2000), 1063–1068.
80. KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13 (2008), 2400–2407.
81. KOCH, A. E., KUNKEL, S. L., HARLOW, L. A., MAZARAKIS, D. D., HAINES, G. K., BURDICK, M. D., POPE, R. M., STRIETER, R. M. Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 93, 3 (1994), 921–928.
82. KOPF, M., GROS, G. L., BACHMANN, M., LAMERS, M. C., BLUETHMANN, H., KÖHLER, G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 6417 (1993), 245–248.
83. KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 6805 (2000), 789–795.
84. LANG, R., PATEL, D., MORRIS, J. J., RUTSCHMAN, R. L., MURRAY, P. J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 169, 5 (2002), 2253–2263.
85. LASKAY, T., VAN ZANDBERGEN, G., SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 213, 3-4 (2008), 183–191.
86. LAUBER, K., BOHN, E., KRÖBER, S. M., JIN XIAO, Y., BLUMENTHAL, S. G., LINDEMANN, R. K., MARINI, P., WIEDIG, C., ZOBYWALSKI, A., BAKSH, S., XU, Y., AUTENRIETH, I. B., SCHULZE-OSTHOFF, K., BELKA, C., STUHLER, G., WESSELBORG, S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113, 6 (2003), 717–730.
87. LAUFS, H., MÜLLER, K., FLEISCHER, J., REILING, N., JAHNKE, N., JENSENIUS, J. C., SOLBACH, W., LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 70, 2 (2002), 826–835.

88. LAUNOIS, P., GUMY, A., HIMMELRICH, H., LOCKSLEY, R. M., RÖCKEN, M., LOUIS, J. A. Rapid IL-4 production by Leishmania homolog of mammalian RACK1-reactive CD4(+) T cells in resistant mice treated once with anti-IL-12 or -IFN-gamma antibodies at the onset of infection with Leishmania major instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions. *J Immunol* 168, 9 (2002), 4628–4635.
89. LAUNOIS, P., OHTEKI, T., SWIHART, K., MACDONALD, H. R., LOUIS, J. A. In susceptible mice, Leishmania major induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1-. *Eur J Immunol* 25, 12 (1995), 3298–3307.
90. LAWYER, P. G., NGUMBI, P. M., ANJILI, C. O., ODONGO, S. O., MEBRAHTU, Y. B., GITHURE, J. I., KOECH, D. K., ROBERTS, C. R. Development of Leishmania major in Phlebotomus duboscqi and Sergentomyia schwetzi (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 43, 1 (1990), 31–43.
91. LEBRE, M. C., BURWELL, T., VIEIRA, P. L., LORA, J., COYLE, A. J., KAPSENBERG, M. L., CLAUSEN, B. E., DE JONG, E. C. Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol Cell Biol* 83, 5 (2005), 525–35.
92. LEE, N., BERTHOLET, S., DEBRABANT, A., MULLER, J., DUNCAN, R., NAKHASI, H. L. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania. *Cell Death Differ* 9, 1 (2002), 53–64.
93. LENARDO, M., CHAN, K. M., HORNUNG, F., MCFARLAND, H., SIEGEL, R., WANG, J., ZHENG, L. Mature T lymphocyte apoptosis—immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17 (1999), 221–253.
94. LEY, K. Arrest chemokines. *Microcirculation* 10, 3-4 (2003), 289–295.
95. LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 5 (2003), 361–370.
96. LIMA, G. M., VALLOCHI, A. L., SILVA, U. R., BEVILACQUA, E. M., KIFFER, M. M., ABRAHAMSOHN, I. A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* 64, 2-3 (1998), 145–151.
97. MALETTO, B. A., ROPOLO, A. S., ALIGNANI, D. O., LISCOVSKY, M. V., RANOCCHIA, R. P., MORON, V. G., PISTORESÌ-PALENCIA, M. C. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 108, 9 (2006), 3094–3102.
98. MARTIN, S. J., REUTELINGSPERGER, C. P., MCGAHON, A. J., RADER, J. A., VAN SCHIE, R. C., LAFACE, D. M., GREEN, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidyserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 5 (1995), 1545–1556.
99. MAURER, M., VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 10 (2004), 1882–1886.
100. MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140, 6 (2010), 771–776.
101. MEHTA, A., SHAHA, C. Apoptotic death in Leishmania donovani promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* 279, 12 (2004), 11798–11813.
102. MENTEN, P., WUYTS, A., DAMME, J. V. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 6 (2002), 455–481.

