

Die Rolle des C-Typ-Lektins Dectin-1 im murinen Modell der experimentellen Leishmaniose

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nicole Zimara
aus Schwandorf

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. W. STREIT
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. J. CLOS
Tag der Disputation: 6. September 2013

Hamburg, den 11. September 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Diese Arbeit wurde zwischen Juli 2010 und Juni 2013 sowohl unter der Anleitung und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Ritter am Institut für Immunologie der Universität Regensburg, als auch in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Clos am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Joachim Clos

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Parasitologie
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Biozentrum Klein Flottbek, Mikrobiologie
Ohnhorststraße 18, 22609 Hamburg

Danksagung

Nun ist es fast geschafft. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle herzlichst bei all jenen bedanken, die mich in den vergangenen drei Jahren unterstützt haben, mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich wieder aufbauten, falls es doch einmal notwendig war.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Joachim Clos für die bereitwillige und kompetente Betreuung dieser Arbeit bedanken. Ebenso herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Streit bedanken für die Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Betreuer, Prof. Dr. Uwe Ritter, für die Vergabe dieses interessanten Themas und die Bereitstellung aller notwendigen Mittel. Lieber Uwe, Deine hilfreichen Anregungen, konstruktiven Diskussionen und Dein stets offenes Ohr bei Problemen waren von unschätzbarem Wert und haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch bei Max Schmid möchte ich mich bedanken für die stets gute Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe. Ebenso möchte ich mich beim Rest meiner Laborkollegen, Dominic Schmid, Thi-Thu-Trang Nguyen und Karin Holz für das gute Arbeitsklima bedanken. An dieser Stelle gilt mein Dank auch Sarina Männich, die in den letzten Wochen die Genotypisierungen meiner Mäuse für mich übernommen hat.

Dr. Bernd Lepenies und Prof. Dr. Gordon Brown danke ich dafür, dass Sie mir wichtige Mittel für meine Arbeit zur Verfügung gestellt haben. PD Dr. Richard Weiss danke ich für die Durchführung der Zytokinmessungen.

Dem gesamten Institut für Immunologie bin ich dankbar dafür, dass Sie mich auf verschiedenste Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben, sei es bei auftretenden Problemen in praktischer Hinsicht, oder durch konstruktive Diskussionsbereitschaft während meiner Seminare.

Ohne die wichtigsten Menschen in meinem Leben würde ich jetzt nicht die letzten Sätze dieser Arbeit schreiben. Meine Eltern und mein Bruder Tobias, die Zeit meines Lebens hinter mir standen, mich unterstützen wo es Ihnen möglich war und mir den Rücken frei hielten, wenn es nötig war. Ohne euch wäre all dies nicht möglich gewesen. Und Wolfgang, der gerade in den letzten Wochen all meine Launen, Nörgeleien, Hochs und Tiefs ertragen hat und trotzdem immer wieder Worte der Aufmunterung fand. Du warst mir solch eine große Stütze. Ich danke Euch aus tiefstem Herzen für alles, was Ihr für mich getan habt.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
1. Das Immunsystem.....	1
1.1 Das angeborene Immunsystem.....	1
1.2 Das adaptive Immunsystem.....	3
1.3 Dendritische Zellen.....	4
1.3.1 Antigenpräsentation durch dendritische Zellen.....	5
1.3.2 T-Zellaktivierung durch dendritische Zellen.....	7
1.3.3 C-Typ-Lektin-Rezeptoren.....	9
1.3.4 DC-vermittelte Vakzinierungsstrategien.....	11
2. Die Leishmaniose.....	12
1.4 Die Parasiten der Gattung <i>Leishmania</i> spp.	12
1.4.1 Taxonomie.....	12
1.4.2 Lebenszyklus.....	13
1.5 Die Leishmaniose des Menschen.....	14
1.5.1 Kutane Leishmaniose (CL).....	15
1.5.2 Mukokutane Leishmaniose (MCL).....	16
1.5.3 Viszerale Leishmaniose (VL).....	16
1.5.4 Therapiemöglichkeiten der Leishmaniose.....	17
1.5.5 Das experimentelle Modell der Leishmaniose.....	18
1.5.6 Die Immunantwort gegen <i>Leishmania major</i>	19
1.5.7 Die Rolle dendritischer Zellen im experimentellen Modell der Leishmaniose..	20
3. Ziel der Arbeit.....	22
II. Material und Methoden.....	23
1. Material.....	23
1.1 Enzyme, Reagenzien und Chemikalien.....	23
1.2 Laborausstattung	25
1.3 Verbrauchsmaterialien.....	26
1.4 Puffer und Medien.....	27
1.5 Antikörper und Detektionsreagenzien.....	29
1.6 Oligonukleotide.....	30
1.7 Software.....	31
1.8 Mausstämme und Leishmanien-Stamm.....	31
1.8.1 Mäuse.....	31
1.8.2 Leishmanien.....	32
2. Methoden.....	32
2.1 Zellbiologische Methoden.....	32
2.1.1 Gießen von Blutagarplatten	32
2.1.2 Leishmanien-Kultur.....	33

2.1.3	Aufreinigung von <i>Leishmania major</i>	34
2.1.4	Herstellung von Leishmanien-Antigen.....	34
2.1.5	Zellzählung.....	34
2.1.6	Blutentnahme und Gewinnung von Seren.....	35
2.1.7	Herstellung von GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand.....	35
2.1.8	Generierung von Knochenmark-DC (BMDC).....	36
2.1.9	Isolierung von Zellen aus Lymphknoten und Milzen.....	36
2.1.10	Isolierung von Zellen aus Mauspfoten.....	37
2.1.11	Anreicherung von Zellen durch magnetische Zellsortierung (MACS).....	37
2.1.12	Markierung von Zellen mit CFSE.....	38
2.1.13	Markierung von <i>Leishmania major</i> mit CFSE.....	39
2.1.14	Stimulation von Lymphknotenzellen.....	39
2.1.15	T-Zell-Proliferationsassay.....	40
2.1.16	Durchflusszytometrie (FACS).....	41
2.1.17	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	43
2.1.18	Nachweis der Expression von C-Typ-Lektin-Liganden auf <i>Leishmania major</i> ...	45
2.2	Tierversuche.....	46
2.2.1	Infektion, Messung der Schwellung und DTH-Reaktion.....	46
2.2.2	<i>In vivo</i> Proliferationsnachweis während einer <i>Leishmania</i> -Infektion.....	47
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	48
2.3.1	DNS-Gewinnung aus Gewebeproben.....	48
2.3.2	RT-PCR zur Parasitendichtebestimmung.....	48
2.3.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	50
2.3.4	Analyse der PCR-Produkte.....	51
2.4	Statistik.....	51
III. Ergebnisse.....		52
1.	Untersuchungen zur Expression des C-Typ-Lektin – Rezeptors Dectin-1 nach Infektion mit <i>L. major</i>	53
1.1	<i>In vivo</i> - Untersuchungen zur Expression von Dectin-1 auf DCs.....	53
1.2	<i>In vitro</i> - Untersuchungen zur Expression von Dectin-1 auf BMDCs.....	56
2.	Funktionelle Untersuchungen zur Rolle des C-Typ-Lektin – Rezeptors Dectin-1 im experimentellen Modell der Leishmaniose.....	59
2.1	Der Effekt von β -Glucan auf infizierte BMDCs.....	60
2.2	<i>In vivo</i> – Studien zur Rolle von Dectin-1 im experimentelle Modell der Leishmaniose.....	69
3.	Parasitologische Untersuchungen zur Expression von C-Typ-Lektin – Liganden auf <i>Leishmania major</i>	88
IV. Diskussion		
1.	Die Infektion mit <i>L. major</i> steigert die Anzahl Dectin-1 ⁺ dendritischer Zellen Am Ort der Infektion und im drainierenden Lymphknoten.....	94

2. Curdlan induziert die Reifung von DCs, wodurch die T-Zellproliferation jedoch nicht beeinflusst wird.....	96
3. Curdlan führt in BALB/c – Mäusen zu einer Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung der Th1-vermittelten Immunantwort im experimentellen Modell der Leishmaniose.....	100
4. Das C-Typ-Lektin Dectin-1 spielt eine Rolle bei der Übermittlung der durch Curdlan induzierten Effekte.....	106
5. Curdlan in Verbindung mit Leishmanienantigenen führt zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf nach Infektion.....	107
6. <i>Leishmania major</i> unterscheiden sich anhand der Expression von C-Typ-Lektin Liganden.....	109
7. Ausblick.....	110

V. Zusammenfassung/Abstract..... 111

VI. Literaturverzeichnis..... 115

VII. Anhang..... 128

1. Abbildungsverzeichnis.....	128
2. Tabellenverzeichnis.....	128
3. Abkürzungsverzeichnis.....	129
4. Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Manuskripte.....	134
5. Präsentationen.....	134
6. Auszeichnungen.....	134
7. Eidesstattliche Versicherung.....	135

I. Einleitung

1. Das Immunsystem

Die Umwelt enthält viele Stoffe, welche für einen Organismus potentiell gefährlich sein können. Hierzu zählen vor allem Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze. Schaffen es die Mikroben einzudringen können Infektionen die Folge sein, die zu einer Schwächung des Wirtes bis hin zu dessen Tod führen. Deshalb haben bereits entwicklungsgeschichtlich sehr alte Tiere, wie z.B. Seesterne, einen Mechanismus entwickelt, bei dem spezialisierte Zellen eingedrungene Fremdkörper oder Erreger aufnehmen und beseitigen. Diesen Vorgang nennt man Phagozytose. Er ist Teil des angeborenen Immunsystems und in der Erbinformation verankert (Beck and Habicht, 1996). Höher entwickelte Organismen, wie der Mensch, besitzen zwei voneinander abhängige Systeme, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Während das angeborene Immunsystem darauf ausgelegt ist, schnell und antigenunspezifisch zu reagieren, setzt die Antwort des adaptiven Immunsystems erst nach wenigen Tagen, dafür jedoch spezifisch für das zu eliminierende Pathogen, ein. Ein spezieller Zelltyp, die sog. dendritischen Zellen, dient dabei als „Brücke“ zwischen den beiden Systemen. Außerdem kann das adaptive Immunsystem ein sog. immunologisches Gedächtnis ausbilden. Um eine adaptive Immunreaktion etablieren zu können, spielt bereits das angeborene Immunsystem eine zentrale Rolle (Alberts et al., 2002; Charles A Janeway et al., 2001). Nachfolgend soll auf die beide Teile des Immunsystems näher eingegangen werden.

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem setzt sich aus mehreren verschiedenen Komponenten zusammen. Die Haut bildet dabei eine erste mechanische Barriere, welche das Eindringen von Krankheitserregern in einen Organismus verhindert (Bangert et al., 2011). Wird diese Barriere überwunden, etwa durch Verletzungen, Bisse oder Stiche von Insekten, bleibt dem

Organismus ein kurzes Zeitfenster, um die eingedrungenen Krankheitserreger zu eliminieren, bzw. in Schach zu halten. Spezialisierte Zellen myeloiden Ursprungs, sogenannte Phagozyten, zu denen unter anderem neutrophile Granulozyten und Makrophagen gehören, nehmen die Keime durch Phagozytose auf. Durch die Induktion von Stickstoffmonoxid-Synthasen (iNOS; *inducible Nitric Oxide Synthase*) und die Aktivierung verschiedener Enzyme, wie Proteasen und Lipasen, werden die Pathogene dann beseitigt.

Um zwischen körpereigenen und fremden Zellen unterscheiden zu können, besitzen die Immunzellen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Mustererkennungsrezeptoren, engl. *pattern recognition receptor*, PRR), welche die konservierten Strukturen der Pathogene (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, engl. *pathogen associated molecular pattern*, PAMP) erkennen (Serezani et al., 2012). Weitere Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind die Mastzellen, die von lymphoiden Vorläuferzellen abstammenden natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und antimikrobielle Peptide (AMP). Die NK-Zellen wirken zytotoxisch auf Pathogene indem sie z.B. nach der Interaktion von CD95 (Fas) mit CD95L (Fas-Ligand) auf der Zielzelle Granulae freisetzen, was zur Zerstörung deren Membranintegrität führt und schlussendlich die Apoptose bewirkt. Zu den AMPs zählt man unter anderem die Defensine, Cathelicidine und Chemokine, deren antimikrobielle Wirkung erst später entdeckt wurde. Außerdem gibt es die Bestandteile des Komplementsystems, welche hauptsächlich im Blut vorkommen. Es handelt sich dabei um Proteine, deren Hauptaufgabe es ist, an Pathogene zu binden und sie somit für die Zellen des Immunsystems zu markieren (Opsonisierung). In der Leishmaniose sind dabei besonders die Komplementfaktoren C3bi und C3b von Bedeutung (Stebut, 2007). Außerdem können Proteine des Komplementsystems auf der Oberfläche von Krankheitserregern porenbildende Komplexe bilden und somit die Lyse der Erreger bewirken. Ebenfalls lytisch wirkt das Enzym Lysozym, welches in Speichel und Tränenflüssigkeit vorhanden ist (Brogden, 2005; Guerra et al., 2012; Kenshi and Richard, 2008; Metcalfe et al., 1997). Des Weiteren gehört die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen zu den elementaren Funktionen des angeborenen Immunsystems. Zusammengefasst besteht in Säugetieren die Aufgabe des angeborenen Immunsystems darin, eingedrungene Krankheitserreger zu eliminieren und, falls dies nicht gelingt, deren Vermehrung und Verbreitung zu unterdrücken, so lange bis das adaptive Immunsystem in der Lage ist die Pathogene zu bekämpfen.

1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem dauert es beim adaptiven Immunsystem länger, bis eine Immunreaktion statt findet. Allerdings zeichnet diese sich durch Antgenspezifität sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Die für die Funktionalität der adaptiven Immunität wichtigen Lymphozyten, die T- und B-Zellen, werden im Knochenmark aus pluripotenten Vorläuferzellen gebildet (Abramson et al., 1977; Lemischka et al., 1986). Während die Reifung der B-Zellen auch in diesem primären lymphatischen Organ stattfindet, wandern die T-Zellen in den Thymus und reifen dort (Gill et al., 2003). Die sekundären lymphatischen Organe, wie Milz oder Lymphknoten, stellen dagegen die Orte der Antigenpräsentation dar und sind somit von großer Bedeutung für die Induktion einer adaptiven Immunantwort.

Jede T- und jede B-Zelle besitzt auf ihrer Oberfläche T-Zell -, bzw. B-Zellrezeptoren, wobei sich alle Rezeptoren, die von einer Zelle exprimiert werden, durch dieselbe Antgenspezifität auszeichnen. Durch die große Anzahl an Lymphozyten ist das Immunsystem folglich in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlichster Antigene spezifisch zu erkennen. Der T-Zell-Rezeptor ist zusätzlich mit einem sog. Korezeptor assoziiert, CD4 oder CD8, welcher für eine effektive Immunantwort wichtig ist (Janeway Jr., 1989). Je nachdem, welchen Korezeptor eine T-Zelle exprimiert bezeichnet man sie als CD4⁺ T-Zelle oder zytotoxische CD8⁺ T-Zelle. CD4⁺ und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen bilden den zellvermittelten Teil einer adaptiven Immunantwort. Die Aufgabe der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen besteht hauptsächlich darin, virusinfizierte Zellen abzutöten und damit ein Voranschreiten der Infektion zu verhindern (Ge et al., 2012). Von den CD4⁺ T-Zellen unterscheidet man anhand des Zytokinprofils nach Aktivierung weiterhin zwei Subtypen. Die CD4⁺ T-Zellen Typ-1 (Th1-Zellen) schütten überwiegend pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL) -12, Interferon (IFN) - γ oder Tumornekrosefaktor (TNF) aus (Viriyakosol et al., 2013; Zhu and Paul, 2010). Somit dient auch dieser Zelltyp der Beseitigung intrazellulärer Pathogene (Mosmann and Coffman, 1989). T-Helferzellen vom Typ-2 (Th2-Zellen) exprimieren überwiegend IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Zhu and Paul, 2010). Diese Zytokine regen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern an, die extrazelluläre Pathogene spezifisch erkennen, an diese binden und somit opsonisieren.

Folglich beeinflussen Th2-Zellen überwiegend den humoralen Teil des Immunsystems, der auf der Sezernierung von Antikörpern beruht.

Daneben unterscheidet man noch die regulatorischen T-Zellen (Treg), welche der Suppression und damit Regulation einer Immunantwort dienen, sowie IL-17 exprimierende T-Zellen (Th17-Zellen), welche speziell bei der Abwehr von Bakterien und Pilzen von Bedeutung sind (Zhu and Paul, 2008).

Naive Lymphozyten rezirkulieren ständig in den lymphatischen Organen. Liegt im Organismus eine akute Infektion vor, wird ihnen in diesen Geweben, wie oben bereits erwähnt, von den dendritischen Zellen Antigen präsentiert. Diese Zellen werden folglich antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cell*, APC) genannt. Monozyten / Makrophagen, aber auch B-Zellen können Antigene präsentieren und gehören zu den sogenannten „professionellen antigenpräsentierenden Zellen“, jedoch sind es die dendritischen Zellen, welche in besonderem Maße dazu fähig sind und somit ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem darstellen (Charles A Janeway et al., 2001).

1.3 Dendritische Zellen

1973 entdeckte Ralph M. Steinman in der murinen Milz einen neuen Zelltyp, welcher sich morphologisch durch die Ausbildung zytoplasmatischer Fortsätze von anderen Zellen unterschied. Deshalb nannte er diesen Zelltyp „dendritische Zelle“ (*dendritic cell*, DC) (Steinman and Cohn, 1973). Heute weiß man, dass es sich bei den DCs um einen sehr heterogenen Zelltyp handelt was sowohl die Lokalisation, als auch die Funktion sowie die Expression von Oberflächenmolekülen betrifft. So gibt es DCs in der Haut, in den lymphoiden Organen, der Lunge, der Leber, den Nieren und in Schleimhäuten (Liu and Nussenzweig, 2010). Dort suchen sie das Gewebe nach eingedrungenen Pathogenen ab, nehmen diese durch Phagozytose auf, wandern zu den sekundären lymphatischen Organen und präsentieren dort das Antigen den T-Zellen (Banchereau et al., 2000). $CD8\alpha^+$ DCs sind zudem zur sog. Kreuzpräsentation fähig, ein Vorgang auf den im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer eingegangen werden wird. $CD8\alpha^-$ DCs dagegen dienen hauptsächlich der regulären

Antigenpräsentation (Liu and Nussenzweig, 2010). Im Gegensatz zu T- und B-Zellen gibt es keinen Oberflächenmarker, mit dessen Hilfe DCs eindeutig charakterisiert werden können, jedoch wird häufig die Expression von CD11c und MHC (*major histocompatibility complex*; Haupthistokompatibilitätskomplex) Klasse-II zur Identifizierung herangezogen (Banchereau et al., 2000; Liu and Nussenzweig, 2010).

1.3.1 Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

Mehrere Faktoren sprechen dafür, dass DCs zu den effektivsten antigenpräsentierenden Zellen gehören. Unreife DCs sind zum einen in der Lage, Pathogene durch Phagozytose aufzunehmen. Durch Makropinozytose kontrollieren sie zudem die extrazellulären Flüssigkeiten auf das Vorhandensein von Partikeln und Mikroben (Charles A Janeway et al., 2001; Steinman and Swanson, 1995). Sie exprimieren Rezeptoren, die in der Keimbahn kodiert sind und zu den Mustererkennungsrezeptoren gehören. Zu diesen PRRs zählen unter anderem die *scavenger*-Rezeptoren, *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-ähnliche Rezeptoren (NLR), RIG (*retinoic acid inducible gene*)-1-ähnliche Rezeptoren (RLR), der Fcγ- und Fcε-Rezeptor und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR) (Banchereau and Steinman, 1998; Diebold, 2009; Hardison and Brown, 2012;). Das Binden eines Liganden an einen dieser Rezeptoren führt zur Endozytose des Erregers. Auf die C-Typ-Lektin-Rezeptoren soll jedoch im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch ausführlicher eingegangen werden.

