

Aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jan Rupp

Modulation der Lipidmediatoren-Freisetzung neutrophiler
Granulozyten durch intrazelluläre Erreger und Apoptose

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Michael Plagge

aus Eckernförde

Lübeck 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. univ. (Univ. Budapest) Tamás Laskay

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Niemann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.01.2019

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Neutrophile Granulozyten	2
1.1.1 Struktur, Reifung und Vorkommen.....	2
1.1.2 Lebenszyklus und Diapedese	2
1.1.3 Chemotaxis.....	4
1.1.4 Funktionen der neutrophilen Granulozyten.....	5
1.1.4.1 Phagozytose und intrazelluläre Lyse	5
1.1.4.2 Granula und Degranulation.....	6
1.1.4.3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)	7
1.2 Eicosanoide:	8
1.2.1 Leukotrien B4 (LTB ₄) und sein Rezeptor BLT1.....	10
1.2.2 Lipoxin A4 (LXA ₄) und sein Rezeptor ALX/FPR2.....	11
1.3 Teil 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten.....	12
1.3.1 Die Gattung <i>Leishmania</i> , die Art <i>L. major</i> und ihre Interaktion mit neutrophilen Granulozyten	13
1.3.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> und die Interaktion mit der Wirtszelle.....	17
1.3.3 Interaktion von <i>Chlamydia pneumoniae</i> und neutrophilen Granulozyten	18
1.4 Teil 2: Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten.....	21
1.4.1 Apoptose.....	22
1.4.2 Nekrose.....	23
1.5 Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit	24
2 Methoden	26
2.1 Isolation neutrophiler Granulozyten aus peripherenvenösem humanen Vollblut.....	26
2.1.1 Bestimmung und Einstellung der Zellzahl	28
2.1.2 Qualität der isolierten neutrophilen Granulozyten.....	28
2.1.3 Zellkulturbedingungen	28
2.2 Teil 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten.....	29
2.2.1 <i>Leishmania major</i>	29
2.2.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	30
2.2.3 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	30
2.2.4 HT-29 Kultur.....	30
2.2.5 Co-Inkubation von Neutrophilen mit Pathogenen, Bestimmung der Infektionsrate... 31	
2.2.6 Induktion und Messung von LTB ₄	31
2.2.7 Induktion und Messung von LXA ₄	32
2.3 Teil 2: Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten.....	34
2.3.1 Induktion der Apoptose neutrophiler Granulozyten durch UV-Bestrahlung	34
2.3.2 Anreicherung Annexin V-positiver Zellen durch MACS	35
2.3.3 Durchflusszytometrie: Messung der Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung	36
2.3.4 Induktion und Messung der LTB ₄ -Freisetzung.....	39
2.4 Statistische Analyse	39

3	Ergebnisse.....	40
3.1	Qualität der neutrophilen Granulozyten.....	40
3.2	Etablieren eines Verfahrens für die Freisetzung und quantitative Bestimmung von Lipidmediatoren <i>in vitro</i>	40
3.3	Teil 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten.....	41
3.3.1	<i>Leishmania major</i>.....	41
3.3.1.1	Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit <i>Leishmania major</i> führt zu einer gesteigerten LTB ₄ -Freisetzung	41
3.3.1.2	Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit <i>Leishmania major</i> führt zu einer verminderten LXA ₄ -Freisetzung.....	42
3.3.2	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>.....	43
3.3.2.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> -infizierte neutrophile Granulozyten zeigen abhängig vom Stimulus eine verstärkte oder reduzierte LTB ₄ -Freisetzung.....	43
3.3.2.2	Die Infektion neutrophiler Granulozyten durch <i>Anaplasma phagocytophilum</i> führt zu einer verminderten LXA ₄ -Freisetzung	44
3.3.3	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	45
3.3.3.1	Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit <i>Chlamydia pneumoniae</i> führt zu einer verminderten LTB ₄ -Freisetzung	45
3.3.3.2	Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit <i>Chlamydia pneumoniae</i> führt zu keiner relevanten Modulation der LXA ₄ -Freisetzung.....	46
3.5	Teil 2: Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten.....	48
3.5.1	Induktion der Apoptose von neutrophilen Granulozyten.....	48
3.5.2	Vergleich der LTB ₄ -Freisetzung vitaler, UV-bestrahlter und selektierter Annexin V-positiver neutrophiler Granulozyten.....	49
3.5.3	Apoptotische PMN hemmen die Freisetzung von LTB ₄ durch vitale neutrophile Granulozyten	51
4	Diskussion	53
4.1	Teil 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten.....	53
4.1.1	<i>Leishmania major</i>.....	53
4.1.1.1	Wem dient der pro-inflammatorische Shift der Lipidmediatoren – dem Wirt oder dem Erreger?.....	54
4.1.1.2	Sonderfall <i>L. major</i> : Ausnutzen neutrophiler Granulozyten.....	54
4.1.1.3	Überleben trotz oder aufgrund erhöhten LTB ₄ -Spiegels: Evasive Mechanismen ..	56
4.1.1.4	Einflussgröße Vektor: Die Rolle der Sandmücke im Überleben der Leishmanien und die Interferenz mit lokalen LTB ₄ -Spiegeln.....	58
4.1.1.5	Abschließende Bewertung des erhöhten LTB ₄ und verminderten LXA ₄	59
4.1.2	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>.....	60
4.1.2.1	Einordnung der infektionsbedingten Unterschiede in der LTB ₄ - und LXA ₄ -Freisetzung durch neutrophile Granulozyten.....	60
4.1.2.2	Überlebensstrategien von <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	62
4.1.2.3	Abschließende Betrachtung der Lipidmediator-Verschiebung nach Infektion neutrophiler Granulozyten durch <i>A. phagocytophilum</i>	64
4.1.3	<i>Chlamydia pneumoniae</i>.....	66
4.1.3.1	Einordnung der erniedrigten LTB ₄ -Freisetzung durch <i>C. pneumoniae</i> -infizierte neutrophile Granulozyten und Vergleich mit der Mediatorenfreisetzung nach Infektionen durch <i>L. major</i> oder <i>A. phagocytophilum</i>	66
4.2	Teil 2: Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten.....	70
4.3	Kritische Betrachtung der Arbeit:.....	73
5	Schlussbetrachtung und klinischer Ausblick zu Lipidmediatoren	74

6	Zusammenfassung.....	80
6.1	Summary	82
8	Literaturverzeichnis	84
<u>Anhang</u>		93
	Materialverzeichnis	93
	Danksagung.....	98
	Lebenslauf	99
	Publikationen und Kongressbeiträge	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1) Synthese wichtiger Eicosanoide aus Arachidonsäure	8
Abbildung 2) Die Rolle neutrophiler Granulozyten im Lebenszyklus der Leishmanien innerhalb des Säugetier-Wirts	14
Abbildung 3) Die zentrale Rolle der durch neutrophile Granulozyten (PMN) freigesetzten Lipidmediatoren in der Regulation der akuten Entzündungsreaktion.....	25
Abbildung 4) Die erste Dichtezentrifugation dient einer groben Auftrennung der zellulären Blutbestandteile	26
Abbildung 5) Aufreinigung der Granulozyten-Suspension in einer zweiten Dichtegradienten-Zentrifugation	27
Abbildung 6) <i>Leishmania major</i> -Kultur	29
Abbildung 7) Versuchsaufbau zur Bestimmung von LTB ₄ aus den Überständen infizierter und nicht-infizierter neutrophiler Granulozyten.....	32
Abbildung 8) Versuchsaufbau zur Bestimmung von LXA ₄ aus den Überständen infizierter und nicht-infizierter PMN in Co-Kultur mit HT-29-Zellen	33
Abbildung 9) Fluss-Schema zur Bereitstellung verschiedener Zellviabilitäten	34
Abbildung 10) MACS-Technik	35
Abbildung 11) Prinzip eines Durchflusszytometers	36
Abbildung 12) Erklärung forward- und sideward scatter anhand einer Zelle im Strahlengang.....	37
Abbildung 13) Annexin V-/ Propidiumiodid-Vitalitätsfärbung	38
Abbildung 14) Lichtmikroskopie Diff-Quik-gefärbter, frisch isolierter neutrophiler Granulozyten	40
Abbildung 15) Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit <i>L. major</i> führt zu einer vermehrten Freisetzung von LTB ₄	42
Abbildung 16) Die Freisetzung von LXA ₄ ist bei <i>L. major</i> -infizierten neutrophilen Granulozyten reduziert.....	43
Abbildung 17) Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit <i>A. phagocytophilum</i> führt in Abhängigkeit des Stimulus zu gegensätzlicher Modulation der LTB ₄ - Freisetzung	44
Abbildung 18) Die Freisetzung von LXA ₄ ist bei <i>A. phagocytophilum</i> -infizierten neutrophilen Granulozyten reduziert.....	45

Abbildung 19) Chlamydia pneumoniae-infizierte primäre neutrophile Granulozyten zeigen eine reduzierte LTB ₄ -Freisetzung nach Stimulation mit Ionomycin oder LPS+fMLP	46
Abbildung 20) Die Freisetzung von LXA ₄ durch neutrophile Granulozyten wird durch Infektion mit Chlamydia pneumoniae nicht beeinflusst.....	47
Abbildung 21) Öl-Immersionmikroskopie Diff-Quik-gefärbter, apoptotischer neutrophiler Granulozyten	48
Abbildung 22) Repräsentative Durchflusszytometrie nach Vitalitätsfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid.....	49
Abbildung 23) LTB ₄ -Freisetzung durch vitale, bestrahlte und selektiv Annexin V-positive neutrophile Granulozyten	50
Abbildung 24) Die LTB ₄ -Freisetzung vitaler neutrophiler Granulozyten wird durch apoptotische PMN reduziert.....	51
Abbildung 25) LTB ₄ -vermittelte Rekrutierung und Aktivierung führt aufgrund evasiver Mechanismen der Pathogene zu inkomplettem Abtöten und Überleben der Erreger.	54
Abbildung 26) Ergebniszusammenstellung zur Fragestellung 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB ₄ - und LXA ₄ -Freisetzung durch PMN	74
Abbildung 27) Ergebniszusammenstellung zur Fragestellung 2: Einfluss apoptotischer PMN auf die lokale Lipidmediatoren-Balance.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1) Effekte von Leukotrien B ₄ , vermittelt durch den Rezeptor BLT1	10
Tabelle 2) Effekte von Lipoxin-A ₄ , vermittelt durch den Rezeptor ALX/FPR2	11
Tabelle 3) Optimale Dichte für die Stabilität verschiedener Blutbestandteile	26

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
altgr.	altgriechisch
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
Bzw.	beziehungsweise
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
CCL2, 3 und 4	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2, 3 und 4</i> = MCP-1, MIP-1 α bzw. MIP-1 β
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i> , auch <i>Chlamydophila pneumoniae</i> genannt
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8 = IL-8
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i> , Schädigungs-assoziiertes molekulares Muster
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , Enzymimmunoassay
engl.	englisch
FACS	<i>Fluorescence activated Cell Sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	<i>Forward Scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte-Colony stimulating factor
gr.	griechisch
Hcl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IL-8	Interleukin-8 = CXCL8
Ir-LBP	<i>Ixodes ricinus</i> leukotriene-binding protein
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT, LTA/B/C/D/E ₄	Leukotrien, Leukotrien A/B/C/D/E ₄
LX, LXA/B ₄	Lipoxin = Lipoxygenase-Interaktionsprodukt, Lipoxin-A/B ₄
MACS	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i> , magnetisch aktivierte Zellsortierung
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i> = CCL2
min	Minute

MIP-1 α und MIP-1 β	<i>Macrophage inflammatory protein-1α</i> bzw. -1 β = CCL3 bzw. CCL4
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> ; spezifischer Transkriptionsfaktor in der Regulation von Immunantwort, Zellproliferation und -tod
NSAID	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drug</i> = nicht-steroidales Antiphlogistikum
O ₂	Sauerstoff
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten, hier: Neutrophile Granulozyten
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Eigenname)
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Sideward Scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
SPMs	<i>Specialized pro-resolving mediators</i> = spezialisierte, zur Auflösung der Entzündung beitragende Mediatoren
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Der menschliche Körper befindet sich in ständiger Interaktion mit seiner Umwelt und ist somit einer Vielzahl von Noxen ausgesetzt. Überwinden Mikroorganismen den mechanischen, chemischen und mikrobiellen Schutz des Epithels, wird die angeborene Immunantwort aktiviert. Neben den humoralen Komponenten des Komplementsystems wird diese von Phagozyten getragen, welche sich in Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten unterteilen lassen. Ihnen ist funktionell das Aufnehmen und intrazelluläre Verdauen der eingedrungenen Mikroorganismen gemeinsam. Aufgrund ihrer hohen Anzahl und großen Mobilität kommt den neutrophilen Granulozyten in diesem Szenario eine besondere Rolle zu: Als erste Zellpopulation der angeborenen Immunantwort am Ort der Gewebeschädigung angekommen, regulieren sie maßgeblich den weiteren Verlauf der Immunantwort und der Entzündungsreaktion. Dabei stellen Eicosanoide, Lipidmediatoren aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, zentrale Stellschrauben der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen dar. Als pro-inflammatorischer Prototyp der Eicosanoide etablierte sich Leukotrien B₄ (LTB₄). Das anti-inflammatorische Lipoxin A₄ (LXA₄) kann als dessen Antagonist betrachtet werden und trägt zur Auflösung der Inflammation bei.

Einzelne intrazelluläre Erreger können in neutrophilen Granulozyten überleben und modulieren dafür die Wirtszellen zu ihren Gunsten. Im **ersten Teil** dieser Arbeit wurde daher der Einfluss einer Infektion durch intrazelluläre Erreger auf die Freisetzung von LTB₄ und LXA₄ durch neutrophile Granulozyten untersucht. Dabei könnten Änderungen im Lipidmediatorprofil sowohl einer optimierten Abwehrreaktion des Wirts als auch dem Pathogen im Sinne einer zu seinen Gunsten modulierten Entzündungsreaktion dienen. Als intrazelluläre Pathogene fanden *Anaplasma phagocytophilum*, *Chlamydia pneumoniae* und *Leishmania major* Verwendung.

Da neutrophile Granulozyten einer kurzen Halbwertszeit und einem extrem hohen Durchsatz unterliegen, ist das Auftreten größerer Mengen apoptotischer Neutrophiler am Ort einer Gewebeschädigung unausweichlich. Um den Einfluss apoptotischer neutrophiler Granulozyten auf die Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurde im **zweiten Teil** deren Lipidmediator-Freisetzung und ihr Einfluss auf die Lipidmediator-Freisetzung durch vitale Neutrophile untersucht. In der folgenden Einleitung werden zunächst die neutrophilen Granulozyten und Lipidmediatoren vorgestellt. Hierauf Bezug nehmend, soll dann auf die genannten intrazellulären Erreger und die Apoptose eingegangen werden.

1.1 Neutrophile Granulozyten

1.1.1 Struktur, Reifung und Vorkommen

Mit etwa 50-70% stellen die neutrophilen Granulozyten die größte Fraktion der Leukozyten im peripheren Blut des erwachsenen Menschen dar [1]. Im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen gebildet, entwickeln sich aus den jungen, stabkernigen schließlich die reifen, segmentkernigen neutrophilen Granulozyten. Diese rund 9 – 15 µm im Durchmesser messenden Zellen weisen einen charakteristischen drei- bis fünffach segmentierten Zellkern auf. Der anhand der Zellmorphologie sechsstufig gegliederte Entwicklungsprozess dauert etwa 14 Tage. Mehr als 90% der reifen Zellen verweilen im Knochenmark und können im Bedarfsfall mobilisiert werden [2]–[4]. Der Rest der ausgereiften neutrophilen Granulozyten verteilt sich zu gleichen Teilen auf einen im peripheren Blut *zirkulierenden Pool* sowie einen am Gefäßendothel adhären *marginalen Pool* [2], [5]. Dieser kann als erneut mobilisierbarer Zwischenspeicher betrachtet werden und findet sich neben dem Knochenmark vorwiegend in den Gefäßen von Leber und Milz.

Gemeinsam mit den eosinophilen und basophilen Granulozyten werden neutrophile Granulozyten aufgrund des multipel lobulierten Kerns auch als polymorphonukleäre Zellen (PMN) bezeichnet. Ihre Namen verdanken die drei Subtypen der PMN ihrem unterschiedlichen Anfärbungsverhalten in der Pappenheim- oder der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Im Folgenden wird die Abkürzung PMN synonym zu neutrophilen Granulozyten verwendet, ohne eosinophile und basophile Granulozyten zu inkludieren. Zum einen sei dies begründet durch den geringen Anteil der eosinophilen (meist 1-3%) und basophilen Granulozyten (0-1%, durch angewandtes Isolationsverfahren exkludiert) an den Leukozyten, zum anderen mit der technischen Problematik, die Granulozyten auf einfachem Wege voneinander zu separieren. Zudem dient diese Vereinfachung der Leserlichkeit.

1.1.2 Lebenszyklus und Diapedese

Neutrophile Granulozyten sind kurzlebige Zellen, die einem extrem hohen Durchsatz unterworfen sind. Täglich werden 1 bis 2×10^{11} dieser Zellen neu im Knochenmark gebildet [1]. Freigesetzt in die periphere Blutzirkulation, beläuft sich ihre Lebensspanne *ex vivo* auf etwa 8 Stunden [1], [2]. *In vivo*-Messungen jüngerer Datums gaben Hinweise auf eine deutlich längere Überlebensdauer von bis zu 90 Stunden [6], [7]. Findet sich binnen dieser Zeit kein lebensverlängernder Reiz, wird der geordnete Zelltod, die Apoptose, initiiert (s. u.). Auf diese folgt der Abbau durch Makrophagen in Knochenmark, Leber oder Milz [1]. Findet

sich jedoch ein geeigneter Stimulus, so migrieren die PMN rasch zum Ort der Schädigung, um dort eine erste Linie der Verteidigung gegenüber eingedrungenen Erregern und Fremdkörpern zu errichten. Das Verlassen der Blutgefäße stellt dabei eine erste Hürde dar, welche schematisiert in einem vierstufigen Prozess überwunden wird [1]:

Durch Freisetzung vasodilatatorischer Mediatoren wie Histamin weiten sich die Kapillaren nahe der Schädigung, sodass die Flussgeschwindigkeit abnimmt und vermehrter Kontakt zwischen den im Blut befindlichen neutrophilen Granulozyten und dem Endothel ermöglicht wird. In einem ersten Schritt kommt es durch vermehrte Expression von Selectinen auf dem Endothel zu schwachen Bindungen von Neutrophilen, dem sogenannten Rollen (engl. *rolling*). Auf der Endotheloberfläche an Glykosaminoglykanen immobilisierte Chemokine führen zu einer vermehrten Aktivierung der PMN [8], [9]. Durch affinitätssteigernde Restrukturierung von Integrinen auf der Oberfläche der Neutrophilen kommt es in einem zweiten Schritt zu einer stärkeren Bindung zwischen PMN und Endothel. In einem dritten Schritt wird diese Bindung durch vermehrte Expression weiterer Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen (VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) und ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*) stabilisiert und eine Konformationsänderung des Zytoskeletts der PMN induziert. Die nun flachen Zellen können in der Folge das endotheliale Gewebe durch parazelluläre, punktuelle Lyse der extrazellulären Matrix und schließlich auch der Basalmembran durchwandern. Dieser Migrationsprozess vom Blutgefäß zum Ort der Schädigung wird als Extravasation oder Diapedese (altgr. *dia* = durch und *pedan* = springen) bezeichnet.

Lipidmediatoren beeinflussen die Diapedese in großem Ausmaß. So mobilisieren Leukotriene P-Selectin und tragen somit zum ersten Kontakt zwischen PMN und Endothel bei [10]. Der Lipidmediator Leukotrien B₄ (LTB₄) steigert die Diapedese neutrophiler Granulozyten zudem durch Induktion von Integrin- β 2 (CD18), welches unter anderem die Bindung der PMN zu ICAM-1 vermittelt [11]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass LTB₄ dabei die Extravasation aktivierter neutrophiler Granulozyten ohne einhergehenden Schaden am Gefäßendothel und Austritt von Proteinen vermittelt [12], [13]. Schließlich reduzieren Lipoxine das Maß an P-Selectin-Expression und mindern damit Adhäsion, Extravasation und Rekrutierung [14].

1.1.3 Chemotaxis

Infolge ihrer Aktivierung migrieren neutrophile Granulozyten verschiedenen Gradienten chemotaktisch wirksamer Substanzen folgend aus den Kapillaren zum Ort der Gewebeschädigung. Dieser Prozess wird als Chemotaxis bezeichnet (gr. *chêmeia* = Chemie und altgr. *taxis* = Ordnung, Ausrichtung). Sind es in der sogenannten *Scouting*-Phase (von engl. *to scout*, auskundschaften) nur wenige neutrophile Granulozyten, die derart migrieren, so finden schließlich in der Amplifikations- und der Stabilisierungsphase immer mehr PMN den Weg zur Schädigung [15]. Die letztlich hoch geordnete Akkumulation neutrophiler Granulozyten am Ort der Schädigung wird in Analogie zum Verhalten von Insekten als Schwärmen (engl.: *swarming*) bezeichnet [16]. Schließlich kommt es zur Zusammenballung vieler Neutrophiler, dem sog. *Clustering* (engl. *cluster* = Haufen, Schwarm) [15]. Dieses dient der Eingrenzung und Elimination von körperfremden Stoffen und dem Wundverschluss und ist wesentliches Korrelat der sich simultan entwickelnden Entzündungsreaktion.

Zum einen können körperfremde Oberflächenmarker wie bakterielle Formylpeptide, zum Beispiel N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), oder das auf der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien vorkommende Lipopolysaccharid (LPS) chemotaktisch wirken. Zum anderen spielen körpereigene Botenstoffe eine wichtige Rolle. Unter den letztgenannten nehmen die aktivierten Komplementfaktoren C3a und C5a sowie eine Vielzahl von Chemo- und Zytokinen herausragende Rollen ein. Insbesondere Interleukin-8 (IL-8 = CXCL8) spielt in der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten eine wichtige Rolle [17]. Die Synthese von Zytokinen ist jedoch vergleichsweise langsam und engmaschig auf der Transkriptionsebene reguliert [18]. Auch unterliegt ihre Freisetzung häufig einer post-transkriptionellen Regulation [18]. Entsprechend setzt ihre Wirkung meist erst verzögert ein. Aufgrund einer vergleichsweise langen Halbwertszeit (z.B. durch Bindung an Glykosaminoglykane [8], [9]) können Zytokine jedoch lange und über große Entfernungen ihre Wirkung entfalten.

In der jüngeren Vergangenheit etablierte sich mit den Eicosanoiden (s.u.) eine weitere Klasse bedeutender chemotaktisch wirksamer Substanzen. Aufgrund ihrer raschen Synthese und kurzen Halbwertszeit kommt ihnen insbesondere zu Beginn der Entzündungsreaktion eine große Bedeutung zu [16], [18], [19]. So können sie als Amplifikatoren der akuten Entzündung fungieren. Auch beim Übergang in die Auflösungsphase der Entzündung stellen sie zentrale Akteure dar [20], [21].

1.1.4 Funktionen der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind lebenswichtige Immunzellen, die mit einer Zahl von 1800 – 8000 Neutrophilen pro Mikroliter im Blut gesunder Erwachsener vorhanden sind. Ist ihre absolute Anzahl im Blut auf weniger als 1500 pro Mikroliter reduziert, kann von einer Neutropenie gesprochen werden [22]. Dabei handelt es sich um einen potentiell lebensgefährlichen Zustand, der mit einer massiv erhöhten Neigung zu Infektionen und schweren Verläufen einhergeht. In der ausgeprägtesten Form der Neutropenie, der Agranulozytose, liegen weniger als 500 Neutrophile pro Mikroliter vor. Bei Infektionen in derartiger Neutropenie handelt es sich stets um einen Notfall.

Ihre derart prominente Rolle in der Erreger-Abwehr ist den vielfältigen Funktionen dieser Zellart zuzuschreiben. Ein breites Portfolio verschiedenster Effektormechanismen sichert den neutrophilen Granulozyten die effiziente Elimination eingedrungener Erreger. Voraussetzung für den Erfolg dieser Mechanismen ist jedoch eine funktionierende Rekrutierung und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, welche in wesentlichem Ausmaß vom Lipidmediator-*signaling* abhängig sind (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2). Auf die herausragenden regulatorischen Funktionen der Lipidmediatoren soll deshalb zunächst auf Ebene der einzelnen Effektormechanismen sowie anschließend im Kapitel „Eicosanoide“ umfassender eingegangen werden.

Zu den direkten Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten, die im Folgenden erläutert werden sollen, zählen die Phagozytose und intrazelluläre Lyse, die Freisetzung löslicher anti-mikrobieller Substanzen aus Granula sowie die Bildung von *Neutrophil extracellular traps* (NETs).

1.1.4.1 Phagozytose und intrazelluläre Lyse

Bei der Phagozytose kommt es zur rezeptorvermittelten Aufnahme von körperfremdem Material durch Endozytose, also Umfließen durch die Zellmembran. Die als Phagosomen bezeichneten, durch eine Membran separierten Einschlüsse können mit einer bestimmten Form von Granula verschmolzen werden, um Phagolysosomen zu bilden. In diesen findet die Elimination der Mikroben durch saures Milieu, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (engl. *reactive oxygen species (ROS)*, *reactive nitrogen species (RNS)*) sowie enzymatische Zersetzung statt. Lipidmediatoren regulieren die phagozytotische Aktivität neutrophiler Granulozyten ebenso wie deren ROS-Produktion. Für LTB₄ konnte

eine Induktion beider Mechanismen gezeigt werden [23], [24], während LXA₄ die ROS-Produktion inhibiert [25]. Weitere anti-inflammatorische Mediatoren wie die Resolvine und Protectine wurden mit gesteigerter Phagozytose und non-phlogistischer Abtötung (engl. *clearance*) aufgenommener Erreger assoziiert [21].

1.1.4.2 Granula und Degranulation

Bereits während der Reifung synthetisieren neutrophile Granulozyten verschiedene Arten zytosolisch gelagerter Granula-Vesikel, welche charakteristische Proteine enthalten und elementar für eine Vielzahl der Funktionen der neutrophilen Granulozyten sind: Zum einen werden *primäre, unspezifische Granula* gebildet, welche funktionell den Lysosomen entsprechen. Hierbei handelt es sich um Kompartimente niedrigen pHs, welche eine Vielzahl pH-abhängiger Verdauungsenzyme enthalten, die der Zersetzung von Biopolymeren in Monomere dienen. Weiterhin sind sie mit antimikrobiellen Enzymen und Peptiden ausgestattet. Marker-Protein ist die Myeloperoxidase, ein elementares Enzym in der Bereitstellung reaktiver Sauerstoffspezies. Zum anderen werden *sekundäre, spezifische Granula* ausgebildet, welche eine Vielzahl von antimikrobiellen Enzymen enthalten. Das in ihnen vorkommende Markerprotein Laktoferrin bindet Eisen und wirkt aufgrund des essentiellen Bedarfs an Eisen seitens vieler Erreger mikrobizid. Weiterhin verfügt Laktoferrin über Peptidase- und Nuklease-Aktivität. Sowohl in primären, als auch in sekundären Granula befindet sich das Enzym Phospholipase-A₂, welches durch Bereitstellung der Arachidonsäure eine zentrale Rolle in der Regulation des oxidativen Bursts und des Lipidmediator-Stoffwechsels einnimmt [26]. Somit ist die Degranulation mit der Lipidmediator-Synthese und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies funktionell gekoppelt. Die *tertiären Gelatinase-Granula* enthalten gleichnamiges Enzym, welches als Matrixmetalloprotease proteolytisch wirksam ist. Während diese drei genannten Granula-Typen mitsamt ihrem Inhalt vom Golgi-Apparat abgeschnürt werden, kommt es durch Endozytose zudem zur Ausbildung *sekretorischer Vesikel*. Diese stellen unter anderem ein Reservoir für Membranrezeptoren dar, die der Erkennung mikrobieller Oberflächenmarker dienen.

Infolge der Aktivierung kommt es Stimulus-abhängig zur sequentiellen Freisetzung dieser Granula, der Degranulation: Durch steigende intrazelluläre Calcium-Konzentrationen werden zunächst sekretorische, dann tertiäre, sekundäre und selten auch primäre Granula mobilisiert [27]. Durch die Exozytose der verschiedenen Granula und dem Freiwerden der

enthaltenen Moleküle ist es den Neutrophilen möglich, sich einen Weg durch Bindegewebe und Fibringerinnsel zu bahnen und schließlich eingedrungene Erreger zu eliminieren. Lipidmediatoren sind zentrale Akteure in der Regulation der Degranulation. So wird die Degranulation durch LTB₄ in großem Ausmaß induziert [19], [28], während LXA₄ diese inhibiert [29].

1.1.4.3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Ein vergleichsweise neu entdeckter Abwehrmechanismus stellt die Produktion von *Neutrophil Extracellular Traps (NETs)* dar. NETs sind anti-mikrobielle Fangnetze, die aus nukleären und zytosolischen Komponenten bestehen [30]. Durch Desintegration von Bestandteilen der äußeren und inneren Membranen kommt es zu einer Verbindung von Nucleinsäuren und nukleären Proteinen sowie Proteinen aus Granula und Zytosol. Es kommt zur Ausbildung netzartiger Strukturen, die in Richtung eingedrungene Erreger freigesetzt werden können. In diesen mit antimikrobiellen Substanzen besetzten, fibrillären Matrices verfangen sich die Erreger und gehen infolge der Arretierung und Exposition gegenüber weiteren Immunfaktoren und –zellen zugrunde.

Zum einen können NETs von aktivierten PMN schnell und ohne konsekutiven Zelltod gebildet werden (engl. *vital NETosis*). Zum anderen ist mit der suizidalen NETose (engl. *suicidal NETosis*) ein aktiver Zelltodmechanismus postuliert. Durch schlechte Abgrenzbarkeit der meist angewandten NET-Nachweismethoden zu Vorgängen des Zelltods ist die Definition und Relevanz der suizidalen NETose kontrovers, da es auch im Rahmen der Nekroptose von neutrophilen Granulozyten zur passiven Freisetzung NET-ähnlichen Chromatins kommt [31], [32]. Die Entstehung von NETs ist in Abhängigkeit des Stimulus meist von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies abhängig [32] und einer Regulation durch Umweltfaktoren wie pH und CO₂-Konzentration unterworfen [33]. Wie bei der Freisetzung von ROS und Enzymen durch PMN, können auch NETs zu einer schwerwiegenden Schädigung des Gewebes und zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen [34]. Lipidmediatoren sind potente Regulatoren der NET-Bildung. So induzieren LTB₄ und Thromboxan A₂ (TXA₂) die NET-Bildung [35], während LXA₄ und Prostacyclin (Prostaglandin I₂, PGI₂) diese hemmen [35], [36].

1.2 Eicosanoide:

Die Eicosanoide sind eine Klasse von hormonähnlichen, auto- und parakrinen Signalmolekülen, denen eine zentrale Rolle in der Regulation der Entzündungsreaktion zukommt [20]. Sie werden typischerweise infolge der Oxidation von mehrfach ungesättigten 20-C-Fettsäuren gebildet und gehören somit zur Klasse der Lipidmediatoren. Substrat dieser Reaktionen ist unter anderem die ubiquitär in Membran-Phospholipiden vorkommende Arachidonsäure (AA). Durch Aktivität der Phospholipase-A₂ (PLA₂) kann diese aus der Membran mobilisiert werden. Die Phospholipase-A₂ stellt dabei eine wichtige Schnittstelle zwischen der Aktivierung der NADPH-Oxidase, also der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), und der Bildung von Eicosanoiden dar [26]. Folgend können zwei verschiedene Synthesepfade eingeschlagen werden (Abbildung 1): Zum einen können aus Arachidonsäure durch Lipoxygenase- (LOX-) Aktivität Leukotriene und Lipoxine gebildet werden. Zum anderen können infolge einer Cyclooxygenase- (COX) katalysierten Reaktion Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane synthetisiert werden. In dieser Arbeit geht es um die Freisetzung der LOX-Produkte Leukotrien B₄ (LTB₄) und Lipoxin A₄ (LXA₄).

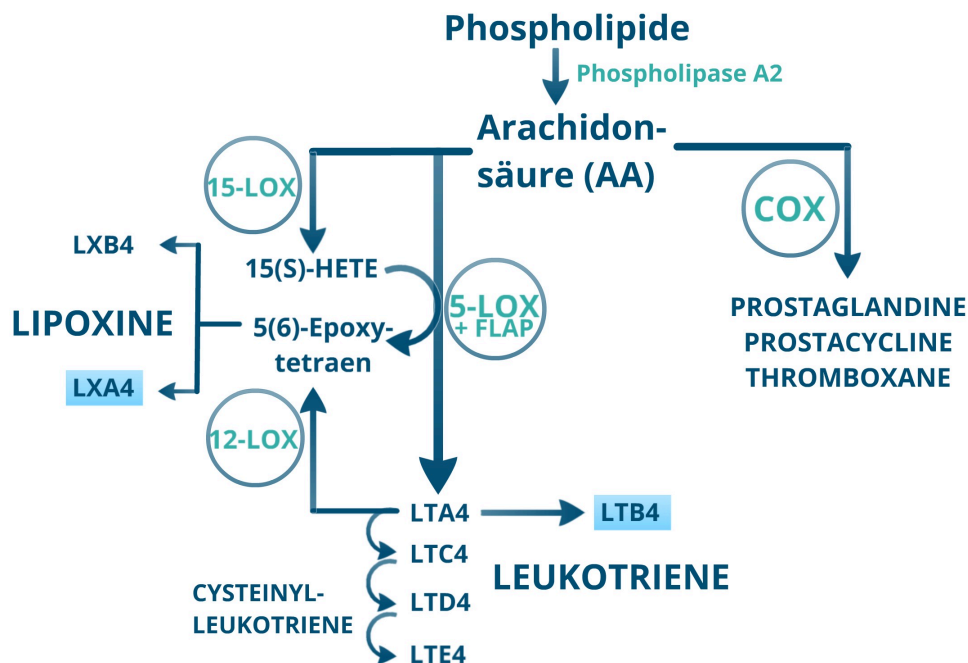


Abbildung 1) Synthese wichtiger Eicosanoide aus Arachidonsäure Durch Aktivität der Phospholipase-A₂ wird die ubiquitär in Membranen vorkommende Arachidonsäure (AA) mobilisiert. AA kann zum einen durch Lipoxygenasen (LOX) zu Leukotrienen und Lipoxinen, zum anderen mittels Cyclooxygenasen (COX) zu Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen umgesetzt werden. Diese Enzyme unterliegen einer Zelltyp-spezifischen Expression. In Neutrophilen wird durch katalytische Aktivität der 5-LOX über das Intermediat LTA₄ der pro-inflammatorische Mediator LTB₄ gebildet. Auch ist durch weitere Enzyme die Bildung von Cysteinyl-Leukotrienen möglich. In Zusammenspiel der 5-LOX in Neutrophilen mit der 12- oder 15-LOX, die z.B. in Epithelzellen exprimiert werden, können LXA₄ und LXB₄ gebildet werden. Neutrophile Granulozyten nehmen durch Expression der 5-LOX eine herausragende Position in der Synthese wichtiger Eicosanoide ein. FLAP = 5-LOX-aktivierendes Protein, HETE (engl. *hydroxyeicosatetraenoic acid*) = Hydroxyeicosatetraensäure.

Gemäß ihrer Entdeckung und ihrer Synthese werden klassische von nicht-klassischen, neuen Eicosanoiden unterschieden. Die Leukotriene stellen neben den Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen Vertreter der klassischen Eicosanoide dar. Dabei wirkt der Vertreter Leukotrien B₄ (LTB₄) gewissermaßen als Katalysator und Amplifikator der frühen Entzündungsreaktion [37], [38]. Lipoxine gehören hingegen zu den neuentdeckten Eicosanoiden, zu denen auch die Maresine, Protectine und Resolvine gezählt werden, welche nicht aus Arachidonsäure gebildet werden [20]. Aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Funktionen bilden sie gemeinsam die Familie der spezialisierten, zur Auflösung der Entzündung führenden Mediatoren (engl. *specialized pro-resolving mediators (SPMs)*), welche der aktiven Rückkehr zur Homöostase dienen [20].

Aufgrund der geringen Halbwertszeit der Produkte werden Eicosanoide unmittelbar nach Stimulation gebildet und unterliegen in ihrer bioaktiven Form keiner Speicherung. Die Substrate der Eicosanoid-Synthese werden dafür zum Teil durch Hilfsproteine, z.B. den *Fatty-Acid-Binding-Proteins* (FABPs), stabilisiert und zur Membran des Zellkerns transportiert. In den neutrophilen Granulozyten könnte der S100A8/A9-Komplex diese wichtige stabilisierende Funktion übernehmen [39]. Zum Nukleus translozieren bei Aktivierung auch die katalysierenden Enzyme, wie das Substrat-bereitstellende Enzym der cytosolischen Phospholipase-A₂ (cPLA₂) [40], [41] und die zelltypische Lipoxygenase. In Neutrophilen stellt die hauptsächlich zytosolisch vorliegende 5-Lipoxygenase (5-LOX) das Schlüsselenzym der Leukotrien- und Lipoxin-Synthese dar. Auch sie erfährt einen nukleären Import [42]. An der Zellkern-Membran kommt es somit zur Akkumulation aller an der Eicosanoid-Synthese beteiligten zellulären Strukturen und Moleküle. Mit Hilfe des 5-Lipoxygenase-aktivierenden Proteins (FLAP) erfolgt in Neutrophilen schließlich durch Katalyse der 5-LOX die Umsetzung der Arachidonsäure zum Intermediat 5-HPETE (5-Hydroperoxyeicosatetraensäure), welches spontan zu 5-HETE (5-Hydroxyeicosatetraensäure) reduziert. Durch erneute katalytische Aktivität der 5-LOX erfolgt die Umsetzung zu Leukotrien A₄ (LTA₄). Die LTA₄-Hydrolase prozessiert dieses schließlich zu Leukotrien B₄ (LTB₄) [43], das über potente pro-inflammatorische Eigenschaften verfügt. Im Verlauf der somit beginnenden Entzündung kommt es im Rahmen des sog. Lipidmediator-Klassenwechsels (engl.: *class switch* [37]) zur Termination der Entzündungsreaktion und schließlich zur Auflösung der Inflammation. Dabei stellen die Lipoxine mit ihrem Vertreter Lipoxin-A₄ (LXA₄) die Hauptfamilie der spezialisierten, zur Auflösung führenden Mediatoren dar. LTB₄ und LXA₄ können also als Prototypen pro- bzw. anti-inflammatorischer Lipidmediatoren betrachtet werden.

1.2.1 Leukotrien B4 (LTB₄) und sein Rezeptor BLT1

LTB₄ ist ein pro-inflammatorischer Lipidmediator, der maßgeblich zur Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen - insbesondere neutrophilen Granulozyten und Makrophagen - beiträgt [16], [18]. Dabei ist die ausschließlich LTB₄-vermittelte Migration *in vitro* eher ungerichtet und von variabler Geschwindigkeit, nach Addition geringster Mengen fMLP oder IL-8 jedoch nahezu maximal direktional und schnell [17]. Entsprechend wurde für LTB₄ die Rolle eines Entzündungssignal-Verstärkers postuliert [44]. Neutrophile Granulozyten sind für einen Großteil der LTB₄-Freisetzung während der Inflammation *in vivo* verantwortlich [16], [45]. Die Wirkung von LTB₄ wird vorwiegend auto- und parakrin über den hochaffinen Rezeptor BLT1 vermittelt (Tabelle 1) [46]. Bei diesem handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der eine G_i-ähnliche Wirkung ausübt. Über die LTB₄-BLT1-Achse sind wenige neutrophile Granulozyten am Ort der Gewebeschädigung in der Lage, eine Entzündungsreaktion zu initiieren. Dabei wirkt LTB₄ durch lokale Aktivierung weiterer PMN und konsekutive LTB₄-Freisetzung im Sinne einer vorwärtsgerichteten Schleife (engl. *feed-forward mechanism*) [47]. Dieser Mechanismus ist vergleichbar mit dem für neutrophile Granulozyten postulierten IL-8-Amplifikations-Loop [48]. Durch LTB₄ kommt es somit zum hoch geordneten Akkumulieren von neutrophilen Granulozyten, dem sogenannten Schwärmen (engl.: *swarming*, s.o.). Da eine direkte Abhängigkeit dieses Phänomens von der LTB₄-Signalkette gezeigt werden konnte [16], stellt LTB₄ einen zentralen Mediator der akuten, durch neutrophile Granulozyten getragenen Entzündung dar. Durch *Priming* mit LPS [49] und anschließende Induktion mit fMLP ist es möglich, *in vitro* Informationen zur Freisetzung von LTB₄ in einem bakteriell infizierten Milieu zu erhalten. Die Behandlung durch den Calcium-Ionophor Ionomycin als potentem, unspezifischem Aktivator lässt auf die Kapazität neutrophiler Granulozyten zur Freisetzung von LTB₄ schließen [50].