103. MILES, S. A., CONRAD, S. M., ALVES, R. G., JERONIMO, S. M. B., MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201, 5 (2005), 747–754.
104. MISSLITZ, A. C., BONHAGEN, K., HARBECKE, D., LIPPUNER, C., KAMRADT, T., AEBISCHER, T. Two waves of antigen-containing dendritic cells in vivo in experimental *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 34, 3 (2004), 715–725.
105. MOORE, K. W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R. L., O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19 (2001), 683–765.
106. MOREIRA, M. E., PORTILLO, H. A. D., MILDER, R. V., BALANCO, J. M., BARCINSKI, M. A. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol* 167, 2 (1996), 305–313.
107. MOSER, B. Chemokines: role in immune cell traffic. *Eur Cytokine Netw* 14, 4 (2003), 204–210.
108. MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A., COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 7 (1986), 2348–2357.
109. MUKHERJEE, S. B., DAS, M., SUDHANDIRAN, G., SHAHA, C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem* 277, 27 (2002), 24717–24727.
110. MULLER, K., VAN ZANDBERGEN, G., HANSEN, B., LAUFS, H., JAHNKE, N., SOLBACH, W., LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 190, 1-2 (2001), 73–6.
111. NGUEWA, P. A., FUERTES, M. A., IBORRA, S., NAJAJREH, Y., GIBSON, D., MARTÍNEZ, E., ALONSO, C., PÉREZ, J. M. Water soluble cationic trans-platinum complexes which induce programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania infantum*. *J Inorg Biochem* 99, 3 (2005), 727–736.
112. NICOLAS, L., PRINA, E., LANG, T., MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 40, 5 (2002), 1666–1669.
113. NICOLAS, L., SIDJANSKI, S., COLLE, J.-H., MILON, G. *Leishmania major* Reaches Distant Cutaneous Sites Where It Persists Transiently while Persisting Durably in the Primary Dermal Site and Its Draining Lymph Node: a Study with Laboratory Mice. *Infect Immun* 68, 12 (2000), 6561–6566.
114. NIETSCH, J. *Die frühe Chemokin- und Zytokinexpression nach einer Infektion mit Leishmania major im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens ist nicht entscheidend für den späteren Krankheitsverlauf*. Doktorarbeit, Universität zu Lübeck, Institut für Anatomie, 2010.
115. NIMMERJAHN, F., RAVETCH, J. V. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 1 (2006), 19–28.
116. NIMMERJAHN, F., RAVETCH, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 1 (2008), 34–47.
117. NOBEN-TRAUTH, N., LIRA, R., NAGASE, H., PAUL, W. E., SACKS, D. L. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol* 170, 10 (2003), 5152–5158.