Die Aufnahme eines Antigens bewirkt die Reifung einer bisher unreifen DC zu einer APC (Charles A Janeway et al., 2001). Hierfür werden jedoch auch weitere Stimuli in Form von Zytokinen, wie TNF, IL – 6 oder IL-1β benötigt (Li et al., 2012). Zugleich exprimieren die Zellen dann vermehrt kostimulatorische Moleküle die für die T-Zellaktivierung wichtig sind, (z.B. CD40, CD80 und CD86). Außerdem reduzieren sie die Expression von Mustererkennungsrezeptoren sowie Adhäsionsmolekülen bei gleichzeitiger Induktion des Chemokin-Rezeptors CCR7. All dies trägt dazu bei, dass die Zellen in der Lage sind zu den sekundären lymphatischen Organen zu wandern (Banchereau et al., 2000; Burdek et al., 2010). Damit das Antigen dort den T-Zellen präsentiert werden kann, muss es an Moleküle

des MHC Klasse-I oder des MHC Klasse-II gebunden sein. Normalerweise werden Peptide, die von extrazellulären Pathogenen stammen, auf MHC Klasse-II präsentiert. Nach der Aufnahme in die Zelle durch Phagozytose gelangen die Erreger in ein Phagosom, dessen pH-Wert daraufhin im Zuge der Reifung sinkt. Durch die Verschmelzung des Phagosoms mit Lysosomen gelangen saure Proteasen und andere Enzyme in das Phagolysosom. Die Pathogenproteine werden in Peptidfragmente gespalten, welche die optimale Größe und Struktur zur Bindung auf dem MHC Klasse-II-Molekül besitzen. Neu synthetisierte MHC Klasse-II - Moleküle verlassen das endoplasmatische Retikulum (ER) in Vesikeln, welche mit dem Phagolysosom verschmelzen, so dass die Beladung mit den prozessierten Peptidfragmenten erfolgen kann. Ist der MHC Klasse-II / Peptidkomplex an die Zelloberfläche gelangt, so kann er von naiven $CD4^+$ T-Zellen erkannt werden (Charles A Janeway et al., 2001).

Intrazelluläre Krankheitserreger werden dagegen in der Regel auf MHC Klasse-I-Molekülen präsentiert. Dazu müssen sie zunächst durch das Anfügen von Ubiquitinresten zum Verdau durch ein Proteasom markiert werden. Der *transporter associated with antigen processing* (TAP) transportiert die Fragmente in das ER, wo sie auf neu synthetisierte MHC Klasse-I-Moleküle geladen werden. Diese MHC Klasse-I / Peptidkomplexe werden dann an die Zelloberfläche geschleust und das Antigen kann zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen präsentiert werden (Lin et al., 2008; Villadangos and Schnorrer, 2007).

Vieles spricht dafür, dass es noch einen weiteren Weg geben muss, durch welchen auch gegen extrazelluläre Pathogene und Tumorzellen eine spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort ausgelöst werden kann. Durch diesen Prozess, welcher Kreuzpräsentation (*cross presentation*) genannt wird, gelangen die Peptide dieser Keime bzw. der entarteten Zellen in den MHC Klasse-I-Präsentationsweg. Aktuell ist noch nicht endgültig geklärt, wie dies funktionieren könnte. Vermutlich ist der Mechanismus jedoch sowohl vom Antigen als auch von der APC abhängig. (Segura and Villadangos, 2011; Villadangos and Schnorrer, 2007).

Zu beachten bleibt jedoch, dass die Präsentation von Antigenen auf MHC-Molekülen zur Einleitung einer adaptiven Immunantwort nicht ausreicht. Es sind weitere Signale notwendig, welche über die ebenfalls auf APCs exprimierten kostimulatorischen Moleküle, wie CD40, CD80 und CD86, gegeben werden. Im folgenden Kapitel soll auf diese Moleküle noch genauer eingegangen werden.

1.3.2 T-Zellaktivierung durch dendritische Zellen

Es gibt verschiedene DC-Subtypen, welche sich durch ihre Lokalisation, ihre Funktion und nicht zuletzt ihre Expression intra- und extrazellulärer Moleküle unterscheiden, zu denen auch die C-Typ-Lektine gehören. Dennoch geht man davon aus, dass alle DCs von einer gemeinsamen hämatopoetischen, pluripotenten Stammzelle abstammen. Diese bildet Vorläuferzellen, welche schließlich zu den DC-Subtypen differenzieren (Kushwah and Hu, 2011). Die für die vorliegende Arbeit relevanten DCs lassen sich allgemein in plasmazytoide DCs (pDCs) und konventionelle (*conventional*) DCs (cDC) einteilen. Die pDCs zeichnen sich unter anderem durch die Expression von CD11c sowie Ly6C und Gr1 aus (Okada et al., 2003; Shortman and Liu, 2002). Eine wichtige Aufgabe der plasmazytoiden DCs ist die Produktion von Typ-I (IFN- α , IFN β)- sowie Typ-III (IFN- λ)- Interferonen, die antivirale Aktivität besitzen (Ank et al., 2008; Lynch et al., 2013). Konventionelle DCs werden in zwei Gruppen eingeteilt. Diejenigen, welche über den Blutkreislauf in Milz, Thymus und Lymphknoten gelangen, werden als *blood derived* bezeichnet. Von ihnen unterscheidet man weiterhin CD8 α^+ CD4 $^-$, CD8 α^- CD4 $^-$ und CD8 α^- CD4 $^+$ (Villadangos and Heath, 2005; Villadangos and Schnorrer, 2007). DCs, welche ausschließlich in den Haut-drainierenden Lymphknoten vorkommen bezeichnet man dagegen als *skin derived*, da diese aus der Haut in das sekundäre Lymphorgan eingewandert sind (Segura et al., 2012). Zu ihnen gehören sowohl die CD11c $^+$ Langerin $^+$ Langerhans-Zellen (*Langerhans cells*, LC), die in der Epidermis und subkutanen Lymphknoten zu finden sind, als auch die dermalen dendritischen Zellen (dDCs). Die dDCs wiederum werden in CD11c $^+$ Langerin $^+$ als auch in CD11c $^+$ Langerin $^-$ dDCs weiter unterteilt (Turley et al., 2010; Villadangos and Schnorrer, 2007).

Damit eine T-Zellantwort durch DCs induziert werden kann, muss die APC zunächst aktiviert werden. Dafür exprimiert die Zelle Mustererkennungsrezeptoren auf ihrer Oberfläche, die an pathogenassoziierte molekulare Muster binden, welche sich auf der Oberfläche von Krankheitserregern befinden (vgl. I. 1.3.1). Auf diese Art der Rezeptoren soll jedoch im nächsten Kapitel genauer eingegangen werden.

Zur umfassenden Aktivierung einer T-Zelle muss diese von einer aktivierten DC mehrere Signale erhalten, welche die antigenspezifische klonale Expansion sowie die Differenzierung zu einer Effektorzelle einleiten. Nachdem der T-Zellrezeptor einen passenden Peptid / MHC-

Komplex auf der Oberfläche einer antigenpräsentierenden DC erkannt hat (Signal 1) ist es wichtig, dass auch das zweite Signal erfolgt, da es sonst zu Anergie, Deletion oder Induktion regulatorischer Mechanismen und damit zur Inaktivierung der T-Zelle kommt (Joffre et al., 2009; Schwartz, 2003). Dieses zweite Signal wird durch eine Reihe kostimulatorischer Moleküle gegeben, wobei die Bindung von CD28 auf den T-Zellen an seine Liganden CD80 und CD86 auf den APCs eines der wichtigsten darstellt (Hutloff, 2011). Das dritte Signal besteht aus Zytokinen, die von der DC ausgeschüttet werden. Durch Sezernierung verschiedener Zytokinprofile können die APCs die Entwicklung der T-Zelle zu einem bestimmten Typ Effektorzelle und somit auch die Immunantwort steuern. IL-12, IL-18 und IFN- α fördern beispielsweise die Entwicklung CD4⁺ Th1-Zellen. Wird dagegen IL-6 und IL-10 sezerniert, kommt es zur Polarisierung in Richtung Th2-Zelle (Joffre et al., 2009; Reis e Sousa, 2006). Um sicherzustellen, dass die T-Zelle all diese Signale erhält, formt sich eine sog. immunologische Synapse (IS). Unmittelbar nach dem ersten Zell-Zellkontakt zwischen APC und T-Zelle bildet sich ein Mikrocluster (MC). Darin werden die Moleküle des T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR) – Signalweges in räumliche Nähe mit jenen des CD28 – Signalweges gebracht. Dies ist von Bedeutung, da CD28 als Rezeptor für die auf den aktivierten APCs exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 dient. Durch Translokation und Akkumulierung dieser MCs beginnt sich dann eine IS zu formieren. Im Zentrum der IS befinden sich das zentrale supramolekulare Aktivierungscluster (*central supramolecular activation cluster*, cSMAC), welches nun überwiegend aus den TCR / MHC – Komplexen besteht. Um das cSMAC bildet sich das periphere SMAC (pSMAC), welches Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Integrine, enthält. Es stellt die Aufrechterhaltung des Zellkontaktes sicher. Das distale SMAC (dSMAC) befindet sich im äußersten Bereich der IS und besteht überwiegend aus Aktin (Angus and Griffiths, 2013; Grakoui et al., 1999; Klammt and Lillemeier, 2012; Thauland and Parker, 2010). Die Funktion der IS besteht in der Regulierung der Lymphozytenaktivierung, der Präsentation von Antigenen auf APCs sowie der zielgerichteten Sekretion von Zytokinen oder lysierenden Granulae (Davis and Dustin, 2004).

1.3.3 C-Typ-Lektin-Rezeptoren

Die Gruppe der CLRs sind sehr vielfältige Rezeptoren, die in ihrer Funktion als PRR verschiedenste Liganden binden können. Ligandenbindung führt zu Phagozytose, mikrobizider Aktivität oder Veränderungen des Transkriptoms der Zelle (Kerrigan and Brown, 2009; Robinson et al., 2006). Auf diese Weise sind APCs in der Lage, effektiv eine Immunantwort zu induzieren. Zu den CLRs gehören auch Moleküle, die eine *C-type lectin-like domain* (CTLD) besitzen. Unter einer CTLD versteht man ein konserviertes Motiv, das in Vertebraten der Ca^{2+} -abhängigen Bindung von Kohlehydraten dient. Deshalb werden sie auch *carbohydrate recognition domain* (CRD) genannt (Drickamer, 1999; Vazquez-Mendoza et al., 2013a). Allerdings haben nicht alle CTLDs Kohlehydrate als Liganden, auch Lipide oder Proteine zählen zu den möglichen Bindungspartnern, und es wird auch nicht immer Ca^{2+} zur Bindung des Liganden benötigt. So erkennen die C-Typ-Lektine (*lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1* (Lox-1) oder *DC, NK lectin group receptor-1* (DNGR-1) hauptsächlich veränderte oder zerstörte körpereigene Strukturen (Kerrigan and Brown, 2011; Sattler et al., 2012), *macrophage-inducible C-type lectin* (Mincle) und *DC-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN) binden sowohl körperfremde als auch eigene Liganden (Erbacher et al., 2009; Kerrigan and Brown, 2011), wohingegen *dendritic-cell-associated C-type lectin* (Dectin) -1 und Dectin-2 als klassische PRRs bezeichnet werden, da sie die PAMPs auf Mikroben erkennen (Vazquez-Mendoza et al., 2013).

Dectin-1, der wichtigste Rezeptor für β -1,3-Glucan auf myeloiden Zellen, ist ein Phagozytoserezeptor, welcher in Mäusen auf DCs, Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und zum Teil auch auf $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert wird (Brown, 2006). Laut Reid et. al. exprimieren alle aus dem Blut stammenden DCs und Kupfferzellen Dectin-1, während die Expression auf pDCs noch nicht bewiesen ist (Reid et al., 2004). Dagegen zeigten Carter et. al., dass die Expression des Rezeptors auf aus dem Blut stammenden DCs ausschließlich auf den $\text{CD8}\alpha^- \text{CD4}^-$ Subtyp begrenzt ist (Carter et al., 2006). Das humane Ortholog wurde zusätzlich auf B-Zellen und eosinophilen Granulozyten identifiziert. (Willment et al., 2005). Als β -Glucanrezeptor ist Dectin-1 vor allem in der Immunabwehr gegen Pilzinfektionen, wie *Candida albicans*, von Bedeutung (Taylor et al., 2006). Stimulierung einer Zelle über diesen

Rezeptor führt zur Zellreifung sowie zur Endozytose und Phagozytose des Antigens, Produktion reaktiver Sauerstoffradikale und Ausschüttung von Zytokinen. Allerdings erfordert die Sezernierung einiger Zytokine die Involvierung MyD88 (*myeloid differentiation primary-response gene 88*) -abhängiger Signalwege. IL-12 wird beispielsweise nur freigesetzt, wenn die Zelle zusätzlich ein Signal über die TLR 2 und TLR 6, welche bakterielle Bestandteile, jedoch kein β -Glucan, erkennen, erhält (Brown, 2006; Drummond and Brown, 2011). Unter Verwendung reinen β -Glucans, wie z.B. Curdlan (gewonnen aus *Alcaligenes faecalis*), ist es demnach möglich DCs TLR-unabhängig zu stimulieren, was zur Induktion einer Th1 CD4⁺ T-Zellantwort führt (LeibundGut-Landmann et al., 2007; Reid et al., 2009). Außerdem wird die Rolle von Dectin-1 als Korezeptor zur Aktivierung von T-Zellen diskutiert, da mittels Untersuchungen mit löslichem Dectin-1 die Bindung des Rezeptors an T-Zellen und deren darauf folgende Proliferation nachgewiesen werden konnte (Reid et al., 2004). Dieser endogene Ligand auf den Lymphozyten ist bisher nicht identifiziert worden (Drummond and Brown, 2011).

Dectin-1 zählt zu den Typ-II-Transmembranproteinen, die durch den Besitz von nur einer CRD charakterisiert sind. Die Bindung eines Liganden an Dectin-1 ist Ca^{2+} -unabhängig und führt zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade, durch die sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beeinflusst wird. Der zytoplasmatische Teil des Rezeptors besitzt ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-ähnliches Motiv, auch hemITAM genannt, da es anstelle von zwei Tyrosinresten nur einen aufweist. Phosphorylierung des Motives führt zur Rekrutierung von Kinasen der Src und Syk/ZAP70-Familien. Autophosphorylierung und Aktivierung von Syk ermöglicht dann die Bindung von SLP-65/SLP-76, Vav, PI3K oder PLC γ , welche wiederum auf verschiedenste Weise zur Aktivierung myeloider Zellen führen (Engels and Wienands, 2011; Sancho and Reis e Sousa, 2012). Da es durch die Bindung eines Agonisten an Dectin-1 u. a. auch zur Aktivierung von NF- κ B kommt erfolgt die Reifung der myeloiden Zelle, so dass diese in der Lage ist, Zytokine, wie IL-2, IL-10, IL-6, TNF und IL-23 zu sezernieren. Daraus kann man schließen, dass DCs, welche über Dectin-1 aktiviert werden, hervorragend dazu befähigt sind eine T-Zellantwort zu induzieren (Saijo and Iwakura, 2011; Sancho and Reis e Sousa, 2012).

1.3.4 DC-vermittelte Vakzinierungsstrategien

Es ist heutzutage möglich zum Schutz vor zahlreichen Infektionskrankheiten Impfungen zu verabreichen. Damit diese protektiv sind, müssen einige Voraussetzungen erfüllt werden, die davon abhängen, gegen welches Pathogen geimpft werden soll. Man unterscheidet passive und aktive Immunisierung. Bei der passiven Immunisierung werden Antikörper direkt verabreicht. Dadurch vermitteln sie sofortigen Schutz. Sie werden zur Protektion gegen Viren oder Toxine verwendet. Die Wirksamkeit ist jedoch von begrenzter Dauer, da es nicht zur Induktion von Gedächtnis-B-Zellen kommt. Bei der aktiven Immunisierung verabreicht man dagegen inaktiviertes Antigen. Dies bewirkt die Entstehung einer immunologischen Gedächtnisantwort, was eine länger andauernde Immunität zur Folge hat (Charles A Janeway et al., 2001). Allerdings kann nicht nur die humorale Immunantwort zum Schutz vor Infektionen manipuliert werden. Wie bereits erwähnt sind DCs für die Initiierung einer T-zellvermittelten Immunantwort unabdingbar. Bereits 1996 gelang es Paglia et. al., DCs *in vitro* mit β -Galactosidase (β -gal), welches als Modell-Tumorantigen diente, zu beladen, um *in vivo* cytotoxische T-Zellen zu aktivieren, die in der Lage waren, Zellen, die mit β -gal transfiziert wurden, zu lysieren (Paglia et al., 1996). Bis heute ist die Entwicklung solcher therapeutischer Impfstoffe zur Induktion einer T-Zellantwort auf Grundlage der Aktivierung von DCs Gegenstand zahlreicher Studien, da es für einige Krebserkrankungen sowie Infektionskrankheiten wie HIV (*human immunodeficiency virus*) – Infektionen, Malaria, Hepatitis C, Tuberkulose oder Leishmaniose noch keine sicheren Heilungsmöglichkeiten gibt (Masic et al., 2012; Palucka et al., 2010; Remer et al., 2010; Weigand et al., 2012).

Wie bereits beschrieben können verschiedene DC - Subtypen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen anhand ihrer Oberflächenmoleküle, wie etwa CLRs, charakterisiert werden. An einige der CLRs, wie etwa Dectin-1 oder Langerin, können Krankheitserreger binden und von der Zelle internalisiert werden. Andere Rezeptoren, z.B. DC-SIGN, dienen darüber hinaus dem Zell-Zellkontakt (Erbacher et al., 2009). Das C-Typ-Lektin DEC-205, ein Endozytoserezeptor, präsentiert den T-Zellen aufgenommene Antigene bis zu 30-mal effizienter als verwandte Rezeptoren, wie etwa der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR) (Hawiger et al., 2001). Eine mögliche Erklärung wird darin gesehen, dass DEC-205

Antigene direkt in späte Endosome bzw. Lysosome transportiert, in denen sich zahlreiche MHC-Moleküle befinden (Mahnke et al., 2000).

Es ist demnach möglich, DCs über bestimmte C-Typ-Lektine, welche ein ITAM-Motiv besitzen, zu aktivieren. Indem man den Zellen entsprechende Liganden zur Verfügung stellt, kann man die Rezeptoren auch dazu verwenden die Immunantwort gegen Pathogene zu manipulieren. (Caminschi et al., 2008; Klechevsky et al., 2010). Denn myeloide DCs, welche auch bei der Stimulierung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen von Bedeutung sind, können zur effizienteren Induktion einer T-zellvermittelten Immunantwort angeregt werden, indem man sie mit Hilfe von Liganden aktivierender Rezeptoren (z.B. C-Typ-Lektinen) zur gesteigerten Reifung anregt (Schott and Seissler, 2003). Moleküle, die die Reaktion des adaptiven Immunsystems auf ein Antigen verstärken, werden im Allgemeinen als Adjuvantien bezeichnet (McKee et al., 2010).

2. Die Leishmaniose

2.1 Die Parasiten der Gattung *Leishmania* spp.

2.1.1 Taxonomie

Leishmanien sind Protozoen, die zur Ordnung der Kinetoplastida gehören. Das bedeutet, sie besitzen einen Kinetoplast, ein charakteristisches Organell, welches große Mengen mitochondrialer Desoxyribonukleinsäure (DNS) enthält und sich an der Basis des Flagellums befindet. Die Kinetoplastida können in zwei Unterordnungen unterteilt werden, Bodonina und Trypanosomatina. Letztere wiederum beinhaltet die Familie der Trypanosomatidae, die sich aus neun Gattungen zusammensetzt, unter denen sich auch die Gattung der *Leishmania* befindet. Diese wiederum kann in zwei Subgattungen unterteilt werden, nämlich *Leishmania*

(*Leishmania*) sowie *Leishmania (Viannia)*. Bis heute wurden daraus rund 20 für den Menschen pathogene *Leishmania*-Spezies identifiziert (Bates, 1994; Desjeux, 2004; Maslov et al., 2001).

2.1.2 Lebenszyklus

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden die Leishmanien erstmals von William Leishman und Charles Donovan unabhängig voneinander als obligat intrazelluläre Parasiten beschrieben (Bailey and Bishop, 1959; Leishman, 1903; Ross, 1903). Während ihres komplexen Lebenszyklus, in dem sie zwischen dem Säugetierwirt und der Sandfliege wechseln, durchlaufen die Einzeller verschiedene Entwicklungsstadien. Die Leishmanien liegen in den Insekten (Sandfliegen der Gattungen *Phlebotomus* oder *Lutzomyia*) in der extrazellulären promastigoten Form vor, in der sie ein Flagellum besitzen und motil sind. Im abdominalen Mitteldarm des Insektes nehmen die Parasiten die prozyklische promastigote Form an, in der sie sich zwar replizieren, jedoch für Säugetiere nicht infektiös sind. Die Leishmanien, welche sich im Mitteldarm des Thorax und im Rüssel der Sandfliegen befinden, sind nicht teilungsfähig, dafür hochinfektiös für Säugetiere. Es handelt sich um metazyklische promastigote Parasiten. Gelangen 10 - 100 Leishmanien durch einen Biss der Sandfliege in einen Säugetierwirt, differenzieren sie in Zellen des mononukleären Systems (überwiegend Makrophagen) zu obligat intrazellulären amastigoten Leishmanien, welche kein Flagellum besitzen und somit unbeweglich sind (Von Stebut, 2007). Nach massiver Vermehrung der Parasiten platzt schließlich die Zelle, wodurch die Erreger in das umliegende Gewebe freigesetzt werden. Weitere Zellen können infiziert werden, welche wiederum in den Blutstrom gelangen können und so bei einer Blutmahlzeit erneut von einer Sandfliege aufgenommen werden. Im Darm des Insektes wandeln die amastigoten Leishmanien sich wieder in die promastigote Form um, so dass der Zyklus von neuem beginnen kann (Besteiro et al., 2007; Stebut, 2007).