Physiologische LTB₄-Wirkung auf Leukozyten, vermittelt durch den Rezeptor BLT1
Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen [51]–[54]
Gesteigerte Chemokinese [55] und Chemotaxis [52]
Aggregation von PMN [55]
Gesteigerte Phagozytose [23]
Intrazelluläre Kationen-Mobilisierung [19], [56]
Aktivierung mit Degranulation [19], [28] und ROS-Freisetzung [24]
Anti-apoptotische Aktivität [57]

Tabelle 1) Effekte von Leukotrien B4, vermittelt durch den Rezeptor BLT1

1.2.2 Lipoxin A4 (LXA₄) und sein Rezeptor ALX/FPR2

Um einer ungebremsten, schädigenden Inflammation entgegenzuwirken, muss die Balance der entzündungsregulierenden Faktoren zugunsten der anti-inflammatorischen Mediatoren umschwenken. LXA₄ stellt einen zentralen Vertreter dieser spezialisierten, zur Auflösung der Entzündung beitragenden Mediatoren (engl.: *specialized pro-resolving mediators (SPMs)*) dar, denen eine Vielzahl anti-inflammatorischer Funktionen zugeschrieben wird (Tabelle 2). Vermittelt werden diese Funktionen über den Rezeptor ALX/FPR2 (engl.: *lipoxin A₄ receptor/ formyl peptide receptor 2*). In Abhängigkeit des Liganden, beispielsweise fMLP, kann über ALX ebenfalls eine pro-inflammatorische Kaskade initiiert werden [58]. Die Freisetzung des anti-inflammatorischen LXA₄ wird dabei maßgeblich durch den frühen pro-inflammatorischen Lipidmediator Prostaglandin-E2 (PGE₂) reguliert [37]. PGE₂ wird wie LTB₄ während der ersten Stunden der Entzündungsreaktion freigesetzt und induziert die Translation von mRNA, welche für Enzyme der Lipoxin-Synthese kodiert [37]. In Neutrophilen kann es dadurch unter anderem zur vermehrten Expression der 15-Lipoxygenase kommen, die in naiven PMN nicht vorhanden ist [37], [59]. Da LTB₄ und LXA₄ aus den gleichen Substraten und Intermediaten (AA, 5-HPETE und LTA₄) hervorgehen, geht eine verstärkte LXA₄-Synthese zudem mit einer verminderten LTB₄ Freisetzung einher. Durch diese *class switch*-Mechanismen wird während des Beginns der Inflammation zugleich auch ihre spätere Limitation determiniert [20], [21], [37].

Physiologische Wirkung von LXA₄ auf Leukozyten, vermittelt durch Rezeptor ALX
Limitiert Neutrophilen-Rekrutierung und PMN-induzierten Gewebeschaden („Stop-Signal“)
Reduziert die Degranulation durch PMN
Steigert non-phlogistische phagozytotische und anti-mikrobielle Aktivität von Neutrophilen und Makrophagen
Steigert die Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen
Steigert Efflux von Phagozyten zu den Lymphknoten
Breite anti-inflammatorische und zur Auflösung beitragende Aktivität auf Transkriptions- u. Translationsebene

Tabelle 2) Effekte von Lipoxin-A4, vermittelt durch den Rezeptor ALX/FPR2 (nach [21], [60])

Lipoxine, als Akronym für *Lipoxygenase-Interaktionsprodukte*, entstehen infolge einer dualen Lipoxygenase-Aktivität von 5-LOX mit 12- oder 15-LOX (Abbildung 1). Da nur wenige Zelltypen wie die eosinophilen Granulozyten über zwei der notwendigen Lipoxygenasen verfügen, erfolgt die Lipoxin-Synthese vorwiegend auf transzellulärer

Ebene. Hierbei werden die Intermediate zwischen unterschiedlichen Zelltypen ausgetauscht und folgend zu den fertigen Eicosanoiden prozessiert. Neutrophile Granulozyten mit ihrer 5-LOX nehmen hierbei eine Schlüsselposition ein: In Kombination mit der 12-LOX, exprimiert in Thrombozyten und Epithelzellen, oder der 15-LOX von Epithelzellen, Eosinophilen oder Monozyten entsteht das fertige LXA₄ bzw. sein Isomer und funktionelles Analogon Lipoxin B₄ (LXB₄).

Für die vorliegende Arbeit wurden LTB₄ und LXA₄ als prototype Vertreter einer Eicosanoid-modulierten Entzündungsreaktion ausgewählt. Die transzelluläre Synthese von LXA₄ wurde durch epithelartige Zellen der Adenokarzinom-Zelllinie HT-29 als Partner der neutrophilen Granulozyten (5-LOX) ermöglicht. Diese Zelllinie verfügt über 12-LOX-Aktivität [61]. Im ersten Teil dieser Arbeit („Teil 1“) geht es um den Einfluss einer Infektion neutrophiler Granulozyten durch intrazelluläre Erreger auf die Freisetzung dieser zwei Lipidmediatoren. Im zweiten Abschnitt („Teil 2“) soll es um die Rolle apoptotischer neutrophiler Granulozyten in der Ausgestaltung des lokalen Lipidmediator-Milieus gehen.

1.3 Teil 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten

Pathogene, die im Rahmen ihrer Überlebensstrategie in eine Wirtszelle eindringen können, werden als intrazelluläre Erreger bezeichnet. Unter diesen werden obligat auf Wirtszellen angewiesene von fakultativ intrazellulären Pathogenen unterschieden. Letztere vermögen es, auch extrazellulär und ohne Wirtszelle zu überleben. Im Rahmen der Evolution haben sich einzelne Erreger auf bestimmte Typen von Wirtszellen spezialisiert. So gibt es zum einen Erreger wie *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), die ein breites Spektrum verschiedenster humaner Wirtszellen infizieren können. Zum anderen gibt es hoch spezialisierte Erreger. Unter diesen finden sich Vertreter, die ausschließlich Phagozyten wie Makrophagen oder neutrophile Granulozyten als Wirtszellen befallen. Zu diesen Erregern zählen *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) und *Leishmania major* (*L. major*). In dieser Arbeit soll der Einfluss dieser drei Erreger auf die Freisetzung von Lipidmediatoren durch infizierte neutrophile Granulozyten untersucht werden.

1.3.1 Die Gattung *Leishmania*, die Art *L. major* und ihre Interaktion mit neutrophilen Granulozyten

Leishmanien stellen eine Gattung obligat intrazellulärer, parasitärer Protozoen dar. Sie werden in der Alten Welt durch Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* übertragen. Besonders betroffen sind der gesamte Mittelmeerraum, der Nahe Osten, der indische Subkontinent, der Sudan und die Sahelzone. In der Neuen Welt fungieren Sandmücken der Gattung *Lutzomyia* in den tropischen Zonen Mittel- und Südamerikas als Vektoren. Leishmanien sind die Erreger der Leishmaniasis, die sich in Abhängigkeit der Leishmanien-Art in Form lokaler bzw. diffuser kutaner („*Aleppo-* oder *Orientbeule*“) oder mukokutaner („*Uta*“ oder „*Espundia*“) Ulzera manifestiert oder als viszerale („*Kala-Azar*“ oder „*Schwarzes Fieber*“) Verlaufsform auftritt. Kutane Manifestationen, die beispielsweise durch *L. major* in der Alten Welt induziert werden, sind nicht lebensbedrohlich, jedoch oft mit entstehenden Ulzera verbunden. Viszerale Krankheitsfälle hingegen, die mit Splenomegalie, Fieber, Panzytopenie, Durchfällen und chronischem Gewichtsverlust einhergehen, verlaufen ohne Therapie in der Regel tödlich. Bislang gibt es keinen zugelassenen Leishmanien-Impfstoff für den Menschen, obgleich mehrere Impfstoffe in der prä-klinischen und wenige bereits in der klinischen Entwicklungsphase sind [62]. Die Möglichkeiten der Prävention beschränken sich bislang also auf das Vermeiden von Sandmücken-Bissen. Neben dem Menschen werden auch Tiere infiziert. So kommt insbesondere dem caninen Erregerreservoir durch die Mobilität und die große Nähe zum Menschen eine besondere Bedeutung in der Ausbreitung von Leishmanien zu (auf Mallorca und Sizilien sind beispielsweise ca. 70% der Hunde infiziert [63]–[65]). Für Hunde besteht die Möglichkeit einer Impfung gegen die im Mittelmeerraum häufige Art *L. infantum* [66].

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die Leishmaniasis in 98 Staaten endemisch, wobei es jährlich laut Schätzungen zu rund 1,5 Millionen kutanen und 0,5 Millionen viszeralen Neuinfektionen beim Menschen kommt [67]. Dabei stehen Leishmaniasis und Immundefizienz, wie beispielsweise im Rahmen einer AIDS-Erkrankung, Tuberkulose oder Mangelernährung, in engem Zusammenhang zueinander. Als opportunistische Erreger sind viszerale Verlaufsformen häufiger und schwerwiegender, die Manifestationsorte diverser und die Therapie beider Erkrankungen durch die jeweils andere erschwert [67]. Aufgrund des Klimawandels und der zunehmenden Globalisierung ist eine deutliche Zunahme von vormals seltenen oder gar unbekanntem Vektoren und Erregern auch in Zentraleuropa zu bemerken [68]. Daher ist auch hierzulande von einer steigenden Zahl an Leishmaniasis

erkrankten Personen auszugehen. Diese Entwicklung dürfte aktuell nicht zuletzt auch durch den Flüchtlingszustrom aus dem Nahen Osten und Nordafrika beschleunigt werden.

Der Lebenszyklus der Leishmanien umfasst einen Wirtswechsel: Während sich die Parasiten im Darmtrakt ihrer Vektoren zu geißeltragenden Promastigoten entwickeln, wandeln sie sich in ihrem Endwirt in die amastigote (unbegeißelte) Form um. Die Makrophagen stellen die Zielzellen der Parasiten dar, in denen schließlich die Replikation erfolgt. In Abhängigkeit der Leishmanien-Art kommt den neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle als Zwischenwirt zu, um die Zeitspanne zwischen Erreger-Inokulation und suffizienter Rekrutierung von Makrophagen zu überbrücken und der Erkennung und Zerstörung im extrazellulären Milieu zu entgehen (Abbildung 2).

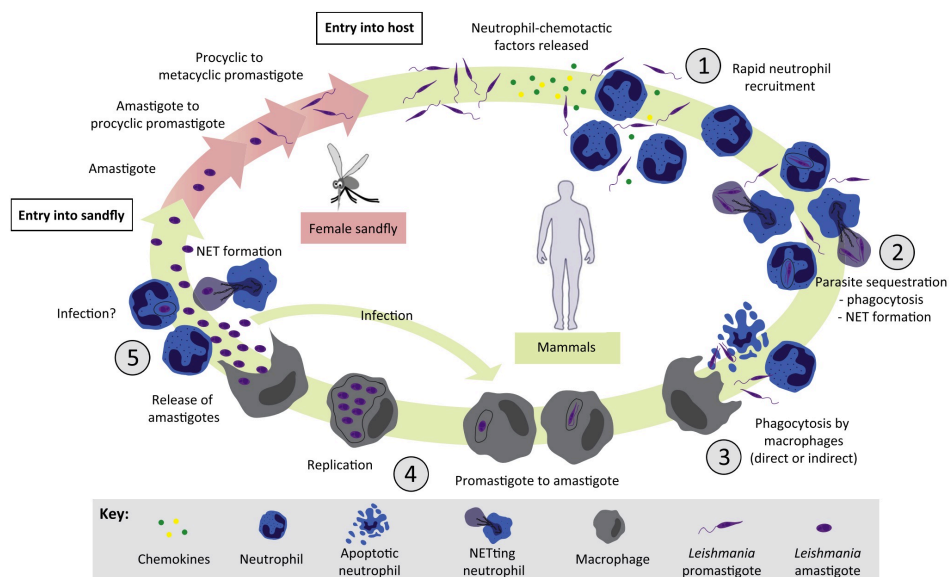


Abbildung 2) Die Rolle neutrophiler Granulozyten im Lebenszyklus der Leishmanien innerhalb des Säugetier-Wirts (aus [69]). (1) Weibliche Sandmücken übertragen durch Blutmahlzeit infektiöse Promastigoten auf den Menschen oder andere Wirbeltiere. Es kommt durch Faktoren des Vektors, der Parasiten und des Wirts zur Freisetzung chemotaktischer Signale. Neutrophile Granulozyten (PMN) werden schnell und in großer Zahl zum Ort der Infektion rekrutiert. (2) Dort kommt es zur Phagozytose der Erreger und zur Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs). (3) Schließlich gelangen überlebende Leishmanien direkt oder indirekt in Makrophagen, ihre Ziel-Wirtszellen. Innerhalb der Makrophagen erfolgt die Transformation in die amastigote Form und die Replikation durch einfache Teilung (4). Tage oder Wochen nach der initialen Infektion kommt es zur Rekrutierung einer zweiten Welle von PMN, die regelhaft in chronischen Läsionen gefunden werden. Amastigote Leishmanien werden aus rupturierenden Makrophagen freigesetzt und durch weitere Makrophagen und möglicherweise auch PMN aufgenommen. Es kommt erneut zur Induktion von NETs (5). Nicht-infizierte, weibliche Sandmücken nehmen die Amastigoten während der Blutmahlzeit auf. Im Mitteldarm der Vektoren kommt es über mehrere Schritte zur Ausbildung der infektiösen, metazyklischen Promastigoten, die schließlich auf andere Wirte übertragen werden.

Insbesondere bei der Art *L. major* kommt es zu ausgeprägter Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Ort der Inokulation [70]–[72]. So wurde für *L. major* *in vitro* gezeigt, dass die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten erfolgreich infiziert werden, was zur Ableitung der Hypothese des „Trojanischen Pferdes“ führte [73]. In der Folge konnte für *L. major*-infizierte Neutrophile eine aktive Verzögerung der Apoptose durch Hemmung der Caspase-3-Aktivierung nachgewiesen werden [74]. Die um zwei bis drei Tage verzögerte

Apoptose könnte dem sicheren Verweilen innerhalb einer intrazellulären Nische bis zur ausreichenden Rekrutierung von Makrophagen dienen. Während dieser Zeit induzieren die Erreger eine vermehrte Ausschüttung von Interleukin-8 (IL-8), das zu vermehrter Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere neutrophiler Granulozyten führt [75]. Überdies werden vermehrt Makrophagen-rekrutierende Faktoren wie MIP-1 α (engl. *macrophage inflammatory protein*) und in geringerem Maße auch MIP 1 β freigesetzt [76]. Schließlich werden die infizierten Neutrophilen apoptotisch und es kommt durch die Phagozytose Erreger-haltiger Apoptose-Körperchen („Trojanisches Pferd“) oder die simultane Aufnahme von Apoptose-Körperchen und freien Leishmanien („Trojanischer Hase“) zur Infektion der Makrophagen [77]. Dieser Prozess wird von vermehrter Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF- β (engl. *transforming growth factor*) durch die Makrophagen gefolgt [77]. In einem Sandmücken-Stich-Modell mit *in-vivo imaging* konnte die Hypothese des Trojanischen Pferdes nicht durch entsprechende Beobachtungen bestätigt werden [71]. Vielmehr zeigte sich ein Freiwerden von *L. major*-Promastigoten aus spät-apoptotischen PMN und die konsekutive Aufnahme der Erreger durch Makrophagen. Ob die Erreger dabei komplett frei vorlagen, oder von Wirtszellmembran-Bestandteilen umgeben waren, blieb offen. Grundsätzlich dienen infizierte und schließlich apoptotisch gewordene neutrophile Granulozyten also als Zwischenwirte, Vektoren und *Immune-Silencer* der stillen Infektion von Makrophagen durch *L. major* [71]. Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Etablierung von Infektionen durch andere Leishmanien-Arten ist weniger geklärt. So führten zahlreiche Studien mit unterschiedlichen Protokollen zur Depletion der Neutrophilen zu verschiedenen, teils widersprüchlichen Ergebnissen [78], [79]. Bei Infektionen durch die meisten Leishmanien-Arten scheinen neutrophile Granulozyten eine eher protektive Rolle einzunehmen [78], [80].

Auch für die Lipidmediatoren wurden in der Pathogenese der Leishmaniasis in Abhängigkeit der Leishmanien-Art verschiedene Rollen postuliert. Bereits 1985 konnte eine gesteigerte Synthese pro-inflammatorischer Lipidmediatoren durch *L. donovani*-infizierte Makrophagen nachgewiesen werden [81]. Die gleiche Beobachtung konnte auch bei Infektion durch *L. braziliensis* gemacht werden, wobei das gesteigerte LTB₄ hier in direktem Zusammenhang zur Elimination und Kontrolle der Erreger stand [82]. Auch für neutrophile Granulozyten konnte gezeigt werden, dass Kontakt zu *L. amazonensis* die Freisetzung von LTB₄ induziert, dessen auto- und parakrine Effekte die Abtötung von Leishmanien, Degranulation und ROS-Produktion kontrollieren [83]. Weiterhin zeigte sich die

Degranulation von PMN als wichtiger Aktivator von Makrophagen, welche über die Synthese von LTB₄ *L. amazonensis* kontrollieren können [84]. Interessanterweise waren bei Menschen mit *L. amazonensis*-Infektion und diffus-kutanem Befallsmuster deutlich erhöhte Serumspiegel des anti-inflammatorischen Lipidmediators Resolvin D1 im Vergleich zum lokal beschränkten Befall nachweisbar [85], [86]. Die hohen Resolvin D1-Spiegel waren mit erhöhten Arginase I- und TGF- β -Spiegeln assoziiert, deren immunsuppressive Eigenschaften das Überleben von *L. amazonensis* steigerten [86]. Zudem korrelierte Resolvin D1 negativ mit TNF- α , einem zentralen Mediator in der Kontrolle der Leishmaniasis [85]. In begleitenden *in vitro*-Experimenten fand sich zum einen ein transients Anstieg von Resolvin D1 während der ersten vier Stunden der Infektion humaner Makrophagen durch *L. amazonensis*-Promastigoten. Zum anderen führte Resolvin D1-Behandlung dosisabhängig zu erhöhtem Infektions-Index, vermehrter Replikation sowie gesteigerter Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren. *L. amazonensis* „überschreibt“ also durch frühe Induktion von Resolvin D1 das physiologische, pro-inflammatorische Entzündungsprogramm und umgeht auf diese Weise weitere Phagozyten-Aktivierung; es entsteht eine anti-inflammatorische Nische. Auch für die Art *Trypanosoma cruzi* der Gattung der Trypanosomen, die eng mit Leishmanien verwandt sind, konnte jüngst eine eigenständige Resolvin-Freisetzung sowie erhöhte Resolvin-Spiegel im Plasma infizierter Mäuse festgestellt werden [87].

Interessanterweise rekrutieren und prozessieren mehrere Leishmanien-Arten Lipid-Organellen (engl. *lipid droplets*), die nach Erregerkontakt gehäuft durch die Wirtszellen gebildet werden [88]. Auch sezernieren Promastigoten verschiedener Arten mit dem *Leishmania Chemotactic Factor* (LCF) ein chemotaktisch wirksames Lipid, das zudem als Agonist des ALX-Rezeptors anti-inflammatorische Wirkung entfaltet [75]. Sowohl LCF als auch LXA₄ führten zu einer verstärkten Phagozytose von *L. major* durch PMN, während gleichzeitig das intrazelluläre Überleben der Erreger durch reduzierte Elimination zunahm [89]. *L. infantum* ist sogar in der Lage, eigenständig das anti-inflammatorische PGF2 α zu synthetisieren und freizusetzen [90]. Dies zeigt eindrücklich, dass Lipide und Lipidmediatoren in die Überlebensstrategien verschiedener *Leishmania*-Arten involviert sind.

Daten zum Einfluss einer *L. major*-Infektion neutrophiler Granulozyten auf deren Freisetzung von Lipidmediatoren liegen bislang nicht vor. Sie können helfen, die Pathophysiologie der kutanen Leishmaniasis in der Alten Welt besser zu verstehen und potentielle therapeutische Ziele zu identifizieren.

1.3.2 *Anaplasma phagocytophilum* und die Interaktion mit der Wirtszelle

Anaplasma phagocytophilum ist ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, das durch Zeckenbiss übertragen wird und sich ausschließlich in neutrophilen Granulozyten repliziert. In den 1990er Jahren kam es in Folge von Genanalysen zu einer taxonomischen Neuordnung, die den gleichen Erreger als Ursache der Humanen Granulozytären Anaplasiose (HGA) sowie diverser Tiererkrankungen identifizierte [91]. Demnach stellen neben Hunden, Katzen und Pferden vor allem Wiederkäuer ein wichtiges, dem Menschen nahes Erregerreservoir dieses Erregers dar, der bereits 1932 als Erreger von Tierkrankheiten erkannt wurde. Infektionen mit *A. phagocytophilum* sind die häufigsten Zeckenübertragenen Erkrankungen bei europäischen Tieren und insbesondere in der Schafzucht ein großes Problem, dem jährlich zigtausende Lämmer durch konsekutiv begünstigte Sekundärinfektionen zum Opfer fallen [92]. In Europa stellt der Gemeine Holzbock, *Ixodes ricinus*, in Nordamerika die Arten *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus* die Hauptvektoren der bis dato äußerst selten diagnostizierten Erkrankung dar. Die HGA verläuft meist asymptomatisch (ca. 75%) und manifestiert sich andernfalls sehr variabel. Beschrieben sind leichtere Verläufe mit grippeähnlichen Symptomen oder gastrointestinalen Beschwerden bis hin zu schweren Komplikationen wie akutem Atemnotsyndrom, Meningoenzephalitis und Multiorganversagen, wobei die Letalität der symptomatischen HGA mit 2-3% beziffert wird. Von schweren Verläufen sind insbesondere Immunsupprimierte betroffen. Aufgrund des Klimawandels wird eine Zunahme von Zecken und deren Aktivität angenommen. Entsprechend wird auch in Europa von einer steigenden Zahl von HGA-Infektionen ausgegangen [68], [93]. Eine häufigere Diagnosestellung beim Menschen dürfte jedoch auch mit dem wachsenden Bewusstsein für diese Erkrankung im Zusammenhang stehen.

Um in ihre Wirtszellen einzudringen, sich dort zu replizieren und schließlich wieder von einer Zecke aufgenommen zu werden, müssen Anaplasmen den Abwehrmechanismen ihrer Wirtszelle trotzen und den Zellmetabolismus zu ihren Gunsten umgestalten. Tatsächlich resultiert aus der Infektion mit *A. phagocytophilum* ein „aktiviert-deaktivierter“ Misch-Phänotyp der Wirtszelle [94]. Zum einen kommt es zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit Degranulation und Proteasen-Freisetzung [95] sowie vermehrter Chemokin-Sekretion wie z.B. IL-8 [96]. Die resultierende Gewebeschädigung führt über das Freiwerden weiterer Immunzell-rekrutierender Faktoren (DAMPs) zu zusätzlicher Inflammation und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Zum anderen führt eine Infektion zur Dysfunktion von endothelialer Adhärenz [97], Phagozytose [98],

Phagolysosomen-Bildung [99] und ROS-Produktion [100], [101]. Auf diese Weise wird die intrazelluläre Elimination der Erreger verhindert. Auch führt die Inhibition der Diapedese infizierter Zellen zur Akkumulation infizierter PMN in den Blutgefäßen. Dies erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung der Anaplasmen bei erneutem Zeckenbiss. Da Menschen unnatürliche Wirte und somit eine biologische Sackgasse zu sein scheinen, äußert sich die Infektion hier in den meisten Fällen lediglich in Form einer leichten, zeitlich begrenzten Bakteriämie [102]. Bei Befall von Tieren dürfte diese Akkumulation von Erregern im Blut in relevanterem Ausmaß der Verbreitung dienen. Durch Aktivierung von p38 MAPK, PI3K/ Akt und NF- κ B wird zudem die Apoptose der Wirtszellen gehemmt, was die Replikation innerhalb der parasitären Vakuolen in den sonst kurzlebigen Zellen ermöglicht [103]–[105].

Möglich wird eine solch schwerwiegende Modulation der Wirtszellen unter anderem durch Wirtszell-ähnliche Proteine wie das Nukleomodulin Ankyrin A (AnkA). AnkA ist in der Lage, über eine direkte Bindung zur nukleären DNA der Wirtszelle deren Genexpression zu manipulieren [94]. Dies führt zu dramatischen epigenetischen Änderungen und einer zellulären Re-Programmierung auf dem chromosomalen Level. Dabei kommt den cis-Elementen als regulatorischen Sequenzabschnitten von Genen im Sinne von „An-/Aus-Schaltern“ besondere Bedeutung zu [94]. Auch die Freisetzung von Lipidmediatoren durch die Wirtszelle könnte von diesen Erreger-induzierten Änderungen betroffen sein. Ob also eine *A. phagocytophilum*-Infektion neutrophiler Granulozyten eine Änderung der Lipidmediatoren-Freisetzung nach sich zieht, soll in dieser Arbeit durch Bestimmung der Prototypen LTB₄ und LXA₄ untersucht werden.

1.3.3 Interaktion von *Chlamydia pneumoniae* und neutrophilen Granulozyten

Chlamydia pneumoniae (*C. pneumoniae*) ist ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, welches für eine Vielzahl von Infektionen der oberen Atemwege (Pharyngitis, Otitis, Sinusitis) und unteren Atemwege (Bronchitis und atypische, interstitielle Pneumonie) verantwortlich ist. Dabei stellt *C. pneumoniae* eine der häufigsten Ursachen für meist mild verlaufende, jedoch rezidivierende Atemwegsinfektionen dar. Die Seroprävalenz von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* steigt während der Pubertät rasant an und beträgt um das 20. Lebensjahr bereits ca. 50%, um das 65. Lebensjahr ca. 75% [106]. Neben akuten Erkrankungen wurden andauernde *C. pneumoniae*-Infektionen mit chronischen Erkrankungen wie COPD (von engl.: *chronic obstructive pulmonary disease*) und Asthma bronchiale assoziiert [107]. Experimentellen Erkenntnissen zufolge besteht darüber hinaus

durch Dissemination über infizierte PBMCs ein Zusammenhang zur Pathogenese der Atherosklerose [108], [109] sowie der reaktiven Arthritis [110]. Weiterhin wurde eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen wiederholt mit Infektionen durch *C. pneumoniae* assoziiert (Meningoencephalitis, Multiple Sklerose, Guillain-Barré-Syndrom, Morbus Alzheimer und das chronische Erschöpfungssyndrom/Fatigue) [111].

Das Bakterium *C. pneumoniae* durchläuft einen biphasischen Entwicklungszyklus [112]: Zunächst liegt es in Form der infektiösen, äußerst robusten, jedoch metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (EBs, von engl. *elementary bodies*) vor. Diese werden durch Tröpfcheninfektion übertragen. Per Endozytose werden die EBs zunächst von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen der Atemwege aufgenommen, wodurch Membransumgeschlossene Einschlusskörper, sogenannte Inklusionen entstehen. Dabei wird die Fusion mit toxischen Lysosomen durch Modifikation der Membran mittels bakterieller Proteine inhibiert [113]. Bereits nach 8-12 Stunden bilden sich innerhalb der Inklusionen aus den EBs die metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RBs, von engl. *reticulate bodies*). Damit beginnt die Replikation durch Schizotomie (Zweiteilung; 12-48 Stunden post infectionem) und schließlich eine Re-Differenzierung zu EBs (48-72 post infectionem). Nach 72-96 Stunden kommt es durch Exozytose der Inklusionen oder Lyse der Wirtszelle zur erneuten Freisetzung der angereicherten EBs [112]. Diese ermöglichen neben der Dissemination im selben Wirt auch den Wirtswechsel über erregerhaltige Aerosole und Speichel.

Chlamydia pneumoniae ist zur Infektion einer Vielzahl von Zelltypen fähig, wobei der Infektion von Makrophagen eine zentrale Bedeutung in der Dissemination des Pathogens zukommt [108], [113]. Auch neutrophile Granulozyten dienen dem Erreger als Wirtszelle [108], [114]. Angelockt durch pro-inflammatorische Mediatoren der aktivierten Epithelzellen wie IL-8, sind PMN rasch und in großer Zahl am Ort der Infektion vorhanden. [115]–[117]. Dabei ist es *C. pneumoniae* möglich, sich in PMN zu replizieren und dafür die Apoptose der kurzlebigen Zellen zu inhibieren [114], [118]. Vermittelt durch NF- κ B kommt es bei den infizierten PMN zu vermehrter Freisetzung von IL-8, was über autokrine Mechanismen zur Inhibition der Apoptose beitragen dürfte [114], [118].

Grundsätzlich scheint den neutrophilen Granulozyten in der Pathogenese von *C. pneumoniae*-Infektionen eine begünstigende Rolle zuzukommen. So wurde *in vivo* gezeigt, dass die Präsenz von PMN die Bakterienlast während der ersten Tage durch gesteigerte Replikation in epithelialen Zelllinien erhöht und eine Depletion von PMN die Bakterienlast reduziert [119]. Auch eine Studie mit Mastzell-Depletion unterstreicht die

Rolle der neutrophilen Granulozyten im Kontext von *C. pneumoniae*-Infektionen. So ging Mastzell-Depletion mit niedrigerer Bakterienlast und gesteigertem Überleben einher, was einer verringerten Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten zugeschrieben wurde [120]. Klinisch konnte durch Analyse der bronchioalveolären Lavage (BAL) von Kindern mit Asthma bronchiale ebenso ein Zusammenhang zwischen Infektion mit *C. pneumoniae* und Neutrophilie sowie erhöhten IL-8 Werten hergestellt werden. In den untersuchten Kohorten konnte zudem die Neutrophilie in der BAL als positiver prädiktiver Marker für eine Infektion mit *C. pneumoniae* etabliert werden [121]. Schließlich konnte analog zur „Trojanisches Pferd-Hypothese“ bei *L. major* [73] auch für *C. pneumoniae* ein immunologisch stiller Aufnahmemechanismus in Makrophagen gezeigt werden (engl. *silent entry*) [122]. Demnach senden infizierte, apoptotische PMN „*find-me*“-Signale aus, um Makrophagen anzulocken [123]. Durch Expression von „*eat-me*“-Signalen wie Phosphatidylserin (PS) wird die Phagozytose der apoptotischen Wirtszelle mitsamt infektiösem Erreger induziert [124], [125]. Da die Erreger von wirtseigener Membran umgeben sind, werden die Chlamydien nicht erkannt. Infolge dieses Abräumens apoptotischer PMN durch Makrophagen, der Efferozytose, werden physiologischerweise „*forget-me*“-Signale ausgesendet. Diese sind anti-inflammatorisch wirksam und dienen der Auflösung der Entzündung. Bemerkenswerterweise zeigten sich auf Ebene der Mediatoren deutliche Unterschiede zwischen direkt infizierten und über apoptotische PMN infizierten Makrophagen: Direkt infizierte Makrophagen zeigten niedrigere Chlamydien-Replikation und höhere pro-inflammatorische TNF- α -Spiegel, während Makrophagen, die infizierte PMN phagozytiert hatten, vermehrte Erreger-Replikation und Freisetzung des anti-inflammatorischen TGF- β zeigten [122]. In der Summe finden sich also zahlreiche Hinweise, die auf ein Ausnutzen des anti-inflammatorischen Efferozytose-Mechanismus durch *C. pneumoniae* hindeuten. Apoptotische neutrophilen Granulozyten stellen also Zwischenwirte für die Infektion von Makrophagen dar.

Grundsätzlich scheinen neutrophile Granulozyten in gewissem Maße auch zur Kontrolle von Infektionen durch *C. pneumoniae* beizutragen. So wurde bei der Infektion von Mäusen durch *C. muridarum* gezeigt, dass insbesondere die Expression von TLR2 auf PMN und die damit verbundene Fähigkeit zur Phagozytose wichtig für die frühe Kontrolle von *C. muridarum*-Infektionen bei neonatalen Mäusen ist. Die Autoren übertrugen die Ergebnisse aufgrund der hinsichtlich Pathogenität, zeitlichem, immunologischem und histopathologischem Verlauf großen Ähnlichkeit zur *C. pneumoniae*-Infektion beim Menschen auf Infektionen im Kindesalter [126]. Weiterhin produzieren neutrophile Granulozyten und Makrophagen

Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL; Lipocalin-2), welches die Verfügbarkeit des wachstumslimitierenden Eisens limitiert und somit *in vivo* bakteriostatisch auf das intrazelluläre Chlamydienwachstum wirkt [127].

Chlamydien scheinen *in situ* zur Aufnahme von Wirtszell-eigenen Lipidkörperchen (engl. *lipid droplets*) in ihre Inklusionen fähig, deren pathophysiologische Relevanz noch nicht geklärt ist [128]. Zur Freisetzung von Lipidmediatoren im Kontext von Infektionen durch *C. pneumoniae* liegen jedoch Zelltypen-unabhängig keinerlei Daten vor. Als wichtige Regulatoren der Entzündungsreaktion soll in dieser Arbeit der Einfluss einer PMN-Infektion durch *C. pneumoniae* auf die Freisetzung von Lipidmediatoren beleuchtet werden.

1.4 Teil 2: Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten haben eine kurze Lebenserwartung, die durch Aktivierung am Ort einer Infektion oder Entzündung deutlich verlängert werden kann (siehe 1.1.2). Gleichwohl kommt es im betroffenen Gewebe zur Akkumulation von apoptotischen oder gar nekrotischen neutrophilen Granulozyten. Der Tod dieser Zellen moduliert die Aktivität des Immunsystems erheblich und kann zur Entstehung und Chronifizierung von Krankheiten beitragen [125], [129]. Dabei kommt es in Abhängigkeit der Form des Zelltodes zu unterschiedlichen Antworten des Immunsystems. Die beiden wichtigsten Zelltod-Entitäten, die Apoptose und die Nekrose, führen zu gegensätzlichen Entwicklungen: Während die Apoptose von PMN eine anti-inflammatorische Reaktion induziert, die zur Auflösung der Entzündung führt, kommt es durch massenhafte Nekrose zur Amplifikation der Entzündungsreaktion.

Neben der Apoptose und der Nekrose lässt sich mit der Nekroptose eine dritte Form des Zelltods abgrenzen. Bei der Nekroptose handelt es sich um einen Hybridmechanismus von Apoptose und Nekrose, bei der es nach Aktivierung von Todesrezeptoren jedoch nicht zur Apoptose, sondern zur Autophagie der betroffenen Zelle kommt [130]. Dabei kommt es zum intrazellulären Abschnüren von Vesikeln, die Organellen und Zytosol aufnehmen und schließlich mit Lysosomen verschmelzen, in denen es zur vollständigen Degradation des organischen Materials kommt [130]. Im Falle der neutrophilen Granulozyten besteht überdies die Möglichkeit zur NETose, dem Untergang der Zelle im Rahmen der NET-

Freisetzung (siehe 1.1.4.3). Sowohl bei der NETose als auch bei der Nekroptose wird Kernchromatin freigesetzt wird, sodass es neben Nukleinsäure-markierender Verfahren ergänzender Methodik bedarf, um diese zwei Zelltod-Entitäten klar voneinander zu differenzieren [32].

1.4.1 Apoptose

Die Apoptose stellt eine Form des geordneten, nicht-entzündlichen Zelltodes dar. Sie ist ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle, Adaptation und Erneuerung von Geweben. In der Initiationsphase dieses aktiven Stoffwechselprozesses kommt es durch extrinsische oder intrinsische Faktoren (z.B. *TNF- α -Signaling* bzw. Aktivität von p53) zur Aktivität proteolytischer Enzyme [129]. Unter diesen stellen die Caspasen die zentralen Akteure der Apoptose dar. Sie bewirken in der Ausführungsphase direkt oder über sekundäre Zielproteine vermittelt die Degradation der nukleären Membran, des Zytoskeletts sowie der DNA [129]. Dabei kommt es durch signalverstärkende Rückkopplung zu einer Caspasen-Kaskade, die im programmierten Untergang der Zelle mündet [129].

Durch Fragmentierung der Zelle in eine Vielzahl membranbesetzter Apoptose-Körperchen kann das Freisetzen gewebeschädigender intrazellulärer Substanzen verhindert und die Phagozytose der zugrunde gehenden Zelle erleichtert werden. Es kommt zur Freisetzung einer Vielzahl chemotaktisch wirksamer „*find-me*“-Signale, die den weiteren Werdegang der apoptotischen Zelle organisieren und die Immunreaktion regulieren [131]. Ein wichtiges, stark chemotaktisches „*find-me*“-Signal stellt das Phospholipid Lysophosphatidylcholin (LPC) dar [123]. Zudem kommt es auf den Membran-Bläschen (engl. *blebs*) zur Expression von „*eat-me*“-Molekülen, welche die Zelle als apoptotisch markieren. Ein wichtiger dieser „*eat-me*“-Marker ist das Phosphatidylserin [131]. In der Folge kommt es zum Abräumen (engl. *clearance*) der apoptotischen Zellen durch Phagozyten, der Efferozytose. Dieser Prozess wird von der Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren wie TGF- β und IL-10 begleitet [129], [131].

Auf der Ebene der Lipidmediatoren wurde kürzlich gezeigt, dass die Apoptose von neutrophilen Granulozyten mit vermehrter Freisetzung von *specialized pro-resolving mediators* (SPMs) einhergeht [132]. Diese wurden begleitet von erhöhten Spiegeln von PGE₂ und PGD₂, die ihrerseits zum *class switch* von pro- zu anti-inflammatorischen Lipidmediatoren beitragen können [37], [132]. Zudem kommt es nach Aufnahme der apoptotischen PMN durch Makrophagen im Rahmen der Efferozytose zu weiterer Bildung

von SPMs [132]. Im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion bilden neutrophile Granulozyten darüber hinaus Annexin A5-positive und charakteristischerweise CD66b-positive Mikropartikel (engl. *microparticles*), die in großem Maße SPM-Vorstufen enthalten [133]. Gehen neutrophile Granulozyten also in die Apoptose, so steigern diese Mikropartikel zusätzlich die Efferozytose und induzieren einen anti-inflammatorischen Makrophagen-Phänotyp [133].

1.4.2 Nekrose

Durch Exposition gegenüber starken Noxen kann es zu einer akuten zellulären Schädigung oder fataler Zytotoxizität kommen, welche im spontanen Zelltod der betroffenen Zelle, der Nekrose, mündet. Sie gilt als passiver Prozess, der mit der Auflösung der Membranintegrität und der Freisetzung gewebeschädigender Zellinhalte einhergeht. So wirken viele zytosolische Proteine und freigewordene Nukleinsäuren als pro-inflammatorisches Schädigungs-assoziiertes molekulares Muster (engl. *damage-associated molecular pattern, DAMP*). Resultat ist eine ausgeprägte Entzündungsreaktion, die durch die Rekrutierung von Immunzellen unterhalten wird. Diese erkennen die DAMPs und amplifizieren die Inflammation. Das Abräumen nekrotischen Materials durch Phagozyten führt also zur Freisetzung pro-inflammatorischer Botenstoffe. Zur Nekrose kommt es, wenn die Zelle durch ausgeprägten akuten Schaden an der Aktivierung des Apoptosesystems gehindert wird (primär), oder apoptotisches Zellmaterial nicht adäquat aus dem Gewebe entfernt wird (sekundär) [134].