118. PADIGEL, U. M., FARRELL, J. P. Control of Infection with *Leishmania major* in Susceptible BALB/c Mice Lacking the Common gamma-Chain for FcR Is Associated with Reduced Production of IL-10 and TGF-beta by Parasitized Cells. *J Immunol* 174, 10 (2005), 6340–6345.
119. PAPE, K. A., CATRON, D. M., ITANO, A. A., JENKINS, M. K. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26, 4 (2007), 491–502.
120. PARIS, C., LOISEAU, P. M., BORIES, C., BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3 (2004), 852–859.
121. PESTKA, S., KRAUSE, C. D., SARKAR, D., WALTER, M. R., SHI, Y., FISHER, P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 22 (2004), 929–979.
122. PETERS, L. L., CHEEVER, E. M., ELLIS, H. R., MAGNANI, P. A., SVENSON, K. L., SMITH, R. V., BOGUE, M. A. Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice. *Physiol Genomics* 11, 3 (2002), 185–193.
123. PETERS, N. C., EGEN, J. G., SECUNDINO, N., DEBRABANT, A., KIMBLIN, N., KAMHAWI, S., LAWYER, P., FAY, M. P., GERMAIN, R. N., SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 5891 (2008), 970–974.
124. PETERS, N. C., SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* 11, 9 (2009), 1290–1296.
125. REINER, S. L., LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. *J Cell Biochem* 53, 4 (1993), 323–328.
126. REINER, S. L., LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13 (1995), 151–177.
127. REINER, S. L., ZHENG, S., WANG, Z. E., STOWRING, L., LOCKSLEY, R. M. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 179, 2 (1994), 447–456.
128. RIBEIRO-GOMES, F. L., OTERO, A. C., GOMES, N. A., MONIZ-DE-SOUZA, M. C. A., CYSNE-FINKELSTEIN, L., ARNHOLDT, A. C., CALICH, V. L., COUTINHO, S. G., LOPES, M. F., DOSREIS, G. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172, 7 (2004), 4454–4462.
129. RITTER, U., FRISCHKNECHT, F., VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol* 25 (2009), 505–510.
130. RITTER, U., KÖRNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 24, 6 (2002), 295–301.
131. RINET, C., TORRE, Y. H.-L., REVAZ-BRETON, M., MASTELIC, B., TACCHINI-COTTIER, F., LOUIS, J., LAUNOIS, P. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol* 184, 2 (2010), 886–894.
132. RINET, C., VOIGT, H., HIMMELRICH, H., DOUCEY, M.-A., TORRE, Y. H.-L., REVAZ-BRETON, M., TACCHINI-COTTIER, F., BRON, C., LOUIS, J., LAUNOIS, P. *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice. *J Immunol* 180, 7 (2008), 4825–4835.

133. ROY, A., GANGULY, A., BOSEDASGUPTA, S., DAS, B. B., PAL, C., JAISANKAR, P., MAJUMDER, H. K. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol* 74, 5 (2008), 1292–1307.
134. SACKS, D., LAWYER, P., KAMHAWI, S. *Leishmania: After the Genome*, 1. Aufl. Caister Academic Press, 2008, Kap. 10 The Biology of Leishmania-Sandfly Interactions, 205–238.
135. SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2, 11 (2002), 845–858.
136. SACKS, D., SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3, 11 (2002), 1041–1047.
137. SACKS, D. L., PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania promastigotes*. *Science* 223, 4643 (1984), 1417–1419.
138. SACKS, D. L., SCOTT, P. A., ASOFSKY, R., SHER, F. A. Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *J Immunol* 132, 4 (1984), 2072–2077.
139. SADICK, M. D., HEINZEL, F. P., HOLADAY, B. J., PU, R. T., DAWKINS, R. S., LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J Exp Med* 171, 1 (1990), 115–127.
140. SADICK, M. D., STREET, N., MOSMANN, T. R., LOCKSLEY, R. M. Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. *Infect Immun* 59, 12 (1991), 4710–4714.
141. SAVILL, J., DRANSFIELD, I., GREGORY, C., HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2, 12 (2002), 965–975.
142. SAVILL, J., FADOK, V., HENSON, P., HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14, 3 (1993), 131–136.
143. SAVILL, J. S., WYLLIE, A. H., HENSON, J. E., WALPORT, M. J., HENSON, P. M., HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83, 3 (1989), 865–75.
144. SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 147, 9 (1991), 3149–55.
145. SCOTT, P., EATON, A., GAUSE, W. C., DI ZHOU, X., HONDOWICZ, B. Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*. *Exp Parasitol* 84, 2 (1996), 178–87.
146. SEN, N., DAS, B. B., GANGULY, A., MUKHERJEE, T., BANDYOPADHYAY, S., MAJUMDER, H. K. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279, 50 (2004), 52366–52375.
147. SHAPIRO, T. A., ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 49 (1995), 117–143.
148. SHEA-DONOHUE, T., THOMAS, K., CODY, M. J., ZHAO, A., DETOLLA, L. J., KOPYDLOWSKI, K. M., FUKATA, M., LIRA, S. A., VOGEL, S. N. Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immun* 14, 2 (2008), 117–124.