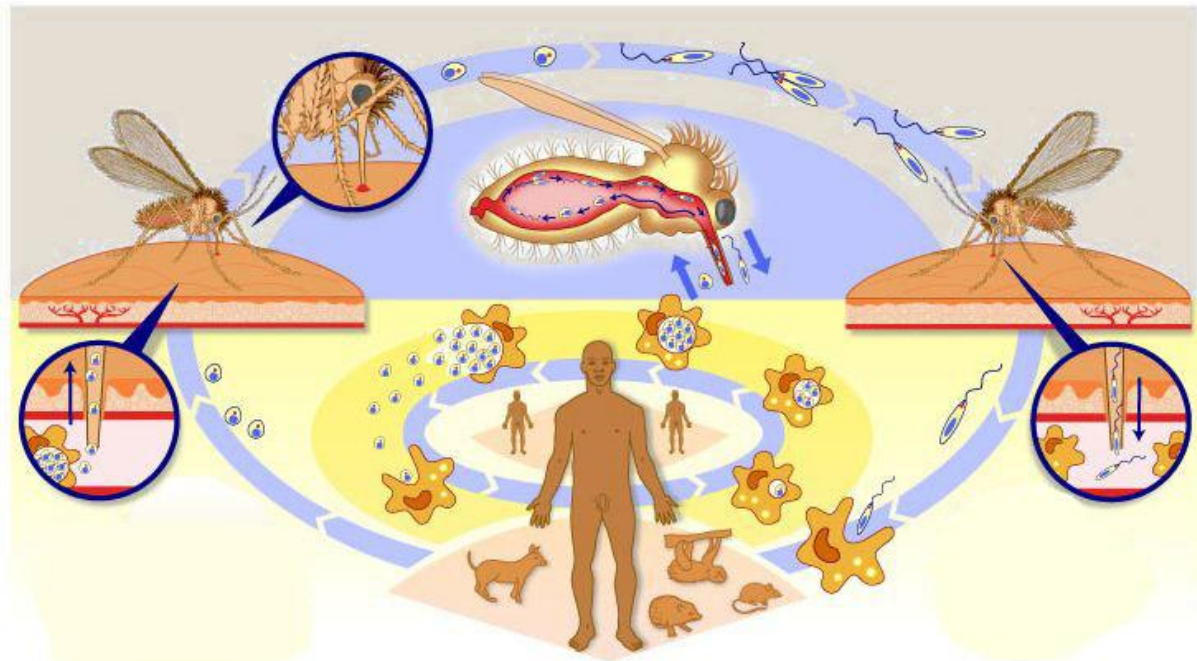


Abbildung 1: Lebenszyklus und Entwicklungsstadien der Leishmania-Parasiten.

Lebenszyklus des *Leishmania*-Parasiten. Eine infizierte weibliche Sandfliege überträgt während einer Blutmahlzeit promastigote Parasiten auf den Säugetierwirt. Diese werden von Makrophagen aufgenommen und wandeln sich zur amastigoten Form um. Nach Vermehrung der *Leishmanien* platzt die Wirtszelle und setzt die amastigoten Parasiten frei. Diese infizieren neue Zellen und gelangen auch in die Blutbahn des Wirtes. Bei einer Blutmahlzeit können die infizierten Zellen wieder von einer weiblichen Sandfliege aufgenommen werden. Im Darm des Insektes transformieren die amastigoten Parasiten wieder zur promastigoten Form und der Zyklus kann von neuem beginnen. Säugetiere, wie Affen, Mäuse, Hunde oder der Mensch gehören zum Wirtsspektrum der *Leishmanien* (WHO). Abbildung verändert nach WHO.

2.2 Die Leishmaniose des Menschen

Bei der Leishmaniose handelt es sich um eine parasitäre Erkrankung, welche von obligat intrazellulären Parasiten, den Leishmanien, übertragen wird. Als Vektor dienen weibliche Sandfliegen der Gattungen *Lutzomyia* (neue Welt) bzw. *Phlebotomus* (alte Welt) (Herwaldt,

1999). Je nach Spezies des Parasiten und Immunstatus des Patienten kann die Erkrankung unterschiedliche Formen annehmen, so etwa die kutane Leishmaniose, die mukokutane Leishmaniose oder die viszerale Leishmaniose (Colmenares et al., 2002). Laut der *World Health Organization* (WHO) tritt die Erkrankung aktuell auf vier Kontinenten auf. Dabei handelt es sich bei 72 der 88 Länder, in welchen die Erkrankung endemisch ist, um Entwicklungsländer. Etwa 90 % der Fälle viszeraler Leishmaniose treten in den Ländern Bangladesch, Indien, Nepal, Sudan und Brasilien auf. Ebenso verteilen sich 90 % der Erkrankungen an kutaner Leishmaniose auf Afghanistan, Algerien, Brasilien, Iran, Peru, Saudi Arabien und Syrien. Jährlich gibt es schätzungsweise 2 Millionen Neuerkrankungen, wobei häufig unterernährte Menschen mit geschwächtem Immunsystem betroffen sind. Der sozioökonomische Einfluss der Leishmaniose wurde lange Zeit unterschätzt. Die Folgen der Krankheit, wie etwa Deformierungen und entstellende Narbenbildung sowie Todesfälle, haben in den betroffenen Ländern lange Zeit die ökonomische Entwicklung mit beeinträchtigt (Alexander et al., 1999; Desjeux and Alvar, 2003; Sakthianandeswaren et al., 2009).

Das Verbreitungsgebiet der Leishmaniose beschränkt sich nicht nur auf tropische und subtropische Gebiete. Regelmäßig werden auch Fälle in Europa gemeldet, wobei diese überwiegend in südlichen Ländern wie Spanien, Portugal, Italien und Frankreich auftreten. Besonders gefährdet sind auch hier immunsupprimierte Menschen, z.B. HIV-Patienten (Alvar et al., 2008). Auch in Mitteleuropa sind bereits vereinzelte autochthone Leishmaniose-Erkrankungen aufgetreten. Es wird vermutet, dass sich durch den Klimawandel auch das Verbreitungsgebiet der Sandmücke in den nächsten Jahren noch weiter Richtung Norden ausdehnen wird. Dies könnte zur Folge haben, dass es dann auch in Mitteleuropa vermehrt zu Leishmanioseerkrankungen kommt (Fischer et al., 2011).

2.2.1 Kutane Leishmaniose (CL)

Die kutane Form der Leishmaniose, auch bekannt als Orientbeule, kommt hauptsächlich in Afghanistan, Brasilien, Iran, Peru, Syrien und Saudi Arabien vor. Die häufigsten Erreger sind *Leishmania major* und *Leishmania mexicana*. Die Erreger, welche durch einen Biss der

Sandfliege übertragen werden, rufen Läsionen hervor, die in der Regel innerhalb einiger Monate selbstständig unter Narbenbildung wieder abheilen. Die Ausprägung der Läsion reicht dabei von der Bildung intakter, geschwollener Knötchen bis zu nekrotischen und ulzerierenden Läsionen (WHO; Murray et al., 2005; Prasad et al., 2011).

Reagiert das Immunsystem des Wirtes nicht ausreichend auf die *Leishmania*-Parasiten, kann sich die Infektion zu einer diffus-kutanen Leishmaniose entwickeln. Das bedeutet, dass über den ganzen Körper nicht-ulzerierende Läsionen entstehen, die nicht spontan abheilen. Diese Komplikation kann nach Infektionen mit *Leishmania mexicana* oder *Leishmania aethiopica* auftreten (David and Craft, 2009; Herwaldt, 1999).

2.2.2 Mukokutane Leishmaniose (MCL)

Eine kompliziertere Form der kutanen Leishmaniose, welche unbehandelt zum Tod führen kann, ist die mukokutane Leishmaniose. Sie entsteht, wenn die Parasiten sich über das Blut oder das lymphatische System im Körper ausbreiten und die Schleimhäute besiedeln. Als Folge werden diese dauerhaft zerstört. Patienten leiden dann neben der Bildung von Narbengewebe häufig auch an sekundären bakteriellen Infektionen sowie Atemwegsbeschwerden (Herwaldt, 1999; Reithinger et al., 2007). Die Ursachen, die zum mukokutanen Verlauf der Krankheit führen, sind bisher noch unklar. Allerdings wird vermutet, dass sowohl die zelluläre Immunantwort des Wirtes, als auch die Virulenzfaktoren der Leishmanien, wie *Leishmania braziliensis* oder *Leishmania amazonensis*, eine Rolle spielen (David and Craft, 2009).

2.2.3 Viszerale Leishmaniose (VL)

Die viszerale Leishmaniose wird in Asien und Ost-Afrika hauptsächlich von *Leishmania donovani* hervorgerufen, während in Nord-Afrika und Südamerika überwiegend *Leishmania infantum* die Krankheit verursacht (Murray et al., 2005).

Bei dieser Form der Leishmaniose, die auch Kala-Azar genannt wird, entwickelt sich typischerweise innerhalb weniger Wochen oder Monaten ein Krankheitsbild, das zunächst von Fieber, Schwäche und nächtlichen Schweißausbrüchen geprägt ist. Unbehandelt kann sich dann eine lebensbedrohende Hepatosplenomegalie, Kachexie sowie Anämie, Thrombozytopenie und Leukopenie entwickeln. Auch eine Hypergammaglobulinämie ist möglich. Durch die erhöhte Anfälligkeit für sekundäre Infektionen sowie innere Blutungen, bedingt durch die Leukopenie und die Thrombozytopenie, führt die viszerale Leishmaniose unbehandelt zum Tod (Herwaldt, 1999; Kumar and Nylén, 2012; Murray et al.).

2.2.4 Therapiemöglichkeiten der Leishmaniose

Es gibt keinen wirksamen Impfstoff gegen Leishmaniose. Umso wichtiger ist die Existenz wirkungsvoller Medikamente. Es gibt zahlreiche Behandlungsmöglichkeiten für Leishmaniosepatienten. Pentavalente Antimonverbindungen werden häufig eingesetzt, wenn es bei kutaner Leishmaniose zu ungewöhnlich großen Läsionen kommt, oder die Krankheit sehr lange nicht von alleine abheilt. Der genaue Wirkmechanismus der Antimonverbindungen ist noch nicht aufgeklärt, jedoch ist wahrscheinlich, dass antimonhaltige Medikamente wie Glucantime® oder Pentostam® den Energiehaushalt der Parasiten stören, indem sie Stoffwechselwege wie Glykolyse oder Lipolyse inhibieren (Haldar et al., 2011). Die Behandlung ist zu 85 % erfolgreich, allerdings können schwere Begleiterscheinungen, wie Pankreatitis, Kardiotoxizität oder periphere Neuropathie, auftreten (Alavi-Naini et al., 2012; Croft and Yardley, 2002). Reagiert der Patient nicht auf die Behandlung mit den Antimonverbindungen, kann das Antimykotikum Amphotericin B eingesetzt werden, ebenso wie das Antiprotozoikum Pentamidin oder das Antibiotikum Paromomycin (Dorlo et al., 2012; Mishra et al., 1992). Diese Wirkstoffe haben gemeinsam, dass sie parenteral verabreicht werden müssen, was mit höherem Aufwand und Kosten verbunden ist als eine orale Gabe. Das ursprünglich als Mittel gegen Krebs entwickelte Miltefosin, ein Alkylphosphocholin, ist bislang der einzige Wirkstoff gegen Leishmaniose, der oral verabreicht werden kann. Weitere Vorteile sind weniger gravierende Nebenwirkungen sowie der kostengünstigere Erwerb des Medikaments (Dorlo et al., 2012).

2.2.5 Das experimentelle Modell der Leishmaniose

In den letzten Jahren hat das murine Modell der experimentellen Leishmaniose viel dazu beigetragen, die Mechanismen, welche zu Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber dem Erreger führen, zu verstehen. Eine Vielzahl an Faktoren hat in verschiedenen Mausstämmen abweichende Infektionsverläufe zur Folge, welche durch die Beobachtung der Gewebsschwellungen verfolgt werden können.

Zunächst lassen sich Unterschiede im Infektionsverlauf auf die Auswahl des verwendeten Leishmanienstammes zurückführen. So ist bekannt, dass der *Leishmania major*-Stamm MHOM/IL/80/Friedlin eine schwächere Pathologie und Immunantwort hervorruft als der Stamm MHOM/IL/81/BNI, welcher in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Ritter et al., 2004). Neben dem verwendeten Leishmanienstamm spielt vor allem der genetische Hintergrund der Mäuse für den Infektionsverlauf eine große Rolle. C57BL/6 Mäuse entwickeln eine Th1 - Antwort, welche bereits ausführlich beschrieben wurde und die zur Resistenz der Tiere gegenüber dem Erreger sowie zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führt. Im Gegensatz dazu kommt es in BALB/c Mäusen zur Ausbildung einer Th2 - Immunantwort, welche sich durch Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 auszeichnet (Kropf et al., 1999; Powrie et al., 1993). Die Tiere können den Parasiten nicht wirksam bekämpfen und die Erkrankung verläuft folglich chronisch. Einen weiteren, für den Krankheitsverlauf wichtigen Faktor, stellt die für die Infektion verwendete Anzahl der Parasiten (Dosis), dar. Dabei entspricht das sogenannte *Low-Dose*-Modell, bei dem etwa 100 metazyklische promastigote Parasiten injiziert werden, am ehesten den natürlichen Bedingungen. Es kommt zu einer verzögerten Immunreaktion und Parasitenvermehrung (Belkaid et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend das *High-Dose*-Modell verwendet, bei dem 3×10^6 Parasiten subkutan in den Fuß injiziert werden. Auf diese Weise kommt es zu einer starken und gut messbaren Immunreaktion (Lira et al., 2000). Ein letzter Faktor, welcher den Verlauf einer Infektion mit *Leishmania* beeinflussen kann, ist die Stelle der Infektion. Während manche Forscher das Ohr als intradermale Injektionsstelle bevorzugen, spritzen andere die Parasiten in den Schwanzansatz oder, wie in dieser Arbeit, in eine der Hinterpfoten, wobei bei letzteren Methoden eine subkutane Injektion nicht ausgeschlossen werden kann (Baldwin et al., 2003). Durch das unterschiedliche Zellmilieu, in

welches die Parasiten dadurch gelangen, kann folglich der Krankheitsverlauf verändert werden.

2.2.6 Die Immunantwort gegen *Leishmania major*

Wie bereits erwähnt, ist *Leishmania major* der Erreger kutaner Leishmaniose, die durch ulzerierende Hautläsionen gekennzeichnet ist. Die Immunreaktion, welche auf eine Infektion erfolgt, kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase, die man auch als „stille Phase“ bezeichnet und die etwa vier bis fünf Wochen dauert, kommt es zur Phagozytose der Leishmanien durch Makrophagen. Dabei benutzen sie das wirtseigene angeborene Immunsystem. Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur Opsonisierung der Parasiten mit den Komplementfaktoren C3bi und C3b. Da Makrophagen den entsprechenden Komplementrezeptor (*complement receptor*, CR) 3 besitzen, entsteht der zur Aufnahme der Leishmanien nötige Kontakt mit den Makrophagen (Reiner and Locksley, 1995; Stebut, 2007). Gleichzeitig hat der Parasit Strategien entwickelt um in der Wirtszelle überleben zu können. Um seiner Abtötung im Phagolysosom zu entgehen inhibiert er die Präsentations- und Wanderungsfähigkeit der Wirtszellen, ebenso wie die Produktion von IL-12 und antimikrobiellem Stickstoffmonoxid (NO) (Belkaid et al., 1998; Stebut, 2007). So kommt es zur massiven Vermehrung amastigoter Erreger in den Zellen, die schließlich ins Gewebe freigesetzt werden. In der „stillen Phase“ treten kaum klinische Symptome auf. Der Beginn der zweiten Phase ist gekennzeichnet durch das Auftreten klinisch relevanter Hautläsionen. Des Weiteren ist diese Phase durch die Invasion inflammatorischer Zellen, wie Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen, gekennzeichnet (Belkaid et al., 2000). Eine besondere Rolle spielen auch die Mastzellen, welche TNF ausschütten und so weitere Neutrophile anlocken (Maurer et al., 2006). Etwa sechs Wochen nach der Infektion beginnt die dritte Phase. Sie zeichnet sich durch das Einleiten einer adaptiven Th1-Antwort durch IL-12-produzierende DCs im Haut-drainierenden Lymphknoten aus (Belkaid et al., 2000). Daraufhin wandern IFN- γ -produzierende Th1-Effektorzellen in die Haut ein und tragen dort zur Aktivierung der Makrophagen bei, welche dann intrazellulär NO produzieren und damit die Parasiten eliminieren. Unterstützt wird die Makrophagenaktivierung durch CD8⁺ T-Zellen,

die ebenfalls IFN- γ produzieren. Nach dem Abklingen der Primärinfektion sind nicht alle Erreger aus dem Organismus entfernt. Aus diesem Grund kann es z.B. in HIV-Patienten zur rezidivierenden, d.h. wiederkehrenden Leishmaniose kommen. Jedoch sind persistierende Leishmanien auch wichtig für die Ausbildung einer protektiven Gedächtnisantwort (Kautz-Neu et al., 2012; Stebut, 2007). Diese kann durch eine intradermale Injektion von Leishmanien-Antigen getestet werden, bei der es zu einer *delayed type hypersensitivity* (DTH) -Reaktion kommt. Diese zeichnet sich durch eine lokale Entzündungsreaktion aus, die bereits 24 Stunden nach Gabe des Antigens durch die Gedächtnis-T-Zellen hervorgerufen wird. Dabei sezernieren Th1-Zellen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) IFN- γ , wodurch Makrophagen aktiviert werden und an der Entzündungsstelle akkumulieren (Gell, 1967; Titus et al., 1984). Diese Reaktion wird auch in der Humanmedizin genutzt, um eine vorausgegangene Infektion mit *Leishmania* zu diagnostizieren. Dabei wird *Leishmania*-Antigen intradermal injiziert. Kommt es innerhalb von 48 Stunden zu einer Verhärtung der Einstichstelle, deren Durchmesser 5 mm überschreitet, wird der Test als positiv bewertet. Eine Leishmanioseinfektion gilt als wahrscheinlich (Fagundes et al., 2012; Kobayashi et al., 2001; Mendes, 1979).

2.2.7 Die Rolle dendritischer Zellen im experimentellen Modell der Leishmaniose

Bei der Immunreaktion gegen die Parasiten der Gattung *Leishmania major* stellen DCs das entscheidende Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. Über MHC Klasse-II-Moleküle präsentieren die DCs naiven CD4⁺ T-Zellen Leishmanien-Antigen und leiten zudem über die Ausschüttung des Zytokins IL-12 eine Th1-Zell-Antwort ein. Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten darüber hinaus, dass ebenso die Aktivierung CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen durch die DCs möglich ist, da sie das Leishmanien-Antigen durch Kreuzpräsentation auch auf MHC Klasse-I-Molekülen präsentieren können (Brewig et al., 2009).

Es wird diskutiert, ob es sich bei den DCs, die in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren, um Zellen handelt, die mit lebenden Parasiten infiziert sind, oder um solche, die lediglich Leishmanien-Antigen aufgenommen haben. Laut unveröffentlichter Beobachtungen reifen

mit lebenden Parasiten infizierte DCs allerdings nicht mehr und sind folglich auch nicht mehr in der Lage zum drainierenden Lymphknoten zu wandern (Prof. Dr. Uwe Ritter, persönliche Kommunikation). Somit erscheint es plausibler, dass für die Aktivierung von T-Zellen DCs nötig sind, die Leishmanien-Antigen aufgenommen haben.