1.5 Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit

Neutrophile Granulozyten sind potente Effektorzellen, die in herausragendem Maße zur Eindämmung akuter Infektionen und zur Elimination eingedrungener Pathogene beitragen. Ihre Effizienz und ihr Erfolg stehen dabei in direktem Zusammenhang zur suffizienten Rekrutierung und Aktivierung. Der pro-inflammatorische Lipidmediator LTB₄ wurde als zentraler Akteur der Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten identifiziert [16]. Da LTB₄ in der akuten Inflammation vorrangig durch Neutrophile selbst freigesetzt wird [16], [45], steuert dieser Zelltypus im Sinne eines *feed-forward*-Mechanismus maßgeblich die eigene Rekrutierung und Aktivierung und somit die Initiationsphase der Inflammation [47]. Durch ihre zentrale Rolle in der transzellulären Synthese von Lipoxinen und anderen *specialized pro-resolving mediators* (SPMs) dämpfen neutrophile Granulozyten im Verlauf Immunzell-Influx und –Aktivierung. Dadurch regulieren sie maßgeblich die Auflösung der Entzündungsreaktion [20], [135]. Die Freisetzung von Lipidmediatoren befähigt neutrophile Granulozyten also nicht nur zur Regulation ihrer eigenen Rekrutierung und Aktivierung. Vielmehr sind sie durch Lipidmediatoren zur richtungsweisenden Regulation der akuten Entzündungsreaktion fähig.

Teil 1) Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten

Verschiedene Arten intrazellulärer Erreger überleben in neutrophilen Granulozyten und entziehen sich den Eliminationsmechanismen ihrer Wirtszellen. Dabei kommt es durch Interaktion mit der Wirtszelle zur Modulation der Entzündungsreaktion. In welchem Maß die Freisetzung von Lipidmediatoren durch Neutrophile infolge intrazellulärer Infektionen beeinflusst wird, ist bislang nicht geklärt. Die Fragestellung des ersten Teils dieser Arbeit lautete also:

- Führt eine Infektion neutrophiler Granulozyten durch die intrazellulären Erreger *Anaplasma phagocytophilum*, *Chlamydia pneumoniae* oder *Leishmania major* *in vitro* zu einer veränderten Freisetzung von LTB₄ bzw. seines funktionellen Antagonisten LXA₄?

Teil 2) Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten

Am Ort einer Infektion oder Gewebeschädigung kommt es zur Akkumulation sterbender und toter neutrophiler Granulozyten. In diesem Szenario kommt den apoptotischen Zellen ein besonderer Stellenwert zu, da sie aktiv das inflammatorische Umfeld mitgestalten. In

dieser Arbeit soll daher das Lipidmediatorprofil apoptotischer neutrophiler Granulozyten anhand der pro- und anti-inflammatorischen Prototypen LTB_4 bzw. LXA_4 erstellt werden. Die zentralen Fragestellungen dieses Teils lauteten:

- Setzen apoptotische neutrophile Granulozyten in Ruhe und nach Stimulation LTB_4 bzw. LXA_4 frei?
- Beeinflussen apoptotische neutrophile Granulozyten die Lipidmediator-Freisetzung durch vitale PMN?

Da zu Beginn dieser Arbeit eine umfangreiche Studie zum Lipidmediator-Profil apoptotischer PMN erschienen war, die eine vermehrte SPM-Freisetzung zeigte [132], wurden lediglich LTB_4 -Konzentrationen bestimmt und auf LXA_4 -Messungen verzichtet. Abbildung 3 fasst Hintergrund und Fragestellungen dieser Arbeit zusammen.

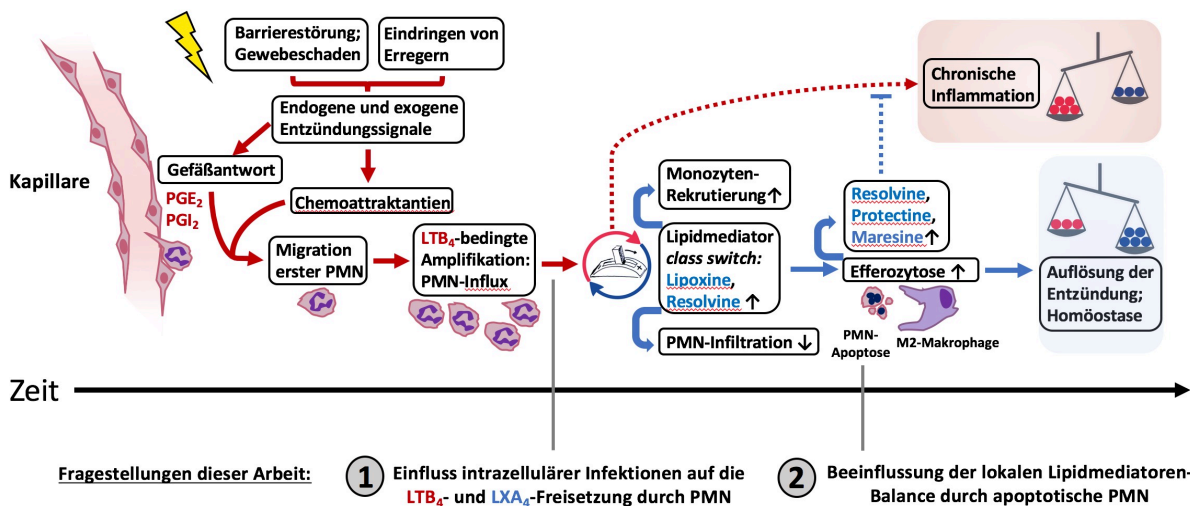


Abbildung 3) Die zentrale Rolle der durch neutrophile Granulozyten (PMN) freigesetzten Lipidmediatoren in der Regulation der akuten Entzündungsreaktion. Infolge eines Gewebeschadens wird durch das Endothel PGE_2 und PGI_2 freigesetzt, welche zu Vasodilatation und gesteigerter Permeabilität führt. Erste PMN erreichen den Ort der Schädigung und amplifizieren durch LTB_4 -Freisetzung lokale Signale, sodass es zum PMN-Swarming kommt. Durch PGE_2 determiniert, kommt es im Verlauf zum class switch und vermehrter Synthese von SPMs. In der vorwiegend transzellulären SPM-Synthese nehmen PMN eine Schlüsselposition ein. SPM-Vertreter wie LXA_4 limitieren den PMN-Influx und rekrutieren Monozyten, welche sich zu anti-inflammatorischen Makrophagen differenzieren. Es kommt SPM-vermittelt zu gesteigerter Efferozytose. In der Summe führen SPM-Effekte zur Auflösung der Inflammation und Rückkehr zur Homöostase. Bei Ausbleiben des class switch, eingeschränkter SPM-Freisetzung oder –Wirkung ist der Übergang in eine chronische Entzündung möglich. Fragestellungen: 1) Sollten intrazelluläre Erreger die Lipidmediator-Freisetzung durch PMN modulieren, manipulierten sie darüber maßgeblich ihre Umgebung sowie den Werdegang der Inflammation. Beispielhaft soll der Einfluss einer PMN-Infektion durch *A. phagocytophilum*, *C. pneumoniae* und *L. major* untersucht werden. 2) Resultat einer Entzündungsreaktion sind in der Regel zahlreiche apoptotische PMN. Ihr Vermögen zur Freisetzung von LTB_4 sowie ihr Einfluss auf die LTB_4 -Freisetzung vitaler PMN soll untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Isolation neutrophiler Granulozyten aus peripherenvenösem humanen Vollblut

Genehmigt durch die Ethik-Kommission der Sektion Medizin der Universität zu Lübeck (Az: 05-124).

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten neutrophilen Granulozyten wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn aus humanem Vollblut isoliert. Um circadiane Schwankungen zu minimieren und eine verbesserte Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde stets zu gleicher Zeit (7.30-8.30 Uhr) Blut entnommen. Dieses wurde gesunden, freiwilligen Probanden nach Aufklärung und schriftlich erklärtem Einverständnis aus einer oberflächlichen Armvene entnommen und zwecks Inhibierung der Koagulation in 9 ml Lithium-Heparin-Monovetten aufgenommen.

Die angewandte Technik der Isolation basiert auf zwei aufeinander folgenden Dichtegradienten-Zentrifugationen. In einem ersten Schritt wurden 25 ml frisch gewonnenen Bluts auf einen vorbereiteten Gradienten, zu gleichen Teilen bestehend aus je 12,5 ml Histopaque 1119 (unten) und Lymphozytenseparationsmedium 1077 (oben), geschichtet (Abbildung 4a). Mit ihren Dichten von 1,119 bzw. 1,077 g/ml ermöglichen sie eine erste Auftrennung der im Blut enthaltenen Zellen, deren Dichte in Abhängigkeit vom Zelltypus zwischen 1,05 und 1,10 g/ml variiert (Tabelle 3).

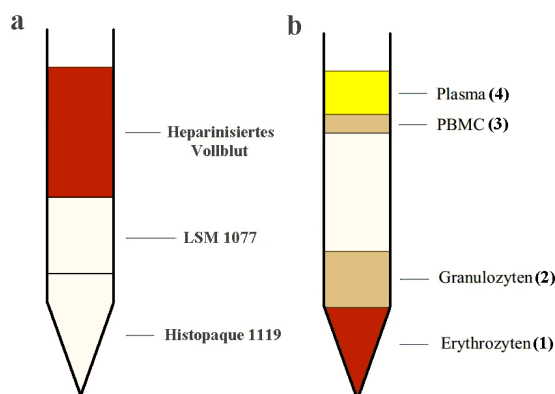


Abbildung 4) Die erste Dichtezentrifugation dient einer groben Auftrennung der zellulären Blutbestandteile a) Frisch gewonnenes, heparinisiertes Vollblut wurde auf eine Schichtung von Histopaque 119 und LSM 1077 aufgetragen und zentrifugiert (5 Minuten bei 54 x g, weitere 30 Minuten bei 216 x g, ohne Bremse). **b)** Durch die Zentrifugation ergab sich eine Dichtebedingte Trennung der Blutbestandteile in vier Schichten.

Blutbestandteil	Dichte (g/ml)
Plasma	~ 1,03
Thrombozyten	~ 1,05
Monozyten und Lymphozyten	~ 1,07
Granulozyten	~ 1,08
Erythrozyten	~ 1,10

Tabelle 3) Optimale Dichte für die Stabilität verschiedener Blutbestandteile

Im Rahmen der Dichtezentrifugation mit Histopaque 1119 und LSM 1077 können die Blutbestandteile anhand ihrer unterschiedlichen Dichten aufgetrennt werden (Werte gemäß Herstellerangaben). Beide Medien bestehen im Wesentlichen aus Saccharose-Polymeren mit einem molekularen Gewicht von 400 kDa. Für optimalen pH, Osmolalität und Dichte sorgt Natriumdiatrizoat.

Durch Zentrifugation (5 min bei $54 \times g$ und weitere 30 min bei $216 \times g$, ohne Bremse) ergab sich eine erste Auftrennung des Vollbluts in vier Schichten, bestehend aus Erythrozyten (1), Granulozyten (2), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, (3)) und Plasma (4) (Abbildung 4b). Zur weiteren Aufreinigung der Granulozyten wurden diese zunächst in einem 50 ml-Tube mit PBS gewaschen (10 min, $865 \times g$, mit Bremse) und das resultierende Zellpellet in 2ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert.

Der zweite Dichtegradient bestand aus fünf in einem 15 ml-Tube übereinander geschichteten Percoll-Verdünnungen (85% - 65%). Für die Verdünnungsstufen wurde Percoll im Verhältnis 10:1 mit 10-fach konzentriertem PBS angesetzt und anschließend entsprechend der gewünschten Verdünnung mit RPMI-Komplettmedium verdünnt. Beginnend mit dem höchsten Percoll-Gehalt von 85%, erfolgte eine vorsichtige Schichtung des Gradienten, wobei von den Verdünnungsstufen 85% - 70% je 2 ml, von der 65%- Verdünnung 3ml genutzt wurde. Die resuspendierte Granulozyten-Suspension wurde schließlich auf diese Percoll-Schichten aufgetragen und zentrifugiert (25 min, $865 \times g$, ohne Bremse) (Abbildung 5a). Nach der Zentrifugation stellte sich folgende Schichtung ein (Abbildung 5b): In der obersten Schicht fanden sich verbliebene PBMCs (3), welche verworfen wurden. In den darauffolgenden Percoll-Trennschichten fanden sich vorwiegend Granulozyten (2). Diese wurden mittels Transferpipette zügig in ein PBS-gefülltes 50 ml-Tube überführt, um Percoll-induzierten Zellschaden zu vermeiden. Die unteren, auch Erythrozyten enthaltenden Schichten wurden mitsamt dem am Boden befindlichen Erythrozyten-Pellet (1) verworfen. Nach einem weiteren Waschvorgang in PBS (Auffüllen auf 50ml, Mischen mit 25 ml-Stabpipette, Zentrifugation von 10 min, $865 \times g$, mit Bremse) wurde das resultierende Pellet in 2 ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und für die Versuche eingestellt.

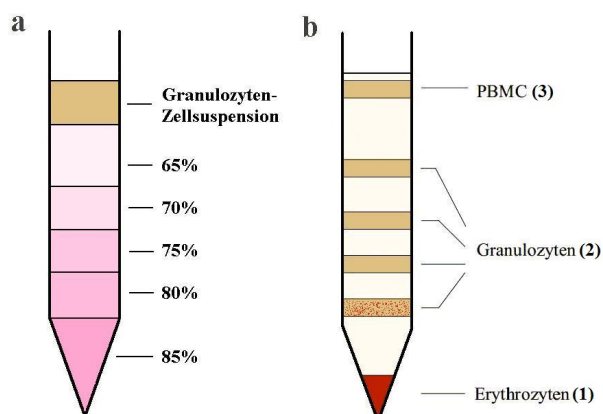


Abbildung 5) Aufreinigung der Granulozyten-Suspension in einer zweiten Dichtegradienten-Zentrifugation a) Durch einen fünfstufigen Percoll-Gradienten werden die Granulozyten von den verbliebenen PBMCs und Erythrozyten getrennt. b) Nach der Zentrifugation (25 min, $865 \times g$, ohne Bremse) finden sich die Granulozyten-führenden Schichten zwischen den Schichten der leichteren PBMC und den schwereren Erythrozyten.

2.1.1 Bestimmung und Einstellung der Zellzahl

In eine Neubauer Improved Zählkammer (Grundfläche 0,0625 mm²/Kleinquadrat, Tiefe 0,1 mm) wurden 10 µl einer 1:10-Verdünnung, bestehend aus 10 µl der resuspendierten Zellsuspension, 60 µl RPMI-Komplettmedium sowie 30 µl Kristallviolett, pipettiert und die vier äußeren Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro Mililiter errechnet sich durch Multiplikation des Mittelwerts der vier Großquadrate, des Verdünnungsfaktors 10 der Zellsuspension und des Volumenfaktors 10.000 der Zählkammer.

$$(\text{Mittelwert der vier Großquadrate}) \times (\text{Verdünnungsfaktor } 10) \times (\text{Volumenfaktor } 10^4) = \text{Zellen / ml}$$

Die anschließende Einstellung der Zellzahl auf die gewünschte Konzentration erfolgte mittels weiterer Verdünnung bzw. Zentrifugation und Aufnahme in kleinerem Volumen. Für die Aufnahme der Zellen in einem anderen Medium erfolgte ein Wasch-Zwischenschritt mit PBS (10min, 865 x g, mit Bremse). Nach Zentrifugation wurde das Pellet entsprechend der gewünschten Konzentration im Versuchsmedium resuspendiert und die Zellzahl adjustiert.

2.1.2 Qualität der isolierten neutrophilen Granulozyten

Für die Beurteilung der Reinheit wurden etwa 100.000 Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 µl mittels Zytozentrifuge (5 min, 28 x g) auf einen Objektträger aufgebracht. Die so erstellten Zytospin-Präparate wurden in einer Methanol-Triphenylmethan-Lösung fixiert und einer zweischrittigen Färbung unterzogen: Durch die Färbung mit Eosin Y (Diff-Quik I) wurden die Granula rot, durch die Färbung mit Thiazin (Diff-Quik II) die Zellkerne blau gefärbt. Sowohl der Fixier- als auch die Färbeschritte dauerten je zwei Minuten. Nach Abspülen überschüssiger Färbelösung mit Aqua dest. erfolgte schließlich die Beurteilung der Zellen durch Öl-Immersionmikroskopie. Charakteristikum reifer, vitaler neutrophiler Granulozyten ist der gelappte Kern: Als segmentkernige neutrophile Granulozyten konnten sie von unreifen Stabkernigen unterschieden werden.

2.1.3 Zellkulturbedingungen

Alle in dieser Arbeit ausgeführten Experimente wurden *in vitro* mit humanen primären neutrophilen Granulozyten in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro Mililiter durchgeführt, sofern die Konzentration nicht anders angegeben wurde. Es wurden Pyrogenfreie Verbrauchsmaterialien genutzt und unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Etwaige Inkubationen erfolgten im Brutschrank bei 37 °C und einer Konzentration von 5 % CO₂ sowie 20 % O₂, sofern nicht anders vermerkt.

2.2 Teil 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten

2.2.1 *Leishmania major*

Das genutzte Isolat der Art *Leishmania major* (*L. major*) entstammt dem Hautbiopsat eines israelischen Patienten am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg (MHOM/IL/81/FEBNI). Die Erreger wurden in schräg gegossenen 96-well-Kaninchenblut-Agarplatten flachen Bodens bei 27°C, 5% CO₂ und 20% O₂ in *L. major*-Medium kultiviert und abhängig vom Wachstum alle 6-10 Tage auf frische Platten umgesetzt (Abbildung 6). Ein solches Umsetzen wird als Passage bezeichnet. Experimentell genutzt wurden die Erreger einer 6-10 Tage alten Kultur maximal bis zur 10. Passage. Darüber hinaus wäre eine Wirtspassage in der Maus notwendig, um langfristige Virulenz der Leishmanien sicherzustellen. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die Leishmanien von der Kulturplatte gespült, in 15 ml *L. major*-Medium gelöst und 10 Minuten bei 27°C und 2650 x g mit Bremse zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml Versuchsmedium resuspendiert und die Leishmanien mittels Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,02 mm, Fläche 0,0025 mm²) bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt und eingestellt. Dabei entspricht der gezählte Wert multipliziert mit dem Zählkammer-Faktor von 50.000 und ggf. einem Verdünnungsfaktor der Anzahl der Leishmanien in Millionen pro Mililiter.

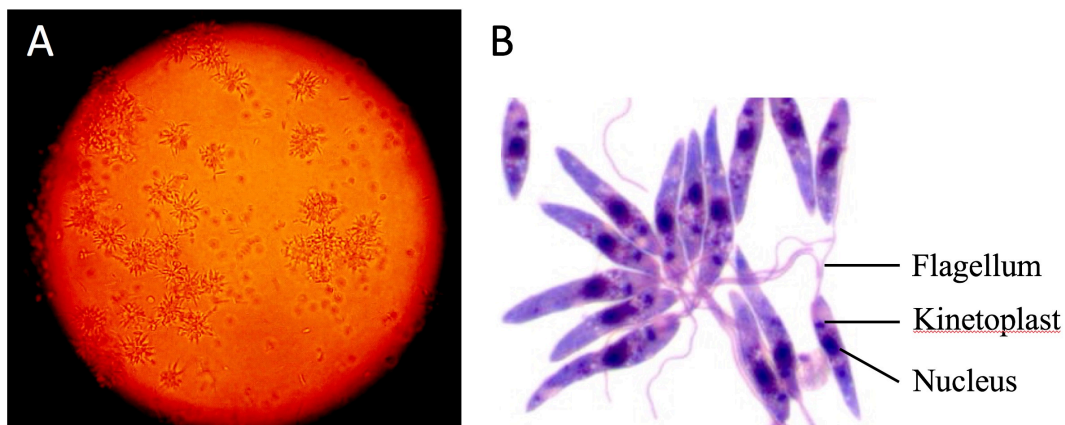


Abbildung 6) *Leishmania major*-Kultur Durch Kultivieren auf Kaninchenblut-Agarplatten und regelmäßige Wirtspassage in der Maus kann das Infektionsvermögen der Leishmanien erhalten werden. **A)** *L. major*-Kultur mit typischen, rosettenartigen Gruppierungen der Promastigoten. **B)** Gruppe von Giemsa-gefärbten *L. major*-Promastigoten, deren Flagellen hier meist zur Mitte hin ausgerichtet sind. Zudem sind Kinetoplast und Nucleus der einzelnen Leishmanien abgrenzbar.

2.2.2 *Anaplasma phagocytophilum*

Da *A. phagocytophilum* nur in Wirtszellen kultiviert werden kann, mussten die Erreger zunächst aus diesen extrahiert werden. Dazu wurden die infizierten HL60-Zellen (*human promyelocytic leukemia cells*; eine Leukämie-Zelllinie) zunächst zentrifugiert (750 x g, 10min), um folgend in PBS aufgenommen zu werden. Aus einer 6-well-Flachbodenplatte wurde diese Zellsuspension jeweils 10-malig durch eine 30G-Nadel und anschließend durch eine 27G-Nadel hindurchgedrückt. Die Suspension wurde dann in ein 15 ml-Tube überführt, feine sterile Glaskugeln hinzugefügt und durch einminütiges Vortexen gemischt. Im Anschluss wurde mit Antibiotika-freiem RPMI-Komplettmedium aufgefüllt und erneut zentrifugiert (750 x g, 10min). Der freie Anaplasmen enthaltende Überstand wurde in einem neuen Gefäß erneut zentrifugiert (2500 x g, 15min) und das *A. phagocytophilum*-haltige Pellet resuspendiert. Die Anaplasmen wurden unmittelbar im Anschluss der Aufbereitung zu den zu infizierenden Zellen gegeben, um eine adäquate Infektionsrate zu erzielen.

2.2.3 *Chlamydia pneumoniae*

Der genutzte *C. pneumoniae*-Stamm CV-6 entstammt einem Isolat aus einem Koronararterien-Plaques. Die Bakterien wurden gemäß etabliertem Protokoll in Hep-2-Zellen vermehrt [114]. Die experimentell genutzten Aliquots mit 9×10^7 inclusion-forming units (IFUs)/ml wurden bei -80°C gelagert und erst unmittelbar vor den Experimenten aufgetaut. Zunächst wurden die *C. pneumoniae*-infizierten Zellen durch Zugabe steriler Glaskugeln mechanisch zerstört (einminütiges Vortexen). Die resultierende Suspension wurde in ein neues Tube überführt und zentrifugiert (68 x g, 10 min). Der nun zellfreie Überstand konnte für eine anschließende Infektion genutzt werden.

2.2.4 HT-29 Kultur

Die humane Adenokarzinom-Zelllinie HT-29 bildet epithelartige Zellen aus. Kultiviert wurden die Zellen unter humiden Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM-Medium, welches mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde. Durch Behandlung mit Trypsin wurden die Zellen aus ihren festen Verbänden gelöst. Lichtmikroskopisch konnte in Vorversuchen ermittelt werden, dass 9×10^4 Zellen binnen 24 Stunden einen Monolayer in einem Well einer 96-Well Flachboden-Platte formten. Zudem konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass HT-29 alleine weder LTB₄ noch LXA₄ freisetzt (Daten nicht gezeigt).

2.2.5 Co-Inkubation von Neutrophilen mit Pathogenen, Bestimmung der Infektionsrate

Neutrophile Granulozyten (5×10^6 per ml) wurden mit *L. major* Promastigoten, zellfreien Anaplasmen oder Chlamydien in RPMI-Komplettmedium für 300 Minuten co-inkubiert. Dabei herrschten 37°C sowie ein CO₂-Gehalt von 5% in angefeuchteter Atmosphäre. Die Multiplizität der Infektion (engl.: *multiplicity of infection*, MOI) für *L. major* und *C. pneumoniae* betrug 5. Für die Infektion mit *A. phagocytophilum* wurde ein Verhältnis von 1:1 gewählt. Dies bedeutete, dass auf einen zu infizierenden Neutrophilen die Anaplasmen aus einer infizierten HL-60 Zelle kamen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die PMN dreimal mit PBS gewaschen ($400 \times g$, 10 min), um extrazelluläre Pathogene zu entfernen und schließlich in Komplettmedium aufgenommen. Die Bestimmung der Infektionsraten nach Co-Inkubation mit *L. major* und *A. phagocytophilum* erfolgte durch morphologische Begutachtung von Diff Quik-gefärbten Zytospin-Präparaten und Beurteilung von mindestens 200 PMN. Die zahlreichen zytosolischen Einschlüsse nach Inkubation mit *A. phagocytophilum* konnten durch immunzytochemische Färbung mit polyklonalen anti-*A. phagocytophilum* Antikörpern Anaplasmen zugeordnet werden. Die Chlamydien-Infektionsrate wurde durch immunzytochemische Färbung Methanol-fixierter Zellen mittels *C. pneumoniae*-spezifischem Antikörper ermittelt. Dabei wurden FITC-konjugierte, murine, monoklonale Antikörper (Dako, Hamburg, Germany) verwendet und die Infektionsrate durch Auszählung am Fluoreszenzmikroskop ermittelt.

2.2.6 Induktion und Messung von LTB₄

Vor der Induktion wurden die Neutrophilen in FCS-freies Komplettmedium umgesetzt, da höhere FCS-Konzentrationen zu einem leichten Hintergrund im LTB₄-ELISA führten. Infizierte und nicht-infizierte PMN sowie Pathogen-Kontrollen (*L. major* Promastigoten, zellfreie Anaplasmen oder Chlamydien jeweils ohne PMN) wurden entweder der Kombination von LPS+fMLP (1 µg/ml LPS für 30 min, gefolgt von 0,5 µM fMLP für 10 min) oder dem Calcium-Ionophor Ionomycin (0,2 µM, 10 min) ausgesetzt. Kontroll-Proben blieben ohne diese Behandlung und wurden nur mit dem Vehikelmedium behandelt. Die Induktion erfolgte in einem 37°C Wasserbad und wurde durch kalte Zentrifugation beendet (vorgekühlt bei 4°C, 800 x g, 10 min). Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und bei -80°C eingefroren. Der Gehalt an LTB₄ in den Überständen wurde schließlich mittels kompetitiven ELISAs entsprechend den Anweisungen des Herstellers ermittelt (Abbildung 7).

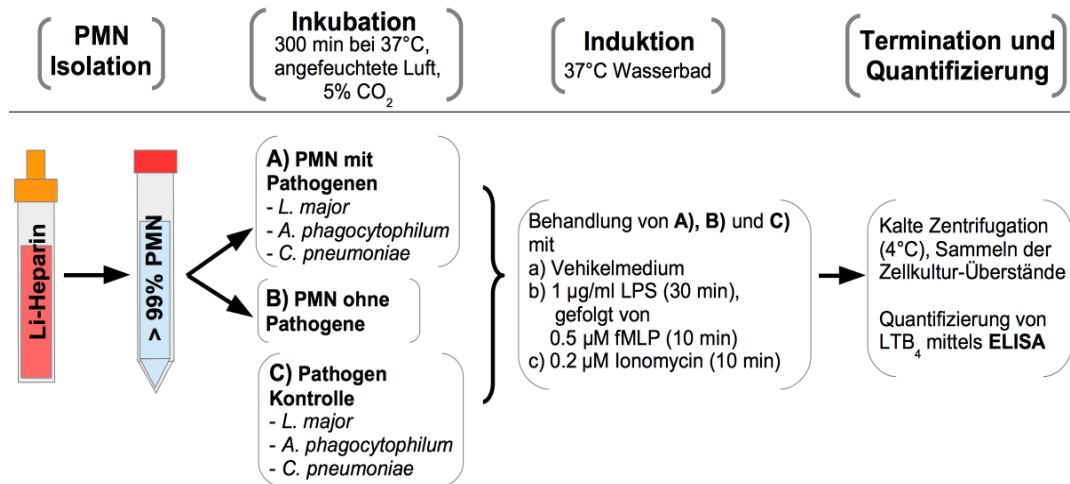


Abbildung 7) Versuchsaufbau zur Bestimmung von LTB₄ aus den Überständen infizierter und nicht-infizierter neutrophiler Granulozyten.

2.2.7 Induktion und Messung von LXA₄

Die neutrophilen Granulozyten wurden wie oben beschrieben mit den Pathogenen für 300 min inkubiert. Für die letzten 90 min dieser Inkubation wurden 10 ng/ml GM-CSF als *Priming*-Agens hinzugefügt [136]. Die gleiche Prozedur wurde bei den Pathogen-Kontrollen angewandt. Alle Zellen wurden folgend gewaschen und in FCS-freiem Medium resuspendiert, um extrazelluläre Erreger zu entfernen. Die neutrophilen Granulozyten wurden daraufhin in Wells einer 96-well Flachbodenplatte überführt, deren Boden mit einem Monolayer der epithelartigen HT-29 Zellen gecoated wurde. Das Verhältnis von HT-29-Zellen zu neutrophilen Granulozyten betrug etwa 1:7,5 (in Anlehnung an [137]). In diesem modellhaften Co-Kultur-Assay wird das Katalyse-Produkt LTA₄ der 5-Lipoxygenase der Neutrophilen als Intermediat an die epithelartigen HT-29-Zellen übertragen. Diese Zellen verfügen vorwiegend über 12-Lipoxygenase-Aktivität [61] und prozessieren LTA₄ zum fertigen LXA₄. Gleichmaßen werden Intermediate der HT-29-Zellen wie 15S-HETE von den Neutrophilen aufgenommen und zu LXA₄ umgesetzt [138].

Für die Induktion von LXA₄ wurden infizierte und nicht-infizierte Neutrophile sowie die Pathogenkontrollen dem Calcium-Ionophor Ionomycin ausgesetzt (1,0 µM; 10 min oder 360 min). Kontrollproben blieben unbehandelt (Medium). Die Induktion fand bei 37°C und 5% CO₂ in angefeuchteter Atmosphäre statt und wurde durch kalte Zentrifugation beendet (vorgekühlt bei 4°C, 800 x g, 10 min). Die Überstände wurde gesammelt und bei -80°C eingefroren. Der Gehalt an LXA₄ wurde mittels ELISA entsprechend den Anweisungen des Herstellers ermittelt (Abbildung 8).

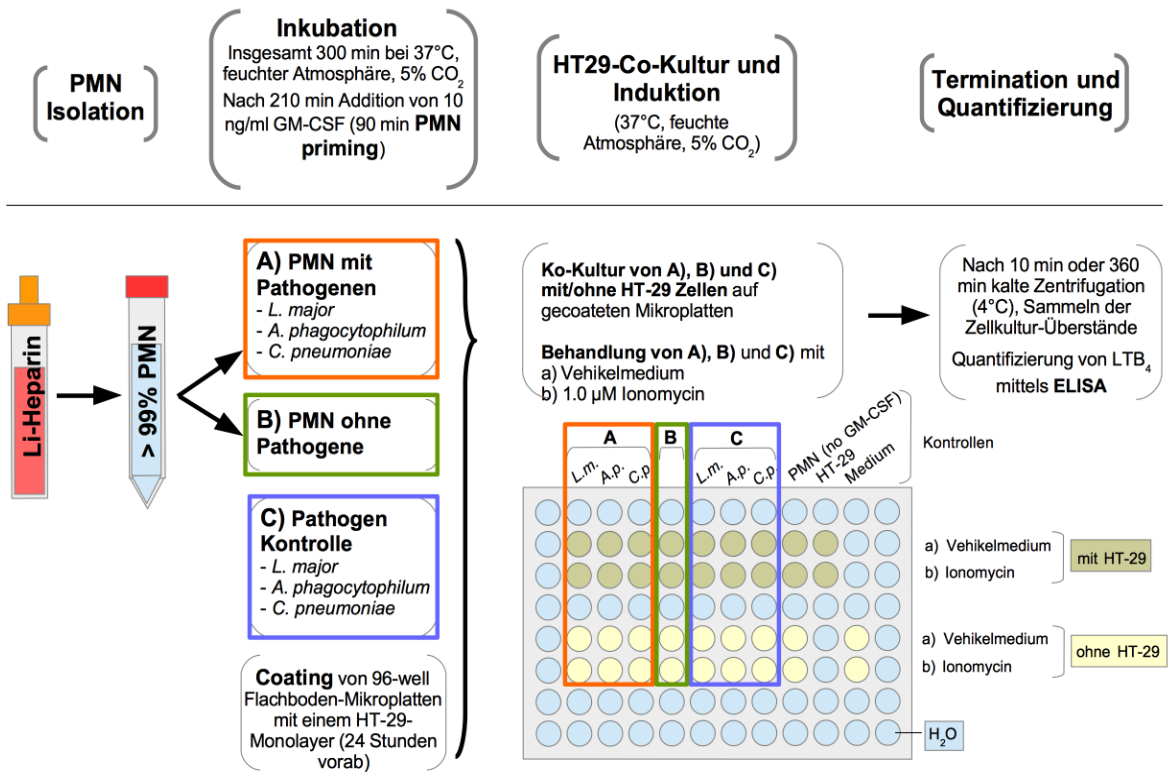


Abbildung 8) Versuchsaufbau zur Bestimmung von LXA₄ aus den Überständen infizierter und nicht-infizierter PMN in Co-Kultur mit HT-29-Zellen

2.3 Teil 2: Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten

Für einen Vergleich der Lipidmediator-Freisetzung vitaler und apoptotischer neutrophiler Granulozyten entstammen diese idealerweise dem gleichen Isolationsprozess. Durch rasches Isolieren wurde ein Großteil der PMN vital erhalten. Bei einem Teil der isolierten PMN wurde die Apoptose durch UV-Bestrahlung der Zellen induziert. Durch magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) konnte zudem aus einem Teil der bestrahlten PMN der Anteil der Annexin V-positiven PMN aufgereinigt werden. Diese Exklusion vitaler, Annexin V-negativer PMN diente dazu, eine bestehende Lipidmediator-Freisetzung eindeutig den apoptotischen (und wenigen sekundär nekrotischen) PMN zuschreiben zu können (Abbildung 9). Eine Kontrolle der Viabilitätszustände fand mikroskopisch und durchflusszytometrisch mittels Vitalitätsfärbung (Annexin V/ Propidiumiodid) statt.

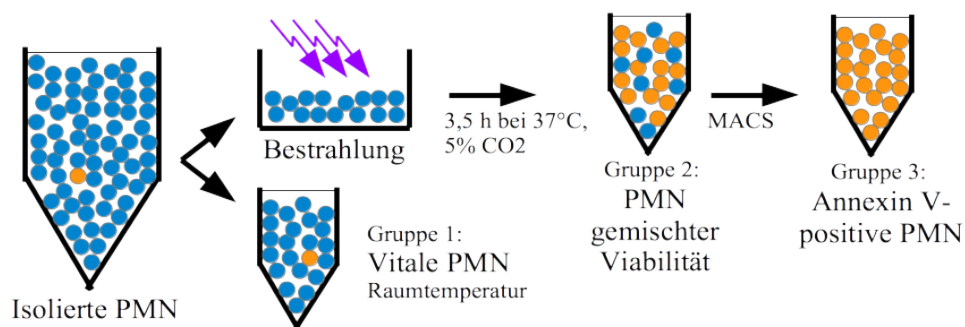


Abbildung 9) Fluss-Schema zur Bereitstellung verschiedener Zellviabilitäten Nach der Isolation neutrophiler Granulozyten (PMN) verbleibt ein Teil von ihnen als Gruppe der vitalen Referenz-PMN bei Raumtemperatur, während ein zweiter Teil einer Bestrahlung unterzogen wird. Nach einer Inkubation von 3,5 Stunden ist ein großer Teil dieser bestrahlten Zellen in die Apoptose übergegangen. Durch positive Selektion mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) lassen sich die Annexin V-positiven Zellen (orange) von den verbliebenen Annexin V- bzw. Phosphatidylserin-negativen (blau), vitalen Zellen trennen.

2.3.1 Induktion der Apoptose neutrophiler Granulozyten durch UV-Bestrahlung

Für die Induktion der Apoptose neutrophiler Granulozyten wurden diese in einer Konzentration von 20×10^6 Zellen pro Mililiter in RPMI-Komplettmedium eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 350 μ l in ein Well einer 12-Well-Zellkulturplatte überführt und durch Resuspension eine gute Verteilung auf der Oberfläche erwirkt. In einem Stratalinker-Bestrahlungsgerät wurden die PMN einer Bestrahlung mit UV-C-Strahlung der Wellenlänge 256 nm und einer Energie von 200 mJ/cm^2 unterzogen. Bei diesem Verfahren resultieren durch Absorption der Strahlung direkte Schädigungen der Nukleinsäuren. Im Rahmen der UV-Absorption durch weitere zellulärer Bestandteile werden zudem reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt und die Zelle zusätzlich geschädigt. In der Summe führt die Bestrahlung also zu irreparablen Schädigungen der Zellen und somit zur Induktion der Apoptose. Nach der Bestrahlung wurde die Konzentration der PMN auf 5×10^6 pro Milliliter eingestellt, erneut gut resuspendiert und die Zellen für 3,5 Stunden bei 37°C und einer Konzentration von 5 % CO_2 sowie 20 % O_2 inkubiert. Während dieser Zeit verblieben die als vitale Vergleichsgruppe genutzten PMN des gleichen Blutdonors bei Raumtemperatur, um die Spontanapoptose-Rate zu reduzieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Apoptose-Induktion mittels Öl-Immersionmikroskopie von Diff-Quik-gefärbten Zytospin-Präparaten.

2.3.2 Anreicherung Annexin V-positiver Zellen durch MACS

Mit Hilfe einer positiven Selektion durch Annexin V-Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) lassen sich Phosphatidylserin (PS)-positive und -negative Zellen voneinander trennen. Dazu wird die bestrahlte PMN-Suspension mit sogenannten MicroBeads inkubiert. Dies sind etwa 50 nm große, magnetische Partikel aus Eisenoxid mit Ziel-spezifischer Oberfläche. Durch den Einsatz Annexin V-besetzter MicroBeads, werden all jene PMN

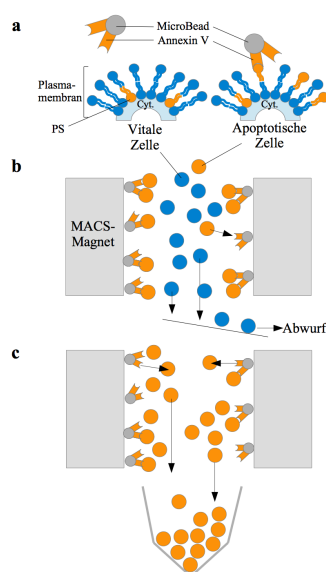


Abbildung 10) MACS-Technik

a) Eine Suspension aus vitalen, apoptotischen und sekundär nekrotischen Granulozyten wird mit Annexin V-besetzten MicroBeads inkubiert. Diese binden an apoptotischen und sekundär nekrotischen Zellen, da diese Phosphatidylserin (PS) exprimieren. **b)** Im Magnetfeld werden die Annexin V-positiven Zellen (orange) durch ihre metallischen Liganden fixiert, während die PS-negativen Zellen (blau) keine Bindung erfahren. **c)** Durch Aufhebung der Bindung zwischen PS und Annexin V werden die Annexin V-positiven Zellen freigesetzt. Cyt. = Zytosol.

gebunden, welche PS auf ihrer Oberfläche exprimieren. Von dieser Bindung sind ausschließlich apoptotische und nekrotische Zellen betroffen, da in diesen der aktive Transport des PS von der äußeren zur inneren Seite der Plasmamembran unterbunden ist (Abbildung 10a). Setzt man die Suspension dann einem Magnetfeld aus, kommt es über ihre metallischen Liganden zur Fixierung der apoptotischen und nekrotischen PMN an der magnetischen Säule, während die vitalen PMN die Säule durchfließen (Abbildung 10b). Schlussendlich kommt es durch Einsatz der Auswasch-Lösung zur Senkung des Calcium-Gehalts, in deren Folge die Ca^{2+} -abhängige Bindung von PS und Annexin V aufgehoben wird. Somit kann in einem zweiten Schritt die PS-positive Zellpopulation aus der Säule herausgespült werden (Abbildung 10c).