149. SHER, A., SACKS, D. L., SCOTT, P. A. Host and parasite factors influencing the expression of cutaneous leishmaniasis. *Ciba Found Symp* 99 (1983), 174–189.
150. SIEGEL, R. M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 6, 4 (2006), 308–17.
151. SOMMER, F., MEIXNER, M., MANNHERZ, M., OGILVIE, A. L., RÖLLINGHOFF, M., LOHOFF, M. Analysis of cytokine patterns produced by individual CD4+ lymph node cells during experimental murine leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Int Immunol* 10, 12 (1998), 1853–1861.
152. SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 2 (1994), 301–314.
153. STETSON, D. B., MOHRS, M., MALLET-DESIGNE, V., TEYTON, L., LOCKSLEY, R. M. Rapid expansion and IL-4 expression by Leishmania-specific naive helper T cells in vivo. *Immunity* 17, 2 (2002), 191–200.
154. SUNDERKÖTTER, C., KUNZ, M., STEINBRINK, K., MEINARDUS-HAGER, G., GOEBELER, M., BILDAU, H., SORG, C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol* 151, 9 (1993), 4891–4901.
155. SYPEK, J. P., CHUNG, C. L., MAYOR, S. E., SUBRAMANYAM, J. M., GOLDMAN, S. J., SIEBURTH, D. S., WOLF, S. F., SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 177, 6 (1993), 1797–802.
156. TACCHINI-COTTIER, F., ZWEIFEL, C., BELKAID, Y., MUKANKUNDIYE, C., VASEI, M., LAUNOIS, P., MILON, G., LOUIS, J. A. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 165, 5 (2000), 2628–2636.
157. THALHOFER, C. J., CHEN, Y., SUDAN, B., LOVE-HOMAN, L., WILSON, M. E. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi. *Infect Immun* 79, 1 (2011), 108–117.
158. THOMAS, B. N., BUXBAUM, L. U. FcγRIII Mediates Immunoglobulin G-Induced Interleukin-10 and Is Required for Chronic *Leishmania mexicana* Lesions. *Infect Immun* 76, 2 (2008), 623–631.
159. TRIPATHI, A., GUPTA, C. M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 128, 1 (2003), 1–9.
160. VALLÉ, A., ZUBER, C. E., DEFRANCE, T., DJOSSOU, O., RIE, M. D., BANCHEREAU, J. Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4. *Eur J Immunol* 19, 8 (1989), 1463–1467.
161. 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. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 37 (2006), 13837–13842.
162. VAN ZANDBERGEN, G., HERMANN, N., LAUFS, H., SOLBACH, W., LASKAY, T. *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 (2002), 4177–84.