Besonders die in der Epidermis vorkommenden LCs wurden lange Zeit als die hauptverantwortlichen Zellen für die Aufnahme des *Leishmania*-Antigens und dessen Präsentation im drainierenden Lymphknoten beschrieben (Creus et al., 2000; Moll, 1993). LCs sind durch die sowohl extra- als auch intrazelluläre Expression des C-Typ-Lektins Langerin (CD207) und durch den Besitz von *Birbeck Granulae*, in denen Langerin gespeichert vorliegt, charakterisiert (Merad et al., 2008). Heute weiß man, dass auch in der Dermis Langerin – exprimierende Zellen auftreten, die Langerin⁺ dermalen DCs (Langerin⁺ dDCs). Außerdem existiert in der Dermis eine dritte, Langerin⁻ DC-Population, die Langerin⁻ dDCs (Poulin et al., 2007). Die Langerin⁺ dDCs interagieren mit den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und sind somit für eine effektive Immunantwort gegen *Leishmania major* entbehrlich. Dagegen spielen die Langerin⁻ dDCs eine wichtige Rolle bei der Voraktivierung des CD4⁺ T-Zellen und tragen demnach wesentlich zur Entstehung einer erfolgreichen Abwehrreaktion bei (Brewig et al., 2009).

3. Ziel der Arbeit

Für eine erfolgreiche Initiierung einer T-Zell - vermittelten Immunreaktion spielen dendritische Zellen als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem eine entscheidende Rolle. DCs exprimieren auf ihrer Oberfläche C-Typ-Lektin-Rezeptoren, die auch der Erkennung von Pathogenen dienen. Das C-Typ-Lektin Dectin-1, exprimiert unter anderem auf DCs, zählt als PRR zu den wichtigsten Rezeptoren für β -Glucan (Taylor et al., 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ligandenbindung an Dectin-1 zur Ausschüttung Th1-typischer Zytokine führt (Zenaro et al., 2009). Dies könnte für die Immunantwort gegen eine Infektion mit *Leishmania* von Bedeutung sein, da verschiedene Studien zeigten, dass die gemeinsame Verabreichung von β -Glucan und abgetöteten *Leishmania*-Parasiten eine Resistenz der ansonsten suszeptiblen Mauslinie BALB/c gegen lebende Leishmanien hervor ruft (Goldman and Jaffe, 1991; Holbrook and Cook, 1983; Holbrook et al., 1981). Der Mechanismus dieser Wirkung ist bislang unbekannt.

Es sollte in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob Dectin-1 während der Immunreaktion, die auf eine Infektion mit *Leishmania major* folgt, von Bedeutung ist. Mit Hilfe geeigneter spezifischer Liganden sollte anschließend die Analyse erfolgen, ob und in welcher Form die Immunantwort moduliert werden kann. Dabei stand die Beantwortung folgender Fragen im Vordergrund:

- (1) Gibt es unterschiedliche Expressionsmuster von CLRs auf den DCs suszeptibler BALB/c – Mäuse und resistenter C57BL/6 – Mäuse, und wie verändert sich die Expression der CLRs nach Infektion mit *Leishmania major*?
- (2) Haben CLRs Einfluss auf die Reifung dendritischer Zellen und damit auf die Induktion einer effizienten T-zellvermittelten Immunantwort gegen *Leishmania major*?
- (3) Exprimieren *Leishmania*-Parasiten Liganden auf ihrer Oberfläche, die von CLRs auf dendritischen Zellen erkannt werden können?

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Enzyme, Reagenzien und Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidino-2'-phenylindol Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
5'-Bromdesoxyuridin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BD Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD OptEIA Substrat Reagent A und B	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Perm/Wash Buffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Brain-Heart-Infusion (BHI) Agar	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Regensburg
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Cell Lysis Solution	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Cohn-II (humane IgG-Fraktion)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
C-Typ-Lekin – hIgG - Fusionsproteine	Bernd Lепенies, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Berlin, Deutschland
Curdlan	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Gatersleben, Deutschland
DNase I	Invitrogen, Carlsbad, USA

Ethanol (100 %)	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Glutaraldehyd	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
GM-CSF	Eigenherstellung Institut für Immunologie, Uniklinikum Regensburg (vgl. II 2.1.7)
IQ™ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kaninchen-Vollblut, defibriniert	Charles River, Sulzfeld
Kollagenase D	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd 36,5 – 38%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin G-Streptomycin Lösung (100x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Protein Precipitation Solution	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Proteinase K	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Rinderserumalbumin für ELISA (Cohn Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Triton X-100	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau (0,2 % in 0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Monensin	eBioscience, San Diego, USA

1.2 Laborausstattung

Accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
BD FACSCalibur Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD LSRII Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CO ₂ Inkubator INCOmed für Leishmanien	Memmert, Schwabach, Deutschland
Eismaschine Scotsman AF80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
EMax Endpoint ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Finnpipette 0,2 µl – 2 µl	Thermo Scientific, Fremont, USA
Finnpipette 2 µl – 20 µl	Thermo Scientific, Fremont, USA
Finnpipette 20 µl – 200 µl	Thermo Scientific, Fremont, USA
Finnpipette 100 µl – 1000 µl	Thermo Scientific, Fremont, USA
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Imager.M1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop-Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Fußdicken-Messgerät	Kroeplin GmbH, Schlüchtern, Deutschland
Handzähler T120	Baumer IVO, Villingen-Schwenningen, Deutschland
Heizblock	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
iCycler IQ5 PCR Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Implen Nano Photometer	Implen, München, Deutschland
Inkubator für Zellkultur Heraeus BBD 6220	Thermo Scientific, Fremont, USA
Kurzzeitmesser TR118	Oregon Scientific, Würzburg, Deutschland
MACS Multi Stand (Ständer)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mehrkanalpipette „Research Pro“	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MyCycler™ PCR Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Neubauer-Zählkammer für Leishmanien	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

(Tiefe 20 µm)

Neubauer-Zählkammer für Zellen (Tiefe 100µm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Shandon Cytoclip	Thermo Scientific, Fremont, USA
Shandon Cytofunnel	Thermo Scientific, Fremont, USA
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific, Fremont, USA
Thermomixer	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach, Deutschland
Wasserbad TW20	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 4	Thermo Scientific, Fremont, USA

1.3 Verbrauchsmaterialien

BD Discardit™ II Spritzen (2 ml, 5 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Falcon Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen, Flachboden und Deckel	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Falcon Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen, Flachboden und Deckel	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Falcon™ Zellsieb 40µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Microlance™ 3 Kanülen	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Plastipak™ Spritzen (1 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Zellkulturschale 100 x 20 mm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Zellkulturschale 60 x 15 mm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Bottel-Top Filter 500 ml; 0,2 µm	Nalgene, Penfield, USA
Deckgläschen für Objektträger 24 x 60 mm	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda Königshofen, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Fettstift Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Folie für PCR Platten	Thermo Scientific, Fremont, USA
Latex-Kugeln, 6µm	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nitrocellulosemembran 0,2µm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Nunc Nunclon™ Surface Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen	Thermo Scientific, Fremont, USA
Parafilm®M	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR-Platten mit 96 Vertiefungen	Thermo Scientific, Fremont, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polysine Objektträger 75 x 25 x 1 mm	Thermo Scientific, Fremont, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
ZYTO-Filterkarten 75 x 25 mm, doppelt gelocht 6 mm	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland

1.4 Puffer und Medien

Blockpuffer für Dot-Blot	10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS
--------------------------	---------------------------------------

Blutagar zur Leishmanienkultur	50 ml Kaninchen-Vollblut 50 ml NaCl (0,9 % in dH ₂ O) 1 x Penicillin G-Streptomycin 200 ml BHI-Agar (52 g / l in dH ₂ O)
Cohn-II – Stammlösung	10 mg / ml in PBS
DPBS (Phosphate Buffered Saline) ohne Magnesium und Calcium	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Erythrozyten-Lysepuffer	10 % (v/v) 0,1 M Tris/HCl 90 % (w/v) 0,16 M Ammoniumchlorid (pH 7,2)
FACS-Fix Puffer	2 % (v/v) FCS 4 % (v/v) PFA (Paraformaldehyd) in PBS
FACS-Puffer	2 % (v/v) FCS in PBS
HBSS (Hanks Buffered Salt Solution) mit NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lektin-Bindepuffer	50 mM HEPES 5 mM MgCl ₂ 5 mM CaCl ₂ in dH ₂ O (pH 7,4)
RPMI-1640 L-Glutamin Medium für Generierung von Knochenmarks-DC	10 % (v/v) FCS 10% (v/v) GM-CSF 100 U / ml Penicillin G 100 U / ml Streptomycin 50 µM 2-Mercaptoethanol in RPMI-1640 (PAN Biotch, Aidenbach, Deutschland)
RPMI-1640 L-Glutamin Medium für	10 % (v/v) FCS

Leishmanienkultur	100 U / ml Penicillin G 100 U / ml Streptomycin 50 µM 2-Mercaptoethanol in RPMI-1640 (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Stopp-Puffer für ELISA	2 N H ₂ SO ₄
TBS (Tris-buffered Saline)	150 mM NaCl 7,7 mM Tris-HCl in dH ₂ O pH 7,5
Waschpuffer für Dot-Blot	0,05 % (v/v) Tween20 in TBS
Waschpuffer für ELISA und Histologie	0,05 % (v/v) Tween20 in PBS

1.5 Antikörper und Detektionsreagenzien

Antikörper	Spezies	Fluorochrom	Klon	Konzentration	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
BrdU		FITC	B44	keine Angabe	2,5 µl / Ansatz	Maus IgG1	BD Pharmingen
CD11c	Maus	PE	N418	0,2 mg / ml	1:200	Armenian Hamster IgG	eBioscience
CD4	Maus	PE	RM4-5	0,2 mg / ml	1:200	Ratte IgG2a	eBioscience
CD4	Maus	eFluor450	RM4-5	keine Angabe	1:200	Ratte IgG2a	eBioscience
CD4	Maus	PerCP- eFluor710	RM4-5	keine Angabe	1:800	Ratte IgG2a	eBioscience
CD45	Maus	eFluor450	30-F11	0,2 mg / ml	1:800	Ratte IgG2b	eBioscience
CD8	Maus	PerCP- eFluor450	53-6.7	0,2 mg / ml	1:200	Ratte IgG2a	eBioscience
CD8	Maus	biotinyliert	53-6.7	0,5 mg / ml	1:400	Ratte IgG2a	BD Pharmingen
CD86	Maus	AlexaFluor647	GL-1	0,5 mg / ml	1:200	Ratte IgG2a	BioLegend
Dectin-1	Maus	biotinyliert	2A11	0,1 mg / ml	1:200	Ratte	AbD SeroTec

						IgG2b	
IFN- γ	Maus	AF647	XMG1.2	0,2 mg / ml	0,5 μ l / Ansatz	Ratte IgG1	BD Pharmingen
IgG	Human	AlexaFluor488	keine Angabe	1 mg / ml	1:200	IgG1	Invitrogen
IL-4	Maus	PE	11B11	0,2 mg / ml	0,5 μ l / Ansatz	Ratte IgG1	BD Pharmingen
MHC Klasse-II	Maus	FITC	M5/114.15.2	82,5 μ g / ml	1:100	Ratte IgG2b	Miltenyi Biotec
MHC Klasse-II	Maus	AlexaFluor700	M5/114.15.2	keine Angabe	1:200	Ratte IgG2b	eBioscience
Streptavidin-Konjugate		Konjugar	Klon	Konzentration	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
Streptavidin		PerCP		0,2 mg / ml	1:500		BD Pharmingen
Streptavidin		PacificOrange		0,2 mg / ml	1:500		Invitrogen
ELISA-Antikörper		Konjugat	Klon	Konzentration	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
IgG1	Maus	HRP	keine Angabe		1:2000	keine Angabe	Invitrogen
IgG2a	Maus	HRP	keine Angabe		1:2000	keine Angabe	BD Pharmingen
IgG2c	Maus	HRP	keine Angabe		1:1000	keine Angabe	Jackson Immuno Research

1.6 Oligonukleotide

Zielgen	Name	Sequenz
Maus- β -Aktin	β -Aktin_for	5' – TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A – 3'
	β -Aktin_rev	5' – GGA TGC CAC AGG ATT CCA TAC CCA – 3'
<i>Leishmania major</i> 18S rRNA	ISS1	5' – GCT CCA AAA GCG TAT ATT AAT GCT GT – 3'
	ISRV	5' – TCC TTC ATT CCT AGA GGC CGT GAG T – 3'
Dectin-1	pKOAREV	5' – GCC AAT GCT GCC GAC TCC AG – 3'
	DKON	5' – GCC TCG ACT GTG CCT TCT AGT TG – 3'
	KOINTREV2	5' – GCT GTA ACT TCT GAA GAA AAC – 3'

1.7 Software

Axio Vision 4.6	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
BD CellQuest Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FlowJo 7.6.5	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism 5.03	GraphPad Software, La Jolla, USA
IQ5™ Optical System Software 2.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Office PowerPoint 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SoftMax Pro Data Acquisition & Analysis Software	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

1.8 Mausstämme und Leishmanien-Stamm

1.8.1 Mäuse

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden am Klinikum Regensburg unter SPF (Specific Pathogen Free) Bedingungen gehalten. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere ab einem Alter von 6 Wochen verwendet.

C57BL/6	Janvier, Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich
BALB/c	Janvier, Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich
Dectin-1 ^{-/-}	Gordon Brown, Aberdeen, Schottland <i>Knock-out</i> -Mäuse sowohl auf C57BL/6 als auch auf BALB/c Hintergrund, <i>knock-out</i>

	durch das Einbringen einer mutierten Dectin-1 – Gensequenz mittels des pKO Scrambler NTKV-1908 Vektors (vgl. Taylor et al., 2006)
--	---

1.8.2 Leishmanien

L. major (MHOM/IL/81/FE/BNI)	Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg, Deutschland
L. major (amastigot)	Ger van Zandbergen, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland

2. Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Gießen von Blutagarplatten

Zur Kultivierung von *Leishmania major* werden Blutagarplatten benötigt. Um diese herzustellen, muss zunächst Blutagar mit folgender Zusammensetzung gemischt werden:

25 ml Natrium-Chlorid

25 ml Kaninchenvollblut

100 ml Brain-Heart-Infusion Agar

Penicillin/Streptomycin

Zum Gießen der Blutagarplatten werden je 50 µl des Blutagars mit einer Mehrkanalpipette in die Näpfe einer unbeschichteten Zellkulturplatte mit 96 Löchern pipettiert. Dabei wird ein Winkel von 45° eingehalten, wodurch ein sogenannter Schrägagar entsteht, bei dem eine Hälfte des Bodens frei von Agar bleibt. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 4 Stunden werden die Platten bei maximal 8° Celsius im Kühlraum gelagert.

2.1.2 Leishmanien-Kultur

Die Leishmanien wurden in RPMI-Vollmedium bei 28° C und 5 % CO₂ auf Blutagarplatten (vgl. II 2.1.1) kultiviert. Innerhalb von sieben Tagen wachsen die Parasiten auf der Agar-freien Fläche in einem Volumen von 190 µl pro Napf zu einer konfluenten Schicht. Je nach Dichte wurden die Leishmanien aus 4 bis 8 Vertiefungen entnommen, in eine Petrischale zu 20 ml RPMI-Vollmedium gegeben und auf einer neuen Blutagarplatte ausgesät.

Um die Virulenz der Parasiten zu erhalten musste im Abstand von etwa sechs Wochen eine BALB/c- Maus mit 3×10^6 *Leishmania major* in die rechte Hinterpfote infiziert werden (vgl. II 2.2.1). Nach vier Wochen wurden die Parasiten aus den Pfoten der Tiere wie folgt isoliert: Man schnitt die infizierte Extremität mit einer Schere ab und legte sie eine Minute zur Desinfektion in eine Petrischale, die Ethanol 70 % enthielt. Nach dem Trocknen wurde das Gewebe von den Knochen gelöst, mit einer Schere zerkleinert und durch ein Metallsieb gedrückt. Zur Entfernung von Knochen- und Geweberesten folgte ein Zentrifugationsschritt für 8 min. bei 1000 rpm und 4° C. Der Überstand, in dem sich die Parasiten befanden, wurde abgenommen, zum Waschen in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und anschließend bei 4000 rpm und 4° C für 8 min. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes resuspendierte man das Pellet in 20 ml RPMI-Vollmedium. Die Parasiten konnten nun auf einer neuen Blutagarplatte ausgesät und kultiviert werden.

2.1.3 Aufreinigung von *Leishmania major*

Um die *Leishmanien*-Parasiten für einen Versuch verwenden zu können, musste zunächst eine entsprechende Menge der Einzeller von der Blutagarplatte abgenommen, in einer Petrischale gepoolt und nach Überführung in ein 50 ml Reaktionsgefäß insgesamt dreimal gewaschen werden. Hierzu erfolgte jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm und 4° C für 8 min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 50 ml PBS gelöst und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Dann wurde die Parasitenzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe: 20 µm, Kammerfaktor: 5×10^4) bestimmt. Hierfür musste der zu zählende Teil der *Leishmanien* in einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert werden. Nun konnte die *Leishmanien*-Suspension auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und im Experiment verwendet werden.

2.1.4 Herstellung von *Leishmanien*-Antigen

Zur Herstellung von löslichem *Leishmanien*-Antigen (SLA; engl. soluble *leishmania* antigen) wurden promastigote *Leishmanien* aus den Blutagarplatten entnommen und aufgereinigt (vgl. II 2.1.3). Nach Bestimmung der Parasitenzahl wurde die *Leishmanien*-Suspension auf eine Konzentration von 1×10^9 *L. major* / ml PBS eingestellt. Anschließend musste diese 15-mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur wieder aufgetaut werden. Die Lagerung des fertigen SLAs erfolgte bei -80° C.

2.1.5 Zellzählung

Um die Zellzahl einer Suspension bestimmen zu können benötigt man eine Neubauer-Zählkammer. Die zu zählenden Zellen werden mit dem sauren Farbstoff Trypanblau vermischt, welcher in die Zellen eindringt. Dadurch nehmen diese zunächst eine tiefblaue Färbung an. Lebende Zellen transportieren den Farbstoff rasch wieder aus dem Zytosol, tote Zellen hingegen bleiben blau gefärbt und können dadurch leicht unter dem Mikroskop

erkannt werden. 10 µl der Mischung aus Trypanblau und Zellsuspension wurden dann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe: 100 µm, Kammerfaktor: 10⁴) ausgezählt. Die Zellzahl je Milliliter Suspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Mittelwert der Zellen in vier Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ \times \text{Kammerfaktor} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Milliliter Suspension}}$$

Somit ergibt sich die Gesamtzellzahl der lebenden Zellen aus dem Produkt des Mittelwertes der Zellen in vier Großquadraten mit dem Kammerfaktor 10⁴, der Verdünnung und dem Volumen der Zellsuspension.

2.1.6 Blutentnahme und Gewinnung von Serum

Für die Bestimmung *L. major*-spezifischer Immunglobuline im Serum von Mäusen wurde den Tieren 100 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Alternativ wurden die Mäuse mit Fluran betäubt und das Blut mit Hilfe einer Pasteurpipette aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Nach vollständiger Gerinnung des Blutes wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation bei 10.000 g und Raumtemperatur für 10 min gewonnen und im ELISA eingesetzt.

2.1.7 Herstellung von GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand

Zur Gewinnung von Zellkulturüberständen, welche rekombinantes GM-CSF zur Generierung von BMDCs (s. 2.1.8) enthalten, wurden X6310 (X63Ag8-653) Zellen zweimal wöchentlich passagiert. Medium von zwei bis drei Tage alten Kulturen wurde gesammelt und 10 min bei 3220 g und 4° C zentrifugiert. Nach Sterilfiltrierung wurde der Überstand bei -20°C gelagert. Die Konzentration lag erfahrungsgemäß bei 250 ng / ml.

2.1.8 Generierung von Knochenmark-DCs (BMDCs)

Knochenmark-DCs (*Bone marrow derived dendritic cells*, BMDCs) wurden nach dem Protokoll von Manfred Lutz (Lutz et al., 1999) hergestellt. Hierfür entnahm man sowohl Tibia als auch Femur beider Hinterbeine einer Maus. Durch vorsichtiges Reiben mit einem Papiertuch wurden die Muskelreste am Knochen entfernt. Dann mussten die intakten Knochen zur Sterilisation für 2 min in 70%-igen Isopropanol eingelegt werden. Ab hier wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Den Alkohol entfernte man durch Abspülen des Knochens mit PBS. Dann wurden beide Enden mit einer sterilen Schere abgeschnitten. Das Knochenmark konnte nun mit Hilfe einer 20 ml Spritze und einer Kanüle (Länge: 19 mm, Außendurchmesser: 0,4 mm) heraus gespült werden. Hierfür verwendete man RPMI-Medium, dem 10% FCS, 50µM Mercaptoethanol, 100 U / ml Penicillin G, 100 U / ml Streptomycin und 10% GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) zugesetzt waren. Zum Erreichen einer homogenen Einzelzellsuspension mussten Knochenmarksklumpen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mit einer 10 ml Pipette zerkleinert werden. Nach Zentrifugation bei 300 g und 4° C für 5 min wurde das Pellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden je 2×10^6 Zellen in eine Petrischale gegeben und in 10 ml Medium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 3 Tagen wurden weitere 10 ml Medium pro Petrischale zugegeben. An Tag 6 sowie an Tag 8 wurde das Medium teilweise erneuert, indem man pro Schale 10 ml abnahm, die Zellen wie oben beschrieben zentrifugierte, das Pellet in einem entsprechendem Volumen frischem Medium resuspendierte und pro Schale wieder 10 ml dieser Zellsuspension hinzufügte. 10 Tage nach Isolation konnten die BMDCs für Versuche verwendet werden.