Durchführung: Zunächst wurden die bestrahlten PMN in 4°C-kaltem Binde-Puffer gewaschen (400 x g, 10 min, 4°C). Im Anschluss wurde das Pellet in 80 µl kalten Binde-Puffers je 10 x 10⁶ Zellen resuspendiert und 20 µl Annexin V-MicroBeads je 10 x 10⁶ Zellen hinzugefügt. Nach 20-minütiger Inkubation im Kühlschrank (4°C) wurden die PMN einem zweiten Wasch-Schritt in Binde-Puffer unterzogen, um nicht-gebundene MicroBeads auszuwaschen (2 ml je 10 x 10⁶ Zellen, 400 x g, 10 min, 4°C). Das resultierende Pellet wurde in 1 ml Binde-Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde schließlich auf eine LS-MACS-Säule gegeben, die zuvor in den MACS-Magneten eingespannt und mit 3 ml Binde-Puffer vorgespült wurde. Die unmittelbar durchfließende Suspension (Annexin V-negativ) wurde verworfen und die Säule dreimalig mit je 3 ml Binde-Puffer gespült, um alle nicht magnetisch gebundenen Zellen auszuwaschen. Für das Herauslösen der Annexin V-positiven Zellen wurde die Säule mit 2 ml des CaCl₂-freien Elutions-Puffer gespült und die PMN in einem neuen Gefäß aufgefangen. Um Medium-induzierten Schaden zu vermeiden, wurden die gewonnenen Zellen schnellstmöglich in RPMI-Medium umgesetzt.

2.3.3 Durchflusszytometrie: Messung der Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse definierter Eigenschaften einzelner Zellen, mit Hilfe dessen eine Erfassung verschiedener Zellpopulationen möglich ist. Die nötige Separation der Zellen erfolgt durch einen Flüssigkeits-Hüllstrom, der eine hydrodynamische Fokussierung der Zellen bewirkt. Einzelne Zellen können somit durch einen Laserstrahl geleitet und über das entstehende Streulicht optisch erfasst werden (Abbildung 11). Abhängig von der Form, der Struktur und -im Falle einer Färbung- auch Fluoreszenz der Zellen, entstehen unterschiedliche optische Emissionen (Streulicht, Fluoreszenz), die Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zelle und somit den Zelltypus zulassen. Das detektierte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) entspricht dabei einem Maß der Beugung des Lichts im flachen Winkel und korreliert mit Größe und Volumen der Zelle. Das senkrecht

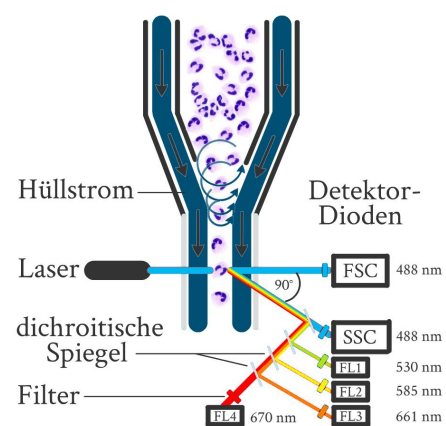


Abbildung 11) Prinzip eines Durchflusszytometers

Durch einen Hüllstrom werden einzelne Zellen einer Suspension durch einen Laserstrahl geleitet. Über forward und sideward scatter des Streulichts (FSC bzw. SSC) werden grobe Merkmale der Zelle wie Größe und Komplexität erfasst. Weitere Detektor-Dioden erfassen wellenlängenspezifisch emittierte Fluoreszenz gefärbter Zellen.

dazu gestreute Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) dient als Maß der inneren Struktur bzw. Komplexität einer Zelle (Abbildung 12). Mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe können Zellen anhand weiterer Parameter charakterisiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete FACS-Calibur™ Durchflusszytometer arbeitet mit einem blauen 15mW Argon-Laser (488 nm), dessen Licht die Erkennung dreier Farben mittels separater Detektoren (FL1, FL2 und FL3) zulässt, sowie einem roten Dioden-Laser (635 nm), dessen Licht durch FL4 detektiert wird. Durch diese Anordnung ist eine simultane Erkennung von bis zu vier verschiedenen Farben möglich.

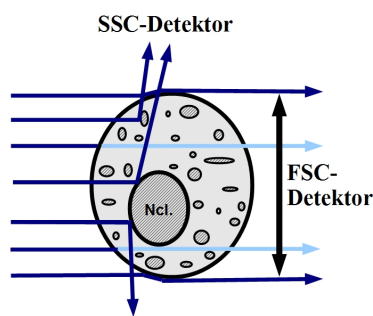


Abbildung 12) Erklärung forward- und sideward scatter anhand einer Zelle im Strahlengang

Das Laserlicht wird durch einen gegenüberliegenden Detektor, den FSC-Detektor, detektiert. Die meisten Photonen passieren den Strahlengang ohne Abweichungen zu erfahren. Durchläuft jedoch eine Zelle den Strahlengang, kommt es zu minimalen Beugungen des Lichts an der Zellmembran. Das Ausmaß dieser Abweichungen entspricht dabei als FSC einem Maß des Volumens der Zelle. Treffen Photonen jedoch auf zelluläre Bestandteile, kommt es zu stärkerer Beugung. Die so abweichenden Strahlen werden durch einen senkrecht zum Strahlengang stehenden SSC-Detektor erfasst. Es gilt: Je komplexer die Zelle, also je mehr Zellbestandteile sie aufweist, desto mehr Seitwärtsstreulicht. Entsprechend steigt die SSC-Detektion als Marker der Komplexität.

Für die Differenzierung zwischen vitalen Zellen auf der einen Seite und apoptotischen sowie nekrotischen Zelle auf der anderen Seite wird der Verlust der Membran-Asymmetrie genutzt. In vitalen Zellen wird Phosphatidylserin (PS), ein Phospholipid-Bestandteil der Membran, durch aktiven Transport von der Zellmembran-Außenseite auf die zytosolische Seite überführt (Abbildung 13a). Während der Apoptose und Nekrose reduziert sich dieser Transportprozess, sodass vermehrt PS an der Zelloberfläche exprimiert wird. *In vivo* entspricht dies bei Leukozyten einer Markierung für die Erkennung und Phagozytose durch Fresszellen. Das humane Protein Annexin V, dem anti-koagulatorische und -inflammatorische Funktionen zugeschrieben werden, bindet calciumabhängig an anionische Phospholipide und hat eine besonders hohe Affinität zu PS. Deshalb kann es zur Markierung PS-positiver Zellen dienen. Für die Färbung mittels Annexin V-FLUOS liegt Annexin V als Konjugat mit dem Fluorochrom Fluoreszein vor. Wird Fluoreszein durch den Argon-Laser angeregt (Exzitation bei 488 nm), liegt sein Emissionsmaximum im grünen Spektrum bei 518 nm. Somit kann es durch FL1 detektiert werden (grünes Licht, 530 ± 30 nm). Annexin V-Fluoreszein färbt also apoptotische und nekrotische Zellen in grüner Fluoreszenz (Abbildung 13b).

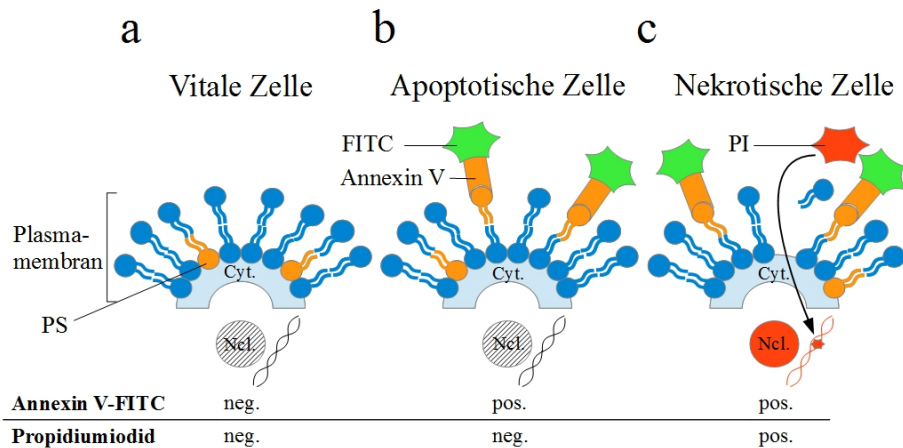


Abbildung 13) Annexin V-/ Propidiumiodid-Vitalitätsfärbung **a)** Vitale Zellen verfügen über eine intakte Membran und einen aktiven Transport von Phosphatidylserin (PS) zur inneren Seite der Plasmamembran. Sie sind Annexin V- und Propidiumiodid-negativ, da sie weder PS exprimieren noch freie Nucleinsäuren vorliegen. **b)** Bei apoptotischen Zellen kommt der PS-Transport zum Erliegen, sodass Annexin V an PS binden kann. **c)** Im Falle der sekundären Nekrose kommt es zudem zur Desintegration der Membran, sodass Propidiumiodid eindringt und Nucleinsäuren färbt.

Während bei vitalen und apoptotischen Zellen die Membran intakt ist, gilt ein Membrandefekt als Charakteristikum der Nekrose und ermöglicht es Farbstoffen, die Membran zu penetrieren und an intrazellulären Strukturen zu binden. Dies macht man sich durch Einsatz des DNA- und RNA-interkalierenden Propidiumiodids zu Nutze (Abbildung 13c). PI verfügt sowohl über ein breites Exzitationsspektrum (488-540 nm) als auch Emissionsspektrum (535-617 nm). Nach Interkalation in Nucleinsäure verschieben sich die Maxima von Exzitation und Emission zu 535 nm bzw. 617 nm, sodass es durch FL2 detektiert werden (gelb-oranges Licht, 585 ± 42 nm). Interkaliertes Propidiumiodid färbt also nekrotische Zellen in rötlicher Fluoreszenz.

Durchführung: Für die durchflusszytometrische Untersuchung der einzelnen Ansätze wurden PMN im Verhältnis von 10:1 mit einer Färbelösung, bestehend aus Annexin V-Fluoreszein, Propidiumiodid, Calciumchlorid und dem jeweiligen Versuchsmedium (1:1:1:10), inkubiert (10 min, 4°C, lichtgeschützt). Unmittelbar nach einer Verdünnung der nun gefärbten Probe mit dem entsprechenden Versuchsmedium (1:2) erfolgte die Analyse. Je Ansatz wurden 10.000 Ereignisse mit Hilfe der CellQuest ProTM Software eingelesen. Auf diese Weise aufgenommene Zelleigenschaften wurden als Dotplots (Punktediagramme) oder Histogramme ausgegeben. Letztere ermöglichten eine Darstellung der Anzahl der Zellen gegen einen bestimmten Parameter. Zudem war es möglich, sich durch *Gating* auf eine bestimmte Zellpopulation zu beschränken und selektiv Informationen über deren Parameter zu erhalten.

2.3.4 Induktion und Messung der LTB₄-Freisetzung

Vor der Induktion wurden die neutrophilen Granulozyten in FCS-freies Komplettmedium umgesetzt. Vitale, bestrahlte oder bestrahlte+MACSed neutrophile Granulozyten wurden entweder der Kombination von LPS+fMLP (1 µg/ml LPS für 30 min, gefolgt von 0,5 µM fMLP für 10 min) oder dem Calcium-Ionophor Ionomycin (0,2 µM, 10 min) ausgesetzt. Kontrollen wurden nur mit dem Vehikelmedium behandelt. Die Induktion erfolgte in einem 37°C Wasserbad und wurde durch kalte Zentrifugation beendet (vorgekühlt bei 4°C, 800 *x* g, 10 min). Die Überstände wurden gesammelt und bei -80°C gekühlt. Der Gehalt an LTB₄ wurde schließlich mittels kompetitiven ELISAs entsprechend den Anweisungen des Herstellers ermittelt.

2.4 Statistische Analyse

Für den Vergleich zweier gleich großer Gruppen wurde der *Student's t-test* für gepaarte Proben angewandt. Bei ungeraden Vergleichsgruppen wurde der ungepaarte *Student's t-test* angewandt und dies gesondert gekennzeichnet. Es kam die Software GraphPad Prism 7 zur Anwendung. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung (SD). Unterschiede mit einem p-Wert von ≤ 0.05 wurden als signifikant erachtet.

Ohne eine Behandlung durch Ionomycin oder LPS+fMLP zeigten infizierte und nicht-infizierte PMN in der großen Mehrzahl nicht detektierbare LTB₄- und LXA₄-Werte (in Grafen als „n.d.“ dargestellt). Viermalig wurden Konzentrationen am unteren Detektionslimit der ELISAs detektiert. Da diese Konzentrationen biologisch nicht relevant sein dürften und sehr selten auftraten, wurden sie aus Gründen der Übersichtlichkeit grafisch nicht mit abgebildet.

3 Ergebnisse

3.1 Qualität der neutrophilen Granulozyten

Die Reinheit der durch Isolation gewonnenen Granulozyten-Präparationen betrug $\geq 99\%$ (Abbildung 14). Spenderabhängig waren unter den neutrophilen Granulozyten bis zu 5% eosinophile Granulozyten zu verzeichnen. In durchflusszytometrischen Kontrollen betrug der Anteil der vitalen Neutrophilen stets $> 95\%$. Laborinterne Kontrollen des Aktivierungsgrades der neutrophilen Granulozyten zeigten ein niedriges Maß an Aktivierung durch den Isolationsprozess (Daten nicht gezeigt).

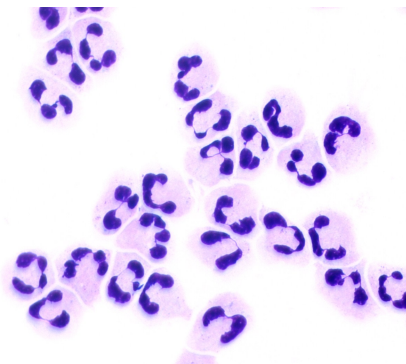


Abbildung 14) Lichtmikroskopie Diff-Quik-gefärbter, frisch isolierter neutrophiler Granulozyten Durch zwei aufeinanderfolgende Dichtezentrifugations-Gradienten konnte eine hohe Reinheit der neutrophilen Granulozyten erzielt werden. Kennzeichen reifer neutrophiler Granulozyten ist der mehrfach lobulierte Kern, der ihnen die Bezeichnung der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten einträgt.

3.2 Etablieren eines Verfahrens für die Freisetzung und quantitative Bestimmung von Lipidmediatoren *in vitro*

Um die Lipidmediatoren LTB_4 und LXA_4 in den Zellkultur-Überständen quantifizieren zu können, wurden zwei neue ELISAs etabliert. Dabei wurde in Vorversuchen nach geeigneten Stimulantien gesucht, die zur Freisetzung von LTB_4 und LXA_4 führen. Dabei sollten die erzielten Konzentrationen im dynamischen Messbereich des jeweiligen ELISAs liegen, also den Effekt einer Intervention abbilden können. Getestet wurden Albumin/Anti-Albumin Immunkomplexe, fMLP, GM-CSF, $IFN-\gamma$, Ionomycin, LPS, MSUM-Kristalle, Pam3Cys, PMA, $TNF-\alpha$ sowie Zymosan in teils unterschiedlichen Konzentrationen und verschiedener Stimulationsdauer (Daten nicht gezeigt). Aufgrund guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden Ionomycin als potenter unspezifischer Zellaktivator sowie die Kombination von LPS und fMLP als bakterielle Induktoren ausgewählt.

Für die Induktion von LTB_4 stellte sich Ionomycin in einer Konzentration von $0,2\ \mu M$ und der Zeitpunkt von 10 Minuten *post inductionem* als günstig heraus; es konnten submaximale LTB_4 -Konzentrationen im ELISA erzielt werden. In Anlehnung an Infektionen durch gram-negative Bakterien wurde LPS als Priming-Agens [41] in einer Konzentration von $1\ \mu g/ml$ für 30 Minuten eingesetzt. Die folgende Induktion erfolgte durch fMLP in einer

Konzentration von 0,5 μM (10 Minuten Induktionszeit). Für den LTB_4 -ELISA fand sich das Problem eines leichten Hintergrundrauschens durch höhere FCS-Konzentrationen, sodass die Induktionen nach einem Waschschrift in FCS-freiem Medium durchgeführt wurden.

Für die transzelluläre Synthese von LXA_4 wurden epithelartige HT-29-Zellen als Partner der neutrophilen Granulozyten ausgewählt. Eine reproduzierbare Freisetzung von LXA_4 erfolgte lediglich nach Priming der PMN mit GM-CSF (10 ng/ml für 90 Minuten)[136] und anschließendem Einsatz von Ionomycin in einer Konzentration von 1,0 μM . Induktionen mit LPS + fMLP (Priming mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS für 30 min, gefolgt von 0,5 μM fMLP) oder $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) führten zu mehreren Zeitpunkten nach Behandlung nur unregelmäßig zu messbaren LXA_4 -Konzentrationen (nach $t = 10, 50, 90$ und 210 min; Daten nicht gezeigt). Es wurden die Zeitpunkte 10 Minuten und 360 Minuten *post inductionem* ausgewählt, um eine Dynamik in der LXA_4 -Freisetzung während der ersten Stunden nach Infektion und anschließender Induktion erfassen zu können.

3.3 Teil 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB_4 - und LXA_4 -Freisetzung durch neutrophile Granulozyten

3.3.1 *Leishmania major*

3.3.1.1 Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *Leishmania major* führt zu einer gesteigerten LTB_4 -Freisetzung

Eine Infektion mit *L. major* führt zu einer ausgeprägten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Ort der Infektion [71]. Da sich LTB_4 als essentieller Mediator der Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten herausgestellt hat [16] und neutrophile Granulozyten selbst eine wichtige Quelle von LTB_4 darstellen [16], [45], [139], wurde der Einfluss einer Infektion mit *L. major* auf die Freisetzung von LTB_4 durch Neutrophile untersucht.

Primäre humane Neutrophile wurden *in vitro* mit *L. major* Promastigoten der stationären Phase infiziert. Nach fünf Stunden der Co-Inkubation wurde durch morphologische Begutachtung Diff Quik-gefärbter Zytospins eine Infektionsrate von $65\% \pm 15\%$ ermittelt (Abbildung 15A). Ohne Behandlung durch Induktoren wurde kein LTB_4 in relevanter Menge freigesetzt (Abbildung 15B und C). Auch die alleinige Infektion der Granulozyten mit *L. major* ging mit keiner messbaren Freisetzung von LTB_4 einher (Abbildung 15B und C).

Um den Einfluss einer Infektion mit *L. major* auf das Freisetzungsvermögen von LTB₄ zu untersuchen, wurden infizierte und nicht-infizierte Neutrophile entweder mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin oder der Kombination von LPS und fMLP behandelt. Beide Stimuli führten zur Freisetzung von LTB₄. *L. major*-infizierte Neutrophile zeigten nach Induktion sowohl mit Ionomycin (Abbildung 15B) als auch mit LPS+fMLP (Abbildung 15C) eine vermehrte LTB₄-Freisetzung im Vergleich zu den nicht-infizierten Referenzzellen.

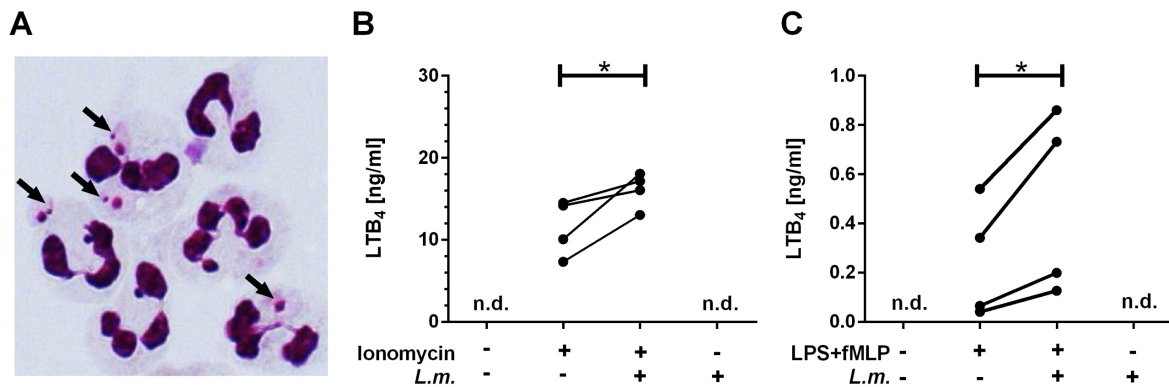


Abbildung 15) Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *L. major* führt zu einer vermehrten Freisetzung von LTB₄. (A) Lichtmikroskopie Diff Quik-gefärbter neutrophiler Granulozyten mit internalisierten *L. major*-Promastigoten (Pfeile). Neutrophile Granulozyten wurden mit *L. major* Promastigoten der stationären Phase für 300 Minuten co-inkubiert (37°C, feuchte Atmosphäre, 5% CO₂) und extrazelluläre Leishmanien durch Waschen entfernt. Die Multiplizität der Infektion (MOI) betrug 5. (B) *L. major*-infizierte und nicht-infizierte PMN wurden mit Ionomycin (0,2 µM, 10 min) behandelt. Die LTB₄-Konzentration wurde im Überstand mittels ELISA quantifiziert. (C) *L. major*-infizierte und nicht-infizierte Zellen wurden zunächst dem Priming-Agens LPS ausgesetzt (1 µg/ml, 30 min), um im Anschluss durch fMLP induziert zu werden (0,5 µM, 10 min). Die LTB₄-Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA ermittelt. (B) und (C) zeigen die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten. n.d. = nicht detektierbar. * p ≤ 0.05

3.3.1.2 Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *Leishmania major* führt zu einer verminderten LXA₄-Freisetzung

Lipoxin A₄ (LXA₄) gehört zur Familie der anti-inflammatorischen, zur Auflösung der Entzündung beitragenden Lipidmediatoren, den *specialized pro-resolving lipid mediators* (SPMs). Die Synthese dieser Mediatoren erfolgt vorwiegend auf transzellulärem Wege unter Beteiligung mehrerer Zelltypen, wobei neutrophilen Granulozyten mit ihrer 5-Lipoxygenase eine Schlüsselrolle zukommt [140]. Ihre Freisetzung führt unter anderem zu einer starken Einschränkung der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen [20]. Die Freisetzung von LXA₄ wurde in einem Co-Kultur-Assay mit epithelartigen HT-29 Zellen beurteilt. In diesem Modell werden die Katalyse-Produkte der 5-Lipoxygenase der Neutrophilen, 5-HPETE und LTA₄, als Intermediate an die epithelartigen HT-29 übertragen. Diese Zellen verfügen über 12-Lipoxygenase-Aktivität [61], was zur Prozessierung der Intermediate zu LXA₄ führt.

In diesem Modell induzierte Ionomycin sowohl eine schnelle Freisetzung von LXA₄ 10 min nach Stimulation (Abbildung 16A), als auch eine Lipoxin-Freisetzung 360 min nach dieser (Abbildung 16B). Eine Infektion mit *L. major* allein führte an beiden Zeitpunkten zu keinerlei messbarer Lipoxin-Freisetzung. Nach Behandlung durch Ionomycin zeigten *L. major*-infizierte neutrophile Granulozyten zu beiden Zeitpunkten eine signifikant reduzierte LXA₄-Freisetzung in Relation zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (Abbildung 16A und B).

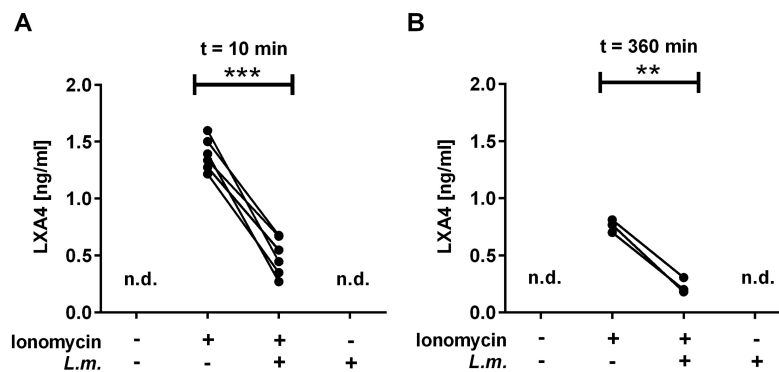


Abbildung 16) Die Freisetzung von LXA₄ ist bei *L. major*-infizierten neutrophilen Granulozyten reduziert
 Neutrophile Granulozyten wurden für 300 Minuten mit *L. major* Promastigoten co-inkubiert. Während der letzten 90 Minuten dieser Inkubation wurde 10 ng/ml GM-CSF als priming-Agens hinzugefügt. *L. major*-infizierte und nicht-infizierte Neutrophile wurden folgend mit HT-29 Zellen co-inkubiert und mit Ionomycin (1,0 µM) behandelt. Der Gehalt an LXA₄ in den Überständen wurde 10 Minuten (A) bzw. 360 Minuten nach Induktion (B) mittels ELISA bestimmt. A) n = 6, B) n = 3; n.d. = nicht detektierbar. ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001.

3.3.2 *Anaplasma phagocytophilum*

3.3.2.1 *Anaplasma phagocytophilum*-infizierte neutrophile Granulozyten zeigen abhängig vom Stimulus eine verstärkte oder reduzierte LTB₄-Freisetzung

Anaplasma phagocytophilum lebt obligat intrazellulär in Granulozyten. Somit ist das Überleben dieses Erregers kritisch an die Präsenz neutrophiler Granulozyten als Wirtszellen gebunden. Da LTB₄ einen zentralen Rekrutierungsfaktor für Neutrophile darstellt [16] und Anaplasmen bekannt für die Modifikation ihrer Wirtszellen sind [93], [141], wurde eine vermehrte Freisetzung dieses Lipidmediators durch Anaplasmen-infizierte Neutrophile erwartet.

Nach der Co-Inkubation mit zellfreien Anaplasmen für fünf Stunden zeigten mehr als 95% der primären humanen Neutrophilen meist zahlreiche zytosolische Einschlüsse (Abbildung 17A). In Vorversuchen konnten diese Inklusionen durch Einsatz polyklonaler anti-*A. phagocytophilum*-Antikörper Anaplasmen zugeordnet werden (Abbildung 17B). Während die Infektion durch Anaplasmen selbst keine LTB₄-Freisetzung induzierte (Abbildung 17C, D), konnten nach Stimulation mit Ionomycin oder LPS+fMLP signifikante Unterschiede im Vergleich nicht-infizierter und *A. phagocytophilum*-infizierter Neutrophiler ermittelt werden: Während sich nach Behandlung mit Ionomycin eine gesteigerte LTB₄-Freisetzung durch *A. phagocytophilum*-infizierte Neutrophile feststellen ließ (Abbildung 17C), fand sich nach Induktion durch LPS+fMLP eine signifikant verringerte LTB₄-Konzentration im Zellkultur-Überstand infizierter neutrophiler Granulozyten (Abbildung 17D).

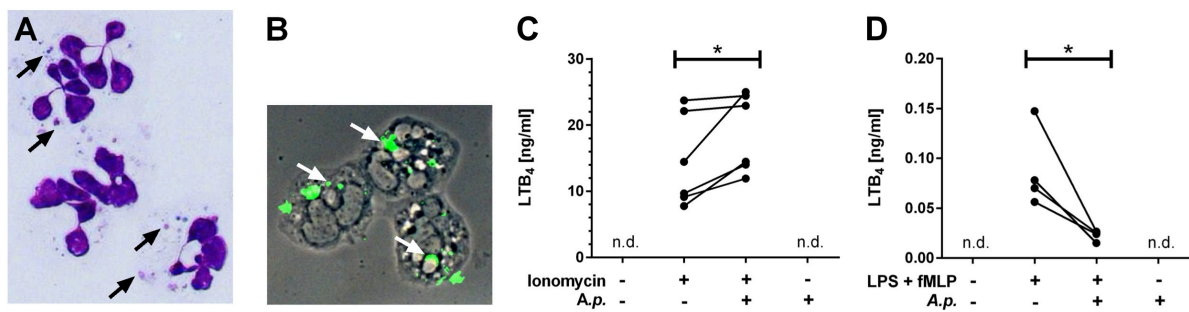


Abbildung 17) Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *A. phagocytophilum* führt in Abhängigkeit des Stimulus zu gegensätzlicher Modulation der LTB₄-Freisetzung Neutrophile Granulozyten wurden mit zellfreien Anaplasmen für 300 Minuten co-inkubiert (37°C, feuchte Atmosphäre, 5% CO₂) und extrazelluläre Erreger durch Waschen entfernt. Für die Infektion eines Neutrophilen wurden die zellfreien Anaplasmen einer infizierten HL-60-Zelle genutzt. **(A)** Lichtmikroskopie Diff Quik-gefärbter neutrophiler Granulozyten mit multiplen Inklusionen (Pfeile). **(B)** Die Inklusionen können durch polyclonale anti-*A. phagocytophilum* Antikörper Anaplasmen zugeordnet werden (Pfeile = *A. phagocytophilum*-Inklusionen). **(C)** *A. phagocytophilum*-infizierte und nicht-infizierte Zellen wurden mit Ionomycin (0,2 µM, 10 min) behandelt. Die LTB₄-Konzentration wurde im Überstand mittels ELISA quantifiziert. **(D)** *A. phagocytophilum*-infizierte und nicht-infizierte Zellen wurden zunächst dem Priming-Agens LPS ausgesetzt (1 µg/ml, 30 min), um im Anschluss durch fMLP behandelt zu werden (0,5 µM, 10 min). Die LTB₄-Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA ermittelt. (B) und (C) zeigen die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten. n.d. = nicht detektierbar. * p ≤ 0.05

3.3.2.2 Die Infektion neutrophiler Granulozyten durch *Anaplasma phagocytophilum* führt zu einer verminderten LXA₄-Freisetzung

Um die LXA₄-Produktion Anaplasmen-infizierter und nicht-infizierter neutrophiler Granulozyten zu vergleichen, wurden diese mit epithelartigen HT-29-Zellen inkubiert und die transzelluläre Synthese von LXA₄ durch Ionomycin induziert. 10 und 360 Minuten nach Induktion wurden die LXA₄-Konzentrationen in den Überständen durch ELISA bestimmt, um eine Dynamik der Lipidmediator-Freisetzung erfassen zu können.

Zu beiden Zeitpunkten fand sich eine deutliche Reduktion des durch *A. phagocytophilum*-infizierte neutrophile Granulozyten freigesetzten LXA₄ im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe: Sowohl 10 Minuten (Abbildung 18A) als auch 360 Minuten (Abbildung 18B) nach Induktion mit Ionomycin war eine deutlich geringere LXA₄-Freisetzung durch infizierte neutrophile Granulozyten festzustellen. Die Infektion durch *A. phagocytophilum* führte ohne weitere Behandlung durch Ionomycin zu keiner messbaren Lipoxin-Freisetzung.

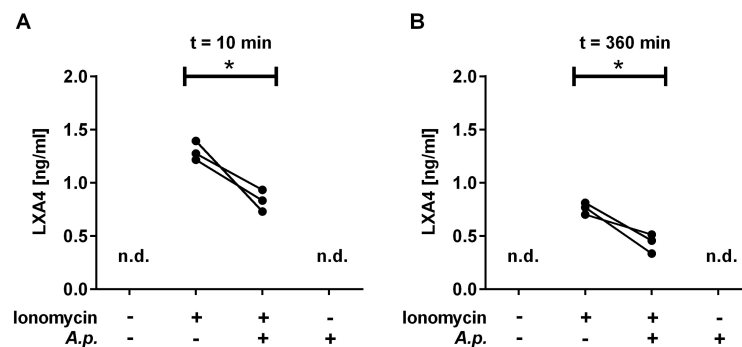


Abbildung 18) Die Freisetzung von LXA₄ ist bei *A. phagocytophilum*-infizierten neutrophilen Granulozyten reduziert Neutrophile Granulozyten wurden für 300 Minuten mit zellfreien Anaplasmen co-inkubiert. Während der letzten 90 Minuten dieser Inkubation wurde 10 ng/ml GM-CSF als *priming*-Agens hinzugefügt. *Anaplasma*-infizierte und nicht-infizierte Neutrophile wurden anschließend mit HT-29 Zellen co-inkubiert und durch Ionomycin (1,0 µM) induziert. Die LXA₄-Konzentration in den Überständen wurde 10 Minuten (A) bzw. 360 Minuten (B) nach Induktion mittels ELISA bestimmt. n = 3, n.d. = nicht detektierbar. * p ≤ 0.05

3.3.3 *Chlamydia pneumoniae*

3.3.3.1 Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *Chlamydia pneumoniae* führt zu einer verminderten LTB₄-Freisetzung

Chlamydia pneumoniae ist in der Lage, eine Vielzahl verschiedener humaner Zelltypen zu infizieren. Dabei kommt den Makrophagen eine besondere Bedeutung in der Pathogenese Chlamydien-assoziiierter Erkrankungen zu. Auch neutrophile Granulozyten, welche zu Beginn einer Infektion in großem Maße angezogen werden, werden von *C. pneumoniae* infiziert [114], [117], [122]. Über die Freisetzung des Lipidmediators LTB₄ sind die ersten PMN am Ort der Infektion maßgeblich an der weiteren Rekrutierung von Immunzellen und der Ausgestaltung der Entzündungsreaktion beteiligt [38]. Entsprechend ist der Einfluss einer *C. pneumoniae*-Infektion neutrophiler Granulozyten auf deren Freisetzung von LTB₄ bzw. dessen physiologischen Antagonisten LXA₄ von Interesse.

Nach fünf Stunden der Ko-Inkubation von neutrophilen Granulozyten und *C. pneumoniae* wurde eine Infektionsrate von 43± 10% erreicht. Diese wurde durch immunozytochemische

Färbung und mikroskopisches Auszählen der Fluoreszenz-positiven Zellen ermittelt (Abbildung 19A). Ohne Behandlung durch Induktoren wurde kein LTB₄ in relevanter Menge freigesetzt (Abbildung 19B und C). Auch die alleinige Infektion der Granulozyten ging mit keiner messbaren Freisetzung von LTB₄ einher (Abbildung 19B und C). Nach Induktion mit Ionomycin (Abbildung 19B) oder LPS+fMLP (Abbildung 19C) wurde LTB₄ freigesetzt. In beiden Fällen zeigte sich die Menge des freigesetzten LTB₄ durch Infektion mit *C. pneumoniae* deutlich reduziert (Abbildung 19B und C).

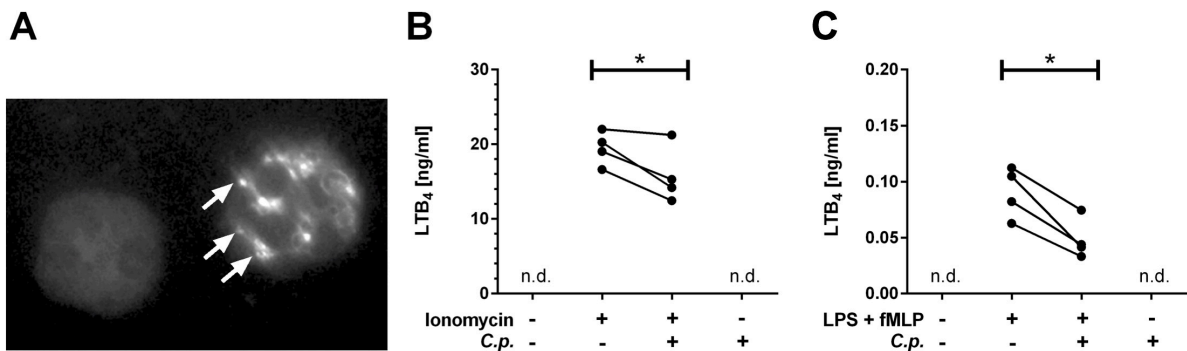


Abbildung 19) *Chlamydia pneumoniae*-infizierte primäre neutrophile Granulozyten zeigen eine reduzierte LTB₄-Freisetzung nach Stimulation mit Ionomycin oder LPS+fMLP Neutrophile Granulozyten wurden mit *C. pneumoniae* IFUs für 300 Minuten co-inkubiert (37°C, feuchte Atmosphäre, 5% CO₂) und extrazelluläre Erreger abschließend durch Waschen entfernt. Dabei wurde für die Co-Inkubation ein Verhältnis von 1:5 von Neutrophilen zu Chlamydien genutzt. **(A)** Fluoreszenzmikroskopie neutrophiler Granulozyten nach Einsatz eines *C. pneumoniae*-spezifischen, FITC-konjugierten Antikörpers. Die Pfeile zeigen multiple Inklusionen eines infizierten Neutrophilen. Farblose Darstellung, um einzelne Inklusionen besser hervorheben zu können (FITC-grün = weiß). **(B)** *C. pneumoniae*-infizierte und nicht-infizierte Zellen wurden mit Ionomycin (0,2 µM, 10 min) behandelt. Die LTB₄-Konzentration wurde im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Dabei zeigen infizierte PMN eine geringere LTB₄-Freisetzung. **(C)** *C. pneumoniae*-infizierte und nicht-infizierte Zellen wurden zunächst dem Priming-Agens LPS ausgesetzt (1 µg/ml, 30 min), um im Anschluss durch fMLP induziert zu werden (0,5 µM, 10 min). Die LTB₄-Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen wurden mittels ELISA ermittelt. (B) und (C) zeigen die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten. n.d. = nicht detektierbar. * p ≤ 0.05

3.3.3.2 Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *Chlamydia pneumoniae* führt zu keiner relevanten Modulation der LXA₄-Freisetzung

Um die LXA₄-Produktion *Chlamydia pneumoniae*-infizierter und nicht-infizierter neutrophiler Granulozyten zu vergleichen, wurden diese mit epithelartigen HT-29-Zellen inkubiert und die transzelluläre Synthese von LXA₄ durch Ionomycin induziert. 10 und 360 Minuten nach Induktion wurden die LXA₄-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen durch ELISA bestimmt, um eine Dynamik der Lipidmediator-Freisetzung erfassen zu können.

Unbehandelte neutrophile Granulozyten zeigten keine LXA₄-Freisetzung (Abbildung 20A, B). Auch die Infektion durch *C. pneumoniae* führte zu keiner Freisetzung von LXA₄ (Abbildung 20A, B). Sowohl 10 Minuten (Abbildung 20A) als auch 360 Minuten

(Abbildung 20B) nach Induktion durch Ionomycin fand sich eine relevante Freisetzung von LXA₄. Eine Infektion durch *C. pneumoniae* führte zu beiden Zeitpunkten zu keinen ausgeprägten Änderungen der LXA₄-Freisetzung (Abbildung 20A, B).

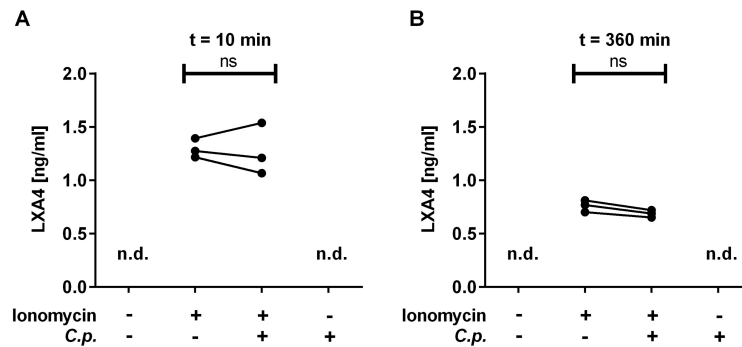


Abbildung 20) Die Freisetzung von LXA₄ durch neutrophile Granulozyten wird durch Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* nicht beeinflusst Neutrophile Granulozyten wurden für 300 Minuten mit Chlamydien co-inkubiert. Während der letzten 90 Minuten dieser Inkubation wurde 10 ng/ml GM-CSF als priming-Agens hinzugefügt. Chlamydien-infizierte und nicht-infizierte Neutrophile wurden anschließend mit HT-29 Zellen co-inkubiert und durch Ionomycin (1,0 µM) induziert. Die LXA₄-Konzentration in den Überständen wurde 10 Minuten (A) bzw. 360 Minuten (B) nach Induktion mittels ELISA bestimmt. n = 3, n.d. = nicht detektierbar, ns = nicht signifikant.

3.5 Teil 2: Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten

Um den Einfluss apoptotischer und nekrotischer neutrophiler Granulozyten auf die lokalen Lipidmediatorspiegel und die damit verbundene Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurden die PMN aus einer Isolation aufgeteilt. Ein Teil wurde als vitale Referenzgruppe keiner Bestrahlung unterzogen. Ein zweiter Teil wurde bestrahlt und zum Teil mittels positiver Selektion durch Annexin V-MACS von den verbliebenen vitalen Zellen getrennt.