163. VAN ZANDBERGEN, G., KLINGER, M., MUELLER, A., DANNENBERG, S., GEBERT, A., SOLBACH, W., LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173, 11 (2004), 6521–5.
164. VANCE, J. E., STEENBERGEN, R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* 44, 4 (2005), 207–234.
165. VOLL, R. E., HERRMANN, M., ROTH, E. A., STACH, C., KALDEN, J. R., GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 6658 (1997), 350–351.
166. VON STEBUT, E., BELKAID, Y., NGUYEN, B., WILSON, M., SACKS, D. L., UDEY, M. C. Skin-derived macrophages from *Leishmania* major-susceptible mice exhibit interleukin-12- and interferon-gamma-independent nitric oxide production and parasite killing after treatment with immunostimulatory DNA. *J Invest Dermatol* 119, 3 (2002), 621–628.
167. VON STEBUT, E., BELKAID, Y., NGUYEN, B. V., CUSHING, M., SACKS, D. L., UDEY, M. C. *Leishmania* major-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous Leishmaniasis. *Eur J Immunol* 30, 12 (2000), 3498–3506.
168. WAKIL, A. E., WANG, Z. E., RYAN, J. C., FOWELL, D. J., LOCKSLEY, R. M. Interferon gamma derived from CD4(+) T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. *J Exp Med* 188, 9 (1998), 1651–1656.
169. WANASEN, N., XIN, L., SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol* 38, 3-4 (2008), 417–429.
170. WANDERLEY, J. L. M., DA SILVA, L. H. P., DEOLINDO, P., SOONG, L., BORGES, V. M., PRATES, D. B., DE SOUZA, A. P. A., BARRAL, A., DE FREITAS BALANCO, J. M., DO NASCIMENTO, M. T. C., SARAIVA, E. M., BARCINSKI, M. A. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. *PLoS One* 4, 5 (2009), e5733.
171. WANDERLEY, J. L. M., MOREIRA, M. E. C., BENJAMIN, A., BONOMO, A. C., BARCINSKI, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* 176, 3 (2006), 1834–1839.
172. WENZEL, U. A. *Stage specific interactions of Leishmania major with host phagocytes*. Doktorarbeit, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Department of Molecular Infection Biology, Division of Microbial Interface Biology, 2009.
173. WOELBING, F., KOSTKA, S. L., MOELLE, K., BELKAID, Y., SUNDERKOETTER, C., VERBEEK, S., WAISMAN, A., NIGG, A. P., KNOP, J., UDEY, M. C., VON STEBUT, E. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203, 1 (2006), 177–188.
174. WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 5756 (1980), 555–556.
175. ZANGGER, H., MOTTRAM, J. C., FASEL, N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 9, 10 (2002), 1126–1139.
176. ZILBERSTEIN, D. *Leishmania: After the Genome*, 1. Aufl. Caister Academic Press, 2008, Kap. 6 Physiological and Biochemical Aspects of *Leishmania* Development, 107–122.

Abbildungsverzeichnis

1-1	Lebenszyklus von <i>L. major</i>	3
1-2	Einfluss von Apoptose auf die Etablierung der Infektion	12
4-1	MACS einer promastigoten <i>L. major</i> -Kultur	34
4-2	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verstärken die Fußschwellung	35
4-3	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> erhöhen die Leishmanienlast in Haut und Lymphknoten	36
4-4	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> steigern die Akkumulation dendritischer Zellen und Neutrophiler in der Haut	38
4-5	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> induzieren in der Haut eine leichte Erhöhung der inflammatorischen Chemokine KC und MIP1 α	39
4-6	PS+ <i>L. major</i> erhöhen die Expression des IgG1-bindenden Fc γ RIII in der Haut	40
4-7	PS+ <i>L. major</i> induzieren leishmanienspezifisches IgG1 im Serum	42
4-8	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verstärken die Expression der krankheitsassoziierten Zytokine IL4 und IL10 in der Haut	43
4-9	PS+ <i>L. major</i> verstärken die Expression von IL10	44
4-10	Ki-67+ T-Zellen proliferieren im T-Zellareal nach 3 Tagen unabhängig von der Zusammensetzung des Inokulums	46
4-11	Lasermikrodissektion ermöglicht die saubere Trennung von T- und B-Zellzone	47
4-12	Die Zytokinexpression in der T-Zellzone ist drei Tage nach Infektion noch nicht festgelegt	48
4-13	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verschieben die relative Leishmanienlokalisation in anfälligen BALB/c nach drei Tagen zugunsten der B-Zellzone	49
4-14	Leishmanientrümmen werden im pLK schnell beseitigt	51
4-15	Die Reduktion der Gesamtinfektionsdosis hat keinen Einfluss auf die Erkrankungsquote	53
4-16	PS- <i>L. major</i> unterteilen sich in FSC ^{hoch} und FSC ^{niedrig}	55