2.1.9 Isolierung von Zellen aus Lymphknoten und Milzen

Zur Gewinnung muriner Lymphknoten- oder Milzzellen wurden die Organe unter der Sterilbank entnommen und auf ein mit RPMI-Vollmedium getränktes Zellsieb gelegt. Anschließend wurden die Organe mit dem Stempel einer 2 ml - Spritze durch das Zellsieb gerieben, das anschließend mit 20 ml RPMI-Vollmedium durchgespült wurde. Es folgte ein

Zentrifugationsschritt, bei dem die Proben für 10 min bei 300 g und 4° C zentrifugiert wurden. Die Lymphknotenzellen konnten direkt für alle nachfolgenden Versuche weiterverwendet werden. Milzzellen hingegen mussten zunächst mit einem Erythrozyten-Lysepuffer behandelt werden. Dazu wurden die Zellen 5 min bei Raumtemperatur in 5 ml des Lysepuffers inkubiert und nach Zugabe von 10 ml RPMI-Vollmedium nochmals für 10 min bei 300 g und 4° C zentrifugiert.

2.1.10 Isolierung von Zellen aus Mauspfoten

Zur Isolierung von Zellen aus Mauspfoten wurden diese am Gelenk abgetrennt und mit einer Schere grob zerkleinert. Anschließend wurden sie in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml HBSS (mit Kalzium- und Magnesium-Zusatz) und 100 µl Kollagenase D-Stammlösung 30 min bei 37° C auf einem Thermoschüttler verdaut. Die Zugabe von 10 µl EDTA-Lösung führte zur Inaktivierung der Kollagenase D. Das verdaute Gewebe wurde wie oben beschrieben durch ein Zellsieb (70 µm) gedrückt und anschließend mit 10 ml RPMI-Vollmedium durchgespült. Nach der Zentrifugation bei 300 g und 4° C für 10 min wurden die Zellen direkt für die FACS-Analysen verwendet.

2.1.11 Anreicherung von Zellen durch magnetische Zellseparation (MACS)

Die Aufreinigung von T-Zellen aus den Zellsuspensionen der Lymphknoten von Mäusen erfolgte mit Hilfe des MACS® Cell Separation Kits von Miltenyi. Bei der MACS (engl. *magnetic cell sorting*) Methode werden Zellen in einer Suspension anhand ihrer Oberflächenmoleküle mit magnetischen MACS® MicroBeads markiert. Dann wird die Probe auf eine MACS-Säule gegeben, welche an einem magnetischen MACS-Separator befestigt wird. Die unmarkierten Zellen können die Säule ungehindert passieren, während die markierten Zellen durch das Magnetfeld in der Säule zurück gehalten werden. Nach Entfernen der Säule vom Separator können die markierten Zellen eluiert werden.

Zunächst wurde eine Einzellsuspension wie oben beschrieben (vgl. II 2.1.9) hergestellt, um das Verstopfen der MACS-Säule zu verhindern. Nach der Bestimmung der Zellzahl in der Suspension (vgl. II 2.1.5) mussten diese bei 300 g für 10 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 90 µl resuspendiert (diese sowie alle folgenden Mengen- oder Volumenangaben beziehen sich auf 10^7 Zellen). Man gab 10 µl MicroBeads hinzu, welche das gewünschte Oberflächenmolekül erkannten und daran banden. Nach 15 min Inkubation bei 4° C mussten die Zellen gewaschen werden, indem man 2 ml MACS-Puffer (PBS / 0,5 % BSA / 2 mM EDTA) zugab und bei 300 g für 10 min zentrifugierte. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Dabei konnten maximal 10^8 Zellen in diesem Volumen aufgenommen werden.

Für die negative Selektion der Zellen wurde eine Säule der Größe LD im magnetischen Feld des MACS-Separators angebracht und mit 2 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurden die Zellen auf die Säule gegeben. Die unmarkierten T-Zellen passierten die Säule und wurden in einem 15 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.1.12 Markieren von Zellen mit CFSE

1×10^7 MACS-aufgereinigte T-Zellen von BALB/c – bzw. C57BL/6 – WT – Mäusen wurden bei 300 g und 4° C für 5 min zentrifugiert und in 1 ml PBS / 2 % FCS resuspendiert. CFSE wurde zum Zellpellet hinzugegeben, so dass die Endkonzentration 1 µM betrug. Die Suspension wurde zehn Sekunden durch vortexen gemischt und anschließend 10 min bei 37° C im abgedunkelten Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden nun zweimal mit 15 ml eiskaltem PBS / 5 % FCS (300 g, 4° C, 5 min), dann noch einmal zweimal mit PBS auf die gleiche Weise gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels FACS-Analyse die Überprüfung der CFSE-Markierung, bevor die Zellen im Experiment eingesetzt wurden.

2.1.13 Markierung von *Leishmania major* mit CFSE

Leishmanien wurden wie unter II. 2.1.3 beschrieben isoliert. Das erhaltene Pellet musste zunächst in 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert werden, um Rückstände aus den Blutagarplatten zu entfernen. Nach 5 min folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3000 g und 4° C für 7 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert, erneut wie beschrieben zentrifugiert. Nachdem die Parasiten zweimal mit PBS gewaschen wurden konnte man anschließend die Zellzahl bestimmen. Das gewünschte Volumen wurde abgenommen, wie bereits beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die *Leishmanien* in einer frisch hergestellten CFSE – Färbelösung ($c = 1 \mu\text{M}$) resuspendiert (1×10^7 *Leishmanien* je 1 ml). Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37° C im Wasserbad, bei der das Reaktionsgefäß zum Schutz vor Licht mit Alufolie umwickelt wurde, gab man 10 ml PBS / 5 % FCS hinzu. Nach Zentrifugation bei 3000 g und 4° C für 8 min wurde noch einmal mit PBS / 5 % FCS gewaschen. Bevor die Parasiten im Versuch verwendet werden konnten mussten sie noch zweimal mit PBS gewaschen werden.

2.1.14 Stimulation von Lymphknotenzellen

In dieser Arbeit wurden Lymphknotenzellen von naiven und infizierten BALB/c-Mäusen *in vitro* stimuliert, um sowohl das Proliferationsverhalten, als auch die Zytokinproduktion untersuchen zu können. Dazu wurden je 3×10^5 Zellen in RPMI-Vollmedium in jede Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 96 Näpfen pipettiert und in einem Endvolumen von 200 μl mit SLA (das lösliche Äquivalent von drei *Leishmania major*-Parasiten pro Lymphknotenzelle) für drei Tage bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Zusätzlich enthielt das Medium 3 mg / ml Bromdesoxyuridin (BrdU). Dabei handelt es sich um ein Thymidin-Analogon, welches in neu synthetisierte DNS eingebaut wird. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, welcher an BrdU bindet und mit einem Fluorochrom konjugiert ist, können Zellen, welche proliferiert haben, im FACS detektiert werden (vgl. II. 2.1.16). Am Ende der

Inkubation wurde der Überstand abgenommen und für den Zytokin-ELISA (vgl. II. 2.1.17) eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet und für die FACS-Analyse verwendet.

2.1.15 T-Zell-Proliferationsassay

Um die Aktivierung von T-Zellen über BMDCs untersuchen zu können, wurden zunächst Knochemark-DCs generiert (vgl. II. 2.1.8). Am selben Tag wurden ein bis zwei Mäuse mit *Leishmania major*-Parasiten infiziert (vgl. II. 2.2.1). Nach neun Tagen wurden die BMDCs geerntet und die Zellzahl bestimmt (vgl. II. 2.1.5). In einer Rundboden -Zellkulturplatte mit 96 Näpfen wurden pro Ansatz 200.000 BMDC eingesetzt. Die verschiedenen Stimulanzien verwendete man wie folgt:

- (1) *Leishmania major* (promastigot und amastigot): 1×10^6 pro Ansatz
- (2) SLA (von promastigoten und amastigoten *L. major*): das Äquivalent von 1×10^6 pro Ansatz
- (3) Curdlan: 50 µg je Ansatz

Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert.

10 Tage nach Infektion der Mäuse wurden diese durch zervikale Dislokation getötet und die poplitealen Lymphknoten entnommen. Aus der erhaltenen Einzelzellsuspension (vgl. II. 2.1.9) konnten die T-Zellen durch MACS (*magnetic activated cell sorting*, vgl. II. 2.1.11) isoliert und zur Analyse der Proliferation mit dem CFSE-Farbstoff angefärbt (vgl. II. 2.1.12) werden. Pro Ansatz wurden 2×10^4 stimulierte BMDCs und 2×10^5 CFSE – gefärbte T-Zellen in eine Zellkulturplatte mit 96 Näpfen eingesetzt und 72 Stunden bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der dreitägigen Inkubation wurden zunächst 100 µl des Überstandes abgenommen und bei -20° C eingefroren. Anschließend überführte man die Zellen in FACS-Röhrchen, wobei die Zellen eines Ansatzes in jeweils ein Röhrchen gegeben wurden. Dann erfolgte die Färbung der Oberflächenmoleküle und anschließend die intrazelluläre Zytokinfärbung (vgl. II. 2.1.16). Nach Fixierung der Zellen in PBS / 2 % FCS / 4 % PFA wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

2.1.16 Durchflusszytometrie (FACS)

Das Verfahren der Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellsuspensionen auf Einzelzelebene. Es beruht darauf, dass Zellen einzeln hintereinander durch eine Kapillare des FACS-Gerätes den Lichtstrahl eines Lasers passieren. Die Vorwärtsstreuung korreliert dabei mit der Zellgröße, während die seitliche Streuung ein Maß für die zelluläre Granularität darstellt. Der Einsatz von fluoreszenzkonjugierten Antikörpern erlaubt den Nachweis verschiedener Proteine einer Zelle, die sich auf der Zelloberfläche oder im Inneren der Zelle befinden können. Die Antikörper, die spezifische Proteine erkennen, sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, der entweder durch den Argon-Ionen-Laser mit der Wellenlänge von 488 nm, dem Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm, dem violettem Laser mit der Wellenlänge 407 nm oder dem UV-Laser mit der Wellenlänge 355 nm angeregt wird. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl der zu untersuchenden Moleküle auf oder in einer einzelnen Zelle. Ausgewertet werden die Daten entweder in einem Histogramm (Einparameterdarstellung) oder in einem Dotplot (Zweiparameterdarstellung).

Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie angewendet, um Zellen aus Mauspfoten, Lymphknoten, Milzen und Blut zu untersuchen. Dazu wurde zunächst eine Einzelzellsuspension hergestellt und daraus 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und pelletiert (300 g, 4° C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen. Um eventuell auftretende Zellverluste während der Färbung bestimmen zu können, wurden pro FACS-Röhrchen 10.000 Latex-Kügelchen zugegeben. Für die extrazelluläre Färbung wurden die Fc-Rezeptoren auf den Zellen mit 20 µg / ml Cohn-II für 20 min bei 4° C geblockt. Dadurch konnte die unspezifische Anlagerung der Färbeantikörper verhindert werden. Zum Waschen der Zellen wurde nach jedem Inkubationsschritt 1 ml FACS-Puffer (PBS / 2 % FCS) hinzugegeben und die Proben 5 min bei 300 g und 4° C zentrifugiert. Anschließend wurden die entsprechenden Antikörper, in FACS-Puffer verdünnt, hinzu pipettiert und 20 min bei 4° C inkubiert. Bei Mehrfachfärbungen wurde ein Gemisch aus allen Antikörpern verwendet (vgl. II. 1.5). Falls ein biotinylierter Antikörper eingesetzt wurde, folgte nach einem

zusätzlichen Waschschrift noch einmal für 20 min bei 4° C ein weiterer Färbeschritt mit einem fluoreszenten Streptavidin-Konjugat. Nach der Färbung folgte die Fixierung der Zellen in PBS / 2 % FCS / 4 % PFA. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte entweder am BD FACSCalibur oder am BD LSR II. Die Auswertung der Daten wurde mit der Software *FlowJo* durchgeführt.

Zur Auswertung wurden innerhalb der Zweiparameterdarstellung die Latex-Kugeln anhand ihrer Größe identifiziert und deren Anzahl bestimmt. Aus dem Verhältnis der eingesetzten Latex-Kugeln zu den vorhandenen Kugeln konnte man berechnen, wie viele Kügelchen während der Färbung verloren gingen. Mit diesem Prozentsatz ließ sich auf die im FACS-Röhrchen enthaltenen Zellen einzelner Populationen zurück rechnen. Da jedes Röhrchen 500.000 Zellen enthielt, konnte nun der Quotient aus Zellzahl des kompletten Organs und den im Röhrchen befindlichen Zellen gebildet werden. Mit diesem Quotient multiplizierte man dann die Zellzahl der Population, die sich im FACS-Röhrchen befand. Auf diese Weise erhielt man die Anzahl der Zellen einer Population im ganzen Organ.

Alternativ wurde der prozentuale Anteil einer Zellpopulation im Bezug zu allen im FACS-Röhrchen befindlichen Zellen berechnet.

Intrazellulärer Zytokinnachweis im Durchflusszytometer

Um intrazellulär die Zytokine IL-4 und IFN- γ nachzuweisen wurden je 3×10^5 Lymphknotenzellen in der Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 96 Näpfen in einem Volumen von 200 μ l für vier Stunden mit PMA (Endkonzentration im Napf: 10 ng / ml) und Ionomycin (Endkonzentration im Napf: 500 ng / ml) bei 37° C inkubiert. Zusätzlich wurde je Napf 1 μ l Golgi-Stop (Monensin) zugegeben, um den Transport von Proteinen aus der Zelle zu inhibieren. Anschließend erfolgte die Färbung extrazellulärer Moleküle, wie oben beschrieben. Danach wurden die Zellen für die intrazelluläre Färbung für 20 min bei 4° C mit 100 μ l Cytofix / Cytoperm-Lösung fixiert und permeabilisiert und anschließend mit 1 ml Perm / Wash-Lösung gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 300 g und 4° C wurden je 0,5 μ l der Antikörper gegen IL-4 und IFN- γ in die Röhrchen zu den Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 4° C wurden die Zellen noch einmal gewaschen und für die Analyse in 200 μ l PBS / 2 % FCS / 4 % PFA fixiert.

FACS-basierter Zytokinnachweis in Zellkulturüberständen

Die Überstände *in vitro* kultivierter oder aus Lymphknoten isolierter Zellen nach Stimulation wurden gesammelt und bei -20° C gelagert.

Die Proben wurden an Dr. Richard Weiss, Salzburg, Österreich gesendet. Dort wurde die Konzentration der Zytokine IL-1 α , IFN- γ , TNF, IL-12, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 in den Proben mit Hilfe des BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) bestimmt.

Analyse der Zellproliferation *in vivo*

Um die *in vivo*-Proliferation von Zellen nachweisen zu können, wurde ein BrdU-Test durchgeführt (vgl. II. 2.2.2). Dabei bauen proliferierender Zellen das Thymidin-Analogon BrdU in ihre DNS ein. Dieser Einbau kann durch Färbung mit einem Antikörper gegen BrdU durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Zunächst erfolgte die Färbung extrazellulärer Moleküle nach dem oben beschriebenen Protokoll. Danach folgte die Permeabilisierung der Plasmamembran mit Cytofix / Cytoperm, und anschließender Inkubation der Zellen in 100 μ l PBS / 1 % BSA / 0,01 % Triton-X100 für 10 min bei 4° C, wodurch die Kernmembran permeabilisiert wurde. Dann wurden die Zellen erneut für 5 min bei Raumtemperatur mit 100 μ l Cytofix / Cytoperm inkubiert, mit 1 ml Perm / Wash-Lösung gewaschen und für 60 min bei 37° C mit 30 μ g DNase / 100 μ l PBS inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Perm / Wash-Lösung wurden 2,5 μ l des FITC-konjugierten anti-BrdU Antikörpers direkt in den Rücklauf zum Zellpellet gegeben. Nach dem Mischen folgte ein Inkubationsschritt für 20 min bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in PBS / 2 % FCS / 4 % PFA resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

2.1.17 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mit Hilfe eines ELISA können in einer Lösung enthaltene Proteine spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente diese Methode zur Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen sowie zum Nachweis *Leishmania major*-spezifischer Immunglobuline in den Seren infizierter Mäuse.

Zytokin-ELISA

Zur Quantifizierung der Zytokine IFN- γ und IL-4 in den Überständen von Lymphknoten-Zellsuspensionen wurden DuoSet ELISA Development Kits (R & D Systems, Wiesbaden) verwendet. Der ELISA wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Um den zytokinspezifischen Antikörper für den sog. „Sandwich“-ELISA an die Oberfläche der ELISA-Platte zu binden wurde er in Coating-Puffer verdünnt, pro Napf 50 μ l der Verdünnung eingesetzt, und über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt und unspezifische Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation mit PBS / 1 % BSA (300 μ l / Napf) bei 37° C blockiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde 50 μ l der Proben in die Näpfe zugegeben. Um die Konzentration des Zytokins in der jeweiligen Probe ermitteln zu können, musste auf jeder Platte eine Standardreihe in Doppelwerten mitgeführt werden. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation bei 37° C wurden die Platten dreimal gewaschen. Anschließend wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (50 μ l, in PBS / 0,1 % BSA verdünnt) zugegeben und zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Bevor die Platten mit einem Konjugat aus Streptavidin und Meerrettich-Peroxidase (1 : 200 in PBS / 0,1 % BSA) beladen werden konnten, mussten sie erneut dreimal gewaschen werden.

Da Biotin eine hohe Affinität zu Streptavidin besitzt bilden sich innerhalb von 30 Minuten stabile Komplexe. Die Detektion dieser Komplexe erfolgte nach dreimaligem Waschen mit Hilfe einer Substratlösung, von der 100 μ l pro Napf hinzugefügt wurden. Das enthaltene 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) wird durch die Peroxidase, welche proportional zu dem vorhandenen Zielmolekül im Napf vorhanden ist, in einen blauen Farbstoff umgewandelt. Sobald in der Standardreihe eine deutliche Blaufärbung zu erkennen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 2 N H₂SO₄ je Napf gestoppt, wodurch ein Farbumschlag zu Gelb erfolgte. Die quantitative Analyse erfolgte durch eine photometrische Messung bei 450 nm im ELISA-Reader.

Detektion *Leishmania*-spezifischer Immunglobuline

Zur quantitativen Bestimmung Leishmanien-spezifischer Antikörper im Serum infizierter Mäuse wurden zunächst *Leishmania major*-Parasiten von einer Blutagarplatte geerntet. Die Leishmanien wurden mit PBS gewaschen (vgl. II. 2.1.3), auf eine Konzentration von 2×10^6 /

ml eingestellt und jeweils 50 µl dieser Suspension wurde in jede Vertiefung einer ELISA-Platte gegeben. Die Platte wurde für 8 min bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Im Anschluss wurden die Parasiten durch Zugabe von 50 µl 0,25 % Glutaraldehyd in PBS für 5 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit 200 µl PBS / 1 % BSA über Nacht bei 4° C blockiert. Ein erneutes Waschen führte zur Entfernung des Blockpuffers. Anschließend wurden 50 µl Probenlösung jeweils als Duplikate hinzugefügt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nun mussten die Platten erneut dreimal mit PBS / 0,05 % Tween 20 gewaschen werden, ehe 50 µl Isotyp spezifischer Ratte-anti-Maus Antikörper, in Blockpuffer gelöst, hinzugefügt werden konnte. Nach einer Stunde Inkubation bei 37° C und dreimaligem Waschen mit PBS / 0,05 % Tween 20 wurden 100 µl der Substratlösung pro Ansatz hinzugefügt. Sobald die Kontrolle eine leichte Blaufärbung annahm wurde die Reaktion mit 50 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt. Die Intensität der Blaufärbung ließ sich mittels OD bei 450 nm im ELISA-Reader messen. Die ermittelten Werte wurden dann durch die Werte eines naiven Serums dividiert, um die relativen ELISA-Einheiten (REU) der Proben berechnen zu können.