3.5.1 Induktion der Apoptose von neutrophilen Granulozyten

Nach UV-Bestrahlung und anschließender Inkubationszeit zeigten sich in der Öl-Immersionmikroskopie von Diff-Quik-gefärbten Zytospin-Präparaten charakteristische Unterschiede zwischen vitalen und apoptotischen Zellen: Gegenüber den gelappten Kernen vitaler PMN hob sich das typisch kondensierte, rund erscheinende Kernchromatin apoptotischer PMN deutlich ab (Abbildung 21). Zudem schrumpfte das Zytoplasma, das somit durch Verdichtung des Inhalts eosinophiler wirkt. Bei wenigen Zellen kam es bereits zur Fragmentierung des nukleären Chromatins und dem Abschnüren einer Vielzahl membranbesetzter Apoptosekörperchen.

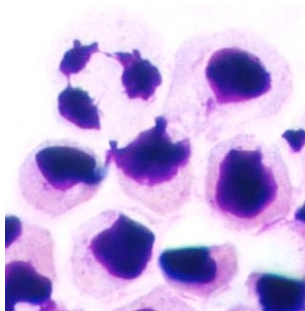


Abbildung 21) Öl-Immersionmikroskopie Diff-Quik-gefärbter, apoptotischer neutrophiler Granulozyten Oben links findet sich ein einzelner morphologisch als vital einzustufender, segmentkerniger neutrophiler Granulozyt. Alle anderen Zellen zeigen deutliche Zeichen der Apoptose. Hierzu zählen der kondensierte, abgerundete Kern sowie das geschrumpfte, eosinophile Zytoplasma.

Auch durchflusszytometrisch ließ sich anhand einer Vitalitätsfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid eine erfolgreiche Induktion der Apoptose feststellen. So enthielten die bestrahlten PMN-Suspensionen stets > 80% apoptotische Zellen, wobei der Anteil vitaler Zellen < 5%, der Anteil sekundär nekrotischer Zellen < 15% lag (Abbildung 22, mittlere Zeile). In einem zweiten Schritt wurde ein Teil der bestrahlten PMN durch Annexin V-MACS von den verbliebenen vitalen PMN getrennt, um die LTB₄-Freisetzung durch ausschließlich apoptotische (und sekundär nekrotische) PMN bestimmen zu können. Diese Prozedur führte zu einer Annexin V-positiven Zellpopulation, die zu > 85% aus apoptotischen, < 15% aus sekundär nekrotischen und ≤ 1% vitalen Zellen bestand (Abbildung 22, untere Zeile). Die vitale Vergleichspopulation (weder bestrahlte noch MACSed PMN aus der selbigen Isolation) zeigte währenddessen noch > 93% vitale, < 5%

apoptotische und < 3% nekrotische PMN (Abbildung 22, obere Zeile). Die Annexin V-negative Population nach Bestrahlung und MACS wurde nicht als vitale Referenzpopulation genutzt, da hier durchflusszytometrisch neben vitalen PMN viele Ereignisse registriert wurden, die nicht neutrophilen Granulozyten zugeordnet werden konnten.

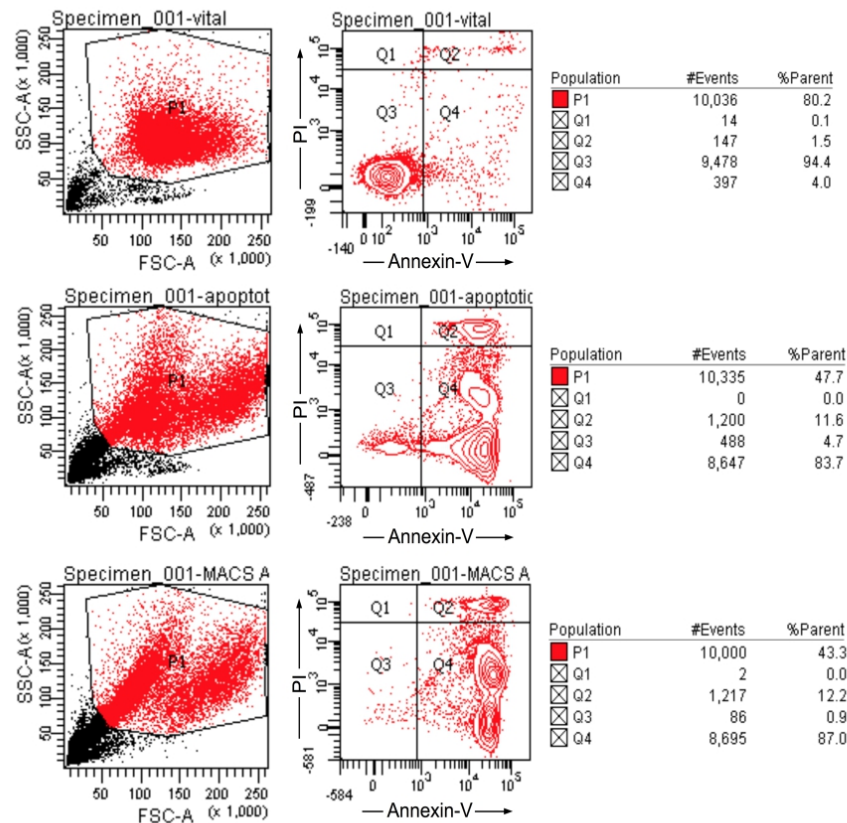


Abbildung 22) Repräsentative Durchflusszytometrie nach Vitalitätsfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid
 Nach der Isolation wurde ein Teil der PMN zur Induktion der Apoptose UVC-bestrahlt (200 mJ/cm²) und folgend bei 37°C in feuchter, 5% CO₂ führender Luft für vier Stunden inkubiert. Nicht bestrahlte Kontroll-PMN („vital“) verblieben derweil bei Raumtemperatur. Ein Teil der bestrahlten PMN wurde durch positive Selektion mittels Annexin V MACS von den verbliebenen vitalen Zellen getrennt.

Obere Zeile: Nicht bestrahlte PMN, **mittlere Zeile:** bestrahlte PMN, **untere Zeile:** bestrahlte + Annexin V-positive MACSed PMN. In der linken Spalte ist das Gating der neutrophilen Granulozyten als Dotplot abgebildet. In der rechten Spalte findet sich das Färbeverhalten der gegateten Zellen nach Annexin- und PI-Färbung. Vitale PMN finden sich in Quadrant Q3, apoptotische Zellen in Q4, nekrotische Zellen in Q1 und Q2.

3.5.2 Vergleich der LTB₄-Freisetzung vitaler, UV-bestrahlter und selektierter Annexin V-positiver neutrophiler Granulozyten

Bei dem Vergleich der LTB₄-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen vitaler und bestrahlter PMN zeigten sich Hinweise auf eine spontane Freisetzung geringer Mengen LTB₄ durch bestrahlte, also vorwiegend apoptotische PMN (Abbildung 23A). Während die vitalen Zellen mit Ausnahme eines Spenders keinerlei LTB₄ spontan freisetzten, fanden sich bei den bestrahlten PMN fast immer niedrige LTB₄-Konzentrationen (Abbildung 23A).

Diese Freisetzung geringer Mengen LTB₄ durch apoptotische PMN wurde durch Exklusion verbliebener vitaler PMN mittels MACS bestätigt (Abbildung 23A).

Auch nach Behandlung der PMN durch LPS + fMLP zeigten UV-bestrahlte PMN im Vergleich zu vitalen PMN eine deutlich reduzierte Freisetzung von LTB₄ (Abbildung 23B). Wie auch bei den zusätzlich durch MACS angereicherten Annexin V-positiven PMN fanden sich in ihren Überständen niedrige LTB₄-Konzentrationen, die der spontanen Freisetzung vergleichbar waren (Abbildung 23B). Dies bestätigte sich auch nach Behandlung durch Ionomycin (Abbildung 23C): Während in den Überständen vitaler PMN nach Induktion massiv erhöhte LTB₄-Konzentrationen gemessen werden konnten, zeigten die bestrahlten Zellen ein deutlich geringeres oder fehlendes Ansprechen (Abbildung 23C).

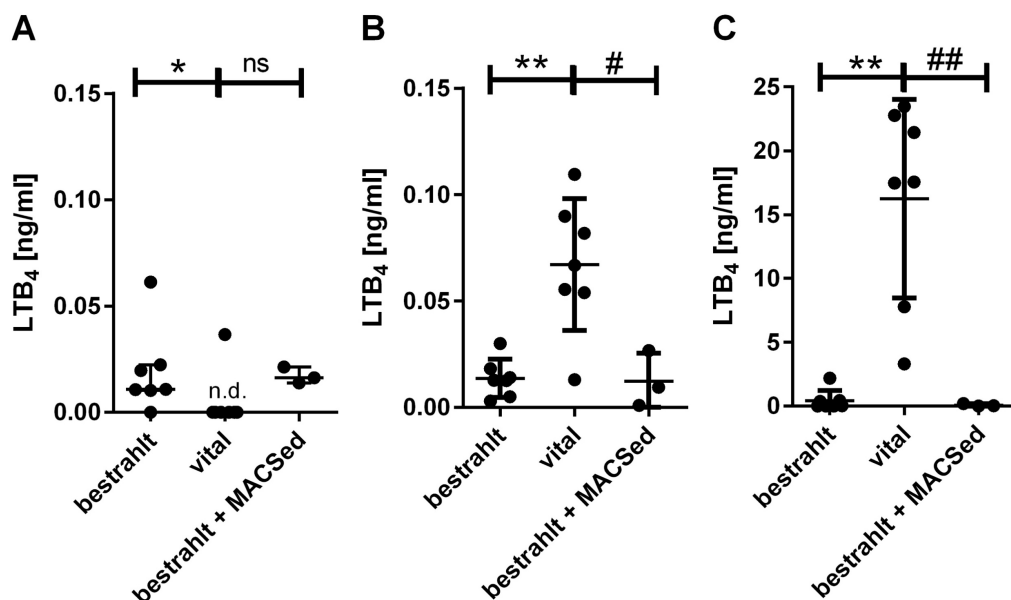


Abbildung 23) LTB₄-Freisetzung durch vitale, bestrahlte und selektiv Annexin V-positive neutrophile Granulozyten
 Nach der Isolation wurde ein Teil der PMN bei Raumtemperatur als vitale Vergleichspopulation in Kompletmedium belassen, während ein zweiter Teil einer UV-Bestrahlung von 200 mJ/cm² unterzogen wurde. Von den bestrahlten PMN wurde ein Teil durch Annexin V-MACS von den verbliebenen vitalen PMN befreit. Die drei generierten Zellpopulationen wurden auf 5×10^6 PMN/ml eingestellt und folgend den gleichen Behandlungen zugeführt. **(A) Medium-Kontrolle.** **(B) LPS + fMLP** Priming durch LPS (1 µg/ml, 30 min), gefolgt von Induktion durch fMLP (0,5 µM, 10 min). **(C) Ionomycin** Induktion durch Ionomycin (0,2 µM, 10 min). Die LTB₄-Konzentration in den Zellkultur-Überständen wurde jeweils mittels ELISA ermittelt.

n = 7 für bestrahlt und vital, n = 3 für bestrahlt+MACSed. n.d. = nicht detektierbar, hier grafisch als 0 ng/ml veranschaulicht. */# p ≤ 0.05 im gepaarten/ ungepaarten *t-test*, **/## p ≤ 0.01 im gepaarten/ ungepaarten *t-test*, ns = nicht signifikant. Der ungepaarte *t-test* fand bei ungleich großen Vergleichsgruppen (vital vs. bestrahlt+MACSed) Anwendung.

3.5.3 Apoptotische PMN hemmen die Freisetzung von LTB₄ durch vitale neutrophile Granulozyten

Am Ort einer Gewebeschädigung kommt es durch Akkumulation vitaler neutrophiler Granulozyten zu hohen lokalen PMN-Konzentrationen, dem sogenannten *Clustering*. Im Verlauf steigt unter diesen Zellen stetig der Anteil apoptotischer und nekrotischer PMN, sodass vor Ort unterschiedliche Kompositionen der verschiedenen Viabilitätszustände vorliegen. Um zu untersuchen, ob die Präsenz apoptotischer neutrophiler Granulozyten die LTB₄-Freisetzung vitaler PMN beeinflusst, wurden vitale und bestrahlte PMN in einem definierten Verhältnis zueinander vermischt. Dabei bestand die bestrahlte Population zu über 80% aus apoptotischen Zellen (Abbildung 22, mittlere Zeile).

Während die vitalen PMN in der für alle anderen Experimente genutzten Konzentration von 5×10^6 PMN/ml sowohl auf LPS + fMLP (Abbildung 24A) als auch Ionomycin (Abbildung 24B) mit ausgeprägter Freisetzung von LTB₄ reagierten, zeigten die bestrahlten PMN auch in einer Konzentration von 10×10^6 PMN/ml keine relevante Freisetzung des Lipidmediators auf diese Induktoren (Abbildung 24A, B).

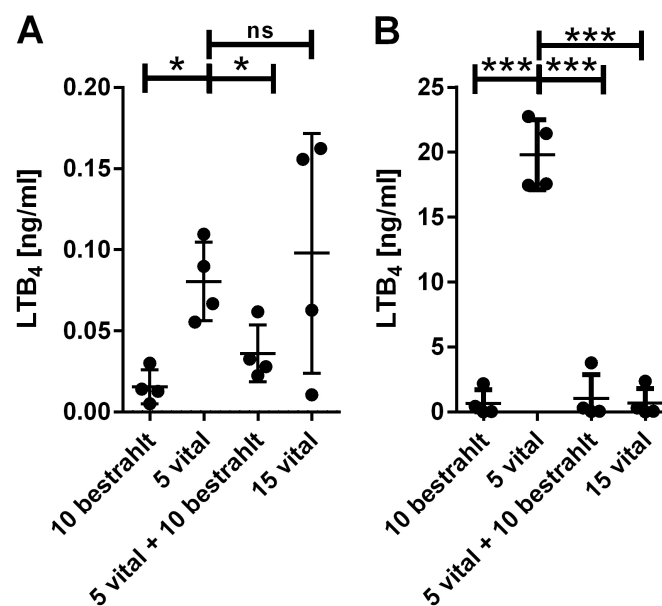


Abbildung 24) Die LTB₄-Freisetzung vitaler neutrophiler Granulozyten wird durch apoptotische PMN reduziert
 Nach der Isolation wurde ein Teil der PMN bei Raumtemperatur als vitale Vergleichspopulation in Kompletmedium belassen, während ein zweiter Teil einer UV-Bestrahlung von 200 mJ/cm² unterzogen wurde. Die vitalen und bestrahlten PMN wurden gemäß Kennzeichnung auf der X-Achse auf 5, 10 bzw. 15 x 10⁶ PMN/ml eingestellt und folgend den gleichen Behandlungen zugeführt. **(A) LPS + fMLP** Priming durch LPS (1 µg/ml, 30 min), gefolgt von Induktion durch fMLP (0,5 µM, 10 min). **(B) Ionomycin** Induktion durch Ionomycin (0,2 µM, 10 min). Die LTB₄-Konzentration in den Zellkultur-Überständen wurde mittels ELISA ermittelt.

n = 4, * p ≤ 0.05, *** p ≤ 0.001, ns = nicht signifikant.

Bei Co-Kultur der vitalen (5×10^6 PMN/ml) und bestrahlten PMN (10×10^6 PMN/ml) in einem Verhältnis von 1:2 zeigte sich die LTB₄-Konzentration sowohl nach Induktion mit LPS + fMLP (Abbildung 24A), als auch nach Ionomycin (Abbildung 24B) deutlich im Vergleich zur vitalen Vergleichsgruppe (5×10^6 PMN/ml) reduziert. In einer gleichwertig hohen PMN-Konzentration von 15×10^6 PMN/ml zeigten ausschließlich vitale PMN nach Induktion durch LPS + fMLP eine LTB₄-Freisetzung, welche jener durch vitale PMN in Standardkonzentration (5×10^6 PMN/ml) vergleichbar war (Abbildung 24A). Bei Behandlung durch Ionomycin zeigten die vitalen PMN in höherer Konzentration (15×10^6 PMN/ml) deutlich niedrigere LTB₄-Spiegel im Zellkultur-Überstand als in jene PMN in Standardkonzentration (5×10^6 PMN/ml).

4 Diskussion

4.1 Teil 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten

Intrazelluläre Erreger haben im Laufe der Evolution adaptive Strategien entwickelt, um in ihrem Wirt überleben zu können. Durch evasive Mechanismen gelingt es ihnen, sich der Elimination durch die Immunantwort des Wirts zu entziehen und sich diese bisweilen gar zunutze zu machen. Dazu ist es ihnen zum Teil möglich, die Wirtszelle durch aktive Modulation zu ihren Gunsten umzugestalten. Auch Zellen der angeborenen Immunabwehr wie die neutrophilen Granulozyten (PMN) können Zielzellen intrazellulärer Erreger sein. Da PMN meist als erste Zellpopulation zahlreich zum Ort einer Infektion rekrutiert werden, kommt ihnen in der Regulation der Abwehrreaktion eine besondere Bedeutung zu. Mit den Lipidmediatoren verfügen PMN über schnell synthetisierbare, potente Signalmoleküle, die großen Stellenwert in der Orchestrierung der Immunantwort besitzen. So amplifizieren PMN die frühe Inflammation durch Freisetzung des Mediators Leukotrien B₄ (LTB₄) und sind an der späteren transzellulären Synthese anti-inflammatorischer Mediatoren wie Lipoxin A₄ (LXA₄) maßgeblich beteiligt. Ob eine Infektion neutrophiler Granulozyten durch intrazelluläre Pathogene die Freisetzung dieser prototypischen Lipidmediatoren moduliert und somit Einfluss auf das immunologische Geschehen hat, war zum Zeitpunkt dieser Arbeit unbekannt. In dieser Studie sollte daher anhand von drei intrazellulären Erregern exemplarisch untersucht werden, ob sich die Freisetzung dieser Lipidmediatoren infolge intrazellulärer Infektionen ändert. Genutzt wurden dafür die Erreger *Leishmania major*, *Anaplasma phagocytophilum* und *Chlamydia pneumoniae*.

4.1.1 *Leishmania major*:

Nach Infektion mit *L. major* zeigten neutrophile Granulozyten keinerlei spontane LTB₄-Freisetzung. Hingegen zeigten infizierte PMN im Vergleich mit den nicht-infizierten PMN nach Behandlung durch verschiedene Stimuli signifikant gesteigerte LTB₄-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen. Dies war sowohl bei Induktion mit der Kombination aus LPS und fMLP als auch nach Behandlung durch Ionomycin der Fall. Weiterhin war bei *L. major*-infizierten PMN die Freisetzung des funktionellen Antagonisten LXA₄ während der ersten sechs Stunden nach Induktion mit Ionomycin deutlich reduziert. In der Summe führte eine *L. major*-Infektion der PMN also zu einer Verschiebung des Lipidmediator-Profiles zugunsten des pro-inflammatorischen Mediators LTB₄. Grundsätzlich ist die inverse

Korrelation der beiden Mediatoren als schlüssig zu betrachten, da LTB₄ und LXA₄ nicht nur funktionelle Antagonisten darstellen, sondern auch aus den gleichen Intermediaten synthetisiert werden [20], [138].

4.1.1.1 Wem dient der pro-inflammatorische Shift der Lipidmediatoren – dem Wirt oder dem Erreger?

LTB₄ ist ein zentraler Rekrutierungs- und Aktivierungsfaktor von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und wird vorwiegend durch PMN im Sinne eines *feed-forward*-Mechanismus freigesetzt [47], [38]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LTB₄ durch *L. major*-infizierte PMN vermehrt freigesetzt wird, während sein Antagonist vermindert freigesetzt wird. Dies könnte zum einen der Abwehr des Erregers durch vermehrte Immunzell-Rekrutierung und –Aktivierung dienlich sein. Zum anderen könnte der Erreger durch vermehrte Wirtszell-Rekrutierung von diesem Mechanismus profitieren, sofern er sein Überleben in der Wirtszelle durch geeignete Umgebungsmodulation und evasive Mechanismen sichern kann (Abbildung 25).

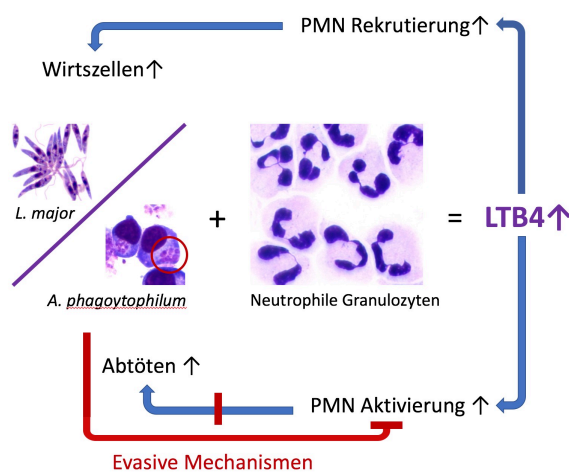


Abbildung 25) LTB₄-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung führt aufgrund evasiver Mechanismen der Pathogene zu inkompletem Abtöten und Überleben der Erreger. Die intrazellulären Pathogene *Leishmania major* und *Anaplasma phagocytophilum* induzieren eine erhöhte LTB₄-Freisetzung durch PMN. Sie könnten in der Summe von vermehrter LTB₄-Freisetzung profitieren, da sie eine Aktivierung der Wirtszellen potent unterdrücken können. Links abgebildet sind *L. major*-Promastigoten sowie intrazelluläre *Anaplasma*-Ansammlungen in HL60-Zellen, sog. Morulae (Kreis).

4.1.1.2 Sonderfall *L. major*: Ausnutzen neutrophiler Granulozyten

Für Infektionen durch die meisten *Leishmania*-Arten konnte ein protektiver Effekt neutrophiler Granulozyten in zahlreichen *in vitro*-Versuchen und *in vivo*-PMN-Depletionsversuchen nachgewiesen werden [78]. So zeigte sich nach Addition von murinen PMN zu murinen, *Leishmania*-infizierten Makrophagen eine deutlich reduzierte Parasitenlast, wobei vergleichbare Ergebnisse für *L. braziliensis*, *L. chagasi* und *L. amazonensis* gewonnen wurden [142]. Bei Infektion durch *L. infantum* konnte ebenfalls

ein protektiver PMN-Effekt im *in vivo*-Mausmodell gezeigt werden [143]. Dieser Effekt zeigte sich auch eindrücklich durch kleinere Läsionen bei Co-Injektion von *L. braziliensis* mit vitalen PMN [144], wobei Kontakt von PMN zu *L. braziliensis in vitro* mit Aktivierung (Elastase-, TNF- α - und ROS-Freisetzung) einherging [144]. Bei humanen *L. braziliensis*-infizierten Makrophagen ließ sich ebenfalls ein gesteigertes, unter anderem TNF- α -vermitteltes *killing* durch Addition humaner PMN nachweisen [142]. Grundsätzlich wird das Abtöten der Leishmanien teils direkt durch die neutrophilen Granulozyten, teils indirekt über deren induktive Effekte auf Makrophagen und andere Zellen vermittelt [84], [142].

Währenddessen gibt es für die Art *L. major* zahlreiche Ergebnisse, die auf eine Nutzung neutrophiler Granulozyten im Rahmen der parasitären Überlebensstrategie hindeuten. So kam es im Mausmodell nach Addition von PMN zu *L. major*-infizierten Makrophagen zu einer deutlich gesteigerten Parasitenlast [142]. Weiterhin zeigten sich vitale *L. major*-Promastigoten in den Phagosomen von PMN und eine Induktion der IL-8-Freisetzung durch infizierte PMN [145] und Monozyten [146]. Zudem fand sich die Apoptose bei *L. major*-infizierten PMN deutlich verzögert [77], [147], [148], während diese bei anderen Arten (*L. braziliensis* und *L. amazonensis*) induziert wird, was mit erfolgreichem Abtöten der Erreger vergesellschaftet auftrat [144]. Auch die NET-Bildung nach Kontakt zu *L. major*-Promastigoten fiel im Vergleich zu *L. amazonensis* und *L. chagasi* deutlich geringer aus [149]. Derartige Beobachtungen bei *L. major* führten zur Hypothese des „Trojanischen Pferdes“, also der immunologisch stillen Aufnahme von Erreger-haltigen neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen [73], [79]. Demzufolge dienen PMN *L. major* als transiente Wirtszellen bis zum Eintreffen von Makrophagen zum einen als Vektoren, zum anderen als frühe intrazelluläre Nische dem Schutz vor der Elimination durch das Immunsystem. Auch gemäß PMN-Depletionsversuchen scheinen neutrophile Granulozyten eine tragende Rolle in der Etablierung produktiver *L. major*-Infektionen zu spielen [78]. So kam es in einem *in vivo*-imaging Versuch mit C57BL/6-Mäusen durch PMN-Depletion zu einer massiv beeinträchtigten Infektion nach Biss durch infizierte Sandmücken [71]: Fehlten neutrophile Granulozyten, so wurden mehr Leishmanien eliminiert und schließlich weniger Makrophagen infiziert. Schließlich kam es bei intradermaler Inokulation von *L. major* in die Haut neutropener *Genista*-Mäuse zu keinerlei Entwicklung von Läsionen, während normale C57BL/6-Mäuse chronische Ulzera entwickelten [69].

Ogleich das Genom verschiedener Leishmanien-Arten in Größe und Organisation sehr ähnlich ist (nur ca. 200 von etwa 8300 Genen differieren unter den Arten) [150], gibt es Art-spezifische Gene und offensichtlich auch unterschiedliche Mechanismen, in der jeweiligen Umwelt zu bestehen. Für *L. major* scheinen neutrophile Granulozyten ein wichtiger Bestandteil der Überlebensstrategie zu sein, für andere *Leishmania*-Arten ein gefährlicher Gegner [69].

Da neutrophile Granulozyten und Makrophagen also die wichtigsten Zielzellen von *Leishmania major* darstellen, müssen die Erreger aus evolutionärer Sicht mit Mechanismen ausgestattet sein, deren Abwehrmechanismen zu trotzen. In diesem Sinne stellten mehr Phagozyten also mehr potentielle Wirtszellen und somit einen potentiellen Überlebensvorteil dar. Folglich könnte eine gesteigerte Freisetzung von LTB₄ durch infizierte PMN im Sinne einer gesteigerten Wirtszell-Rekrutierung als *feed-forward*-Mechanismus der *L. major*-Infektion interpretiert werden.

4.1.1.3 Überleben trotz oder aufgrund erhöhten LTB₄-Spiegels: Evasive Mechanismen

Damit die Gratwanderung einer gesteigerten Rekrutierung ohne Elimination der Erreger durch verstärkte Aktivierung der Phagozyten gelingt, muss *L. major* sich der Erkennung entziehen und über deaktivierende Mechanismen verfügen.

Rekrutierung von Phagozyten und Phagozytose der Erreger

Die Aufnahme von *L. major*-Promastigoten durch PMN erfolgt über zwei Wege, welche die Abhängigkeit von Serumfaktoren, insbesondere der Opsonine, unterscheidet [145]. Opsonine stellen Serumbestandteile dar, die zum einen mikrobielle Oberflächen, zum anderen Rezeptoren auf Phagozyten binden und diese aktivieren. Sowohl beim Serum-abhängigen als auch beim -unabhängigen Weg ist der Komplement-Rezeptor 3 (CR3) maßgeblich beteiligt [145]. In Abhängigkeit des genutzten Phagozytoseweges kommt es zu einem unterschiedlichen Werdegang der Infektion: Während es beim Opsonin-abhängigen Weg zur Aktivierung der Zelle (ROS- und IL-8-Induktion) und Abtöten der meisten Erreger kommt, bleibt die Aktivierung beim Opsonin-unabhängigen Weg aus. Dies hat ein gesteigertes Überleben der Leishmanien zur Folge [145]. Da es durch Membrankomponenten der Leishmanien zu einer umfassenden Komplement-Aktivierung und somit zu lokaler Komplement-Depletion kommt, wird eine stille, Opsonin-unabhängige Phagozytose der verbliebenen Erreger begünstigt [145], [151]. *In vivo* konnte gezeigt

werden, dass ein Teil der *L. major*-infizierten PMN stets nicht aktiviert wurde und die Erreger somit überlebten [145]. Entsprechend könnte eine durch erhöhte LTB₄-Spiegel induzierte PMN-Rekrutierung zu einem gesteigerten Überleben der Erreger beitragen, indem der Anteil vitaler, immunologisch still aufgenommener Erreger durch häufigere und frühere Phagozytose steigt. Neben der vermehrten Phagozytose durch erhöhte PMN-Zellkonzentration induziert LTB₄ zudem direkt die Phagozytose-Aktivität von PMN in einer Fc- oder Komplement-Rezeptor-vermittelten Reaktion [23]. Die Leishmanien werden somit häufiger phagozytiert und verbleiben somit für kürzere Zeit im toxischen extrazellulären Milieu. Zudem wurde postuliert, dass *L. major*-Promastigoten, die zunächst durch PMN phagozytiert wurden, besser für das Leben in Makrophagen adaptiert sind [78].

Lipidmediatoren wie LTB₄ werden innerhalb kürzester Zeit synthetisiert und freigesetzt, sodass die LTB₄-induzierte Rekrutierung weiterer PMN innerhalb weniger Minuten beginnt [16]. Folglich kann sich die Infektion erster PMN, welche innerhalb von Minuten erfolgt [145], positiv auf das Überleben der verbliebenen extrazellulären Leishmanien auswirken. Dabei ist eine Modulation des Wirts auf Ebene der Lipidmediatoren aus Sicht des Erregers besonders sinnvoll, da über sie – im Gegensatz zu Mediatoren auf Protein-Basis - eine Möglichkeit zur schnellen Rekrutierung von Wirtszellen besteht [18]. Langfristig kommt es durch erhöhte LTB₄-Spiegel zudem zur vermehrten Rekrutierung von Makrophagen, welche den Leishmanien als zelluläre Endwirte dienen und ebenfalls chemotaktisch auf LTB₄ ansprechen [152].

Vermeidung einer Aktivierung

Auf funktioneller Ebene kommt es durch das LTB₄-/BLT1-signaling zur Aktivierung von PMN und Makrophagen, was unter anderem mit Phagolysosomen-Bildung und ROS-Produktion einhergeht (Tabelle 1). Diese Effektorfunktionen sind mit gesteigertem Abtöten aufgenommener Erreger assoziiert. *Leishmania major* ist jedoch in der Lage, diese Mechanismen zu inhibieren. So kommt es maßgeblich durch das Oberflächen-Glykolipid Lipophosphoglykan (LPG) zur Inhibition der Fusion von Phagosomen und Lysosomen [153], [154]. Gleichermaßen wird die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies in Makrophagen und PMN aktiv unterbunden [151], [155]. Auch auf Ebene der Entzündungsmediatoren wird die Aktivierung der Wirtszellen bei vielen *Leishmania*-Arten aktiv unterbunden oder durch gesteigerte Synthese deaktivierender Mediatoren antagonisiert [151]. So kommt es unter anderem zu verminderter Produktion der aktivierenden Faktoren

TNF- α , IL-12 und IFN- γ , während deaktivierende Faktoren wie TGF- β und IL-10 nach Infektion von Phagozyten durch verschiedene *Leishmania*-Arten hochreguliert werden [151]. Dabei führt auch die Präsenz apoptotischer *L. major*-Promastigoten durch Expression von Phosphatidylserin (PS) zu einem deaktivierenden Einfluss auf die Phagozyten, die nach PS-Erkennung weniger TNF- α und mehr TGF- β freisetzen [156], [157]. Zudem sezernieren *L. major*-Promastigoten mit dem *Leishmania Chemotactic Factor* (LCF) ein chemotaktisch wirksames Lipid, das als Agonist des ALX-Rezeptors anti-inflammatorische Wirkung entfaltet [75]. LCF führte zu einer verstärkten Phagozytose von *L. major* durch PMN, während gleichzeitig das intrazelluläre Überleben der Erreger durch reduzierte Elimination zunahm [89]. In der Summe führen diese Mechanismen zum Überleben einzelner *L. major*-Erreger.

Folglich könnte auch eine auto- und parakrine Aktivierung der Phagozyten durch erhöhte LTB₄-Spiegel durch diese Mechanismen kompensiert und eine kritische Aktivierung der Zellen unterdrückt werden. Selbst nach klinischer Gesundung immunkompetenter Wirte finden sich noch vitale Leishmanien, welche unter anderem in immunologisch weniger kompetenten Zellen wie Fibroblasten, unreifen Makrophagen oder Langerhans-Zellen eine Zuflucht finden [151].

4.1.1.4 Einflussgröße Vektor: Die Rolle der Sandmücke im Überleben der Leishmanien und die Interferenz mit lokalen LTB₄-Spiegeln

Für ihren Entwicklungszyklus und die Übertragung zwischen den Wirten benötigen Leishmanien Sandmücken als Vektoren. Der Einfluss der Sandmücken auf die Entzündungsreaktion geht dabei weit über die initiale Gewebeschädigung infolge des Bisses hinaus. Im Darm der Sandmücken synthetisieren *Leishmania*-Promastigoten ein Proteophosphoglykan-reiches Gel (PSG, von engl. *promastigote secretory gel*), das die erfolgreiche Deposition der Erreger in der Haut sicherstellt und zudem das Überleben im Wirt steigert [158]. Dabei führt das Gel im Sinne einer Blockierung des Darmtrakts zur Regurgitation von Erregern sowie zu längeren und häufigeren Blutmahlzeiten, die mit vornehmlich inkompletten Mahlzeiten assoziiert sind. Auch auf Ebene der LTB₄-Regulation ergibt sich ein direkter Einfluss der Sandmücke auf das Überleben der Leishmanien: Für den Speicheldrüsen-Extrakt (SGE, von engl. *salivary gland extract*) von *Lutzomyia longipalpis*-Sandmücken wurde gezeigt, dass dieser die LTB₄-Synthese durch PMN und die über LTB₄ vermittelte PMN-Chemotaxis *in vitro* und *in vivo* inhibiert [159]. Es kam nach SGE-Behandlung zu weniger Freisetzung der pro-inflammatorischen Mediatoren TNF- α , IL-1 β

und LTB₄, während IL-10 und IL-4 gesteigert freigesetzt wurden [159]. Zudem enthält SGE große Mengen an Enzymen, die vor Ort die Entzündungsreaktion mitgestalten dürften [159]. Schließlich wurde für SGE eine Steigerung der PGE₂-Freisetzung gezeigt, was mit dem gesteigerten Überleben von *L. infantum* korreliert wurde [160] und gemäß Lipidmediator-*class switch* eine gesteigerte Synthese entzündungsaflösender Mediatoren (SPMs) nach sich ziehen dürfte.

In der Summe zeigt sich also eine gegensätzliche Regulation der Entzündungsreaktion durch Vektor und Parasit: Während Sandmücken auf eine langfristig ungestörte Möglichkeit des Nahrungsgewinns aus Wirbeltieren durch Unterdrücken der Entzündung auf Ebene der angeborenen und erworbenen Immunantwort hinwirken, benötigt *Leishmania major* die Inflammation, um ausreichend Wirtszellen zu rekrutieren. Dies zeigt, dass die Modulation der LTB₄-getragenen Entzündungsreaktion auf mehreren, teils konkurrierenden Ebenen geschieht und einen gängigen Angriffspunkt für Parasiten darstellt.

4.1.1.5 Abschließende Bewertung des erhöhten LTB₄ und verminderten LXA₄

Für diverse *Leishmania*-Arten (*L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum*) wurde ein Zusammenhang zwischen Phagozyten-Infektion und erhöhten LTB₄-Spiegeln hergestellt [81]–[84]. Dabei war das erfolgreiche Abtöten und die Kontrolle der Erreger zum Teil unmittelbar von der LTB₄-bedingten Aktivierung abhängig und wurde teils direkt durch die neutrophilen Granulozyten selbst, teils indirekt über deren induktive Effekte auf Makrophagen vermittelt (siehe Einleitung) [84], [142]. Im Gegensatz zur Pathogenschädlichen Rolle des LTB₄ bei Infektionen durch obige *Leishmania*-Arten, postuliere ich für die Art *L. major* einen parasitären Nutzen der erhöhten LTB₄-Spiegel zum Zeitpunkt der frühen Infektion. Ich begründe dies mit Verweis auf die potenten Überlebensstrategien dieser Leishmanien-Art sowie ihrer außergewöhnlichen Affinität zu neutrophilen Granulozyten.

Währenddessen dürfte zu einem späteren Zeitpunkt, nach abgeschlossener Wirtszell-Rekrutierung, eine vermehrte Freisetzung von LXA₄ das Überleben des Erregers begünstigen. So zeigte sich, dass LXA₄ dosis- und zeitabhängig die Phagozytose von *L. major* durch PMN und das intrazelluläre Überleben der Erreger steigert [89]. Zudem wird die Efferozytose, das Abräumen der zum Teil infizierten PMN durch Makrophagen, gesteigert [21], [60]. Gemäß der Hypothese des Trojanischen Pferdes dürfte ein im Verlauf der Inflammation steigendes LXA₄ folglich zur Infektion der Makrophagen beitragen.

Da die *L. major*-induzierte akute Entzündungsreaktion mit Neutrophilen-Influx *in vivo* mehr als fünf Stunden anhält [71], wurde erwartet, dass die LXA₄-Produktion infizierter PMN nicht während der ersten sechs Stunden nach Behandlung durch Ionomycin ansteigen würde. In der Tat zeigten *L. major*-infizierte PMN während der ersten sechs Stunden nach Behandlung durch Ionomycin eine reduzierte LXA₄-Freisetzung. Der Lipidmediator *class switch* (Wechsel von LTB₄- zu LXA₄-Synthese), der *in vitro* und *in vivo* im Zebrafisch-Modell innerhalb der ersten sechs Stunden vollzogen wird [37], [161], ist im Fall der *L. major*-infizierten PMN also verzögert. Dies legt den Schluss nahe, dass im Kontext der *L. major*-Infektion eine suffiziente Rekrutierung von Wirtszellen durch ein erhöhtes LTB₄ zunächst höhere Priorität genießt, als über vermehrte LXA₄-Freisetzung zusätzlichen deaktivierenden Einfluss auf Phagozyten auszuüben.

Gedanken zu weiterführenden Experimenten finden sich unter „Schlussbetrachtung und Ausblick“.

4.1.2 *Anaplasma phagocytophilum*:

Das Bakterium *Anaplasma phagocytophilum* lebt obligat intrazellulär in neutrophilen Granulozyten. Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *A. phagocytophilum* selbst führte zu keiner messbaren LTB₄-Freisetzung. Hingegen führte die Behandlung *A. phagocytophilum*-infizierter PMN mit aktivierenden Agenzien zu einer modulierten Freisetzung von LTB₄. So kam es nach Behandlung durch Ionomycin zu deutlich erhöhten LTB₄-Konzentrationen, während die kombinierte Behandlung aus LPS und fMLP zu niedrigeren LTB₄-Spiegeln in den Zellkulturüberständen infizierter PMN führte. Weiterhin zeigte sich die Freisetzung des funktionellen LTB₄-Antagonisten Lipoxin A₄ (LXA₄) während der ersten sechs Stunden nach Behandlung durch Ionomycin deutlich reduziert. Die Diskrepanz zwischen den LTB₄-Konzentrationen nach Behandlung *A. phagocytophilum*-infizierter PMN durch LPS+fMLP bzw. Ionomycin soll im Folgenden behandelt werden.

4.1.2.1 Einordnung der infektionsbedingten Unterschiede in der LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten

Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *A. phagocytophilum* führt zu einem „aktiviert-deaktivierten“ Misch-Phänotyp [94]: Zum einen kommt es zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit langwieriger Degranulation und Proteasen-Freisetzung [95] sowie massiv gesteigerter Sekretion von IL-8 [96], [104]. Zum anderen führt eine Infektion zur

Dysfunktion von endothelialer Adhärenz [97], Phagozytose [98], Phagolysosomen-Bildung [99] und ROS-Produktion [100], [101]. Dieser besondere Phänotyp ist das Resultat einer Interaktion von Wirtszelle und Erreger und entsprechend durch Wirts- wie auch Erregerfaktoren definiert. Letztere wirken teils direkt, teils indirekt über eine Modulation von zelleigenen Faktoren auf Wirtszell-Signalwege und –Funktionen ein. Die Potenz dieser Mechanismen lässt sich am Beispiel der ROS-Inhibition belegen: So kam es bei *A. phagocytophilum*-infizierten PMN nach Einsatz potenter ROS-Induktoren zu kompletter Inhibition eines ROS-Anstiegs oder gar zu niedrigerer ROS-Freisetzung, als in der unstimulierten, nicht-infizierten Kontrolle (reviewed in [141]). Dies ließ auf aktive Inhibition dieses Prozesses schließen. Derartige Ergebnisse liegen für Behandlungen von *A. phagocytophilum*-infizierten PMN durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), *Escherichia coli* (*E. coli*), Immunkomplexe, aber auch für LPS und fMLP vor [101], [162]–[164].