4-17	Ein Teil der gestressten PS- FSC ^{niedrig} <i>L. major</i> -Population tritt bei Körpertemperatur in Apoptose	57
4-18	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verstärken nicht die Schwellung und Entzündung des infizierten Fußes in resistenten C57BL/6	59
4-19	Apoptotische PS+ <i>L. major</i> verstärken nicht die Fc γ R-Expression und adaptive Immunantwort in der Haut resistenter C57BL/6	60
4-20	Der <i>L. major</i> Stamm <i>Lm</i> /SD persistiert im Infektionsgebiet und induziert einen chronischen Verlauf	62
4-21	Der <i>L. major</i> Stamm <i>Lm</i> /SD rekrutiert langfristig keine Neutrophilen in das Infektionsgebiet	63
5-1	Überblick über den Einfluss apoptotischer PS+ <i>L. major</i> während der Infektion auf die Immunantwort im Infektionsgebiet und Serum	75
5-2	Überblick über den Einfluss apoptotischer PS+ <i>L. major</i> während der Infektion auf die Immunantwort im Lymphknoten	76
5-3	Modell der Apoptose promastigoter <i>L. major</i>	81
A-1	Der <i>L. major</i> Stamm <i>Lm</i> /SD induziert Zytokine, leishmanienspezifische IgGs und Fc γ -Rezeptoren in der Haut verzögert	102
A-2	Ein höherer Anteil apoptotischer PS+ <i>L. major</i> verschlechtert das Ausmaß der Erkrankung anfälliger BALB/c nicht	103

Anhang A

Ergänzende Daten

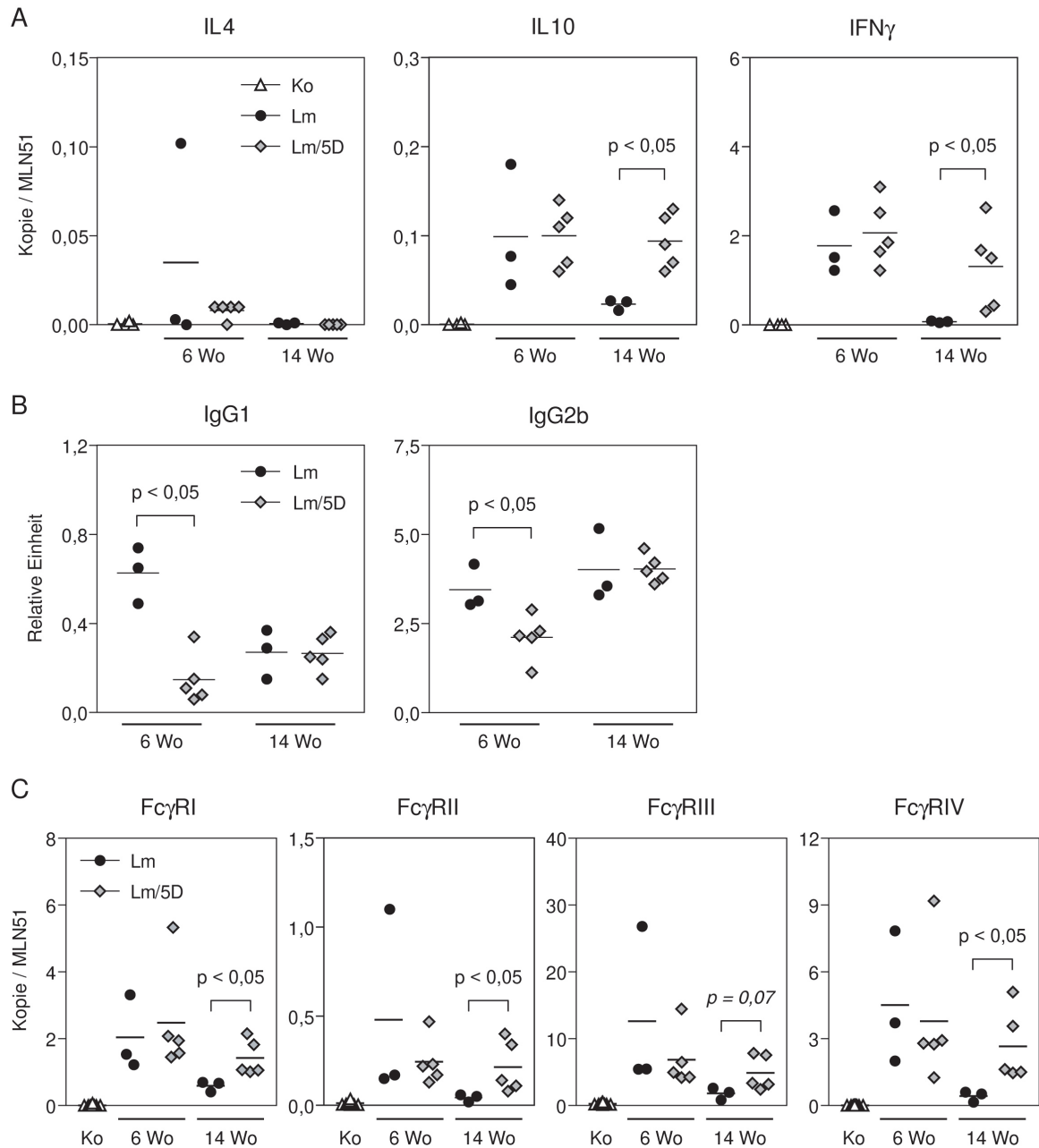
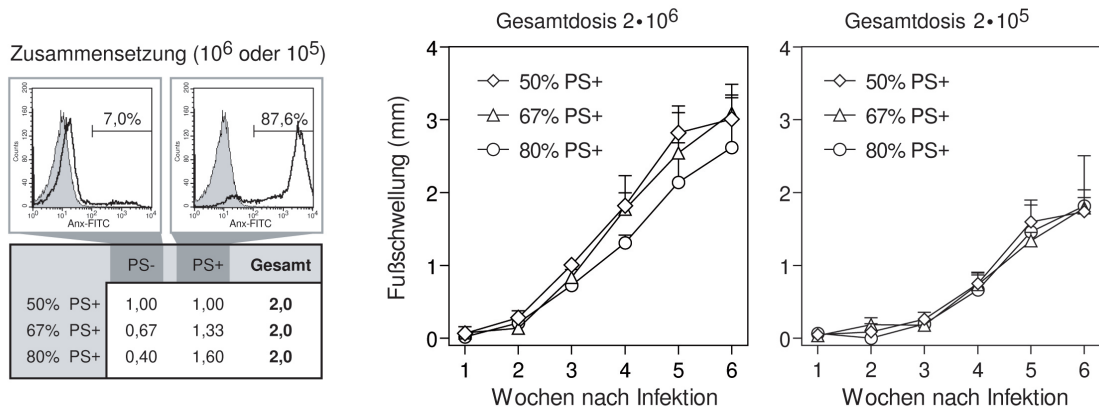