2.1.18 Nachweis der Expression von C-Typ-Lektin-Liganden auf *Leishmania major*

Um zu untersuchen, ob *Leishmania major* auf ihrer Oberfläche Liganden für C-Typ-Lektine tragen, wurden die Parasiten zusammen mit C-Typ-Lektin – hIgG – Fusionsproteinen inkubiert. Gebundene Fusionsproteine konnten dann mit einem anti-humanIgG-Antikörper detektiert werden.

Dazu mussten zunächst Parasiten, wie in Punkt II. 2.1.3 beschrieben, aufgereinigt werden. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit Erythrozyten-Lysepuffer, um Rückstände der Blutagarplatten vollständig zu entfernen. Dabei wurden pro Ansatz 3×10^6 *Leishmania* in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, in dem auch die Färbung stattfand. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 30-minütige Inkubation mit PBS / 10 % FCS / 10 % Mausserum blockiert. Anschließend wurden die Leishmanien mit PBS gewaschen und bei 3000 g und 4° C für 8 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden in jeden Ansatz 2 µg eines Fusionsproteins in 100 µl Lektinbindepuffer / 10 % FCS

zugegeben. Durch Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die Bindung des C-Typ-Lektinteils an die Parasiten ermöglicht. Nach einer Stunde erfolgte ein Waschschriff mit PBS, danach Zentrifugation bei 3000 g und 4° C für 8 min. Um die an Parasiten gebundenen Fusionsproteine detektieren zu können, mussten die Leishmanien mit einem Fluoreszenz-konjugiertem Anti-human-IgG-Antikörpers, verdünnt in Lektinbindepuffer / 10 % FCS, für 1 Stunde bei RT inkubiert werden. Dann musste wieder mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert werden. Um die DNS der Leishmanien anzufärben wurde 4', 6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) 1:1000 in PBS verdünnt und für 10 min zu den Parasiten gegeben. DAPI lagert sich an AT-reiche DNS-Sequenzen an und färbt diese somit. Nach einem letzten Waschschriff wurden die Proben mit Hilfe des *Cytospins* bei 1000 g auf einen Objektträger gebracht, mit Permafluor eingedeckelt und über Nacht bei RT im Dunkeln getrocknet.

2.2 Tierversuche

Für alle Tierversuche wurden weibliche Mäuse ab einem Alter von sechs Wochen verwendet.

2.2.1 Infektion, Messung der Pfotenschwellung und DTH-Reaktion

Promastigote Leishmanien in der stationären Wachstumsphase wurden aus den Blutagarplatten entnommen, in einer Petrischale gesammelt und in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem PBS und Zentrifugation bei 3000 g und 4° C für 8 min wurde eine 1 : 10 - Verdünnung der Parasiten in Paraformaldehyd-Lösung ausgezählt (vgl. II. 2.1.5). Die Mäuse wurden infiziert, indem 3×10^3 (*low dose*-Modell) oder 3×10^6 (*high dose*-Modell) Parasiten in 30 µl PBS subkutan in die rechte Hinterpfote injiziert wurden. Dazu fixierte man die Tiere am Abdomen in einer Röhre.

Der Infektionsverlauf wurde anhand wöchentlicher Messungen des Pfortendurchmessers verfolgt. Anschließend wurde die prozentuale Zunahme des Durchmessers der infizierten rechten Pfote gegenüber der linken naiven Pfote berechnet.

Um die Immunantwort der Gedächtnis-T-Zellen zu untersuchen, wurden vier bis sechs Wochen nach dem Abheilen der Primärinfektion 3×10^3 (*low dose*-Modell) oder 3×10^6 (*high dose*-Modell) Parasiten in 30 µl PBS in die linke Hinterpfote subkutan injiziert und der Infektionsverlauf wie oben beschrieben verfolgt.

Zudem kann zur Untersuchung der Immunantwort der Gedächtnis-T-Zellen eine DTH-Reaktion durchgeführt werden. Dazu erhielten Tiere, deren Primärinfektion komplett abgeheilt war, eine Injektion von 30 µl SLA (Konzentration entsprach 3×10^6 Parasiten) in die linke Pfote. Im Abstand von 24 Stunden wurden die Pfortenschwellungen gemessen und als prozentualer Anstieg gegenüber einer 2 mm dicken Pfote, was der durchschnittlichen Dicke einer naiven Pfote entspricht, dargestellt.

2.2.2 In vivo Proliferationsnachweis während einer *Leishmania*-Infektion

In dieser Arbeit wurde die Proliferation von Zellen *in vivo* untersucht. Den infizierten Tieren wurden drei Tage vor dem Analysezeitpunkt 0,8 mg / ml des Thymidin-Analogons BrdU mit dem Trinkwasser verabreicht. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen BrdU konnten die Zellen detektiert werden, welche das BrdU in ihre DNS eingebaut und somit proliferiert hatten.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNS-Gewinnung aus Gewebeproben

Um genomische DNS aus Mausorganen oder Gewebestücken zu isolieren, wurden kleine Stücke der für die Analyse notwendigen Organe in einem 2 ml Reaktionsgefäß in 500 µl Zelllyse-Puffer aufgenommen. Füße wurden komplett zur Isolation der genomischen DNS herangezogen und daher in 1000 µl Zelllyse-Puffer lysiert. Um störende Proteine zu entfernen erfolgte der Verdau zusammen mit 10 µl Proteinase K bei 58°C und 1000 rpm über Nacht im Thermoschüttler. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die restlichen Proteine durch Zugabe von 200 µl Proteinpräzipitations-Puffer und anschließendem scharfen mischen für 20 Sekunden gefällt. Zur Abtrennung dieser Proteine wurden die Proben 10 min bei 1700 g zentrifugiert. Der proteinfreie Überstand wurde zur Fällung der DNS zu 700 µl 100 %-igem Isopropanol gegeben, 50-mal invertiert und bei 20800 g und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 70 %-iger unvergällter Ethanol zum Pellet gegeben. Nach erneutem Zentrifugieren bei 20800 g und RT für 5 min wurde der Überstand erneut verworfen und das DNS-Pellet für 45 min an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die DNS der Organe in 50µl DNase-freiem H₂O gelöst und bei 4° C gelagert. Die DNS, welche aus den Mauspfoten isoliert wurde, musste hingegen in bis zu 1 ml DNase-freiem H₂O gelöst werden.

2.3.2 Quantitative PCR zur Parasitendichtebestimmung

Um den Verlauf einer Immunreaktion nach einer Infektion mit *Leishmania major* verfolgen zu können, wurde unter anderem die Anzahl der Parasiten in den Füßen der infizierten Mäuse bestimmt. Dies geschah mit Hilfe von quantitativen PCR-Analysen. Dazu musste zunächst DNS aus den infizierten Geweben gewonnen werden (vgl. II. 2.3.1). Nach photometrischer Bestimmung des DNS-Gehalts in den Proben wurde die Konzentration auf 125 pg / µl eingestellt.

Die Standardkurve zur Bestimmung des β -Aktin-Gehalts der Proben wurde erstellt, indem genomische DNS einer Mäusemilz isoliert und auf eine Konzentration von 12500 pg / μ l eingestellt wurde. Durch eine Verdünnungsreihe erhielt man Konzentrationen von 1250 pg / μ l, 125 pg / μ l, 12,5 pg / μ l und 1,25 pg / μ l, von denen jeweils 1 μ l pro Napf eingesetzt wurde. Zur Bestimmung des Gehalts an Leishmanien-DNS wurde das Plasmid von Christian Drosten verwendet (Schulz et al., 2003), welches mehrere Kopien der 18S-rRNA-Sequenz des Leishmanien-Genoms enthält. Hierfür wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe erstellt, ausgehend von der 10^{-2} -Verdünnung (wurde vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg zur Verfügung gestellt). Die Verdünnungen erfolgten in Maus - DNS ($c = 125$ pg / μ l). Die 10^{-2} - Verdünnung entspricht 10^8 Units / μ l. Die aus der Verdünnungsreihe resultierenden Konzentrationen 10^{-5} (10^5 Units / μ l), 10^{-6} (10^4 Units / μ l), 10^{-7} (10^3 Units / μ l) und 10^{-8} (10^2 Units / μ l) wurden zur Erstellung einer Standardkurve verwendet.

Durch die quantitative PCR wurde zum einen Maus- β -Aktin nachgewiesen, zum anderen wurde die in den Proben enthaltene Leishmanien-18S-rRNA quantifiziert. Mit Hilfe der gemessenen Kopienzahlen konnte dann die Anzahl der sich im Gewebe befindlichen Parasiten berechnet werden. Alternativ konnten die Werte miteinander ins Verhältnis gesetzt und als relative Parasitendichte dargestellt werden.

In jede Vertiefung einer PCR-Platte mit 96 Vertiefungen wurde folgender Ansatz gegeben:

- 12,5 μ l iQ™ SYBR Green Supermix
- 2 μ l Primer (entweder Maus- β -Aktin oder *Leishmania* spezifisch)
- 9,5 μ l H₂O
- 1 μ l genomische DNS

Nach dem Verschließen der PCR-Platte mit einer selbstklebenden Folie wurden die Proben im BioRad iCycler iQ5 vermessen. Dazu verwendete man folgendes Programm:

- (1) Initiale Denaturierung: 95° C für 13 Minuten
- (2) Denaturierung: 95° C für 20 Sekunden
- (3) *Annealing*: 58° C für 30 Sekunden
- (4) Elongation: 72° C für 30 Sekunden

(5) 24° C für 5 Minuten

Die Schritte zwei bis vier wurden 40-mal wiederholt.

2.3.3 Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*; PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Standardmethode, die zur Amplifikation von DNS genutzt wird. Mit ihrer Hilfe lassen sich auch geringe Mengen vorhandener DNS nachweisen und analysieren.

In dieser Arbeit wurde die PCR dazu verwendet, gentechnisch veränderte Mäuse zu genotypisieren. Dazu wurde, wie unter II. 2.3.1 beschrieben, DNS aus kleinen Gewebestücken isoliert und anschließend mit einer Taq – Polymerase, Primern sowie freien Nukleotiden und einem Puffer wie folgt versetzt:

12,5 µl GoTaq®

1 µl Primer pKOAREV

1 µl Primer DKON

1 µl Primer KOINTREV2

8,5 µl H₂O

1 µl cDNA

Der verwendete GoTaq® Green Master Mix enthielt neben der GoTaq® DNS Polymerase einen 2 x Green GoTaq® *Reaction Buffer* (pH 8,5), je 400 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP sowie 3 mM MgCl₂. Außerdem beinhaltete er zwei Farbstoffe, durch die der Fortschritt bei der Gelelektrophorese verfolgt werden kann.

Die DNS – Doppelstränge wurden aufgetrennt, indem die Ansätze in einem *Thermocycler* auf 95° C erhitzt wurden. Während des *Annealing*-Schrittes lagern sich die Primer an die DNS an. Die Elongationsphase diente der Duplikation der DNS durch die Taq – Polymerase.

Standardmäßig wurden folgende Bedingungen verwendet:

- (1) Vordenaturierung sowie Aktivierung des Enzyms : 95° C für 5 Minuten
- (2) Denaturierung: 95 °C für 60 Sekunden
- (3) *Annealing*: 55° C für 60 Sekunden
- (4) Elongation: 72°C für 110 Sekunden
- (5) Finale Elongation: 72° C für 5 Minuten

Die Schritte zwei bis vier wurden 35-mal wiederholt.

2.3.4 Analyse der PCR-Produkte

Die Analyse der PCR-Fragmente erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese. Das Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren liegt unter elektrophoretischen Bedingungen negativ geladen vor. Das bedeutet, dass die Fragmente im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern. Da die Fragmente alle eine unterschiedliche Größe besaßen, wiesen sie im elektrischen Feld eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit auf und konnten dadurch aufgetrennt werden.

Zum Gießen eines Gels wurden 1,8 % (w/v) Agarose in 200 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Außerdem wurden 2 µl Ethidiumbromid zur Detektion der DNS hinzu gegeben. Nachdem dieses Gemisch leicht abgekühlt war, wurde es auf einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach vollständiger Abkühlung wurde es in eine Gelkammer mit 1 x TAE-Puffer, welcher als Laufpuffer diente, gelegt. Die PCR-Proben wurden aufgetragen und die äußersten Taschen mit Standardproben der Größen 100 bp oder 1 kB befüllt. Es wurde eine Spannung von 100 V für 45 min bis 1 Stunde angelegt und anschließend die Fragmente in einem *Biolmager* sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der jeweils angegebene Test verwendet.

III. Ergebnisse

In den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts deuteten einige Studien darauf hin, dass durch die gemeinsame Verabreichung von β -Glucan und abgetöteten *Leishmania*-Parasiten eine Resistenz der ansonsten suszeptiblen Mauslinie BALB/c gegen lebenden Leishmanien erreicht werden kann. In den Untersuchungen wurden ein Erreger der Hautleishmaniose, *Leishmania major*, sowie der viszeralen Leishmaniose, *Leishmania donovani*, verwendet. Die resistenzfördernde Wirkung des β -Glucans konnte sowohl bei subkutaner, intraperitonealer als auch intradermaler Gabe nachgewiesen werden (Goldman and Jaffe, 1991; Holbrook and Cook, 1983; Holbrook et al., 1981). Allerdings gelang es den Forschern zum damaligen Zeitpunkt nicht, den Mechanismus der Wirkung von β -Glucan auf den Verlauf der Tropenkrankheit zu identifizieren. Nach 1991 sind lange Zeit keine weiteren Ergebnisse auf diesem Gebiet der Forschung veröffentlicht worden.

Im Jahre 2001 identifizierten Brown et. al. den C-Typ-Lektin-Rezeptor Dectin-1 als einen weiteren Rezeptor für β -Glucan auf Makrophagen (Brown and Gordon, 2001). In den darauf folgenden Jahren konnten sie zudem zeigen, dass es sich bei Dectin-1, von dem mittlerweile bekannt war, dass es auch auf anderen Zelltypen, wie dendritischen Zellen (DC), exprimiert wird, um den wichtigsten Rezeptor für β -Glucan handelt. Die Bindung eines Liganden sorgt für die Aktivierung verschiedenster zellulärer Funktionen, wie Endo- und Phagozytose oder die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor (TNF) oder Interleukin-6 (IL-6), sowie von Chemokinen wie CXCL2 (Brown et al., 2002, 2003; Reid et al., 2009; Taylor et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der C-Typ-Lektin-Rezeptor Dectin-1 für den Krankheitsverlauf im experimentellen Modell der Leishmaniose von Bedeutung ist. Damit zusammenhängend sollte der Einfluss des Dectin-1 – Liganden β -Glucan auf Resistenz bzw. Suszeptibilität der verwendeten Mausstämmen betrachtet und ein möglicher Wirkmechanismus herausgearbeitet werden.

1. Untersuchungen zur Expression des C-Typ-Lektin-Rezeptors Dectin-1 nach Infektion mit *L. major*

1.1 *In vivo* Untersuchungen zur Expression von Dectin-1 auf DCs

Resistente C57BL/6-Mäuse sowie susceptible BALB/c-Mäuse wurden mit je 3×10^6 Parasiten subkutan infiziert. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob, und wenn ja auf welchen Zellen, sich das Expressionsmuster von Dectin-1 nach einer Infektion mit *Leishmania* (*L.*) *major* ändert. Dazu erfolgte an Tag 6 sowie an Tag 20 nach Infektion (*post infection*; p.i.) die durchflusszytometrische Analyse der Zellen des drainierenden poplitealen Lymphknotens (pLN).

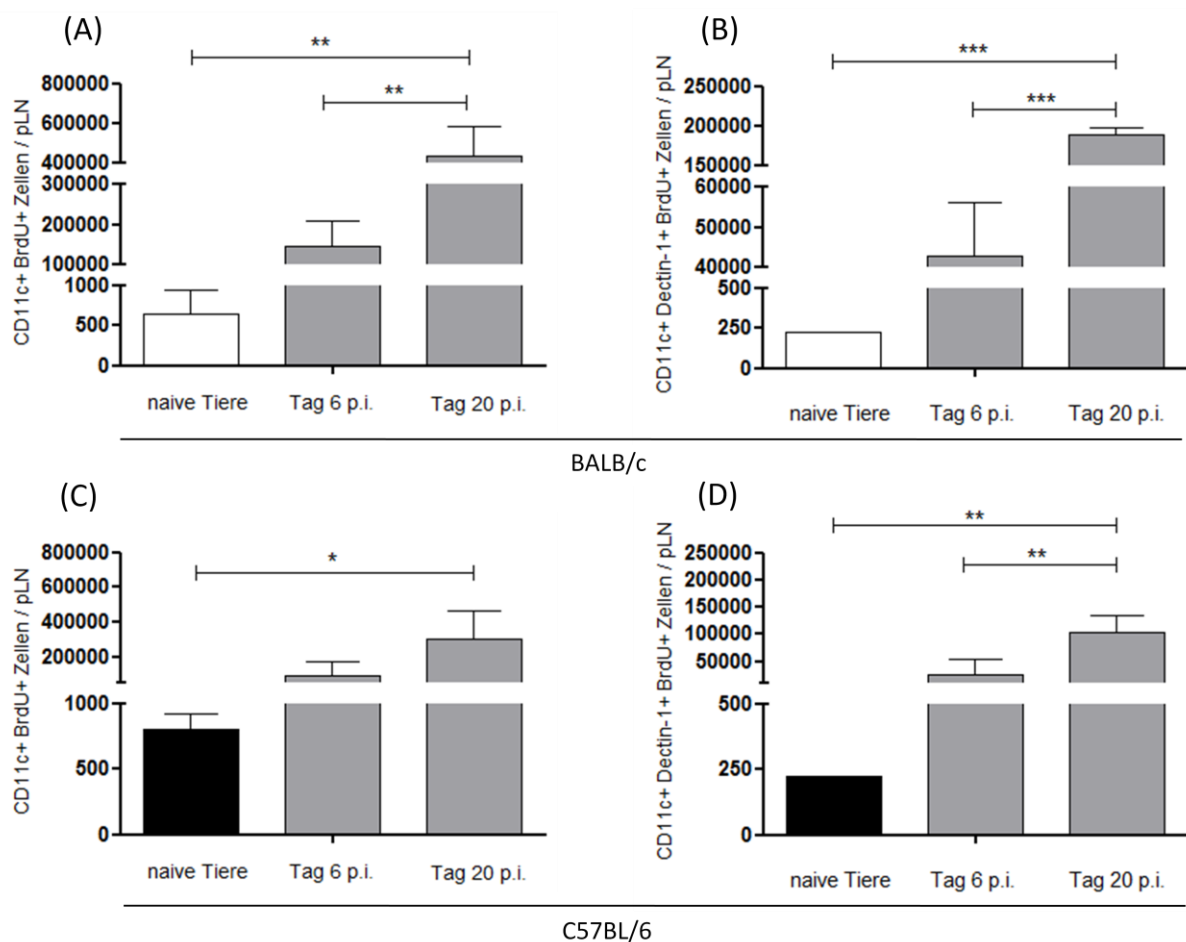


Abbildung 2: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation von DCs und der Dectin-1 - Expression auf den Zellen.

Infizierten Tieren wurde zur Identifizierung proliferierender Zellen drei Tage vor der Analyse BrdU verabreicht. Die Anzahl proliferierender DCs *in vivo* sowie deren Dectin-1 Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde mittels FACS-Analysen ermittelt. (A) In BALB/c – Mäusen kann eine signifikant erhöhte Anzahl proliferierender (BrdU⁺) DCs im

Vergleich zu naiven Tieren nachgewiesen werden. (B) Die Anzahl der Dectin-1⁺ proliferierenden DCs steigt signifikant mit der Dauer der Infektion. (C) Auch in C57BL/6 – Mäusen steigt die Proliferationsrate CD11c⁺ Zellen nach Infektion mit *L. major* signifikant an. (D) Die *L. major* – Infektion führt auch hier zu einem signifikant erhöhtem Anteil Dectin-1⁺ Zellen unter den proliferierenden CD11c⁺ Zellen.

Repräsentativ gezeigt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten. Analysiert wurden pro Gruppe jeweils 3 Tiere. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: One-way ANOVA.

Bereits 6 Tage nach der Infektion konnten in Tieren beider Mauslinien deutlich mehr proliferierende CD11c⁺ DCs in den drainierenden Lymphknoten mittels BrdU – Einbau durchflusszytometrisch nachgewiesen werden als in naiven Kontrolltieren. Nach einer Infektionsdauer von 20 Tagen proliferierten signifikant mehr DCs als in den nicht infizierten Tieren (Abb. 2A, 2C). Ein beträchtlicher Teil (BALB/c: 42,9 %; C57BL/6: 34,7 %) dieser proliferierenden Zellen exprimierte Dectin-1, wobei 20 Tage p.i. auch die Anzahl der Dectin-1 – exprimierenden DCs in beiden Mausstämmen signifikant erhöht war, verglichen mit den Kontrolltieren (Abb. 2B, 2D). Auffällig war, dass in den suszeptiblen BALB/c - Mäusen allgemein mehr proliferierende sowie Dectin-1 exprimierende DCs nachweisbar waren als in resistenten C57BL/6 – Mäusen (Abb. 2).