Diese Beobachtung könnte mehrere Erklärungsansätze für die erniedrigten LTB₄-Spiegel nach Behandlung *A. phagocytophilum*-infizierter PMN durch LPS + fMLP liefern, da auch die LTB₄-Freisetzung Ausdruck einer Wirtszell-Aktivierung sein kann, die es aus Sicht des Erregers zu verhindern gilt: Zum einen ist denkbar, dass *A. phagocytophilum* selbst exogene Wirtszell-Aktivatoren wie LPS oder fMLP detektiert und konsekutiv mit vermehrter deaktivierender Aktivität auf die Wirtszelle einwirkt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das Ausmaß einer Wirtszell-Aktivierung durch den intrazellulären Erreger detektiert und folgend antagonisiert wird. Auch die Freisetzung von LTB₄ könnte von dieser Antagonisierung betroffen sein, da sie mit der vital bedeutsamen Bildung von ROS funktionell gekoppelt ist: Die ROS-Produktion ist abhängig von Arachidonsäure (AA) [165], die auch das Substrat der Eicosanoid-Synthese darstellt. Arachidonsäure wird über die zytosolische Phospholipase-A₂ bereitgestellt (cPLA₂), die bei PMN-Aktivierung durch eine funktionale NADPH-Oxidase zur Plasmamembran rekrutiert und dort verankert wird [26]. Die Co-Lokalisation dieser zwei Enzyme korreliert dabei mit der Kinetik des oxidativen Bursts [26]. Entsprechend ist es möglich, dass *A. phagocytophilum* in Gegenwart starker Aktivatoren auf einer den beiden Funktionen übergeordneten Ebene die weitere Aktivierung unterbindet – beispielsweise durch Inhibition der cPLA₂. Da die cPLA₂ auch für die nukleäre Lipidmediator-Synthese unabdingbar ist [40], [41], könnte somit auch die Freisetzung von LTB₄ reduziert sein. Die reduzierte LTB₄-Freisetzung macht aus Sicht des Erregers Sinn, da LPS und fMLP im Sinne einer bakteriellen Co-Infektion im Bereich des Zeckenbisses gewertet werden müssen, die aufgrund starker chemotaktischer Wirkung ohnehin zu einer

ausgeprägten PMN-Rekrutierung führt. Entsprechend ist es in Gegenwart starker Chemoattraktanten und Aktivatoren nicht nötig, über LTB₄ weitere PMN zu rekrutieren. Vielmehr ist es von vitaler Bedeutung, die Aktivierung der Wirtszelle in diesem Milieu effizient zu unterbinden.

A. phagocytophilum-infizierte PMN setzen deutlich mehr Interleukin-8 (IL-8) frei, als die nicht-infizierte Referenzpopulation [96], [104], [166]. Das chemotaktische Zytokin IL-8 dient, wie auch der Lipidmediator LTB₄, in erster Linie der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und verlängert überdies deren Lebensdauer [105]. Zudem aktivieren beide Botenstoffe wichtige Effektorfunktionen der PMN. Entsprechend dieser funktionellen Analogie erscheint eine gleichgerichtete Modulation dieser Wirtszell-Mediatoren vorteilhafter, als eine gegenläufige. Nach Behandlung durch Ionomycin konnte in der Tat eine vermehrte LTB₄-Freisetzung durch *A. phagocytophilum*-infizierte PMN registriert werden. Zudem konnte nach Ionomycin-Behandlung eine verminderte Konzentration von LXA₄ in den Überständen *A. phagocytophilum*-infizierter PMN nachgewiesen werden. Dies ist schlüssig, da LTB₄ und LXA₄ nicht nur funktionelle Antagonisten darstellen, sondern auch aus den gleichen Intermediaten synthetisiert werden [20], [138]. Die resultierende proinflammatorische Lipidmediator-Verschiebung könnte in einem wenig aktivierenden Umfeld (weitestgehend sterile Inokulation durch Zeckenbiss) als Modulation der Wirtszelle zu Gunsten einer vermehrten Wirtszell-Rekrutierung gedeutet werden (Abbildung 25). In diesem Sinne wären die erhöhten LTB₄-Spiegel *A. phagocytophilum*-infizierter PMN in Einklang mit den erhöhten IL-8-Spiegeln zu sehen.

4.1.2.2 Überlebensstrategien von *Anaplasma phagocytophilum*

Das Bakterium *Anaplasma phagocytophilum* ist auf neutrophile Granulozyten als Wirtszellen angewiesen. Um von dem PMN-rekrutierenden Effekt erhöhter LTB₄-Spiegel profitieren zu können und nicht durch die damit einhergehende PMN-Aktivierung eliminiert zu werden, verfügt *A. phagocytophilum* über vielfältige evasive Strategien. So entzieht sich der Erreger der Erkennung durch das Immunsystem, inhibiert umfassend Aktivierung und Effektormechanismen seiner Wirtszelle und moduliert ihre Stoffwechselwege. Durch diese im Folgenden detaillierter beschriebenen Mechanismen dürfte es *A. phagocytophilum* möglich sein, auch in einem Umfeld erhöhter LTB₄-Spiegel zu überleben.

A. phagocytophilum fehlen die notwendigen Enzyme für die Synthese der klassischen Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs, von engl. *pathogen-associated molecular patterns*) wie LPS und Peptidoglykan, was die Erkennung durch Wirtszellen wesentlich erschwert [167]. Einzigartig für *A. phagocytophilum* und wenige nahe Verwandte ist zudem, dass sie selbst nicht zur Cholesterolsynthese fähig sind und somit eine direkte Abhängigkeit von exogenen Quellen – den Wirtszellen – besteht [167]. Diese zwei Faktoren tragen dazu bei, dass die äußere Membran des Erregers jener des Wirtes stark ähnelt und somit einer Erkennung und Eliminierung vorgebeugt wird. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bereits eine 30-minütige Bindung von *A. phagocytophilum* durch primäre humane PMN ausreicht, um die ROS-Produktion massiv zu inhibieren [162]. Diese Hemmung war von Kohlenhydrat-Resten auf der Membranoberfläche der Erreger abhängig und unabhängig von der strukturellen Integrität der Erreger oder deren Neusynthese von Proteinen [162].

Die Aufnahme in PMN erfolgt schließlich über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Hierfür sind spezielle Lipid-Schollen in der Wirtszellmembran notwendig, die reich an Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen, Flotillin 1 und möglicherweise auch Caveolin sind. Durch das Vorhandensein dieses Lipid-Protein-Komplexes formen sich flaschenförmige, Cholesterol-reiche Invaginationen in der Membran, in denen *A. phagocytophilum* bindet [141], [168]. Es kommt in der Folge zum Abschnüren atypischer Endosomen, die aufgrund der speziellen Membranzusammensetzung nicht mit Lysosomen oder Granula fusionieren [141], [168]. Somit bleibt eine Ansäuerung des Milieus und eine enzymatische Zersetzung aus. Ebenfalls wird durch das Ausbleiben von Fusionen einzelner Zellbestandteile das Zusammensetzen einer funktionstüchtigen NADPH-Oxidase, welche für die ROS-Bildung unabdingbar ist, verhindert. Bereits nach 30 Minuten wird zudem die Komponente gp22^{phox} herunterreguliert [163], was die Bildung eines funktionsfähigen Enzyms empfindlich stört. Dieser „sichere Hafen“ wird in Anlehnung an das Aussehen von Maulbeeren *Morula* genannt. Von dort aus kommt es zu weitreichender Modulation der Wirtszelle, die direkt bei deren DNA ansetzt und sich auf nahezu allen Ebenen niederschlägt: So ändert sich die Zusammensetzung der Wirtszellmembran, zytoskelettale Komponenten werden re-arrangiert, der Energie-Metabolismus umgestellt, der vesikuläre Austausch unter den Zellorganellen und das zelluläre *signaling* beeinflusst sowie die Apoptose inhibiert [94], [141], [166] (siehe Einleitung: *Anaplasma phagocytophilum*).

Um eine Aktivierung der nun infizierten Wirtszelle zu unterdrücken, kommt es auch zu verminderter Expression von Rezeptoren, die der Detektion von Gefahrensignalen dienen.

Beispielsweise ist die Häufigkeit des Toll-like Rezeptors 1 (TLR1) auf infizierten HL-60-Zellen deutlich vermindert [169]. TLR1 formt mit TLR2 einen Heterodimer, welcher der Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs, von engl. *pathogen-associated molecular patterns*) durch Epithelien, Makrophagen und PMN dient. Auch die IL-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 werden in *A. phagocytophilum*-infizierten PMN deutlich weniger exprimiert, sodass die gesteigerte IL-8-Freisetzung durch infizierte Zellen weniger auto- und parakrin aktivierend auf diese selbst, sondern vielmehr rekrutierend auf nicht-infizierte PMN wirkt [96], [166], [170]. Analog zu CXCR1 und -2 könnte auch der LTB₄-Rezeptor BLT1 auf *A. phagocytophilum*-infizierten neutrophilen Granulozyten herunterreguliert werden, um eine autokrine Aktivierung bei gesteigerter LTB₄-Freisetzung zu reduzieren.

Auch der bedeutendste Vektor der Anaplasmen in Europa, der Gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*), manipuliert die Entzündungsreaktion auf Ebene der Lipidmediatoren: Er sezerniert neben gerinnungshemmenden und anästhetisierenden Stoffen ein Leukotrien-bindendes Protein in seinen Speichel (nach dem Vektor Ir-LBP genannt), in dessen Folge es *in vivo* zu verminderter Zahl und geringerer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten kommt [171]. Ebenso wie durch den Einsatz Histamin-bindender Proteine [172] dürfte Ir-LBP der Zecke zum einen die ungestörte Einnahme der aktuellen Blutmahlzeit sicherstellen, zum anderen langfristig eine adaptive Immunantwort des lokalen Säugetier-Pools durch verminderte „immunologische Aufmerksamkeit“ unterdrücken. Da Anaplasmen auf neutrophile Granulozyten als Wirtszellen angewiesen sind, ist eine Induktion der LTB₄-Freisetzung durch erste infizierte PMN sinnig, um diese Vektor-bedingte Reduktion der PMN-Rekrutierung kompensieren zu können.

4.1.2.3 Abschließende Betrachtung der Lipidmediator-Verschiebung nach Infektion neutrophiler Granulozyten durch *A. phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum kann in einem inflammatorischen Umfeld überleben. Wie soeben dargestellt, stellt eine ausgeprägte akute Entzündungsreaktion vermutlich sogar einen Überlebensvorteil für *A. phagocytophilum* dar, da mehr Wirtszellen rekrutiert werden. Die hier gezeigten Daten legen den Schluss nahe, dass die Freisetzung des schnell produzierbaren Lipidmediators LTB₄ durch infizierte PMN vom Erreger als Stellschraube der initialen Entzündungsreaktion genutzt wird, um auf unterschiedliche Umgebungsbedingungen zu reagieren:

- Liegt eine ausreichend starke Entzündungsreaktion mit hinreichender PMN-Rekrutierung vor – beispielsweise bei ausgeprägter Co-Infektion oder Kontamination des Zeckenstichs (hier modellhaft imitiert durch LPS + fMLP) – wird die LTB₄-Freisetzung durch infizierte PMN reduziert. Dadurch kann das Ausmaß der PMN-Aktivierung weiter reduziert und somit das Überleben der Anaplasmen-Population im Wirt verbessert werden.
- Sind nicht genügend Wirtszellen vorhanden – beispielsweise bei Vorhandensein großer Mengen Ir-LBP im Vektor-Speichel –, kommt es durch erste infizierte PMN zu vermehrter LTB₄-Freisetzung. Dadurch werden unter Inkaufnahme eines gesteigerten Aktivierungsgrades mehr PMN rekrutiert. Sollte jedoch analog zur verminderten Expression der IL-8-Rezeptoren auch BLT1 vermindert exprimiert oder die nachfolgende Signalkaskade inhibiert werden, könnten sich die infizierten PMN weitestgehend vom aktivierenden Einfluss dieses Mediators abschirmen.

Die variable Expression von *A. phagocytophilum*-Genen in unterschiedlichen Wirtszell-Typen (z.B. HL-60-Zellen oder primären neutrophilen Granulozyten [166], [169]) sowie die im zeitlichen Verlauf der Infektion wechselnde Protein-Expression [170] implizieren, dass Faktoren wie die Bakterien-Dichte und die Wirtszell-Umgebung die bakterielle Transkription maßgeblich beeinflussen. Während für viele Erreger *Feedback*-Mechanismen etabliert sind, welche der Regulation der Populationsdichte und der Kommunikation dienen, ist für *A. phagocytophilum* kein solcher *quorum sensing*-Mechanismus auf Basis bakterieller Moleküle bekannt [141].

Da das Ausmaß der gesteigerten IL-8-Freisetzung durch infizierte PMN von der Bakterienlast und der Dauer der Infektion abhängt [96], könnten Signalmoleküle der infizierten Wirtszellen wie IL-8 diese Funktion erfüllen. Dies macht Sinn, da Anaplasmen als intrazelluläre Erreger über eingeschränkte Möglichkeiten der direkten Kommunikation über die Zellgrenze hinaus verfügen, während sie über eine Modulation der Wirtszelle indirekt kommunizieren könnten. Neben IL-8 könnte auch LTB₄ als potenter, früher Mediator und Amplifikator der durch PMN getragenen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle in diesem Szenario einnehmen. Demnach wäre die Modulation von LTB₄ in *A. phagocytophilum*-infizierten PMN als die initiale, die Modulation von IL-8 als die spätere Stellschraube der Wirtszell-Rekrutierung anzusehen. Die Mediatoren LTB₄ und IL-8 könnten dabei entweder selbst Faktoren wie die Populationsdichte als „gekaperte“ Autoinduktoren anzeigen oder Resultat einer Rückkopplung auf anderer Ebene sein. Als

exekutiver Arm eines *quorum sensing*-Mechanismus könnten LTB₄ und IL-8 also der Koordination der lokalen Population dienen. Dass sich *in vitro* gewonnene Daten bei Anaplasmen-Infektionen zumindest in Teilen auf die Situation *in vivo* übertragen lassen, zeigen die analog zu Zellkultur-Versuchen deutlich erhöhten IL-8-Spiegel im Serum infizierter Patienten [96].

Gedanken zu weiterführenden Experimenten finden sich im Kapitel „Schlussbetrachtung und Ausblick“.

4.1.3 *Chlamydia pneumoniae*:

Das Bakterium *Chlamydia pneumoniae* ist in der Lage, verschiedenste Wirtszell-Typen zu infizieren. Auch Phagozyten wie die neutrophilen Granulozyten (PMN) oder Makrophagen werden regelhaft infiziert [108], [115]. Dabei stellen die PMN die erste Immunezellpopulation dar, die zum Ort der *C. pneumoniae*-Infektion rekrutiert wird und Kontakt zum Erreger aufnimmt [117]. Durch Freisetzen der entzündungsregulierenden Lipidmediatoren LTB₄ und LXA₄ sind PMN maßgeblich an der Ausgestaltung der Entzündungsreaktion beteiligt [20], welche über Überleben oder Elimination des Erregers entscheidet. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss einer PMN-Infektion durch *C. pneumoniae* auf die Freisetzung dieser zwei Botenstoffe untersucht.

Die Infektion neutrophiler Granulozyten mit *C. pneumoniae* führte zu keiner messbaren LTB₄-Freisetzung. Allerdings zeigte sich sowohl nach Behandlung durch Ionomycin als auch durch den kombinierten Einsatz von LPS und fMLP eine erniedrigte LTB₄-Freisetzung *C. pneumoniae*-infizierter PMN im Vergleich zu der nicht-infizierten Referenzpopulation. Die Freisetzung des funktionellen LTB₄-Antagonisten Lipoxin A₄ (LXA₄) war während der ersten sechs Stunden nach Behandlung durch Ionomycin nicht in relevantem Maße beeinflusst.

4.1.3.1 Einordnung der erniedrigten LTB₄-Freisetzung durch *C. pneumoniae*-infizierte neutrophile Granulozyten und Vergleich mit der Mediatorenfreisetzung nach Infektionen durch *L. major* oder *A. phagocytophilum*

Nach inhalativer Aufnahme von *C. pneumoniae* in den Atemtrakt kommt es initial zur Infektion der Atemwegs-Epithelzellen, deren Aktivierung zur rapiden Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt [108], [115]. Obgleich neutrophile Granulozyten in begrenztem Maße auch zur Kontrolle von *C. pneumoniae*-Infektionen beitragen können

[126], [127], scheint ihnen in der Pathogenese *C. pneumoniae*-induzierter Erkrankungen eher eine begünstigende Rolle zuzukommen: Neutrophile Granulozyten nehmen die eingedrungenen Chlamydien auf, vermögen es aber nicht, diese komplett abzutöten [108]. So ist es *C. pneumoniae* möglich, sich in PMN zu replizieren und dafür deren Apoptose zu inhibieren [114], [118]. Dabei kommt es *in vitro* im weiteren Verlauf der *C. pneumoniae*-Infektion von PMN NF- κ B-vermittelt zur vermehrten Freisetzung von IL-8 [114], [118]. Dies dürfte über autokrine Mechanismen zur Inhibition der Apoptose beitragen. Weiterhin zeigte sich *in vivo*, dass die Präsenz von PMN während der ersten Tage der Infektion die Bakterienlast durch gesteigerte Replikation in epithelialen Zellen erhöht und eine Depletion von PMN die Bakterienlast reduziert [119]. Auch führte eine Mastzell-Depletion zu niedrigerer Bakterienlast und gesteigertem Überleben, was maßgeblich einer verringerten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zugeschrieben wurde [120]. Schließlich konnte analog zur Hypothese des Trojanischen Pferds bei *L. major* [73] auch für *C. pneumoniae* ein immunologisch stiller Aufnahmemechanismus in Makrophagen über infizierte, apoptotische PMN gezeigt werden [122]. Anstelle von Makrophagen-Aktivierung und Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren (TNF- α) bei direkter Aufnahme wurden nach stiller Erreger-Aufnahme vermehrt anti-inflammatorische Botenstoffe (TGF- β) freigesetzt, was das Überleben des Erregers steigerte und die Dissemination begünstigen dürfte [122].

Gemäß dieser Erkenntnisse begünstigen PMN also das Etablieren einer *C. pneumoniae*-Infektion. Entsprechend liegt der Schluss nahe, in Analogie zu den PMN-Infektionen durch *A. phagocytophilum* oder *L. major* von einer erhöhten LTB₄-Freisetzung durch *C. pneumoniae*-infizierte PMN auszugehen. Die erhöhten LTB₄-Spiegel könnten wiederum einer gesteigerten Rekrutierung von Wirtszellen dienen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestärkt, dass allen drei Erregern eine vermehrte IL-8-Sekretion [114], [118] sowie eine Inhibition der Apoptose [114], [118] gemein ist. Tatsächlich zeigten sich die LTB₄-Spiegel im Überstand *C. pneumoniae*-infizierter PMN jedoch verringert. Dieser Beobachtung können mehrere Überlegungen zur Rekrutierung und Aktivierung von PMN als potentiellen Wirtszellen zu Grunde gelegt werden:

Zunächst ist bei *C. pneumoniae*-Infektionen bedeutsam, dass vor Infektion der PMN bereits Epithelzellen infiziert und aktiviert wurden [115], [117]. Dabei kommt es auch in den infizierten Epithelzellen zur Inhibition der Apoptose sowie zur vorwiegend apikalen Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine [173]–[175]. Entsprechend liegt bereits ein

fortgeschrittenes inflammatorisches Umfeld mit rekrutierender und aktivierender Wirkung auf Phagozyten vor. Hierin liegt ein großer Unterschied zur Infektion durch *L. major* und *A. phagocytophilum*, welche beide in erster Instanz neutrophile Granulozyten infizieren. Somit ist zum einen denkbar, dass durch die Aktivierung von Epithelzellen bereits ausreichend Phagozyten, also sowohl PMN als auch Makrophagen, rekrutiert werden. In diesem Falle erübrigt sich die zusätzliche Induktion rekrutierender Faktoren wie LTB₄ aus Sicht des Erregers, da diese neben chemotaktischer auch aktivierende Wirkung auf die Phagozyten entfalten. Entsprechend könnte durch verringerte LTB₄-Freisetzung infizierter PMN ein niedrigerer Aktivierungsgrad der bereits rekrutierten Phagozyten erreicht und somit das Überleben des Parasiten gesteigert werden. Zum anderen ist aufgrund der Vielseitigkeit des Erregers hinsichtlich des Wirtszell-Typus von keiner absoluten Notwendigkeit für PMN im Rahmen der Überlebensstrategie auszugehen. Tatsächlich gibt es sogar Hinweise, dass PMN – insbesondere bei noch reifendem Immunsystem während der Neonatalperiode - aktiv an der Elimination von *C. pneumoniae* beteiligt sein können: So kam es in Folge eines Knockouts von TLR2 bei neonatalen *C. muridarum*-infizierten Mäusen zwar zu verstärktem PMN-Influx, jedoch zu insuffizienter Phagozytose, was die Infektion stark begünstigte und auf eine wichtige Rolle der PMN in der Kontrolle des Erregers rückschließen ließ [126]. Weiterhin sind PMN durch Bildung des Neutrophilengelatine-assozierten Lipocalins (NGAL; Lipocalin-2), welches die Verfügbarkeit von Eisen limitiert und somit *in vivo* bakteriostatisch auf das intrazelluläre Chlamydienwachstum wirkt, zur Begrenzung der Infektion in der Lage [127]. Folglich ist es logisch, das Ausmaß der PMN-Rekrutierung und –Aktivierung zu reduzieren. *C. pneumoniae* kann auf direktem Wege Makrophagen und eine Vielzahl anderer Zelltypen befallen (s. Einleitung) und ist somit von neutrophilen Granulozyten unabhängig, obgleich deren Präsenz der Etablierung einer Infektion offenbar meist zuträglich ist (s. oben).

Auch hinsichtlich der LXA₄-Freisetzung nach Ionomycin-Behandlung ergaben sich bei der PMN-Infektion durch *C. pneumoniae* deutliche Unterschiede zu jener von *L. major*- oder *A. phagocytophilum*-infizierten PMN: Während nach PMN-Infektion durch *L. major*- oder *A. phagocytophilum* deutlich weniger LXA₄ freigesetzt wurde, kam es bei *C. pneumoniae*-infizierten PMN zu keiner signifikanten Änderung der LXA₄-Freisetzung im Vergleich zur nicht-infizierten Referenzpopulation. Fand sich bei Infektion durch *L. major* und *A. phagocytophilum* also eine komplementäre Verschiebung der zwei Antagonisten LTB₄ und LXA₄ (mehr LTB₄, weniger LXA₄), fand sich diese Beziehung bei *C. pneumoniae* nicht so stark ausgeprägt (weniger LTB₄, LXA₄ unverändert). Die Tatsache, dass lediglich die

Freisetzung eines Mediators nennenswert beeinflusst wurde, könnte Ausdruck einer weniger starken Spezialisierung von *C. pneumoniae* auf PMN als Wirtszellen sein. Andererseits vermögen es die Chlamydien, den Mediator LTB₄ entgegen seiner physiologischen Reaktion bei Pathogen-Kontakt „umzupolen“, sodass dieser nach Stimulation vermindert freigesetzt wurde. Da die Außenmembran von *C. pneumoniae* unter anderem LPS enthält [176], wäre grundsätzlich eher eine gesteigerte LTB₄-Freisetzung zu erwarten. Es ist daher anzunehmen, dass eine solch starke Einflussnahme auf die Wirtszelle ein hohes Maß an Spezialisierung und mehr Wirtszell-modulierende Aktivität des Erregers erfordert, als eine durch Pathogen-Kontakt bereits induzierte LTB₄-Freisetzung zu fördern, wie es bei *A. phagocytophilum* und *L. major* der Fall ist.

Darüber hinaus könnte LXA₄ als anti-inflammatorischer, jedoch Phagozytose-fördernder Mediator eine Infektion durch *C. pneumoniae* durchaus begünstigen. Entsprechend ist es möglich, dass der Spiegel dieses Mediators gemäß *class switch* im weiteren Verlauf der Infektion steigt. Zusammengefasst könnte die reduzierte frühe LTB₄-Freisetzung durch *C. pneumoniae*-infizierte PMN also einer verminderten Aktivierung von Phagozyten und damit dem Überleben von *C. pneumoniae* dienen.

Gedanken zu weiterführenden Experimenten finden sich im Kapitel „Schlussbetrachtung und Ausblick“.

4.2 Teil 2: Beeinflussung der lokalen Lipidmediatoren-Balance durch apoptotische neutrophile Granulozyten

Die Apoptose neutrophiler Granulozyten ist ein häufiges Ereignis am Ort einer Entzündung. Da apoptotische Zellen die Entzündungsreaktion maßgeblich mitgestalten, sollte das Lipidmediator-Profil apoptotischer PMN anhand von LTB₄ und LXA₄ als Prototypen pro-respektive anti-inflammatorischer Mediatoren ermittelt werden. Weil zu Beginn dieser Arbeit eine umfangreiche Studie zum Lipidmediator-Profil apoptotischer PMN erschienen war, welches sich durch Freisetzung vorwiegend anti-inflammatorischer Mediatoren auszeichnet [132], wurde hier auf die Bestimmung des LXA₄ verzichtet. In der genannten Studie wurde für apoptotische PMN eine Freisetzung von Lipoxinen und Resolvinen, welche zur Klasse der *specialized pro-resolving mediators* (SPMs) zählen, gezeigt. Zudem wurden die SPMs von erhöhten PGE₂- und PGD₂-Spiegeln begleitet. Diese Prostaglandine steigern zunächst Leukozyten-Rekrutierung und vaskuläre Permeabilität, tragen im Verlauf jedoch maßgeblich zum *class switch* von pro- zu anti-inflammatorischen Lipidmediatoren bei [37], [132]. Da in jener Studie ausschließlich die spontane Freisetzung von Lipidmediatoren durch apoptotische PMN untersucht wurde, habe ich die LTB₄-Freisetzung apoptotischer PMN nach Behandlung durch LPS + fMLP oder Ionomycin sowie der Einfluss apoptotischer PMN auf die LTB₄-Freisetzung vitaler PMN untersucht.

Für den Vergleich vitaler und apoptotischer neutrophiler Granulozyten stammen diese idealerweise vom gleichen Spender und wurden identisch behandelt. Durch rasches Isolieren ist es möglich, einen Großteil der PMN vital zu erhalten. Da die Spontanapoptose von PMN natürlicherweise jedoch erst nach etwa acht Stunden in größerem Maße einsetzt und eine zweite Blutentnahme mit PMN-Isolation die Vergleichbarkeit einschränken würde, war eine Induktion der Apoptose zum Vergleich vitaler und apoptotischer neutrophiler Granulozyten vonnöten. Mit Hilfe einer UV-Bestrahlung konnte dieses Ziel erreicht werden. Ein erster Teil der isolierten Zellen konnte somit in kurzer Zeit in Apoptose versetzt werden, während ein zweiter Teil als vitale Vergleichsgruppe zur Verfügung stand. Beiden Gruppen lag somit die gleiche Zellpopulation zu Grunde.

Es zeigte sich, dass apoptotische PMN auf Behandlung durch potente exogene Stimuli wie LPS + fMLP oder Ionomycin nicht mehr mit vermehrter Freisetzung von LTB₄ reagierten, gewissermaßen also refraktär waren. Im Gegensatz zu vitalen PMN fand sich jedoch eine basale Freisetzung geringer, jedoch physiologisch relevanter LTB₄-Konzentrationen (etwa 10 - 20 pg/ml). Zum Vergleich liegen gemäß des Herstellers des LTB₄-ELISA die LTB₄-

Spiegel im EDTA-Plasma gesunder Probanden im Mittel bei 38,2 pg/ml (n = 35, [177]). Da die Umgebung der apoptotischen PMN *in vitro* verglichen mit der Situation *in vivo* deutlich reizfreier und substratärmer ist, dürfte die LTB₄-Freisetzung *in vivo* mindestens den hier gemessenen Konzentrationen entsprechen. Die LTB₄-Freisetzung durch apoptotische PMN konnte durch positive Selektion apoptotischer (und sekundär nekrotischer) PMN mittels Annexin V-MACS bestätigt werden. Auch in der Literatur gibt es konkrete Hinweise auf das Freisetzen niedriger LTB₄-Konzentrationen durch apoptotische PMN [132]. Persistierende, niedrige LTB₄-Konzentrationen könnten die Efferozytose durch Rekrutierung, Leitung und Aktivierung von Makrophagen unterstützen und somit das Abräumen apoptotischer PMN fördern.

Grundsätzlich ist bekannt, dass es in Folge der Efferozytose apoptotischer PMN zu vermehrter Bildung von SPMs durch Makrophagen kommt [132]. Bemerkenswerterweise sind sowohl die Efferozytose als auch die Freisetzung von SPMs in Gegenwart PMN-entstammender Mikropartikel deutlich gesteigert [133]. Diese werden während der akuten Entzündungsreaktion durch neutrophile Granulozyten freigesetzt und sind charakteristischerweise Annexin A5- und CD66b-positiv [133], [178]. Unter anderem enthalten sie in großem Maße SPM-Vorstufen und induzieren einen anti-inflammatorischen Makrophagen-Phänotyp [133]. Neben Mechanismen wie dem *class switch*, also dem maßgeblich PGE₂-vermittelten Wechsel von pro- zu anti-inflammatorischen Lipidmediatoren, wird also auch durch Mikropartikel bereits während der Initiation der Entzündungsreaktion deren Auflösung vorbereitet.

In dieser Arbeit konnte ich eine weitere Funktion apoptotischer PMN in der Regulation des Entzündungsgeschehens offenlegen: So konnte ein inhibitorischer Effekt apoptotischer PMN auf die LTB₄-Freisetzung vitaler PMN nachgewiesen werden. Dieser Effekt wird möglicherweise durch SPMs, die von den apoptotischen PMN freigesetzt werden, vermittelt [21], [132]. Durch Unterbinden der LTB₄-Freisetzung vitaler PMN in Gegenwart apoptotischer PMN kann der LTB₄-vermittelte *feed-forward*-Mechanismus der Immunzell-Rekrutierung durchbrochen, die Entzündungsreaktion somit gedrosselt und der Übergang in die Auflösungsphase der Entzündung initiiert werden. Neben verminderter Rekrutierung kommt es auch zu reduzierter Aktivierung von Phagozyten – insbesondere neutrophiler Granulozyten –, was ebenfalls deeskalierende immunmodulatorische Effekte nach sich zieht [20]. Gemäß der Hypothese des Trojanischen Pferdes [73] ergeben sich durch diese anti-

inflammatorischen Eigenschaften apoptotischer PMN jedoch auch für diverse Erreger Möglichkeiten der Ausnutzung.

Interessanterweise zeigte sich nach Behandlung einer sehr hohen PMN-Konzentration von 15×10^6 PMN/ml durch Ionomycin eine drastische Reduktion der LTB₄-Freisetzung im Vergleich zur PMN-Standardkonzentration von 5×10^6 PMN/ml. Möglicherweise besitzen neutrophile Granulozyten einen Mechanismus zur Detektion der lokalen PMN-Dichte. So könnte es, beispielsweise bei Überschreiten eines kritischen Maßes an Zell-Zell-Kontakt und entsprechender Rezeptoren-Aktivierung (z.B. im putriden Exsudat), zu verminderter Freisetzung rekrutierender und aktivierender Faktoren wie LTB₄ kommen. Da es sich um die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten handelt, sind ursächliche Fehler in der Durchführung unwahrscheinlich, systematische Fehler jedoch möglich. Diese Beobachtung sollte experimentell weiter adressiert werden.

4.3 Kritische Betrachtung der Arbeit:

Grundsätzlich stellt die überschaubare Anzahl an experimentellen Reproduktionen der gewonnenen Ergebnisse ein statistisches Problem dar. So unterliegt die Freisetzung der Lipidmediatoren interindividuellen, spenderbezogenen Schwankungen (zum Beispiel zu sehen in Abbildung 15C), die unter anderem mit dem Aktivierungsgrad der neutrophilen Granulozyten zusammenhängen dürften. Insbesondere im Fall von Leishmanien ist die große Rolle von Wirts-Faktoren gut belegt: So zeigten sich enorme Unterschiede zwischen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen in der Empfänglichkeit für *L. major*-Infektionen und der damit verbundenen Immunreaktion [69], [78]. Entsprechend stark könnten auch beim Menschen Faktoren wie genetischer Hintergrund, Geschlecht, Alter und Komorbiditäten Einfluss auf den Werdegang verschiedenster Infektionen nehmen. Größere Vergleichsgruppen wären folglich sehr wünschenswert, um zufallsbedingte Missinterpretationen sicherer zu vermeiden. In Bezug auf die LXA₄-Synthese sind grundsätzlich primäre Zellen anstelle der genutzten Zelllinie als Partner der PMN zur transzellulären Synthese zu favorisieren, um den physiologischen Bedingungen *in situ* näher zu kommen. Andererseits stellt die HT-29-Zelllinie eine konstante im Lipoxin-Assay dar und unterliegt im Gegensatz zu primären Zellen weniger Schwankungen. Die Gewinnung primärer epithelialer Zellen des PMN-Spenders ist zudem aufwendig und erhöhte das Ausmaß interindividueller Schwankungen. Zudem reduzierte der Einsatz primärer Epithelzellen die Möglichkeit, etwaige Effekte einer Intervention eindeutig den PMN zuzuschreiben. Grundsätzlich ist der Ansatz, *in vitro* Erkenntnisse zu den komplexen Systemen der transzellulären Synthesewege *in vivo* zu gewinnen, problematisch. Gerade auf dieser Ebene ist in Anbetracht vielfältigster interzellulärer Interaktion von zahlreichen Faktoren auszugehen, die *in vitro* nicht berücksichtigt werden können. Da PMN aus dem peripheren Blut zudem nicht in allen Merkmalen mit gewebständigen PMN übereinstimmen (z.B. aufgrund von *Priming* durch Rekrutierungsprozess) [179], sollten die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* bestätigt werden.

5 Schlussbetrachtung und klinischer Ausblick zu Lipidmediatoren

Als zentrale Regulatoren der Entzündungsreaktion erfahren Lipidmediatoren sowohl in experimentellen Modellen der Entzündung als auch im klinischen Kontext zunehmende Beachtung und Bedeutung [20], [135], [180]. Neutrophile Granulozyten (PMN) sind eine wesentliche Quelle von Lipidmediatoren und stellen die zumeist erste und größte Fraktion rekrutierter Immunzellen am Ort einer akuten Inflammation dar [20]. Durch die Freisetzung von Leukotrien B₄ (LTB₄) rekrutieren und aktivieren PMN weitere Phagozyten und werden somit zur treibenden Kraft in der Initiation der Entzündungsreaktion [47], [38], während sie im weiteren Verlauf wichtige Partner der transzellulären Synthese von *specialized pro-resolving mediators* (SPMs) werden [132], [181]. Lipoxin A₄ (LXA₄) ist ein klassischer Vertreter jener SPMs, welcher den PMN-Influx inhibiert und über Monozyten-Rekrutierung und gesteigerte Efferozytose die Auflösung der Entzündungsreaktion induziert [20], [135].

Im **ersten Teil** meiner Studie wurde der Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die Freisetzung von Lipidmediatoren durch neutrophile Granulozyten *in vitro* untersucht. Zusammenfassend konnte ich für PMN-Infektionen durch *Anaplasma phagocytophilum*, *Chlamydia pneumoniae* und *Leishmania major* eine jeweils modulierte Freisetzung der pro- bzw. anti-inflammatorischen Lipidmediator-Prototypen LTB₄ bzw. LXA₄ nachweisen (Abbildung 26). So setzten *A. phagocytophilum*-infizierte PMN in Abhängigkeit des Stimulus mehr (Ionomycin) oder weniger (LPS + fMLP) LTB₄ frei, als die nicht-infizierte Referenz. Weiterhin konnte eine verminderte LXA₄-Freisetzung durch *A. phagocytophilum*-infizierte PMN nach Ionomycin-Behandlung festgestellt werden. PMN-Infektionen durch *L. major* führten zu vermehrter Freisetzung von LTB₄ und verringerten LXA₄-Spiegeln. Infolge von PMN-Infektionen durch *Chlamydia pneumoniae* wurde weniger LTB₄ freigesetzt, während die LXA₄-Spiegel unverändert waren.

Intrazellulärer Erreger	LTB ₄		LXA ₄
	nach LPS+fMLP	nach Ionomycin	nach Ionomycin
<i>A. phagocytophilum</i>	↓	↑	↓
<i>C. pneumoniae</i>	↓	↓	→
<i>L. major</i>	↑	↑	↓

Abbildung 26) Ergebniszusammenstellung zur Fragestellung 1: Einfluss intrazellulärer Infektionen auf die LTB₄- und LXA₄-Freisetzung durch PMN Dargestellt sind die Veränderungen der Lipidmediatorkonzentrationen in den Überständen infizierter PMN in Relation zu den dazugehörigen, nicht-infizierten PMN-Populationen.

Ungeachtet der möglichen Interpretationen dieser Ergebnisse, kann die Beeinflussung der durch neutrophile Granulozyten freigesetzten Lipidmediatoren also als eine gängige Überlebensstrategie PMN-infizierender Pathogene betrachtet werden. Über diesen frühen

Eingriff in die lokale Lipidmediatoren-Balance üben diese Erreger starken Einfluss auf die Rekrutierung und Aktivierung lokaler Immunzellen und somit auf den Werdegang der Entzündungsreaktion aus.

In den hier untersuchten Modellen intrazellulärer Infektionen blieben die kausalen Zusammenhänge der veränderten Lipidmediatorspiegel ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchung, um die Pathophysiologie dieser Infektionen besser zu verstehen und potentielle therapeutische Ziele identifizieren zu können. Dabei könnten weiterführende Experimente die Inhibition einzelner Komponenten der jeweiligen Signalachsen in Kombination mit limitierenden Verdünnungsassays (engl. *limiting dilution assay*) umfassen. So könnten PMN vor Infektion beispielsweise mit Zileuton, einem reversiblen Inhibitor der 5-LOX behandelt werden, was u.a. zu einer drastischen Reduktion der LTB₄-Freisetzung führen dürfte.

Der in dieser Arbeit postulierte Überlebensvorteil einer gesteigerten Wirtszell-Rekrutierung für *A. phagocytophilum* und *L. major*, der aus einer gesteigerter LTB₄-Freisetzung resultiert, könnte *in vitro* durch einen PMN-Migrationsassay untersucht werden. Dieser bietet die Möglichkeit, durch Inhibition einzelner Moleküle oder Signalwege deren Einfluss auf das Migrationsverhalten von PMN zu untersuchen. Somit sind in eingeschränktem Rahmen auch Rückschlüsse auf die Rekrutierung der PMN *in vivo* möglich. Durch Addition einer definierten Menge extrazellulärer Erreger könnte zudem die Rolle von LTB₄ in der Infektion neu rekrutierter PMN untersucht werden. Dabei wäre grundsätzlich statt der Behandlung der infizierten PMN-Population durch LTB₄-Synthese-Inhibitoren auch eine Behandlung der migrierenden PMN-Population mit einem BLT1-Rezeptor-Antagonisten möglich. Auch wäre der Effekt von Behandlungen durch diverse andere pro- oder anti-inflammatorische Lipidmediatoren auf das Überleben von intrazellulären Erregern charakterisierbar.