Abb. A–1: Der *L. major* Stamm *Lm*/SD induziert Zytokine, leishmanienspezifische IgGs und Fc γ -Rezeptoren in der Haut verzögert. Haut wurde 6 und 14 Wochen nach Infektion entnommen und die Zytokine IL4, IL10 und IFN γ mittels Real-Time PCR bestimmt (A). Serum wurde 6 und 14 Wochen nach Infektion entnommen und IgG1, IgG2a und IgG2b mittels ELISA bestimmt (B). Haut wurde 6 und 14 Wochen nach Infektion entnommen und die mRNA-Expression der Fc γ -Rezeptoren I bis IV mittels Real-Time PCR analysiert (C). Dargestellt sind die Einzelwerte pro Tier und der Mittelwert, $n \geq 3$.

A Gesamtinfektionsdosis konstant – Dosis lebender *Lm* PS- variabel



B Gesamtinfektionsdosis variabel – Dosis lebender *Lm* PS- konstant

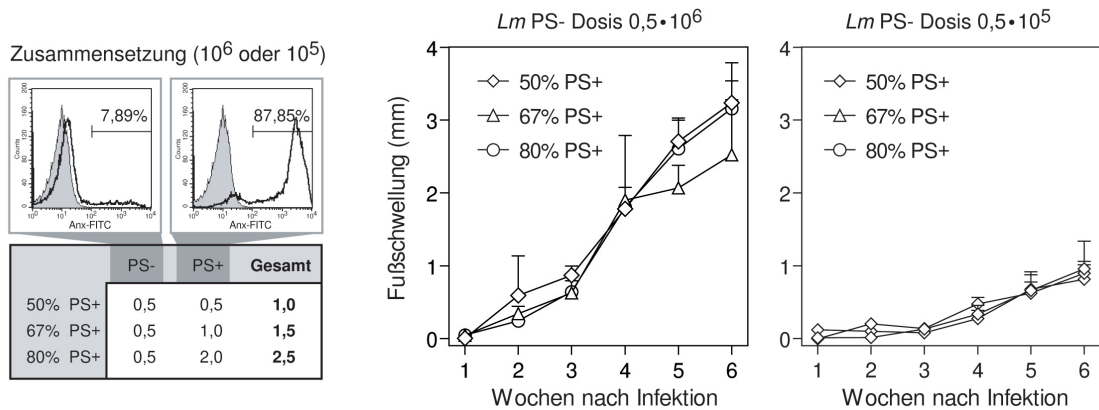


Abb. A-2: Ein höherer Anteil apoptotischer PS+ *L. major* verschlechtert das Ausmaß der Erkrankung anfälliger BALB/c nicht. A: Gesamtinfektionsdosis konstant, steigender relativer Anteil apoptotischer PS+ *L. major*. B: Gesamtinfektionsdosis variabel, konstante Dosis lebender PS- *L. major*, steigende Dosis apoptotischer PS+ *L. major*. A + B: Links: Zusammensetzung der Inokulate (Tabelle). Annexin-Histogramme lebender PS- und apoptotischer PS+ *L. major* vor Zusammensetzung der Inokulate sind gezeigt, grau: nicht gefärbt, schwarz: Annexin V gefärbt. Mitte, rechts: Dokumentation der Fußschwellung nach Hochdosis- (Mitte) oder Niedrigdosisinfektion (rechts) anfälliger BALB/c. Mittelwert + Standardabweichung, n = 3.

Anhang B

Publikationen und Kongresse

Publikationen

- **BARTHELMANN J**, NIETSCH J, BLESSENOHL M, LASKAY T, VAN ZANDBERGEN G, WESTERMANN J, KALIES K. The protective Th1 response in mice is induced in the T-cell zone only three weeks after infection with *Leishmania major* and not during early T-cell activation. *Med Microbiol Immunol*, published online 06 May 2011, 1–11.
- KALIES K, KÖNIG P, ZHANG YM, DEIERLING M, **BARTHELMANN J**, STAMM C, WESTERMANN J. Nonoverlapping expression of IL10, IL12p40, and IFN γ mRNA in the marginal zone and T cell zone of the spleen after antigenic stimulation. *J Immunol* 180, 8(2008), 5457–65.

In Planung

- **BARTHELMANN J**, VAN ZANDBERGEN G, LASKAY T, WESTERMANN J, KALIES K. Phosphatidylserin-positive *Leishmania major* support the disease-promoting cytokine response and inflammation in susceptible BALB/c mice. *Manuskript in Planung*.

Nationale und internationale Kongresse

- 2nd European Congress of Immunology (13. – 16. September 2009), Berlin, Deutschland
Apoptotic Leishmania major in the inoculum support disease-promoting inflammation and cytokine response in BALB/c mice (Poster)

- 13. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“ (12. – 14. März 2009), Burg Rothenfels, Deutschland
Apoptotic Leishmania major mediate a Th2 response in BALB/c mice (Vortrag)
- 31. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen (14. November 2008), Forschungszentrum Borstel, Deutschland
Apoptotic Leishmania major in the inoculum mediate a Th2 response in the draining lymph node of BALB/c mice (Vortrag)
- Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI) (3. – 6. September 2008), Wien, Österreich
Apoptotic Leishmania major in the inoculum mediate a Th2 response in BALB/c mice (Poster)
- 12. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“ (7. – 9. März 2008), Burg Rothenfels, Deutschland
T cell activation in vivo by different Leishmania major preparations in the draining lymph node of BALB/c mice (Vortrag)
- 10th German Meeting on Th1/Th2 research (2007), Marburg, Deutschland
Apoptotic leishmania induce IL-10 mRNA in the T cell zone of lymph nodes in vivo (Vortrag)
- 11. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“ (9. – 11. März 2007), Burg Rothenfels, Deutschland
T cell activation by Leishmania major lysate in the draining lymph node of BALB/c mice (Vortrag)

Anhang C

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

Julia Barthelmann

Lübeck 2011