Da für eine erfolgreiche Immunabwehr nicht nur die lymphatischen Organe eine Rolle spielen, sondern auch die Immunzellen, welche am Infektionsherd vorhanden sind, wurde nachfolgend untersucht, ob proliferierende Dectin-1⁺ DCs auch im Gewebe des Fußes, also dem Ort der Infektion, nachweisbar sind.

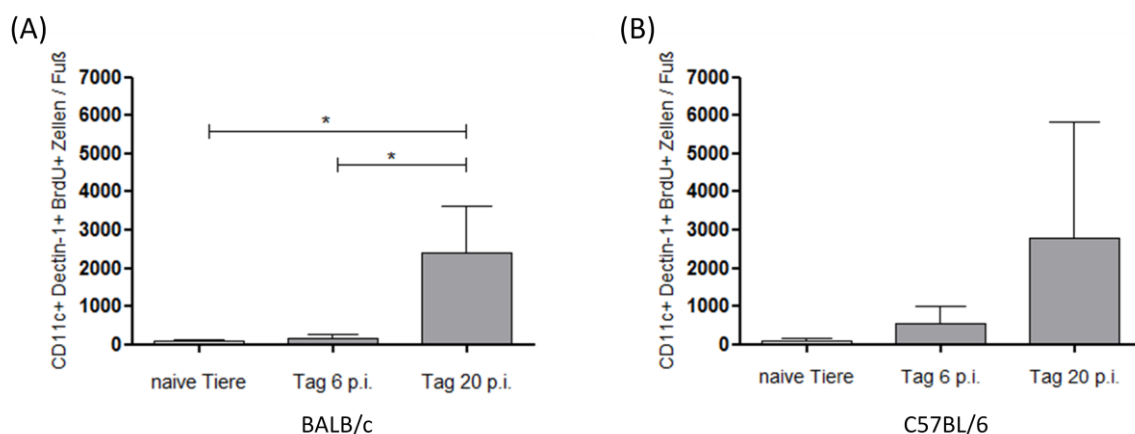


Abb. 3: Legende siehe Seite 55.

Abbildung 3: FACS-Analyse zum Nachweis Dectin-1⁺ DCs am Ort der Infektion.

Der Anteil proliferierender Dectin-1⁺ DCs im Gewebe infizierter Füße wurde mit Hilfe von FACS-Analysen ermittelt. Den Tieren war dazu an den drei Tagen vor der Analyse BrdU verabreicht worden. (A) In BALB/c – Mäusen steigt die Anzahl proliferierender Dectin-1 exprimierender DCs am Infektionsherd signifikant an. (B) Auch in C57BL/6 – Mäusen ist nach Infektion mit dem Parasiten ein tendentieller Anstieg der Anzahl proliferierender Dectin-1⁺ DCs im Fuß erkennbar.

Das Experiment wurde einmal mit jeweils drei Tieren pro Gruppe durchgeführt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: One-way ANOVA.

Wie Abbildung 3 zeigt, war auch im Gewebe des Fußes, also am Ort der Infektion, nach einer Infektion mit dem Parasiten *Leishmania* ein erhöhter prozentualer Anteil proliferierender, Dectin-1 exprimierender CD11c⁺ Zellen durchflusszytometrisch nachweisbar. Dieser Anstieg war in BALB/c – Mäusen 20 Tage nach Infektion statistisch signifikant (Abb. 3A). Auch im Gewebe infizierter C57BL/6 – Mäuse waren nach dieser Infektionsdauer deutlich mehr proliferierende Dectin-1⁺ DCs vorhanden (Abb. 3B).

Um die Bedeutung von Dectin-1 für den Verlauf einer Immunreaktion einschätzen zu können ist es nicht nur wichtig, die Anzahl der Zellen zu kennen, die das Protein exprimieren. Einen weiteren Parameter stellt die Expressionsstärke des Rezeptors auf den einzelnen Zellen dar. Um diese bestimmen zu können, wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*Mean Fluorescence Intensity*, MFI) der Dectin-1⁺ Zellen ermittelt.

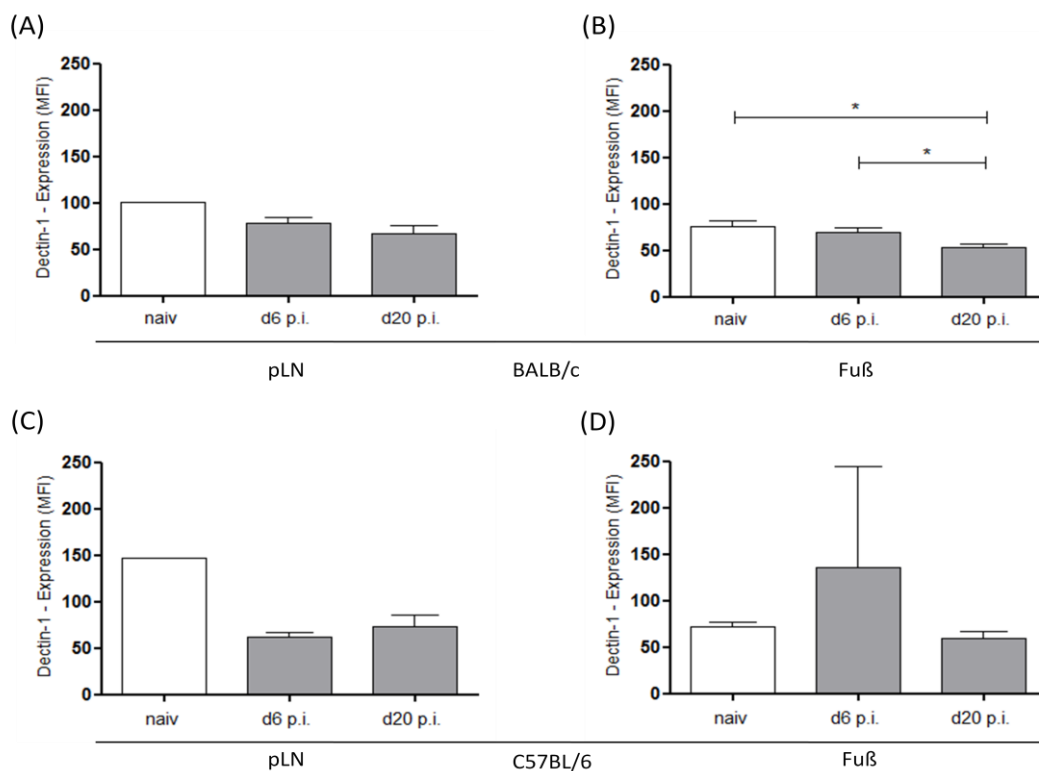


Abbildung 4: FACS-Analysen zur Dectin-1 – Expressionsstärke auf DCs nach Infektion.

Dectin-1⁺ Zellen der drainierenden pLN sowie der Gewebe im Fuß von naiven BALB/c - und C57BL/6 – Mäusen sowie 6 und 20 Tage p.i. wurden durchflusszytometrisch untersucht und die MFI bestimmt. Um eine ausreichende Anzahl für die Analyse zu erhalten, mussten die Zellen aus den Lymphknoten naiver Tiere gepoolt werden. (A) Die MFI Dectin-1 – exprimierender CD11c⁺ Zellen nimmt in den pLN von BALB/c – Mäusen nach Infektion tendenziell ab. (B) In den Füßen von BALB/c – Mäusen ist ein signifikanter Rückgang der MFI Dectin-1⁺ DCs nach Infektion erkennbar. (C) Auch in den drainierenden Lymphknoten von C57BL/6 – Mäusen nimmt die MFI der Dectin-1⁺ Zellen nach Infektion ab. (D) Wie in den anderen untersuchten Organen ist auch bei der MFI Dectin-1 – exprimierender Zellen in den Füßen von C57BL/6 – Mäusen ein Trend in Richtung verringerter Expression erkennbar.

Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Analysiert wurden jeweils 3 Tiere. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: One-way ANOVA.

Die MFI ist ein relativer Wert, der Aufschluß darüber gibt, wie viele der Moleküle von Interesse sich im Schnitt auf der Oberfläche der zu analysierenden Zellen befinden. Abbildung 4 zeigt, dass die Dectin-1 – Rezeptordichte sowohl auf den DCs der Lymphknoten als auch am Infektionsort in BALB/c – Mäusen an Tag 6 und Tag 20 p.i. abnahm. Dabei konnte in den Füßen die Signifikanz der Reduktion festgestellt werden (Abb. 4A, 4B). Auch in C57BL/6 – Mäusen konnte 6 und 20 Tage nach der Infektion mit Leishmanien eine tendenzielle Abnahme (nicht signifikant) der Dectin-1 – Expression auf DCs festgestellt werden. Allerdings war dieser Rückgang weder auf den Lymphknotenzellen noch auf den Zellen, die aus dem infizierten Gewebe isoliert wurden, statistisch signifikant (Abb. 4C, 4D). Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass nach der Infektion mit Leishmanien die Anzahl Dectin-1⁺ Zellen am Infektionsherd und im drainierenden Lymphknoten zunimmt, auf zellulärer Ebene jedoch ein leichter Rückgang der Expression von Dectin-1 – Molekülen zu erkennen ist.

1.2 *In vitro* Untersuchungen zur Expression von Dectin-1 auf BMDCs

Um untersuchen zu können, ob es sich bei den Dectin-1 exprimierenden DCs um infizierte Zellen handelt, und um anschließend deren Funktion im weiteren Verlauf einer Immunantwort gegen Leishmanien zu analysieren, sollten auch *in vitro* – Analysen durchgeführt werden. Deshalb wurden die BMDCs wie unter II. 2.1.8 beschrieben generiert

und über Nacht mit CFSE-markierten *Leishmania*-Parasiten inkubiert. Die Dectin-1 – Expression infizierter Zellen, welche nun im Durchflusszytometer CFSE⁺ erschienen, konnte so mit der nicht-infizierter Kontroll-BMDCs verglichen werden.

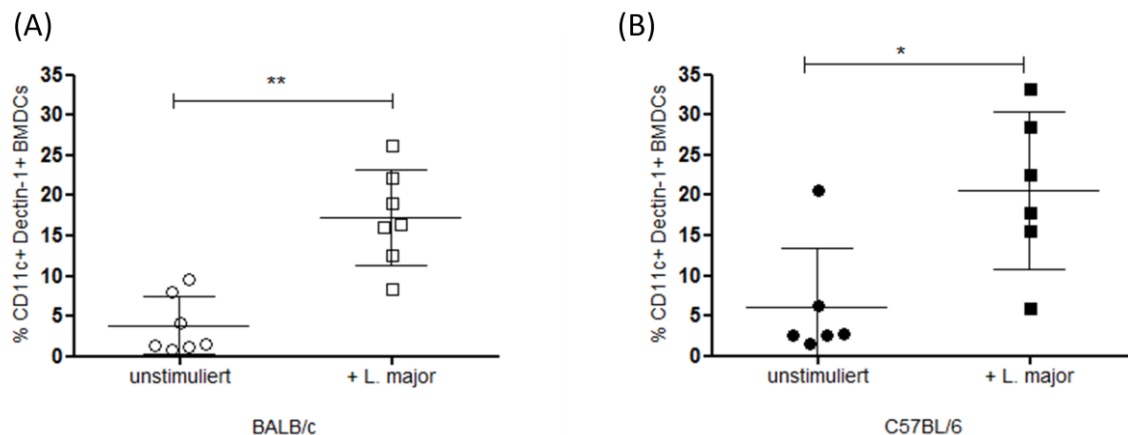


Abbildung 5: FACS-Analysen zur Dectin-1 – Expression auf BMDCs.

Die Expression von Dectin-1 auf BMDCs wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von fünf Parasiten je Zelle infiziert. Die infizierten BMDCs erschienen auf Grund der markierten Parasiten im Durchflusszytometer CFSE⁺. Sowohl in BMDCs aus BALB/c – als auch C57BL/6 – Mäusen war der Anteil Dectin-1 exprimierender CD11c⁺ Zellen signifikant erhöht, wenn die Zellen infiziert waren.

Eines von vier (BALB/c) bzw. drei (C57BL/6) repräsentativen und unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist gezeigt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: Mann-Whitney-Test.

Wie Abb. 5 zeigt war auch der prozentuale Anteil infizierter Dectin-1 – exprimierender Zellen gegenüber nicht infizierten Dectin-1⁺ Zellen signifikant erhöht. Dies war sowohl in Zellen aus BALB/c (Abb. 5A) – als auch C57BL/6 – Mäusen (Abb. 5B) der Fall.

Als nächstes sollte auch bei den BMDCs die Dichte der Dectin-1 – Moleküle auf der Oberfläche unstimulierter und mit den Parasiten kokultivierter Zellen bestimmt werden. Auch hierfür wurde nach 12-stündiger Inkubation der Zellen mit den Leishmanien an Tag 10 nach deren Generierung die Fluoreszenzintensität des C-Typ-Lektins durchflusszytometrisch bestimmt.

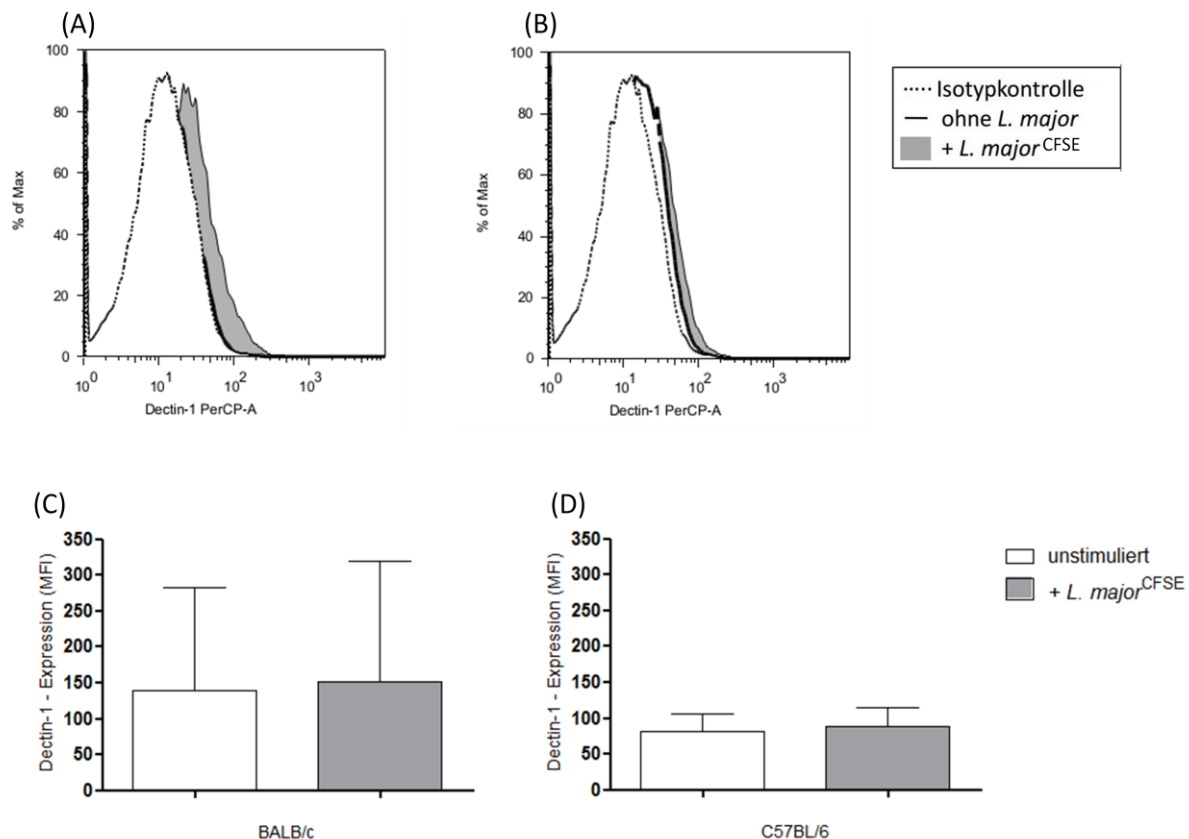


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Dectin-1 – Expression auf BMDCs.

Die MFI unstimulierter sowie über Nacht mit *L. major* inkubierter, Dectin-1⁺ BMDCs wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Zur Infektion wurden je fünf CFSE-markierte Parasiten pro Zelle zur BMDC-Kultur gegeben.

Die Histogramme zeigen exemplarisch die Dectin-1 – Expression auf BMDCs aus BALB/C (A) und C57BL/6 – Mäusen (B). Zusammen genommen änderten weder Zellen, die aus dem Knochenmark von BALB/c – Mäusen (C), noch aus C57BL/6 – Mäusen (D) generiert wurden, die Expressionsstärke von Dectin-1 nach Inkubation mit den Parasiten signifikant.

Gezeigt ist ein repräsentatives von vier (BALB/c) bzw. 3 (C57BL/6) unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: Mann-Whitney-Test (Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden).

Die Inkubation und die daraus resultierende Infektion von BMDCs mit *Leishmania*-Parasiten änderte die Expressionsstärke der Dectin-1 – Moleküle auf der Oberfläche der Zellen nicht. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, zeigten infizierte sowie uninfizierte Zellen die gleiche MFI. Dies war sowohl bei Zellen aus BALB/c – als auch C57BL/6 – Mäusen der Fall. Damit zeigte sich hier ein leichter Unterschied bezüglich der Dectin-1 – Expression von BMDCs im Vergleich zu der Expression auf den DCs, welche aus den Lymphknoten bzw. Füßen infizierter Tiere

isoliert wurden, da auf diesen Zellen die Dichte des C-Typ-Lektins leicht, jedoch auch nicht signifikant verringert war (Abb. 4).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass der Anteil der Dectin-1⁺ dendritischen Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nach Infektion mit *L. major* anstieg. Dagegen blieb die Expressionsstärke des Rezeptors unverändert (*in vitro*) oder nahm leicht ab (*in vivo*), wobei dieser Rückgang nicht signifikant war.

Im nächsten Kapitel sollte die Rolle des β -Glucans Curdlan, einem spezifischen Liganden für das C-Typ-Lektin Dectin-1, im Laufe einer Immunantwort gegen Leishmanien genauer untersucht werden.

2. Funktionelle Untersuchungen zur Rolle des C-Typ-Lektin-Rezeptors Dectin-1 im experimentellen Modell der Leishmaniose

Um die Rolle von Dectin-1, einem Rezeptor für β -Glucan, im experimentellen Modell der Leishmaniose genauer untersuchen zu können, wurde dieser durch Ligandenbindung stimuliert. Hierfür verwendeten wir eine in den Zellwänden von Pilzen und Bakterien vorkommende Komponente, Curdlan. Bei Curdlan handelt es sich um ein lineares β -1,3-Glucan, welches spezifisch an Dectin-1 bindet und so den Dectin-1 – Signalweg aktiviert (Nerren and Kogut, 2009). Es bildet Ketten bestehend aus etwa 500 Einheiten und ist somit relativ groß. Außerdem verwendeten wir Laminarin, ein weiteres β -1,3-Glucan mit einigen β -1,6-Verzweigungen. Es bindet ebenso spezifisch an den Rezeptor. Da es jedoch weitaus kürzere Ketten bildet und eine Kreuzvernetzung der Rezeptoren so kaum möglich ist, wurde es als Inhibitor der Signalweiterleitung von Dectin-1 genutzt. (Goodridge et al., 2011; Nerren and Kogut, 2009; Yoshitomi et al., 2005).

2.1 Der Effekt von β -Glucanen auf infizierte BMDCs

2007 zeigten LeibundGut-Landmann et. al., dass BMDCs aus C57BL/6 – Mäusen reifen, wenn sie 24 Stunden mit Curdlan inkubiert werden. Sie analysierten die Expression der Oberflächenmarker CD40, CD80 und CD86 und wiesen nach, dass diese durch das β -Glucan erhöht ist (LeibundGut-Landmann et al., 2007). 2012 jedoch veröffentlichten Soltani et. al. eine Studie, in der sie nachweisen konnten, dass Curdlan keinen Einfluss auf die Reifung von DCs hatte, die sie aus den Milzen von BALB/c – Mäusen isolierten. Soltani et. al. analysierten dabei die Expression von CD40, CD86 und MHC Klasse-II und konnten keine Erhöhung feststellen (Soltani et al., 2012).