Ein komplexeres Modell wäre die Untersuchung des LTB₄-Einflusses auf das Gesamtüberleben der Erreger im murinen Air-Pouch-Modell: Nach Erstellen der Pouch könnten durch Induktion einer sterilen Entzündung PMN gewonnen werden. Diese könnten mit Inhibitoren der LTB₄-/BLT1-Signalachse behandelt und anschließend durch intrazelluläre Erreger infiziert werden. Die Re-Injektion dieser Zellen könnte Aufschluss über die Bedeutung dieses Signalweges für den Verlauf Entzündungsreaktion und das Überleben der Erreger geben. Letztlich käme beispielsweise auch ein Knockout des LTB₄-Rezeptors BLT1 oder der 5-LOX in PMN sowie Technologien wie das *in-vivo imaging* [71] im Mausmodell in Betracht, um die Rolle der Lipidmediatoren bei Infektionen durch intrazelluläre Erreger weiter zu untersuchen.

Im **zweiten Teil** dieser Arbeit sollte der Einfluss apoptotischer PMN auf die lokale Lipidmediator-Balance untersucht werden. Hier konnte ich zeigen, dass apoptotische PMN neben der Freisetzung verschiedener SPMs [132] auch niedrige, jedoch physiologisch relevante Konzentrationen von LTB₄ freisetzen (Abbildung 27). Diese LTB₄-Spiegel könnten der Rekrutierung von Makrophagen sowie einer gesteigerten Efferozytose dienen. Währenddessen zeigten die apoptotischen PMN keine vermehrte LTB₄-Freisetzung nach Behandlung durch Ionomycin oder LPS + fMLP. Mit Eintritt der Apoptose werden PMN also refraktär und können nicht mehr zur Amplifikation der Entzündungsreaktion beitragen.

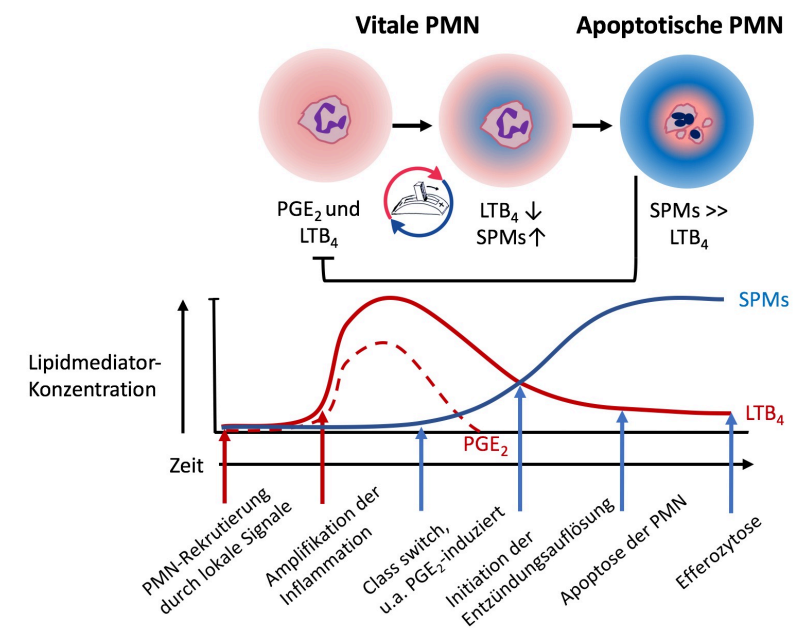


Abbildung 27) Ergebniszusammenstellung zur Fragestellung 2: Einfluss apoptotischer PMN auf die lokale Lipidmediatoren-Balance Dargestellt ist die Lipidmediatorenfreisetzung vitaler und schließlich apoptotischer PMN über die Zeit. Zunächst kommt es durch LTB₄ zur Amplifikation der Entzündungsreaktion und PMN-*swarming*. Freigesetztes PGE₂ induziert die Translation von mRNA, welche für Enzyme der SPM-Synthese kodiert [37]. So kommt es zum *class switch* und der meist transzellulären Synthese von *specialized pro-resolving mediators* (SPMs), vornehmlich Lipoxinen. Die Apoptose der PMN reduziert deren LTB₄-Freisetzung auf ein weiterhin physiologisch relevantes Niveau (ca. 10-20 pg/ml), welches möglicherweise der Rekrutierung von Makrophagen und der Efferozytose, der Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen, dient. Apoptotische PMN sind nicht mehr zu vermehrter LTB₄-Freisetzung in der Lage und inhibieren die LTB₄-Freisetzung vitaler PMN. Diese negative Rückkopplung durch apoptotische PMN sowie deren SPM-Freisetzung stoppen die vorwärts gerichtete, LTB₄-bedingte Amplifikationsschleife der Entzündung. Die Efferozytose führt schließlich zu vermehrter SPM-Freisetzung durch anti-inflammatorische (M2-)Makrophagen.

Die wohl interessanteste Beobachtung war die Hemmung der LTB₄-Freisetzung vitaler PMN durch die Präsenz apoptotischer PMN. Indem die weitere LTB₄-Freisetzung durch vitale PMN unterbunden wird und simultan vermehrt SPMs durch apoptotische PMN freigesetzt werden, kann der LTB₄-vermittelte *feed-forward*-Mechanismus der Immunzell-Rekrutierung [38] durchbrochen werden. Dies drosselt die Entzündungsreaktion und ermöglicht den Übergang in die Auflösungsphase der Entzündung. Neben verminderter Rekrutierung kommt es durch niedrigere LTB₄-Spiegel auch zu reduzierter Aktivierung von Phagozyten, was ebenfalls deeskalierende immunmodulatorische Effekte nach sich zieht

[20]. Die Ergebnisse des zweiten Teils meiner Arbeit tragen dazu bei, den aktiven Prozess der Auflösung der Entzündung (engl. *resolution of inflammation*) weiter zu entschlüsseln. Aufgrund ihrer großen Zahl nehmen apoptotische PMN darin eine zentrale Stellung ein.

Das große therapeutische Potential auf der Ebene der Lipidmediatoren wird zunehmend erkannt. Beispielfhaft sei das Asthma bronchiale genannt, in dessen Therapie mit Montelukast (in Deutschland zugelassener Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptorantagonist) und Zileuton (nur in den USA zugelassener, reversibler 5-LOX-Inhibitor) bereits zwei Medikamente eingesetzt werden, welche auf Ebene der Lipidmediatoren wirken. Neben den klassischen Behandlungsansätzen, welche auf Erreger, Dämpfung der Entzündungsreaktion oder Symptome abzielen, rücken zusehends auch Wirtsfaktoren wie die aktive Entzündungsauflösung in den Fokus. So wurden mit der *resolution physiology* und *resolution pharmacology* zwei zukunftssträchtige Felder erschlossen, in denen Lipidmediatoren die zentrale Position einnehmen [182], [183]. Wesentliche Vorteile endogener SPMs im Vergleich zu vielen gängigen Therapeutika bestehen im Ausbleiben einer Immunsuppression und im Aktivieren angemessener, körpereigener Reperaturmechanismen [183]. So wird der potentielle Wert von SPMs in der Prävention von Krankheiten zunehmend erkannt. Gegenwärtig wird unter anderem die schwangerschaftsbegleitende Supplementation von Fischöl, welches reich an SPM-Substraten (Omega-3-Fettsäuren) ist, als Präventionsmaßnahme bei hohem Atopie-Risiko ungeborener Kinder abgewogen [184]. Dass eine Supplementation dieser Fettsäuren zu höheren SPM-Spiegeln im Plasma und verschiedenen Geweben führt, konnte erfolgreich demonstriert werden und ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen [183], [185]. Da SPMs rasch inaktiviert werden, wird zudem die Nutzung löslicher Epoxid-Hydrolase-Inhibitoren, welche den Abbau endogener SPMs reduzieren, sowie die Gabe stabiler SPM-Analoga diskutiert. Dies ist beispielsweise im Falle des schweren Asthmas der Fall [186]. Für die Parodontitis, das Syndrom des trockenen Auges sowie infantile Ekzeme konnte ein Nutzen des Einsatzes stabiler SPM-Analoga beim Menschen bereits gezeigt werden (reviewed in [183]). Weiterhin bestehen Bemühungen, SPMs in humanisierten Nanopartikeln auf Basis von PMN-Mikropartikeln (siehe Einleitung: Apoptose) zu verpacken, um die Vorteile dieser biomimetische Konstruktion nutzen zu können [133], [187].

SPMs reduzierten in Tiermodellen die Schwere und Dauer verschiedener Infektionen, reduzierten Kollateralschäden und beschleunigten die Geweberegeneration (reviewed in [183], [188]). Durch die supportive Gabe von SPMs konnte in verschiedenen Tiermodellen

zudem der Bedarf an Antibiotika gesenkt und das Outcome verbessert werden, was langfristig einen Beitrag zum langsameren Fortschreiten von Erreger-Resistenzen liefern könnte [189]. Ein interessantes Beispiel zu innovativen Therapieansätzen auf Basis von SPMs ist auch das folgende: In einem Pneumonie-Modell mit *Streptococcus pneumoniae*-Infektion bei Pavianen konnten deutlich reduzierte SPM-Serumkonzentrationen bei infizierten Individuen gezeigt werden. Vermittelt über das Oxygenase-1 System, stieg die Konzentration der SPMs nach *low-dose* Inhalation mit Kohlenmonoxid (CO, wird auch endogen gebildet) jedoch wieder, sodass die Dauer der Pneumonie verkürzt werden konnte [190]. Auch die Steigerung der endogenen *Clearance* von Tumorzell-Trümmern durch SPMs nach Radio- oder Chemotherapie stellt einen vielversprechenden Therapieansatz dar [191]. Da SPMs auch die adaptive Immunantwort steigern, könnte ihr Einsatz als Adjuvans schließlich auch die Effektivität von Impfungen steigern [192].

Viele seit Jahrzehnten genutzte Medikamente entfalten ihre Wirkung zumindest partiell auf Ebene der Lipidmediatoren. Dazu zählen neben nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) wie Acetylsalicylsäure (ASS), Diclofenac und Ibuprofen auch Statine und Kortikosteroide [183], [193], [194]. Interessanterweise führt die Gabe von ASS oder Statinen zur Bildung biologisch aktiver Epimere von klassischen SPMs. Durch ihren Einsatz können anstelle von pro-inflammatorischen Mediatoren weitere, potente SPMs wie die *Aspirin-triggered Lipoxins* (ATLs) gebildet werden [183]. Der Einsatz dieser Medikamente im Sinne einer *Host-directed therapy* (HDT) wird zurzeit beispielsweise bei der Tuberkulose erprobt (Dr. Joan-Pere Cardona, Universität Autonoma de Barcelona, Spanien). Auch der Einsatz des reversiblen 5-LOX-Inhibitors Zileuton wird bei der Tuberkulose gegenwärtig evaluiert (Prof. Robert J. Wilkinson, Imperial College London, UK). Für die hier untersuchten Erreger *A. phagocytophilum*, *C. pneumoniae* und *L. major* wäre eine therapeutische Antagonisierung der Lipidmediator-Dysregulation ebenfalls denkbar. Da viele der genannten Medikamente seit langem in Deutschland zugelassen sind und als vergleichsweise sicher gelten, sollte ihr supportiver Einsatz in großem Maßstab für chronische und akute Infektionen geprüft werden.

Auch für einen beachtlichen Anteil der entzündlichen Erkrankungen des Menschen wurde experimentell oder *in vivo* eine Assoziation zu dysregulierten Lipidmediatoren hergestellt (*reviewed in* [135], [180]). Dazu zählen unter anderem die Alzheimer Erkrankung, Arthritis, Atherosklerose sowie Apoplexie (Schlaganfall) und Myokardinfarkt, chronisch-

entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes mellitus, chronische Pankreatitis, Glomerulonephritis und Retinopathie. Auch auf genetischer Ebene besteht ein Zusammenhang zwischen einzelnen Komponenten der Lipidmediator-Synthese und der Pathogenese bedeutender Erkrankungen. So konnte in isländischen und britischen Studienpopulationen bei Vorliegen bestimmter Polymorphismen im *ALOX5AP*-Gen, das für das 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein (FLAP, siehe Abbildung 1) codiert, ein nahezu doppeltes Risiko für Myokardinfarkt oder Apoplexie nachgewiesen werden [50]. Neutrophile Granulozyten von Trägern jener *ALOX5AP*-Polymorphismen setzten *in vitro* signifikant mehr LTB₄ frei, dem somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Myokardinfarkt und Apoplexie zukommen könnte [50]. Derartige Gene könnten zukünftig als Marker-Gene zur individuellen oder familiären Risikokalkulation in den klinischen Alltag Eingang finden. Für eine enorme Bandbreite infektiöser und entzündlicher Erkrankungen konnte mittlerweile meist auch *in vivo* ein enormer Nutzen einer Lipidmediator-gerichteten Therapie gezeigt werden (*reviewed* in [135]). Entsprechend der rasanten Entwicklung der letzten Jahre ist auf dem Feld der Lipidmediatoren mit zahlreichen diagnostischen und therapeutischen Innovationen zu rechnen.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Neutrophile Granulozyten (PMN) etablieren als Bestandteil der angeborenen Immunantwort eine erste Linie der Verteidigung gegen eindringende Pathogene. Durch vielfältige Effektorfunktionen sind sie zur Elimination körperfremder Stoffe fähig. Die Rekrutierung und Aktivierung dieser Immunzellen unterliegt einer engmaschigen Kontrolle. Lipidmediatoren nehmen hierin eine zentrale Rolle ein. PMN stellen selbst eine wichtige Quelle dieser Mediatoren dar. Pro-inflammatorische Vertreter wie Leukotrien B₄ (LTB₄) amplifizieren lokale Entzündungssignale, rekrutieren und aktivieren Phagozyten und initiieren die akute Entzündungsreaktion. Im weiteren Verlauf freigesetzte anti-inflammatorische Vertreter wie Lipoxin A₄ (LXA₄) inhibieren Phagozyten-Influx und –Aktivierung und tragen aktiv zur Auflösung der Entzündung bei. Schließlich treten die PMN massenhaft in die Apoptose über. Intrazelluläre Pathogene wie *Anaplasma phagocytophilum*, *Chlamydia pneumoniae* oder *Leishmania major* haben wirkungsvolle Strategien der Evasion entwickelt, um in den neutrophilen Granulozyten zu überleben und den Effektormechanismen zu widerstehen. Der Modulation ihrer Wirtszellen kommt dabei eine wesentliche Bedeutung zu.

Fragestellungen: Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss intrazellulärer Infektionen von neutrophilen Granulozyten auf deren Freisetzung von LTB₄ und LXA₄ *in vitro*. Darüber hinaus wurde die Lipidmediatoren-Freisetzung apoptotischer PMN sowie der Einfluss apoptotischer PMN auf die LTB₄-Freisetzung vitaler PMN untersucht.

Methodik: PMN wurden aus humanem Vollblut isoliert und im Verhältnis 1:1 mit *A. phagocytophilum*, im Verhältnis 1:5 mit *C. pneumoniae* oder *L. major* infiziert. Die Lipidmediator-Freisetzung wurde durch Ionomycin oder die Kombination aus LPS und fMLP induziert. Dabei wurde zur transzellulären Synthese von LXA₄ eine Vorbehandlung durch GM-CSF und eine Co-Kultur mit der epithelartigen HT-29-Zelllinie genutzt. Die Quantifizierung der Mediatoren LTB₄ und LXA₄ in den Überständen erfolgte mittels ELISA. Die PMN-Apoptose wurde durch UV-Bestrahlung induziert. Vitalitätskontrollen erfolgen mikroskopisch sowie durchflusszytometrisch (Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung). Annexin V-positive, vorwiegend apoptotische PMN wurden durch *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) von verbliebenen vitalen PMN getrennt. Die LTB₄-Freisetzung nicht-bestrahlter, bestrahlter oder MACSed PMN wurde durch Ionomycin und LPS + fMLP induziert und mittels ELISA quantifiziert.

Ergebnisse: In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Infektionen neutrophiler Granulozyten durch *A. phagocytophilum*, *C. pneumoniae* oder *L. major* zu

veränderten Freisetzungen von LTB₄ und LXA₄ führen. Bei Infektionen durch *A. phagocytophilum* war nach Ionomycin-Behandlung mehr LTB₄ und weniger LXA₄, nach LPS und fMLP-Behandlung weniger LTB₄ messbar. Infektionen durch *C. pneumoniae* führten zu niedrigeren LTB₄- und unveränderten LXA₄-Spiegeln. Bei *L. major*-Infektionen war mehr LTB₄ und weniger LXA₄ nachzuweisen.

Für apoptotische PMN konnte eine basale LTB₄-Freisetzung von etwa 10-20 pg/ml festgestellt werden, die nicht durch Behandlung mit Ionomycin oder LPS + fMLP gesteigert werden konnte. Weiterhin wurde eine niedrigere LTB₄-Freisetzung vitaler PMN in Gegenwart apoptotischer PMN gezeigt.

Diskussion: Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lipidmediatoren der PMN ein gängiges Ziel der Überlebensstrategien intrazellulärer Erreger darstellen. Durch Beeinflussung der Lipidmediatoren ihrer Wirtszellen können die Pathogene die Rekrutierung und Aktivierung von Wirtszellen sowie den Werdegang der Inflammation maßgeblich mitgestalten. Möglicherweise dienen Lipidmediatoren auch der Koordination der intrazellulären Erreger. Zudem konnte die Rolle apoptotischer PMN in der Entzündungsauflösung (engl. *resolution*) weiter charakterisiert werden: Apoptotische PMN setzen neben Mediatoren der Entzündungsauflösung (SPMs) physiologisch relevante Mengen von LTB₄ frei und steigern damit mutmaßlich Makrophagen-Rekrutierung und Efferozytose. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus inhibieren apoptotische PMN zudem die vorwärts gerichtete, LTB₄-bedingte Schleife der Entzündungsamplifikation. Für eine rapide steigende Zahl infektiöser und nicht-infektiöser Erkrankungen wurde bereits eine Lipidmediatoren-Dysbalance nachgewiesen. Auf den neuen Feldern der *resolution physiology* und *resolution pharmacology*, in deren Zentrum die Lipidmediatoren stehen, sind daher viele diagnostische und therapeutische Innovationen zu erwarten.

6.1 Summary

Recruitment of neutrophil granulocytes to sites of infectious tissue damage is an early event in innate immune responses. Following chemotactic signals neutrophils establish a first line of defense in a swarm-like manner. For this purpose, neutrophils possess numerous effector mechanisms to kill invading pathogens. To prevent ongoing tissue-damage caused by activated neutrophils, their swarming and activation is strictly controlled. In this concern, the group of lipid mediators with its pro- and anti-inflammatory representatives is of utmost importance. During acute inflammation, neutrophil granulocytes are a major source of lipid mediators. By releasing the pro-inflammatory leukotriene B₄ (LTB₄), neutrophils can amplify their own recruitment in a feed-forward manner and hereby promote acute inflammation. However, PMN also restrict ongoing inflammation and set the course for the transition to resolution phase by switching from LTB₄ to the anti-inflammatory, pro-resolving lipoxin A₄ (LXA₄).

Intracellular pathogens such as *Leishmania major*, *Anaplasma phagocytophilum* or *Chlamydia pneumoniae* can evade neutrophil-mediated killing and survive inside neutrophils. To achieve this, the parasites evolved potent evasion mechanisms and modulate host cell functions. Therefore, the major aim of this study was the investigation of potential influences on neutrophil-derived lipid mediators caused by intracellular infection. By modulating these mediators, the pathogens could actively shape their inflammatory environment and hereby facilitate their survival. The lipid mediators LTB₄ and LXA₄ were chosen as prototypes for pro- and anti-inflammatory mediators, respectively, and their concentration was measured in the supernatants of infected and subsequently stimulated neutrophils by ELISA. In this study it was demonstrated *in vitro*, that infections with each of the three tested intracellular pathogens induced a shift in neutrophil-derived lipid mediators. Infection with *L. major* increased the amount of LTB₄ in the supernatants, while the release of LXA₄ was decreased. Neutrophils infected with *A. phagocytophilum* showed an enhanced release of LTB₄ and decreased LXA₄ after treatment with ionomycin, while LTB₄ was decreased after treatment with LPS + fMLP. *C. pneumoniae*-infected neutrophils released a lower amount of LTB₄ after treatment with each ionomycin or LPS + fMLP. The release of LXA₄ was not significantly affected by *C. pneumoniae*-infection. This suggests, that the modulation of neutrophil-derived lipid mediators is a common survival strategy of intracellular pathogens in acute inflammation. Therefore, therapeutical counteractions for pathogen-induced changes in the early inflammatory environment could help preventing the establishment of intracellular infections in neutrophils.

Due to their limited life span, large amounts of apoptotic and necrotic neutrophils occur at the site of inflammation. Hence, another aim of this study was the investigation of the apoptotic neutrophils potential to release LTB₄ after induction. As it was previously shown, that apoptotic neutrophils possess an anti-inflammatory lipid mediator profile and, amongst other, release great amounts of Lipoxins, we were interested in their responsiveness to external stimuli with regard to the release of LTB₄. Here, UV-induced apoptotic neutrophils showed a basal release of small amounts of LTB₄ but were no longer capable to respond to stimuli by liberation of larger amounts of LTB₄. This implies, that once neutrophils undergo apoptosis, they can no longer return to a pro-inflammatory response. The basal release of LTB₄ could support recruitment and activation of macrophages and local PMN and hereby promote the resolution of inflammation. Furthermore, vital PMN showed a significantly decreased liberation of LTB₄ in the presence of apoptotic PMN. This negative feedback mechanism could contribute to the termination and resolution of inflammation.

8 Literaturverzeichnis

- [1] N. Borregaard, "Neutrophils, from marrow to microbes.," *Immunity*, vol. 33, no. 5, pp. 657–670, Nov. 2010.
- [2] J. W. Athens, O. P. Haab, S. O. Raab, A. M. Mauer, H. Ashenbrucker, G. E. Cartwright, and M. M. Wintrobe, "Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects.," *J Clin Invest*, vol. 40, no. 2, pp. 989–995, 1961.
- [3] K. J. Eash, J. M. Means, D. W. White, and D. C. Link, "CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions," *Blood*, vol. 113, no. 19, pp. 4711–4719, 2009.
- [4] E. Zhao, H. Xu, L. Wang, I. Kryczek, K. Wu, Y. Hu, G. Wang, and W. Zou, "Bone marrow and the control of immunity," *Cell Mol Immunol*, vol. 9, no. 1, pp. 11–19, 2012.
- [5] C. Summers, S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters, and E. R. Chilvers, "Neutrophil kinetics in health and disease," *Trends Immunol*, vol. 31, no. 8, pp. 318–324, 2010.
- [6] V. Witko-Sarsat, M. Pederzoli-Ribeil, E. Hirsch, E. Hirsh, S. Sozzani, and M. a Cassatella, "Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game.," *Trends Immunol*, vol. 32, no. 3, pp. 117–24, Mar. 2011.
- [7] J. Pillay, I. Den Braber, N. Vrisekoop, L. M. Kwast, R. J. De Boer, A. M. Borghans, K. Tesselaar, and L. Koenderman, "In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days," *Blood*, vol. 116, no. 4, pp. 625–627, 2010.
- [8] L. M. C. Webb, M. U. Ehrenguber, I. Clark-Lewis, and M. Baggiolini, "Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 90, pp. 7158–7162, 1993.
- [9] A. E. I. Proudfoot, Z. Johnson, P. Bonvin, and T. M. Handel, "Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System," *Pharmaceuticals*, vol. 10, no. 3, pp. 1–25, 2017.
- [10] K. E. Pedersen, B. S. Bochner, and B. J. Udem, "Cysteinyl leukotrienes induce P-selectin expression in human endothelial cells via a non-CysLT1 receptor-mediated mechanism.," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 281, no. 2, pp. 655–662, 1997.
- [11] G. Goldman, R. Welbourn, C. R. Valeri, D. Shepro, and H. B. Hechtman, "Thromboxane A2 induces Leukotriene B4 synthesis that in turn mediates neutrophil diapedesis via CD 18 activation," *Microvasc Res*, vol. 41, pp. 367–375, 1991.
- [12] Å. Thureson-Klein, P. Hedqvist, and L. Lindbom, "Leukocyte diapedesis and plasma extravasation after leukotriene B4: Lack of structural injury to the endothelium," *Tissue Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 1–12, 1986.
- [13] T. R. Martin, B. P. Pistorese, E. Y. Chi, R. B. Goodman, and M. A. Matthay, "Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability," *J Clin Invest*, vol. 84, no. 5, pp. 1609–1619, 1989.
- [14] A. Papayianni, "Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells.," *J Immunol*, vol. 156, no. 6, pp. 2264–2272, 1996.
- [15] L. G. Ng, J. S. Qin, B. Roediger, Y. Wang, R. Jain, L. L. Cavanagh, A. L. Smith, C. A. Jones, M. de Veer, M. A. Grimbaldston, E. N. Meeusen, and W. Weninger, "Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events," *J Invest Dermatol*, vol. 131, no. 10, pp. 2058–2068, 2011.
- [16] T. Lämmermann, P. V Afonso, B. R. Angermann, J. M. Wang, W. Kastenmüller, C. a Parent, and R. N. Germain, "Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo.," *Nature*, vol. 498, no. 7454, pp. 371–375, 2013.
- [17] A. Yamauchi, M. Degawa-Yamauchi, F. Kuribayashi, S. Kanegasaki, and T. Tsuchiya, "Systematic single cell analysis of migration and morphological changes of human neutrophils over stimulus concentration gradients.," *J Immunol Methods*, vol. 404, pp. 59–70, Feb. 2014.
- [18] C. D. Sadik, N. D. Kim, and A. D. Luster, "Neutrophils cascading their way to inflammation," *Trends Immunol*, vol. 32, no. 10, pp. 452–460, 2012.
- [19] C. N. Serhan, A. Radin, J. E. Smolen, H. Korchak, B. Samuelsson, and G. Weissmann, "Leukotriene B4 is a complete secretagogue in human neutrophils: A kinetic analysis," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 107, no. 3, pp. 1006–1012, 1982.
- [20] C. N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli, and B. D. Levy, "Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no. 2, pp. 1–21, 2014.
- [21] C. N. Serhan, N. Chiang, and J. Dalli, "The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution," *Semin Immunol*, vol. 27, no. 3, pp. 200–215, 2015.
- [22] L. S. Schwartzberg, "Neutropenia: Etiology and Pathogenesis," *Clin Cornerstone*, vol. 8, pp. 5–11, 2006.

- [23] P. Mancuso, P. Nana-Sinkam, and M. Peters-Golden, "Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*," *Infect Immun*, vol. 69, no. 4, pp. 2011–2016, 2001.
- [24] Y. Li, A. Ferrante, A. Poulos, and D. P. Harvey, "Neutrophil oxygen radical generation: Synergistic responses to tumor necrosis factor and mono/polyunsaturated fatty acids," *J Clin Invest*, vol. 97, no. 7, pp. 1605–1609, 1996.
- [25] B. D. Levy, V. V. Fokin, J. M. Clark, M. J. Wakelam, N. A. Petasis, and C. N. Serhan, "Polyisoprenyl phosphate (PIPP) signaling regulates phospholipase D activity: a 'stop' signaling switch for aspirin-triggered lipoxin A₄," *FASEB J*, vol. 13, no. 8, pp. 903–911, 1999.
- [26] Z. Shmelzer, N. Haddad, E. Admon, I. Pessach, T. L. Leto, Z. Eitan-Hazan, M. Hershinkel, and R. Levy, "Unique targeting of cytosolic phospholipase A₂ to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes," *J Cell Biol*, vol. 162, no. 4, pp. 683–692, 2003.
- [27] P. Lacy, "Mechanisms of degranulation in neutrophils," *Allergy Asthma Clin Immunol*, vol. 2, no. 3, pp. 98–108, 2006.
- [28] H. J. Showell, I. G. Otterness, A. Marfat, and E. J. Corey, "Inhibition of Leukotriene B₄-induced neutrophil degranulation by Leukotriene B₄-dimethylamide," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 106, no. 3, pp. 741–747, 1982.
- [29] A. T. Gewirtz, V. V. Fokin, N. A. Petasis, C. N. Serhan, and J. L. Madara, "LXA₄, aspirin-triggered 15-epi-LXA₄, and their analogs selectively downregulate PMN azurophilic degranulation," *Am J Physiol*, vol. 276, no. 4, pp. 988–994, 1999.
- [30] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky, "Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria," *Science*, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–1535, 2004.
- [31] B. G. Yipp and P. Kubes, "NETosis : how vital is it?," *Blood*, vol. 122, no. 16, pp. 2784–2794, 2013.
- [32] J. Desai, S. R. Mulay, D. Nakazawa, and H. J. Anders, "Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is 'NETosis' = necroptosis?," *Cell Mol Life Sci*, vol. 73, no. 11–12, pp. 2211–2219, 2016.
- [33] M. Behnen, S. Möller, A. Brozek, M. Klinger, and T. Laskay, "Extracellular acidification inhibits the ROS-dependent formation of neutrophil extracellular traps," *Front Immunol*, vol. 8, pp. 1–22, 2017.
- [34] S. K. Jorch and P. Kubes, "An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease," *Nat Med*, vol. 23, no. 3, pp. 279–287, 2017.
- [35] A. Carestia, T. Kaufman, L. Rivadeneyra, V. I. Landoni, R. G. Pozner, S. Negrotto, L. P. D'Atri, R. M. Gómez, and M. Schattner, "Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets," *J Leukoc Biol*, vol. 99, no. 1, pp. 153–162, 2016.
- [36] S. Tibrewal, Y. Ivanir, J. Sarkar, N. Nayeb-Hashemi, C. S. Bouchard, E. Kim, and S. Jain, "Hyperosmolar stress induces neutrophil extracellular trap formation: Implications for dry eye disease," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 55, no. 12, pp. 7961–7969, 2014.
- [37] B. D. Levy, C. B. Clish, B. Schmidt, K. Gronert, and C. N. Serhan, "Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution," *Nat Immunol*, vol. 2, no. 7, pp. 612–619, 2001.
- [38] T. Lämmermann, "In the eye of the neutrophil swarm-navigation signals that bring neutrophils together in inflamed and infected tissues," *J Leukoc Biol*, vol. 100, no. 1, pp. 55–63, 2016.
- [39] C. L. Rector and R. C. Murphy, "Determination of leukotriene A₄ stabilization by S100A8/A9 proteins using mass spectrometry," *J Lipid Res*, vol. 50, no. 10, pp. 2064–71, 2009.
- [40] M. Pouliot, P. P. McDonald, E. Krump, J. A. Mancini, S. R. McColl, P. K. Weech, and P. Borgeat, "Colocalization of cytosolic phospholipase A₂, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils," *Eur J Biochem*, vol. 238, pp. 250–258, 1996.
- [41] M. E. Surette, N. Dallaire, N. Jean, S. Picard, and P. Borgeat, "Mechanisms of the priming effect of lipopolysaccharides on the biosynthesis of leukotriene B₄ in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils," *FASEB J*, vol. 12, no. 14, pp. 1521–1531, 1998.
- [42] T. G. Brock, R. W. McNish, M. B. Bailie, and M. Peters-Golden, "Rapid import of cytosolic 5-lipoxygenase into the nucleus of neutrophils after in vivo recruitment and in vitro adherence," *J Biol Chem*, vol. 272, no. 13, pp. 8276–8280, 1997.
- [43] M. Abramovitz, E. Wong, M. E. Cox, C. D. Richardson, L. Chun, and P. J. Vickers, "5-Lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase," *Eur J Biochem*, vol. 215, no. 1, pp. 105–111, 1993.
- [44] P. V. Afonso and C. A. Parent, "LTB₄ is a signal relay molecule during neutrophil chemotaxis," *Dev Cell*, vol. 454, no. 1, pp. 42–54, 2007.
- [45] M. Peters-Golden and W. R. Henderson, "Leukotrienes," *N Engl J Med*, vol. 357, no. 18, pp. 1841–1854, 2007.
- [46] T. Yokomizo, "Two distinct leukotriene B₄ receptors, BLT1 and BLT2," *J Biochem*, vol. 157, no. 2, pp. 65–71, 2015.

- [47] K. Kienle and T. Lämmermann, "Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response," *Immunol Rev*, vol. 273, no. 1, pp. 76–93, 2016.
- [48] J. Gagnet, S. Chollet-Martin, M. Brion, J. Hakim, M. A. Gougerot-Pocidalò, and C. Elbim, "Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation," *Lab Invest*, vol. 78, no. 6, pp. 755–762, 1998.
- [49] M. E. Doerfler, J. Weiss, J. D. Clark, and P. Elsbach, "Bacterial lipopolysaccharide primes human neutrophils for enhanced release of arachidonic acid and causes phosphorylation of an 85-kD cytosolic phospholipase A2," *J Clin Invest*, vol. 93, no. 4, pp. 1583–1591, 1994.
- [50] A. Helgadottir, A. Manolescu, J. R. Gulcher, and K. Stefansson, "The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke," *Nat Genet*, vol. 36, no. 3, pp. 233–239, 2004.
- [51] M. A. Gimbrone, A. F. Brock, and A. I. Schafer, "Leukotriene B4 stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells.," *J Clin Invest*, vol. 74, no. 4, pp. 1552–1555, 1984.
- [52] A. M. Tager, J. H. Dufour, K. Goodarzi, S. D. Bercury, U. H. von Andrian, and A. D. Luster, "BLTR mediates leukotriene B(4)-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis.," *J Exp Med*, vol. 192, no. 3, pp. 439–446, 2000.
- [53] J. Palmblad, C. L. Malmsten, a M. Udén, O. Rådmark, L. Engstedt, and B. Samuelsson, "Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence.," *Blood*, vol. 58, no. 3, pp. 658–661, 1981.
- [54] B. Samuelsson, S. Dahlen, J. A. Lindgren, C. A. Rouzer, and C. N. Serhan, "Leukotrienes and Lipoxins: Structures, Biosynthesis, and Biological Effects," *Science*, vol. 237, no. 4819, pp. 1171–1176, 1987.
- [55] a W. Ford-Hutchinson, M. a Bray, M. V Doig, M. E. Shipley, and M. J. Smith, "Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes.," *Nature*, vol. 286, no. 5770, pp. 264–265, 1980.
- [56] T. F. P. Molski, P. H. Naccache, P. Borgeat, and R. I. Sha'afi, "Similarities in the mechanisms by which formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, arachidonic acid and leukotriene B4 increase calcium and sodium influxes in rabbit neutrophils," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 103, no. 1, pp. 227–232, 1981.
- [57] D. Petrin, S. Turcotte, A. K. Gilbert, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova, "The anti-apoptotic effect of leukotriene B4 in neutrophils: a role for phosphatidylinositol 3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and Mcl-1," *Cell Signal*, vol. 18, no. 4, pp. 479–487, 2006.
- [58] N. Chiang, C. N. Serhan, S.-E. Dahlén, J. M. Drazen, D. W. P. Hay, G. E. Rovati, T. Shimizu, T. Yokomizo, and C. Brink, "The Lipoxin receptor ALX: Potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo," *Pharmacol Rev*, vol. 58, no. 3, pp. 463–487, 2006.
- [59] M. E. Brezinski and C. N. Serhan, "Selective incorporation of (15S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in phosphatidylinositol of human neutrophils: agonist-induced deacylation and transformation of stored hydroxyeicosanoids.," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 87, no. 16, pp. 6248–6252, 1990.
- [60] I. M. Fierro and C. N. Serhan, "Mechanisms in anti-inflammation and resolution: The role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins," *Braz J Med Biol Res*, vol. 34, no. 5, pp. 555–566, 2001.
- [61] D. D. De Carvalho, A. Sadok, V. Bourgarel-Rey, F. Gattacceca, C. Penel, M. Lehmann, and H. Kovacic, "Nox1 downstream of 12-lipoxygenase controls cell proliferation but not cell spreading of colon cancer cells," *Int J Cancer*, vol. 122, no. 8, pp. 1757–1764, 2008.
- [62] P. M. Gillespie, C. M. Beaumier, U. Strych, T. Hayward, P. J. Hotez, and M. E. Bottazzi, "Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis," *Vaccine*, vol. 34, no. 26, pp. 2992–2995, 2016.
- [63] L. Solano-Gallego, P. Morell, M. Arboix, J. Alberola, and L. Ferrer, "Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology," *J Clin Microbiol*, vol. 39, no. 2, pp. 560–563, 2001.
- [64] O. Lisi, V. D. Urso, V. Vaccalluzzo, G. Bongiorno, C. Khoury, F. Severini, T. Di Muccio, M. Gramiccia, L. Gradoni, and M. Maroli, "Persistence of phlebotomine Leishmania vectors in urban sites of Catania (Sicily , Italy)," *Parasit Vectors*, vol. 7, no. 560, pp. 1–10, 2014.
- [65] O. Gr, C. Ba, W. Smith, and R. Jr, "Canine visceral leishmaniasis in Sicily," *Mil Med*, vol. 165, no. 1, pp. 29–32, 2000.
- [66] CVMP, "CaniLeish - Canine vaccine against Leishmania infantum adjuvanted," *Eur. Med. Agency*, vol. CVMP/2, pp. 1–3, 2011.
- [67] World Health Organization, "Control of the leishmaniasis.," *WHO Tech. Rep. Ser.*, no. 949, pp. 22–26, 2010.
- [68] H. Aspöck, "Durch Arthropoden übertragene Erreger von Infektionen des Menschen in Mitteleuropa – ein Update," *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Ent*, vol. 16, pp. 371–392, 2008.

- [69] B. P. Hurrell, I. B. Regli, and F. Tacchini-Cottier, "Different Leishmania species drive distinct neutrophil functions," *Trends Parasitol*, vol. 32, no. 5, pp. 392–401, 2016.
- [70] C. Matte and M. Olivier, "Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators.," *J Infect Dis*, vol. 185, no. 5, pp. 673–681, 2002.
- [71] N. C. Peters, J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, S. Kamhawi, P. G. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain, and D. Sacks, "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies," *Science*, vol. 321, no. 5891, pp. 970–974, 2008.
- [72] N. C. Peters and D. L. Sacks, "The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis," *Cell Microbiol*, vol. 11, no. 9, pp. 1290–1296, 2009.
- [73] T. Laskay, G. Van Zandbergen, and W. Solbach, "Neutrophil granulocytes - Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?," *Trends Microbiol*, vol. 11, no. 5, pp. 210–214, 2003.
- [74] E. Aga, D. M. Katschinski, G. van Zandbergen, H. Laufs, B. Hansen, K. Muller, W. Solbach, and T. Laskay, "Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite Leishmania major," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 2, pp. 898–905, 2002.
- [75] G. van Zandbergen, N. Hermann, H. Laufs, W. Solbach, and T. Laskay, "Leishmania Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Production by Neutrophil Granulocytes," *Infect Immun*, no. August 2002, pp. 4177–4184, 2002.
- [76] M. Charmoy, S. Brunner-Agten, D. Aebischer, F. Auderset, P. Launois, G. Milon, A. E. I. Proudfoot, and F. Tacchini-Cottier, "Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice," *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 2, 2010.
- [77] G. van Zandbergen, M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach, and T. Laskay, "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages.," *J Immunol*, vol. 173, no. 11, pp. 6521–6525, 2004.
- [78] F. L. Ribeiro-Gomes and D. Sacks, "The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 2, pp. 1–8, 2012.
- [79] U. Ritter, F. Frischknecht, and G. van Zandbergen, "Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites?," *Trends Parasitol*, vol. 25, no. 11, pp. 505–510, 2009.
- [80] V. Lemos De Souza, J. Ascensão Souza, T. M. Correia Silva, P. Sampaio Tavares Veras, and L. A. Rodrigues De-Freitas, "Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice," *Microbes Infect*, vol. 2, no. 15, pp. 1807–1815, 2000.
- [81] N. E. Reiner and C. J. Malemud, "Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with Leishmania donovani: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways," *J Immunol*, vol. 134, no. 1, pp. 556–563, 1985.
- [82] C. I. Morato, I. A. da Silva, A. F. Borges, M. L. Dorta, M. A. P. Oliveira, S. Jancar, C. H. Serezani, and F. Ribeiro-Dias, "Essential role of leukotriene B4 on Leishmania (Viannia) braziliensis killing by human macrophages," *Microbes Infect*, vol. 16, no. 11, pp. 945–953, 2014.
- [83] N. M. Tavares, T. Araújo-Santos, L. Afonso, P. M. Nogueira, U. G. Lopes, R. P. Soares, P. T. Bozza, C. Bandeira-Melo, V. M. Borges, and C. Brodskyn, "Understanding the mechanisms controlling Leishmania amazonensis infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils.," *J Infect Dis*, vol. 210, no. 4, pp. 656–666, 2014.
- [84] N. Tavares, L. Afonso, M. Suarez, M. Ampuero, D. B. Prates, T. Araujo-Santos, M. Barral-Netto, G. a. DosReis, V. M. Borges, and C. Brodskyn, "Degranulating neutrophils promote Leukotriene B4 production by infected macrophages to kill Leishmania amazonensis parasites," *J. Immunol.*, vol. 196, no. 4, pp. 1865–1873, 2016.
- [85] H. Malta-Santos, B. B. Andrade, D. L. Zanette, J. M. Costa, P. T. Bozza, C. Bandeira-Melo, A. Barral, J. França-Costa, and V. M. Borges, "Resolvin D1 drives establishment of Leishmania amazonensis infection," *Sci Rep*, vol. 7, pp. 1–8, 2017.
- [86] J. França-Costa, J. Van Weyenbergh, V. S. Boaventura, N. F. Luz, H. Malta-Santos, M. C. S. Oliveira, D. C. S. De Campos, A. C. Saldanha, W. L. C. Dos-Santos, P. T. Bozza, M. Barral-Netto, A. Barral, J. M. Costa, and V. M. Borges, "Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis," *J Infect Dis*, vol. 211, no. 3, pp. 426–435, 2015.
- [87] R. A. Colas, A. W. Ashton, S. Mukherjee, J. Dalli, O. B. Akide-Ndunge, H. Huang, M. S. Desruisseaux, F. Guan, L. A. Jelicks, F. Matos dos Santos, J. Nagajyothi, M. Zingman, J. Reyes, L. M. Weiss, C. N. Serhan, and H. B. Tanowitz, "Trypanosoma cruzi produces the specialized proresolving mediators Resolvin D1, Resolvin D5 and Resolvin E2," *Infect Immun*, no. 00688–17 (Epub), pp. 1–29, 2018.
- [88] S. Rabhi, I. Rabhi, B. Trentin, D. Piquemal, B. Regnault, S. Goyard, T. Lang, A. Descoteaux, J. Enninga, and L. Guizani-Tabbane, "Lipid droplet formation, their localization and dynamics during

- Leishmania major macrophage infection,” *PLoS One*, vol. 11, no. 2, pp. 1–19, 2016.
- [89] U. A. Wenzel and G. van Zandbergen, “Lipoxin A4 receptor dependent Leishmania infection,” *Autoimmunity*, vol. 42, no. 4, pp. 331–333, 2009.
- [90] T. Araújo-Santos, N. E. Rodríguez, S. Moura-Pontes, U. G. Dixt, D. R. Abánades, P. T. Bozza, M. E. Wilson, and V. M. Borges, “Role of prostaglandin F2 α production in lipid bodies from *Leishmania infantum* chagasi: Insights on virulence,” *J Infect Dis*, vol. 210, no. 12, pp. 1951–1961, 2014.
- [91] J. S. Dumler, A. F. Barbet, C. P. J. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Rurangirwa, “Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species comb,” *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 51, no. 6, pp. 2145–2165, 2001.
- [92] S. Stuen, “Tick-borne fever (*Anaplasma phagocytophilum* infection) in sheep – a review,” *J Vet Med Res*, vol. 3, no. 5, pp. 1–6, 2016.
- [93] S. Stuen, E. G. Granquist, and C. Silaghi, “*Anaplasma phagocytophilum* - a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 3, no. 31, pp. 1–33, 2013.
- [94] S. H. Sinclair, K. E. Rennoll-Bankert, and J. S. Dumler, “Effector bottleneck: Microbial reprogramming of parasitized host cell transcription by epigenetic remodeling of chromatin structure,” *Front Genet*, vol. 5, no. 274, pp. 1–10, 2014.
- [95] K. S. Choi, D. J. Grab, and J. S. Dumler, “*Anaplasma phagocytophilum* infection induces protracted neutrophil degranulation,” *Infect Immun*, vol. 72, no. 6, pp. 3680–3683, 2004.
- [96] M. Akkoyunlu, S. E. Malawista, J. Anguita, and E. Fikrig, “Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis,” *Infect Immun*, vol. 69, no. 9, pp. 5577–5588, 2001.
- [97] K. Choi, J. Garyu, J. Park, and J. S. Dumler, “Diminished adhesion of *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils to endothelial cells is associated with reduced expression of leukocyte surface selectin,” *Infect Immun*, vol. 71, no. 8, pp. 4586–4594, 2003.
- [98] J. W. A. Garyu and J. S. Dumler, “*Anaplasma phagocytophilum* infection reduces expression of phagocytosis-related receptors on neutrophils,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1063, pp. 416–419, 2005.
- [99] Z. Woldehiwet, “Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis,” *Vet J*, vol. 175, no. 1, pp. 37–44, 2008.
- [100] J. A. Carlyon, W.-T. Chan, J. Galán, D. Roos, and E. Fikrig, “Repression of *rac2* mRNA expression by *Anaplasma phagocytophila* is essential to the inhibition of superoxide production and bacterial proliferation,” *J Immunol*, vol. 169, no. 12, pp. 7009–7018, 2002.
- [101] R. Banerjee, J. Anguita, D. Roos, and E. Fikrig, “Cutting edge: infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis prevents the respiratory burst by down-regulating gp91phox,” *J Immunol*, vol. 164, no. 8, pp. 3946–3949, 2000.
- [102] C. Silaghi, A. Santos, J. Gomes, I. Christova, I. Matei, G. Walder, A. Domingos, L. Bell-Sakyi, H. Sprong, F. D. von Loewenich, J. Oteo, J. de la Fuente, and J. S. Dumler, “Guidelines for the direct detection of *Anaplasma* spp. in diagnosis and epidemiological Studies,” *Vector Borne Zoonotic Dis*, vol. 17, no. 1, pp. 12–22, 2017.
- [103] H. Scaife, Z. Woldehiwet, C. A. Hart, and S. W. Edwards, “*Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo,” *Infect. Immun.*, vol. 71, no. 4, pp. 1995–2001, 2003.
- [104] K. Choi, J. T. Park, and J. S. Dumler, “*Anaplasma phagocytophilum* delay of neutrophil apoptosis through the p38 Mitogen-activated protein kinase signal pathway,” *Infect Immun*, vol. 73, no. 12, pp. 8209–8218, 2005.
- [105] A. Sarkar, L. Hellberg, A. Bhattacharyya, M. Behnen, K. Wang, J. M. Lord, S. Möller, M. Kohler, W. Solbach, and T. Laskay, “Infection with *Anaplasma phagocytophilum* activates the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and NF- κ B survival pathways in neutrophil granulocytes,” *Infect Immun*, vol. 80, no. 4, pp. 1615–23, Apr. 2012.
- [106] J. T. Grayston, “Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis,” *J Infect Dis*, vol. 181, pp. 402–410, 2000.
- [107] C. Kuo, L. A. Jackson, L. A. Campbell, and J. T. Grayston, “*Chlamydia pneumoniae* (TWAR),” *Clin Microbiol Rev*, vol. 8, no. 4, pp. 451–461, 1995.
- [108] J. Gieffers, G. van Zandbergen, J. Rupp, F. Sayk, S. Krüger, S. Ehlers, W. Solbach, and M. Maass, “Phagocytes transmit *Chlamydia pneumoniae* from the lungs to the vasculature,” *Eur Respir J*, vol. 23, no. 4, pp. 506–510, 2004.
- [109] M. E. Rosenfeld and L. A. Campbell, “Pathogens and atherosclerosis : Update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis,” *Thromb Haemost*, vol. 106, no. 5, pp. 858–867, 2011.
- [110] H. Zeidler and A. P. Hudson, “Coinfection of *Chlamydiae* and other Bacteria in Reactive Arthritis

- and Spondyloarthritis: Need for Future Research,” *Microorganisms*, vol. 4, no. 3, pp. 1–11, 2016.
- [111] C. Contini, S. Seraceni, R. Cultrera, M. Castellazzi, E. Granieri, and E. Fainardi, “Chlamydia pneumoniae infection and its role in neurological disorders,” *Interdiscip Perspect Infect Dis*, no. 273573, pp. 1–18, 2010.
- [112] K. Wolf, E. Fischer, and T. Hackstadt, “Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells,” *Infect Immun*, vol. 68, no. 4, pp. 2379–2385, 2000.
- [113] R. J. Bastidas, C. A. Elwell, J. N. Engel, and R. H. Valdivia, “Chlamydial intracellular survival strategies,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 3, no. 5, pp. 1–20, 2013.
- [114] G. van Zandbergen, J. Gieffers, H. Kothe, J. Rupp, A. Bollinger, E. Aga, M. Klinger, H. Brade, K. Dalhoff, M. Maass, W. Solbach, and T. Laskay, “Chlamydia pneumoniae multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis,” *J Immunol*, vol. 172, no. 3, pp. 1768–1776, 2004.
- [115] Z. Yang, P. K. Cummings, D. L. Patton, and C. Kuo, “Ultrastructural lung pathology of experimental Chlamydia pneumoniae pneumonitis in mice,” *J Infect Dis*, vol. 170, pp. 464–467, 1994.
- [116] R. E. Molestina, R. D. Miller, J. A. Ramirez, and J. T. Summersgill, “Infection of human endothelial cells with Chlamydia pneumoniae stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes,” *Infect Immun*, vol. 67, no. 3, pp. 1323–1330, 1999.
- [117] H. U. Jahn, M. Krüll, F. N. Wuppermann, A. C. Klucken, S. Rosseau, J. Seybold, J. H. Hegemann, C. A. Jantos, and N. Suttorp, “Infection and activation of airway epithelial cells by Chlamydia pneumoniae,” *J Infect Dis*, vol. 182, no. 6, pp. 1678–1687, 2000.
- [118] A. Sarkar, S. Möller, A. Bhattacharyya, M. Behnen, J. Rupp, G. Van Zandbergen, W. Solbach, and T. Laskay, “Mechanisms of apoptosis inhibition in Chlamydia pneumoniae-infected neutrophils,” *Int J Med Microbiol*, vol. 305, no. 6, pp. 493–500, 2015.
- [119] N. Rodriguez, F. Fend, L. Jennen, N. Wantia, C. U. Prazeres, S. Dürr, U. Heinzmann, H. Wagner, T. Miethke, N. Rodriguez, F. Fend, L. Jennen, M. Schiemann, N. Wantia, C. U. Prazeres, S. Du, U. Heinzmann, H. Wagner, and T. Miethke, “Polymorphonuclear neutrophils improve replication of Chlamydia pneumoniae in vivo upon MyD88-dependent attraction,” *J Immunol*, vol. 174, no. 8, pp. 4836–4844, 2005.
- [120] N. Chiba, K. Shimada, S. Chen, H. D. Jones, R. Alsabeh, A. V Slepkin, E. Peterson, T. R. Crother, and M. Ardit, “Mast cells play an important role in Chlamydia pneumoniae lung infection by facilitating immune cell recruitment into the airway,” *J Immunol*, vol. 194, no. 8, pp. 3840–3851, 2016.
- [121] K. K. Patel, A. G. Vicencio, Z. Du, K. Tsirilakis, P. S. Salva, and W. C. Webley, “Infectious Chlamydia pneumoniae is associated with elevated interleukin-8 and airway neutrophilia in children with refractory asthma,” *Pediatr Infect Dis J*, vol. 29, no. 12, pp. 1093–1098, 2010.
- [122] J. Rupp, L. Pfliegerer, C. Jugert, S. Moeller, M. Klinger, K. Dalhoff, W. Solbach, S. Stenger, T. Laskay, and G. van Zandbergen, “Chlamydia pneumoniae hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages,” *PLoS One*, vol. 4, no. 6, 2009.
- [123] K. Lauber, E. Bohn, S. M. Kröber, Y. Xiao, S. G. Blumenthal, R. K. Lindemann, P. Marini, C. Wiedig, A. Zobywalski, S. Baksh, Y. Xu, I. B. Autenrieth, K. Schulze-Osthoff, C. Belka, G. Stuhler, and S. Wesselborg, “Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal,” *Cell*, vol. 113, pp. 717–730, 2003.
- [124] K. Lauber, S. G. Blumenthal, M. Waibel, and S. Wesselborg, “Clearance of apoptotic cells: Getting rid of the corpses,” *Mol Cell*, vol. 14, pp. 277–287, 2004.
- [125] M. C. Greenlee-Wacker, “Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation,” *Immunol Rev*, vol. 273, no. 1, pp. 357–370, 2016.
- [126] E. L. Beckett, S. Phipps, M. R. Starkey, J. C. Horvat, K. W. Beagley, P. S. Foster, and P. M. Hansbro, “TLR2, but not TLR4, is required for effective host defence against Chlamydia respiratory tract infection in early life,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. 1–13, 2012.
- [127] R. Bellmann-Weiler, A. Schroll, S. Engl, M. Nairz, H. Talasz, M. Seifert, and G. Weiss, “Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-10 regulate intramacrophage,” *Immunobiology*, vol. 218, no. 7, pp. 969–978, 2013.
- [128] R. G. Rank, J. Whittimore, A. K. Bowlin, and P. B. Wyrick, “In vivo ultrastructural analysis of the intimate relationship between polymorphonuclear leukocytes and the chlamydial developmental cycle,” *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 8, pp. 3291–3301, 2011.
- [129] J. M. McCracken and L.-A. H. Allen, “Regulation of human neutrophil apoptosis in health and disease,” *J Cell Death*, vol. 7, pp. 15–23, 2014.
- [130] A. Degtarev, Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz, and J. Yuan, “Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury,” *Nat Chem Biol*, vol. 1, no. 2, pp. 112–119, 2005.
- [131] K. S. Ravichandran, “Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums,” *J Exp Med*, vol. 207, no. 9, pp. 1807–1817, 2010.

- [132] J. Dalli and C. N. Serhan, "Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: Microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators," *Blood*, vol. 120, no. 15, pp. 60–73, 2012.
- [133] L. V. Norling, M. Spite, R. Yang, R. J. Flower, M. Perretti, and C. N. Serhan, "Cutting Edge: Humanized nano-proresolving medicines mimic inflammation-resolution and enhance wound healing," *J Immunol*, vol. 186, no. 10, pp. 5543–5547, 2011.
- [134] C. Nathan and A. Ding, "Nonresolving inflammation.," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 871–82, Mar. 2010.
- [135] M. C. Basil and B. D. Levy, "Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation," *Nat Rev Immunol*, vol. 16, no. 1, pp. 51–67, 2016.
- [136] S. Fiore and C. N. Serhan, "Formation of lipoxins and leukotrienes during receptor-mediated interactions of human platelets and recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-primed neutrophils.," *J Exp Med*, vol. 172, no. 5, pp. 1451–1457, 1990.
- [137] J. Clària, M. H. Lee, and C. N. Serhan, "Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549)-neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation.," *Mol Med*, vol. 2, no. 5, pp. 583–96, 1996.
- [138] V. Capra, G. E. Rovati, P. Mangano, C. Buccellati, R. C. Murphy, and A. Sala, "Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1851, no. 4, pp. 377–382, 2015.
- [139] R. J. Shaw, O. Cromwell, and a B. Kay, "Preferential generation of leukotriene C4 by human eosinophils.," *Clin Exp Immunol*, vol. 56, no. 3, pp. 716–22, 1984.
- [140] C. N. Serhan, N. Chiang, and T. E. Van Dyke, "Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators," *Nat Rev Immunol*, vol. 8, no. 5, pp. 349–361, 2008.
- [141] Y. Rikihisa, "Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*," *Clin Microbiol Rev*, vol. 24, no. 3, pp. 469–489, 2011.
- [142] F. O. Novais, R. C. Santiago, A. Báfica, R. Khouri, L. Afonso, V. M. Borges, C. Brodskyn, M. Barral-Netto, A. Barral, and C. I. de Oliveira, "Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection.," *J Immunol*, vol. 183, no. 12, pp. 8088–8098, 2009.
- [143] D. Rousseau, S. Demartino, B. Ferrua, J. F. Michiels, F. Anjuère, K. Fragaki, Y. Le Fichoux, and J. Kubar, "In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection," *BMC microbiol*, vol. 1, no. 17, 2001.
- [144] S. A. C. Falcão, T. Weinkopff, B. P. Hurrell, F. S. Celes, R. P. Curvelo, D. B. Prates, A. Barral, V. M. Borges, F. Tacchini-Cottier, and C. I. de Oliveira, "Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 9, no. 3, pp. 1–19, 2015.
- [145] H. Laufs, K. Müller, J. Fleischer, N. Jahnke, J. C. Jensenius, W. Solbach, N. Reiling, and T. Laskay, "Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors," *Infect Immun*, vol. 70, no. 2, pp. 826–835, 2002.
- [146] R. Badolato, D. L. Sacks, D. Savoia, and T. Musso, "Leishmania major: Infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF," *Exp Parasitol*, vol. 82, no. 1, pp. 21–26, 1996.
- [147] A. Sarkar, E. Aga, U. Bussmeyer, A. Bhattacharyya, S. Möller, L. Hellberg, M. Behnen, W. Solbach, and T. Laskay, "Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis," *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 202, no. 1, pp. 25–35, 2013.
- [148] M. Charmoy, F. Auderset, C. Allenbach, and F. Tacchini-Cottier, "The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites," *J Biomed Biotechnol*, no. 719361, pp. 1–8, 2010.
- [149] A. B. Guimaraes-Costa, M. T. C. Nascimento, G. S. Froment, R. P. Soares, F. N. Morgado, F. Conceição-Silva, and E. M. Sareiva, "Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 16, pp. 6748–6753, 2009.
- [150] D. F. Smith, C. S. Peacock, and A. K. Cruz, "Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniases," *Int J Parasitol*, vol. 37, no. 11, pp. 1173–1186, 2007.
- [151] C. Bogdan and M. Rölinghoff, "The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion," *Int J Parasitol*, vol. 28, no. 1, pp. 121–134, 1998.
- [152] P. Li, D. Y. Oh, G. Bandyopadhyay, W. S. Lagakos, S. Talukdar, O. Osborn, A. Johnson, H. Chung, M. Maris, J. M. Ofrecio, S. Taguchi, M. Lu, and J. M. Olefsky, "LTB4 causes macrophage-mediated inflammation and directly induces insulin resistance in obesity," *Nat Med*, vol. 21, no. 3, pp. 239–247, 2015.
- [153] J. F. Dermine, S. Scianimanico, C. Privé, A. Descoteaux, and M. Desjardins, "Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis," *Cell Microbiol*, vol. 2, no. 2, pp. 115–126, 2000.
- [154] N. Moradin and A. Descoteaux, "Leishmania promastigotes: Building a safe niche within macrophages," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 2, no. 121, pp. 1–7, 2012.

- [155] M. F. Horta, B. P. Mendes, E. H. Roma, F. S. M. Noronha, J. P. MacDo, L. S. Oliveira, M. M. Duarte, and L. Q. Vieira, "Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis," *J Parasitol Res*, no. 203818, pp. 1–11, 2012.
- [156] G. van Zandbergen, A. Bollinger, A. Wenzel, S. Kamhawi, R. Voll, M. Klinger, A. Müller, C. Hölscher, M. Herrmann, D. Sacks, W. Solbach, and T. Laskay, "Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 37, pp. 13837–13842, 2006.
- [157] T. Laskay, G. van Zandbergen, and W. Solbach, "Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor," *Immunobiology*, vol. 213, no. 3–4, pp. 183–191, 2008.
- [158] M. E. Rogers, "The role of Leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host," *Front Microbiol*, vol. 3, no. 223, pp. 1–13, 2012.
- [159] M. C. Monteiro, L. G. Nogueira, A. A. Almeida Souza, J. M. C. Ribeiro, J. S. Silva, and F. Q. Cunha, "Effect of salivary gland extract of Leishmania vector, Lutzomyia longipalpis, on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis," *Eur J Immunol*, vol. 35, no. 8, pp. 2424–2433, 2005.
- [160] T. Araújo-Santos, D. B. Prates, J. França-Costa, N. F. Luz, B. B. Andrade, J. C. Miranda, C. I. Brodskyn, A. Barral, P. T. Bozza, and V. M. Borges, "Prostaglandin E2/Leukotriene B4 balance induced by Lutzomyia longipalpis saliva favors Leishmania infantum infection," *Parasit Vectors*, vol. 7, no. 601, pp. 1–8, 2014.
- [161] C. A. Loynes, J. A. Lee, A. L. Robertson, M. J. Steel, F. Ellett, Y. Feng, B. D. Levy, M. K. Whyte, and S. A. Renshaw, "Lipid mediator class-switching downstream of PGE 2 determines the outcome of inflammation resolution in vivo," *Cold Spring Harb*, Epub Preprint Dezember, pp. 1–33, 2017.
- [162] J. Mott and Y. Rikihisa, "Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils," *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 12, pp. 6697–6703, 2000.
- [163] J. Mott, Y. Rikihisa, and S. Tsunawaki, "Effects of Anaplasma phagocytophila on NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells," *Infect Immun*, vol. 70, no. 3, pp. 1359–1366, 2002.
- [164] T. Wang, S. E. Malawista, U. Pal, M. Grey, J. Meek, M. Akkoyunlu, V. Thomas, and E. Fikrig, "Superoxide anion production during Anaplasma phagocytophila infection.," *J. Infect. Dis.*, vol. 186, no. 2, pp. 274–280, 2002.
- [165] A. Lowenthal and R. Levy, "Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the H+ channel in phagocyte-like cells," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 31, pp. 21603–21608, 1999.
- [166] H. C. Lee, M. Kioi, J. Han, R. K. Puri, and J. L. Goodman, "Anaplasma phagocytophilum-induced gene expression in both human neutrophils and HL-60 cells," *Genomics*, vol. 92, no. 3, pp. 144–151, 2008.
- [167] M. Lin and Y. Rikihisa, "Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival," *Infect Immun*, vol. 71, no. 9, pp. 5324–5331, 2003.
- [168] Y. Rikihisa, "Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis: subversive manipulators of host cells," *Nat Rev Microbiol*, vol. 8, no. 5, pp. 328–339, 2010.
- [169] M. Lin, T. Kikuchi, H. M. Brewer, A. D. Norbeck, and Y. Rikihisa, "Global proteomic analysis of two tick-borne emerging zoonotic agents: Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis," *Front Microbiol*, vol. 2, no. 24, pp. 1–19, 2011.
- [170] B. Sukumaran, J. A. Carlyon, J.-L. Cai, N. Berliner, and E. Fikrig, "Early transcriptional response of human neutrophils to Anaplasma phagocytophilum infection," *Infect Immun*, vol. 73, no. 12, pp. 8089–8099, 2005.
- [171] J. Beaufays, B. Adam, C. Menten-Dedoyart, L. Fieves, A. Grosjean, Y. Decrem, P. P. Prevot, S. Santini, R. Bresseur, M. Brossard, M. Vanhaeverbeek, F. Bureau, E. Heinen, L. Lins, L. Vanhamme, and E. Godfroid, "Ir-LBP, an Ixodes ricinus tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function," *PLoS One*, vol. 3, no. 12, pp. 1–13, 2008.
- [172] G. C. Paesen, P. L. Adams, K. Harlos, P. A. Nuttall, and D. I. Stuart, "Tick Histamine-Binding Proteins: Isolation, Cloning, and Three-Dimensional Structure," *Mol Cell*, vol. 3, no. 5, pp. 661–671, 1999.
- [173] K. Rajalingam, H. Al-Younes, A. Müller, T. F. Meyer, A. J. Szczepek, and T. Rudel, "Epithelial cells infected with Chlamydia pneumoniae (Chlamydia pneumoniae) are resistant to apoptosis," *Infect Immun*, vol. 69, no. 12, pp. 7880–7888, 2001.
- [174] J. Yang, W. C. Hooper, D. J. Phillips, M. L. Tondella, and D. F. Talkington, "Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during Chlamydia pneumoniae infection," *Infect Immun*, vol. 71, no. 2, pp. 614–620, 2003.
- [175] L. Törmäkangas, E. Markkula, K. Lounatmaa, and M. Puolakkainen, "Chlamydia pneumoniae infection in polarized epithelial cell lines," *Infect Immun*, vol. 78, no. 6, pp. 2714–2722, 2010.
- [176] S. Ying, M. Pettengill, D. M. Ojcius, and G. Häcker, "Host-cell survival and death during Chlamydia

- infection,” *Curr Immunol Rev*, vol. 3, no. 1, pp. 31–40, 2007.
- [177] R&D-Systems, “LTB4 Assay Manual,” *Tag des Zugriffs: 18.01.2018*. Online: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/kge006b.pdf>.
- [178] J. Dalli and C. N. Serhan, “Pro-resolving mediators in regulating and conferring macrophage function,” *Front Immunol*, vol. 8, no. 1400, pp. 1–9, 2017.
- [179] W. M. Nauseef and N. Borregaard, “Neutrophils at work,” *Nat Immunol*, vol. 15, no. 7, pp. 602–611, 2014.
- [180] J. Z. Haeggström and C. D. Funk, “Lipoxygenase and leukotriene pathways: Biochemistry, biology, and roles in disease,” *Chem Rev*, vol. 111, no. 10, pp. 5866–5896, 2011.
- [181] C. N. Serhan, “Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology,” *Nature*, vol. 510, no. 7503, pp. 92–101, 2014.
- [182] C. N. Serhan, “Discovery of specialized pro-resolving mediators marks the dawn of resolution physiology and pharmacology,” *Mol Asp. Med*, no. 58, pp. 1–11, 2017.
- [183] C. N. Serhan, “Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms,” *FASEB J*, vol. 31, no. 4, pp. 1273–1288, 2017.
- [184] R. Ramaswami, C. N. Serhan, B. Levy, and M. Makrides, “Fish Oil Supplementation in Pregnancy,” *N Engl J Med*, vol. 375, no. 26, pp. 2599–2601, 2016.
- [185] J. F. Markworth, G. Kaur, E. G. Miller, A. E. Larsen, A. J. Sinclair, K. R. Maddipati, and D. Cameron-Smith, “Divergent shifts in lipid mediator profile following supplementation with n-3 docosapentaenoic acid and eicosapentaenoic acid,” *FASEB J*, vol. 30, no. 11, pp. 3714–3725, 2016.
- [186] E. Ono, S. Dutilleul, S. Kazani, M. E. Wechsler, J. Yang, B. D. Hammock, D. N. Doua, Y. Tabet, R. Khaddaj-Mallat, M. Sirois, C. Sirois, E. Rizcallah, É. Rousseau, R. Martin, E. R. Sutherland, M. Castro, N. N. Jarjour, E. Israel, and B. D. Levy, “Lipoxin generation is related to soluble epoxide hydrolase activity in severe asthma,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 190, no. 8, pp. 886–897, 2014.
- [187] M. Piffoux, F. Gazeau, C. Wilhelm, and A. K. A. Silva, “Imaging and therapeutic potential of extracellular Vesicles,” in *Design and Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging*, 2017, pp. 43–68.
- [188] C. D. Russell and J. Schwarze, “The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease,” *Immunology*, vol. 141, no. 2, pp. 166–173, 2014.
- [189] N. Chiang, G. Fredman, F. Bäckhed, S. F. Oh, T. Vickery, B. A. Schmidt, and C. N. Serhan, “Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements,” *Nature*, vol. 484, no. 7395, pp. 524–528, 2012.
- [190] J. Dalli, B. D. Kraft, R. A. Colas, M. Shinohara, L. E. Fredenburgh, D. R. Hess, N. Chiang, K. Welty-Wolf, A. M. Choi, C. A. Piantadosi, and C. N. Serhan, “The regulation of proresolving lipid mediator profiles in baboon pneumonia by inhaled carbon monoxide,” *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 53, no. 3, pp. 314–325, 2015.
- [191] M. L. Sulciner, C. N. Serhan, M. M. Gilligan, D. K. Mudge, J. Chang, A. Gartung, K. A. Lehner, D. R. Bielenberg, B. Schmidt, J. Dalli, E. R. Greene, Y. Gus-Brautbar, J. Piwowarski, T. Mammoto, D. Zurakowski, M. Perretti, V. P. Sukhatme, A. Kaipainen, M. W. Kieran, S. Huang, and D. Panigrahy, “Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy,” *J. Exp. Med.*, vol. 215, no. 1, pp. 115–140, 2017.
- [192] S. Ramon, F. Gao, C. N. Serhan, and R. P. Phipps, “Specialized proresolving mediators enhance human B cell differentiation to antibody-secreting cells,” *J Immunol*, vol. 189, no. 2, pp. 1036–1042, 2012.
- [193] A. Planaguma, M. A. Pfeffer, G. Rubin, R. Croze, M. Uddin, C. N. Serhan, and B. D. Levy, “Lovastatin decreases acute mucosal inflammation via 15-epi-Lipoxin A4,” *Mucosal Immunol*, vol. 3, no. 3, pp. 270–279, 2010.
- [194] D. W. Cain and J. A. Cidlowski, “Immune regulation by glucocorticoids,” *Nat Rev Immunol*, vol. 17, no. 4, pp. 233–247, 2017.

Anhang

Materialverzeichnis

Chemikalien

Annexin V-FLUOS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Aqua dest.	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Lübeck, D
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid- Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Diff-Quik-Lösung	Medion Grifols Diagnostics, Düdingen, CH
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
FACS Clean	BDBioscience, Erembodegem, BEL
FACS Flow	BDBioscience, Erembodegem, BEL
FACS Rinse	BDBioscience, Erembodegem, BEL
FCS (fetal calf serum, fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
GM-CSF	Peprotech, Hamburg, D
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
HCl (Salzsäure), 25 %	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Lübeck, D
HEPES (Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure)-Puffer	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Histopaque 1119 (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer), Dichte von 1,119 g/ml bei 20°C	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, D
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Lymphozytenseparationsmedium 1077 (Polysucrose (Ficoll™) mit Natrium-Amidotrizoat), Dichte von 1,077 g/ml bei 20°C	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PBS, 1x (phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung)	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Lübeck, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Percoll™	GE Healthcare, München, D
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640-Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween 20	Serva, Amstetten, A

Medien und Puffer

HT-29-Zellkultur-Medium	500 ml DMEM, versetzt mit 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 10% hitzeinaktiviertes FCS
Leishmanien-Medium	500 ml RPMI, versetzt mit 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES-Puffer, 25 mM β-Mercaptoethanol, 5% hitzeinaktiviertes FCS
Leishmanien-Gefrier-Medium	500 ml RPMI, versetzt mit 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES-Puffer, 25 mM β-Mercaptoethanol, 20% hitzeinaktiviertes FCS
[MACS-]Binde-Puffer	PBS + 0,5 % BSA + 5 mM CaCl ₂ , pH-Adjustierung auf 6,5
[MACS-]Elutions-Puffer	PBS + 0,5 % BSA, pH-Adjustierung auf 6,5
RPMI-Komplettmedium - mit bzw. ohne Antibiotika	500 ml RPMI 1640-Medium, ergänzt durch 10 mM HEPES-Puffer, 50µM β-Mercaptoethanol, 10 % hitzeinaktiviertes FCS sowie 4 mM L-Glutamin, wahlweise versetzt mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

RPMI-Komplettmedium ohne FCS - mit bzw. ohne Antibiotika	500 ml RPMI 1640-Medium, ergänzt durch 10 mM HEPES-Puffer, 50 µM β-Mercaptoethanol sowie 4 mM L-Glutamin, wahlweise versetzt mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
---	---

Laborverbrauchsmaterialien

Cellstar Suspensionszellkulturplatte, 24-Loch	Greiner BioOne, Frickenhausen, D
Cellstar Zellkultur-Platten 6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch, Flachboden	Greiner BioOne, Frickenhausen, D
Cellstar Zellkultur-Platten, 96-Loch, Spitzboden	Greiner BioOne, Frickenhausen, D
Deckgläser, rund, 15 mm	Hecht-Assistent, Sondheim, D
FACS-Röhrchen (1,4 ml, U-Boden)	Micronic B.V., Lelystad, NL
FACS-Röhrchen (5 ml, U-Boden)	Becton Dickson, Heidelberg, D
Falcon-Röhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Kanülen BD Microlance™3, 27G und 30G	Becton Dickson, Heidelberg, D
LS-MACS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Objektträger Menzel	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Safety Multifly Kanülen-Set	Sarstedt, Nürmbrecht, D
S- Monovette 9ml Lithium/Heparin	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Spritzen (2, 5 ml)	Becton Dickson, Heidelberg, D
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, D

ELISA-Sets und MACS-Kit

Annexin V MicroBead Kit (130-090-201)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
LXA4 BioAssay™ (L2622-20)	United States Biological, Salem, USA
Parameter™ LTB4-Assay (KGE006B)	R&D Systems, Minneapolis, USA

Geräte und Software

<p>ELISA-Platten-Reader</p> <p>Photometer Tecan Sunrise™</p> <p>Magellan™ Software</p>	<p>Tecan, Männedorf, CH</p>
<p>Durchflusszytometer</p> <p>FACS-Calibur™ Durchflusszytometer</p> <p>CellQuest Pro™ Software</p>	<p>BD Biosciences, Heidelberg, D</p>
<p>Mikroskope</p> <p>Axiocam Hrc ((Digitale Mikroskopkamera)</p> <p>Axio Vision Rel. 4.8-Software</p> <p>Axioskop 40</p> <p>Axiovert 25</p>	<p>Carl Zeiss, Jena, D</p>
<p>Pipetten</p> <p>Accu-Jet Pipettierhilfe</p> <p>Kolbenhubpipetten (0,5 µl - 1000 µl)</p> <p>Mehrkanalpipette (Pelpette, 50 µl)</p> <p>Mehrkanalpipette (Transferpette-8, 10 – 100 µl)</p> <p>Mehrkanalpipette (10 - 100 µl)</p> <p>Mehrkanalpipette (20 - 200 µl)</p> <p>Multipipette</p>	<p>Brand, Wertheim, D</p> <p>Eppendorf, Hamburg, D</p> <p>Peqlab, Erlangen, D</p> <p>Brand, Wertheim, D</p> <p>Eppendorf, Hamburg, D</p> <p>Brand, Wertheim, D</p> <p>Eppendorf, Hamburg, D</p>
<p>Weiteres</p> <p>CO₂-Brutschrank, Forma Series II Water Jacket</p> <p>Eismaschine</p> <p>MACS-Magnet: MidiMACS-Seperator</p>	<p>Thermo Scientific, Braunschweig, D</p> <p>Ziegra, Isernhagen, D</p> <p>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D</p>

Magnetrührer MR 3003	Heidolph, Schwabach, D
Minishaker MS2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Neubauer Improved Zählkammer	Karl Hecht, Sondheim, D
Software GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Vortex-Schüttler	Heidolph, Schwabach, D
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, D
Werkbank Clean Air EF A6, EN 12469	Telstar Laboratory Equipment (früher CleanAir), Wörden, NL
Zentrifugen	
Cytospin 3 Zentrifuge	Shandon, Frankfurt, D
Megafuge 2.0	Heraeus, Langenselbold, D
Megafuge R 40	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Langenselbold, D
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Multi-Spin MSC-3000	Lab4You GmbH, Berlin, D

Danksagung

Für das hervorragende Rahmenprogramm und die damit einhergehende finanzielle Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft möchte ich mich bei der IRTG 1911 und insbesondere bei Dr. rer. nat. Julia Figge und Prof. Dr. med. Jörg Köhl bedanken. Ohne ihr stetes Engagement wäre die Universität um einen tollen Projektverbund, eine wichtige Austauschplattform und vielfältige Möglichkeiten für junge Forschende ärmer. Weiterhin gilt mein Dank dem ehemaligen Leiter des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach, sowie seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. Jan Rupp, unter deren wohlwollender Schirmherrschaft diese Arbeit entstand. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Tamás Laskay für die familiäre Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Begeisterung für das Feld der neutrophilen Granulozyten, die vielen fachlichen Ratschläge und den positiven Geist, den er mir mit auf den Weg gegeben hat. Auch möchte ich mich für den Vertrauensvorschuss bedanken, der mir eine Umstrukturierung des Projekts nach eigenen Vorstellungen nach Wegfall des US-amerikanischen Partners ermöglicht hatte. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die gute Atmosphäre, den kollegialen Umgang und die vielfältige Unterstützung, die mir durch sie zuteilwurde. Für ihre Hilfe im Labor möchte ich insbesondere Sonja Möller danken. Herrn Professor Dr. rer. nat. Ulrich Schaible danke ich für die Betreuung als Zweitmentor und die massenspektrometrische Validierung einzelner Proben im Forschungszentrum Borstel. Frau Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke König danke ich für die statistische Beratung. Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Christian Sina für die Bereitstellung der HT-29-Zelllinie und Herrn Prof. Dr. John Stephen Dumler (MD) von der University of Maryland (Baltimore, Maryland, USA) für die Bereitstellung des *A. phagocytophilum*-Stamms sowie der dazugehörigen Antikörper zur immunohistologischen Detektion. Auch möchte ich mich bei den zahlreichen Blutspendern für ihre „großzügigen Spenden“ bedanken, ohne die diese Experimente nicht realisierbar gewesen wären.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Maria und Alois, meinen Brüdern Jan und Felix sowie meiner Lebenspartnerin Gyde für ihre allgegenwärtige Unterstützung und guten Gedanken danken. Vielen, vielen Dank!

Lebenslauf

Michael Plagge

Geboren am 11.07.1990 in Eckernförde

Kontakt: michaelplagge@web.de



STUDIUM

2009-2016	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck, Abschluss des Staatsexamens mit Note 1,66
2013 und 2017	Jeweils einzelne Promotionssemester, Universität zu Lübeck
Praktisches Jahr	Innere Medizin, DRK-Krankenhaus Ratzeburg-Mölln
2015-2016	Chirurgie, Spital Uster (Lehrspital d. Universität Zürich), Schweiz Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Famulaturen	Pneumologie - St. Josefskrankenhaus, Freiburg im Breisgau Innere Medizin - Imland-Klinik, Eckernförde Kinder- u. Jugendmedizin, Prof. Dr. Schultz/ Dr. Parlowsky, Lübeck Allg. Chirurgie - Universitätsklinikum S.-H., Campus Lübeck Geriatric - DRK-Krankenhaus, Lübeck
Promotion	
04 / 2013	Beginn der Dissertationsarbeit im Rahmen des Projektverbundes <i>International Research Training Group 1911</i> der DFG
06 - 07 / 2013	Ausstieg des US-Kooperationspartners in Cincinnati, Restrukturierung des Projekts entsprechend lokaler Ressourcen
bis 08 / 2017	Ausarbeitung der Zellkultur-Experimente während zweier Promotionssemester und der Semesterferien
Tutoriat	Begleitung des Präparierkurses der makroskopischen Anatomie

SCHULBILDUNG und EHRENAMT

2014	Leiter des 17-tägigen Kurses „Volkskrankheiten“ an der Deutschen SchülerAkademie
2010	10-tägige Vollzeit-Betreuung von Muskeldystrophie-Betroffenen bei der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V.
2000 - 2009	Gymnasium Herderschule, Rendsburg Abitur mit Note 1,2
2005	Bilat. Austausch mit der Lancaster Royal Grammar School, UK
2006 und 2008	Teilnehmer der JuniorAkademie S.-H./HH bzw. der Deutschen SchülerAkademie (nationale Begabtenförderungsprogramme)

STIPENDIEN

2013 und 2017	Je halbjährliches DFG-Stipendium im Rahmen der IRTG-1911
2014-2016	Online-Stipendium e-fellows.net

Publikationen und Kongressbeiträge

- Michael Plagge und Tamás Laskay, “Early production of the neutrophil-derived lipid mediators LTB₄ and LXA₄ is modulated by intracellular infection with *Leishmania major*”, *Biomed Research International*, Oktober 2017
- Poster-Präsentation „Intrazelluläre Erreger modulieren die Freisetzung von Entzündungsbotenstoffen durch neutrophile Granulozyten“, Uni im Dialog, Lübeck, Juni 2017
- Vorstellung eigener Daten im Vortrag „Intracellular pathogens modulate the release of neutrophil-derived lipid mediators” beim *International Retreat* der IRTG1911/ SPP MIA, Neumünster, 13.-16. November 2013