Um eine Aussage über die durch Curdlan induzierte Reifung von BMDCs aus C57BL/6 – und BALB/c – Mäusen treffen zu können, haben wir zunächst überprüft, welchen Effekt die Aktivierung von Dectin-1 auf die Reifung der Zellen hat. Dazu wurde, wie in den oben genannten Studien, Curdlan als Ligand für Dectin-1 verwendet. BMDCs wurden über Nacht durch Zugabe von Curdlan zum Medium ($c = 250 \mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Auf diese Weise ließ sich der Anteil der CD11c^+ Zellen, die eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD86 aufwiesen, erhöhen. Dieser Befund traf sowohl für die BMDC-Kultur aus BALB/c – als auch für jene aus C57BL/6 – Mäusen zu und bestätigte damit die Ergebnisse von LeibundGut-Landmann et. al. weitgehend. Außerdem konnten wir zeigen, dass der Anteil MHC Klasse-II-exprimierender CD11c^+ Zellen in der C57BL/6 BMDC-Kultur ebenfalls deutlich anstieg (Daten nicht gezeigt).

Da man bisher davon ausging, dass die Aktivierung des Dectin-1 – Signalweges durch Curdlan für den Verlauf der Leishmaniose von Bedeutung ist, haben wir auch untersucht, ob es möglich ist, diesen aktivierenden Effekt durch Zusatz von Laminarin zu inhibieren. Wir konnten weder einen Einfluss des Laminarins auf die Reifung der Zellen, noch eine vollständige Inhibierung der curdlaninduzierten Reifung durch Laminarin nachweisen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden keine weiteren Versuche mit Laminarin durchgeführt.

Unveröffentlichten Beobachtungen zufolge sind DCs nicht mehr in der Lage zu reifen, wenn sie mit *Leishmania*-Parasiten infiziert sind (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Uwe Ritter). Deshalb sollte nun untersucht werden, welchen Effekt eine *Leishmania major* – Infektion bei gleichzeitiger Anwesenheit des Dectin-1 – Agonisten auf den Reifestatus einer BMDC-Kultur aus dem Knochenmark von suszeptiblen BALB/c - und resistenten C57BL/6 - Mäusen hat.

Hierfür wurden zunächst *L. major* wie unter II. 2.1.3 beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde ein Teil der Parasiten mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff CFSE markiert (II. 2.1.13), um die Zellen identifizieren zu können, die mit Parasiten infiziert waren. Aus dem anderen Teil der Parasiten wurde, wie unter II. 2.1.4 beschrieben, SLA hergestellt. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob für einen möglichen Effekt lebende Parasiten notwendig sind, oder ob dieser auch bei Anwesenheit der Antigene auftritt.

BMDC-Kulturen aus BALB/c – und C57BL/6 – Mäusen wurden wie bereits beschrieben generiert. Am Tag neun wurden dem Medium zunächst entweder nur CFSE - markierte *Leishmania major* zugegeben, oder markierte Parasiten und Curdlan. Die Menge der Erreger wurde so gewählt, dass ein Verhältnis von 5 Parasiten je eukaryontischer Zelle vorlag. Die Konzentration des Curdlan betrug 250 µg / ml Medium. Am nächsten Tag wurde der Reifestatus der BMDCs mit Hilfe von FACS-Analysen untersucht.

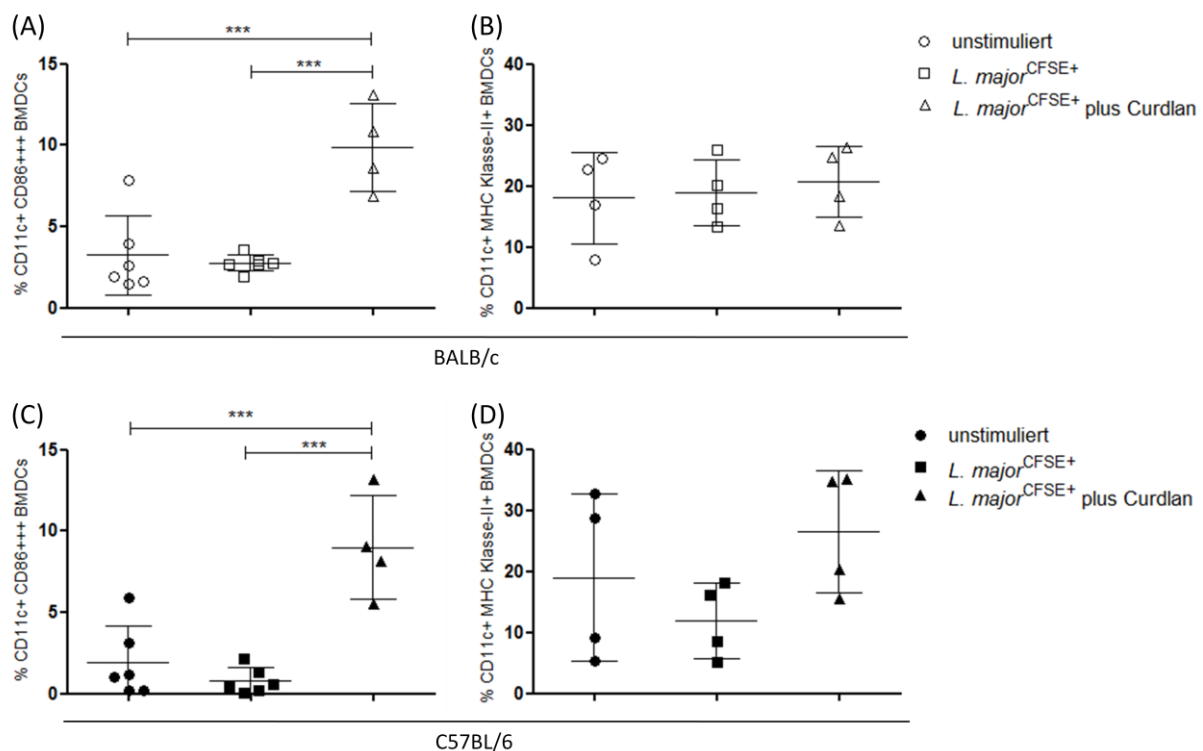


Abbildung 7: Effekt des Dectin-1 – Agonisten Curdlan auf infizierte BMDCs.

Die Reifung von unstimulierten BMDCs an Tag 10 nach ihrer Generierung, sowie von BMDCs, die über Nacht mit CFSE-markierten *L. major* bzw. *L. major* und Curdlan inkubiert wurden, wurde anhand der Reifungsmarker CD86 und MHC Klasse-II durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Der Anteil CD86⁺⁺⁺ exprimierender Knochenmarks-DCs aus BALB/c – Mäusen nach Kokultivierung mit *L. major* ist signifikant erhöht, wenn sich zusätzlich zu den Parasiten Curdlan (c = 250 µg / ml) im Medium befand. (B) Der Anteil der MHC Klasse-II – exprimierenden BMDCs ist dagegen in allen Ansätzen unverändert. (C) Werden BMDCs aus C57BL/6 – Mäusen mit *Leishmania*-Parasiten und Curdlan inkubiert, erhöht sich der Anteil

der CD86⁺⁺⁺ - exprimierenden Zellen signifikant. (D) Der Anteil MHC Klasse-II – exprimierender Zellen ist in den drei Ansätzen gleich.

Gezeigt sind die zusammengefasst die Daten aus vier (+ *L. major*) bzw. zwei (+ *L. major* + Curdlan) unabhängig durchgeführten Experimenten. Technische Replikate wurden angefertigt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: One-way ANOVA.

Wir konnten bestätigen, dass sich der Anteil CD86⁺⁺⁺ Zellen in CFSE⁺ und somit mit *Leishmania major* infizierten BMDCs von BALB/c und C57BL/6 – Mäusen nicht ändert, verglichen mit unstimulierten Zellen (Abb. 7A, 7C). Auch der Prozentsatz MHC Klasse-II⁺ Zellen blieb gleich (Abb. 7B, 7D). Dieser Befund bestätigte die unveröffentlichten Beobachtungen, laut derer dendritische Zellen durch einen Befall mit den Parasiten nicht weiter reifen können. Dagegen stieg der Anteil CFSE⁺ CD86⁺⁺⁺ BMDCs in Anwesenheit von Parasiten zusammen mit Curdlan signifikant an. Dies konnte für BMDCs aus suszeptiblen (Abb. 7A) und resistenten (Abb. 7C) Tieren nachgewiesen werden. Der Prozentsatz CFSE⁺ MHC Klasse-II⁺ BMDCs änderte sich in beiden Kulturen allerdings durch den Zusatz von Curdlan nicht signifikant (Abb. 7B, 7D). Dennoch war es uns somit möglich durch die Zugabe des Dectin-1 – Liganden Curdlan eine Reifung von BMDCs zu erzielen, welche mit *Leishmania*-Parasiten infiziert waren.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob der in Abb. 7 beobachtete Effekt auch dann eintritt, wenn anstelle lebender Parasiten Leishmanienantigen zur Stimulation verwendet wird. Das Äquivalent von 5 *Leishmania major* wurde pro BMDC zu den Kulturen aus BALB/c – oder C57BL/6 – Mäusen gegeben. In einem weiteren Ansatz wurde zusätzlich zum Antigen Curdlan in oben genannter Konzentration hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Nach der Inkubation wurde der Reifestatus der Zellen anhand der Oberflächenmarker CD86 und MHC Klasse-II durchflusszytometrisch bestimmt.

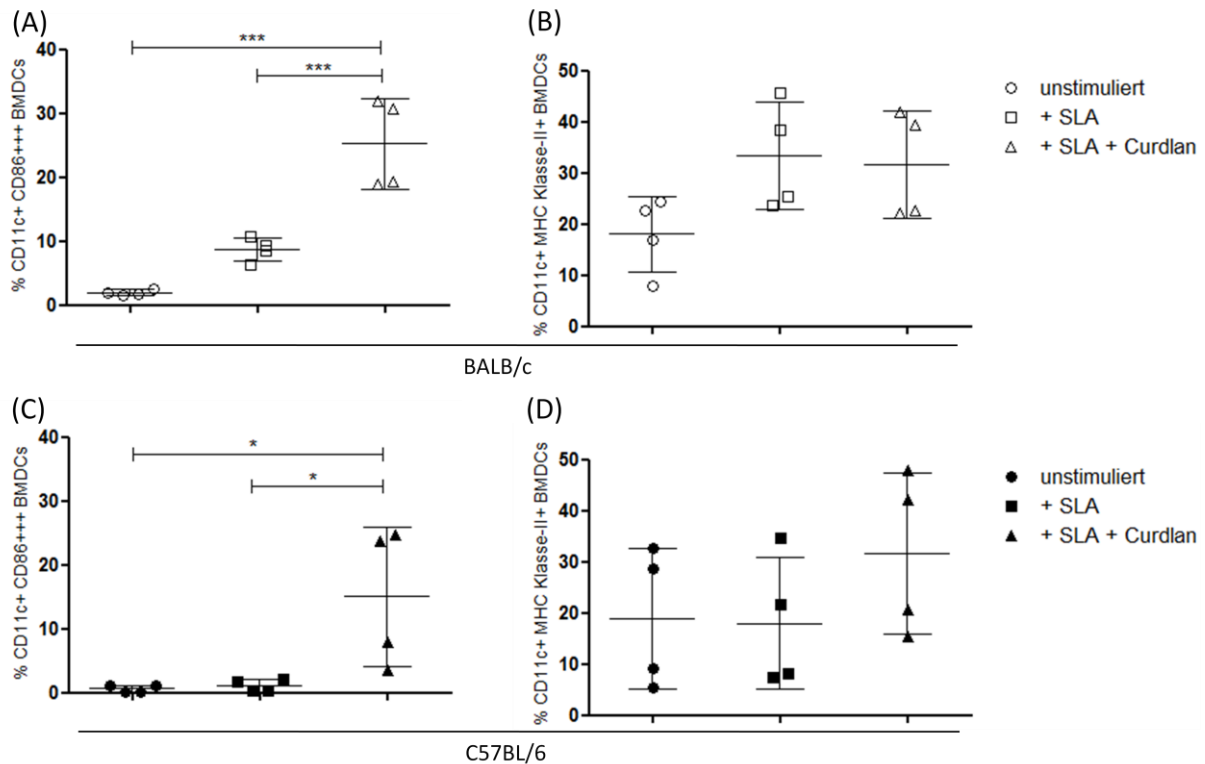


Abbildung 8: Wirkung von SLA und Curdlan auf die BMDC-Reifung.

Es wurde die Reifung unstimulierter BMDCs 10 Tage nach deren Generierung, sowie von BMDCs, die über Nacht mit *Leishmania*-Antigen (SLA, *Soluble Leishmania Antigen*) bzw. SLA und Curdlan inkubiert wurden, bestimmt. (A) Der Anteil CD86⁺⁺⁺ exprimierender BMDCs aus BALB/c – Mäusen steigt in Anwesenheit von Curdlan signifikant an. (B) Durch die Inkubation mit SLA und SLA in Kombination mit Curdlan erhöht sich der Anteil MHC Klasse-II – exprimierender Zellen im Vergleich zu unstimulierten BMDCs leicht. (C) BMDCs aus C57BL/6 – Mäusen können mit SLA und Curdlan zu signifikant gesteigerter Reifung und somit CD86⁺⁺⁺ - Expression angeregt werden. (D) Der Anteil MHC Klasse-II – exprimierender Zellen ist in allen drei Ansätzen gleich, wobei eine leichte Erhöhung des Anteils MHC Klasse-II⁺ Zellen erkennbar ist, wenn dem Medium Curdlan beigelegt wurde.

Es sind die zusammengefassten Daten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Dabei wurden jeweils technische Replikate angefertigt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: One-way ANOVA

Wie man in Abb. 8 erkennen kann, ist der Anteil der CD86⁺⁺⁺ Zellen bei Zugabe von SLA nicht signifikant erhöht (Abb. 8A, 8C). Gleiches gilt für den Prozentsatz MHC Klasse-II⁺ BMDCs. (Abb. 8B, 8D). Dagegen erhöht sich der Anteil an CD86⁺⁺⁺ Zellen signifikant, wenn zusätzlich Curdlan im Medium vorhanden ist. Dies ist sowohl bei Zellen suszeptibler (Abb. 8A) als auch resistenter (Abb. 8C) Tiere der Fall. Vergleichbar mit den Ergebnissen aus Abbildung 7 lässt sich weder durch die Zugabe des SLAs, noch durch Stimulation mit SLA und Curdlan eine

signifikante Erhöhung des Anteils an MHC Klasse-II⁺ Zellen erzielen (Abb. 8B, 8D). Die Ergebnisse zeigen, dass es für die Inhibierung der Reifung von BMDCs keine Rolle spielt, ob die Zellen mit lebenden Parasiten oder mit deren Antigen inkubiert wurden. In jedem Fall hob die Zugabe von Curdlan jedoch diese Inhibierung auf, so dass die Zellen einen höheren Grad der Reifung erreichen konnten (Abb. 7, 8).

Um zunächst *in vitro* untersuchen zu können, ob sich die Stimulation mit Curdlan und die dadurch bewirkte Reifung der BMDCs auch auf deren Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen auswirken, wurde ein Proliferations-Assay durchgeführt. Dadurch konnte zunächst die Vermehrung der T-Zellen, die mit durch Curdlan zur Reifung angeregten BMDCs interagierten, abgeschätzt werden. BMDCs aus BALB/c – und C57BL/6 – Mäusen wurden mit lebenden promastigoten oder amastigoten Leishmanien oder SLA, welches aus promastigoten oder amastigoten Parasiten hergestellt wurde, mit und ohne Curdlan, über Nacht stimuliert. Dann wurden die T-Zellen aus den Lymphknoten infizierter Mäuse isoliert und mit CFSE markiert, so dass die Proliferation der Zellen analysiert werden konnte. Die T-Zellen wurden anschließend drei Tage lang mit den stimulierten BMDCs kokultiviert (vgl. II. 2.1.15). Auf diese Weise sollte die Fähigkeit der stimulierten BMDCs zur Aktivierung von T-Zellen mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen zu untersuchen.

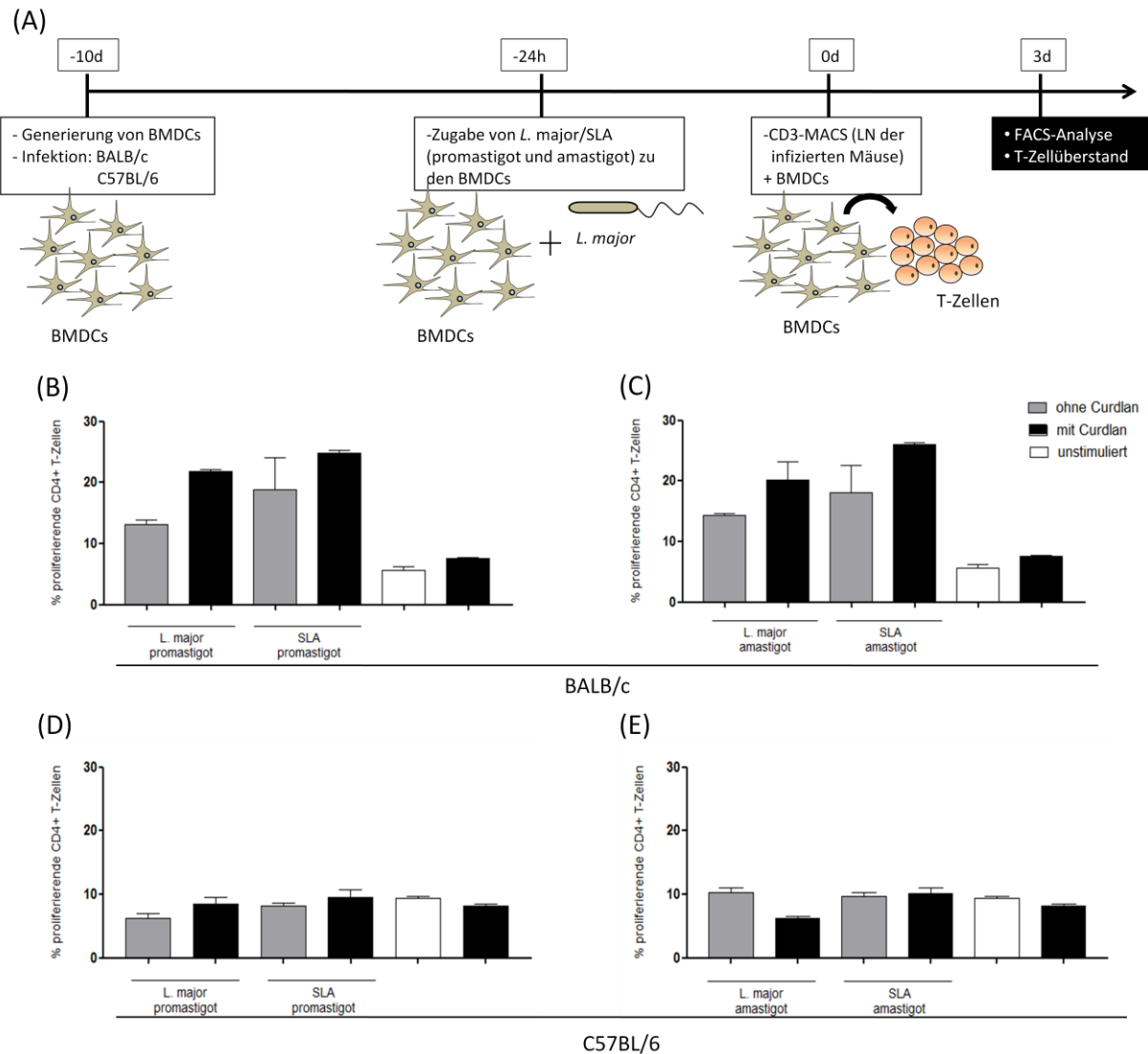


Abbildung 9: Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch BMDCs.

BMDCs wurden über Nacht mit *L. major* oder SLA, in An- oder Abwesenheit von Curdlan, stimuliert. Die Fähigkeit der Zellen zur Aktivierung von T-Zellen aus 10 Tage lang infizierten Mäusen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau. (B und C) Der Anteil proliferierender CD4⁺ T-Zellen aus BALB/c – Mäusen ist tendenziell erhöht, wenn zu den BMDCs zusätzlich zur Stimulation mit promastigoten bzw. amastigoten Leishmanien oder SLA Curdlan gegeben wurde. (D und E) Bei den CD4⁺ T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen blieb der Anteil der proliferierenden Zellen weitgehend gleich. Eine Stimulation mit Parasiten, SLA oder Curdlan zeigte hier keinen Effekt.

Gezeigt ist ein repräsentatives aus zwei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden die BMDCs aus je einer Maus pro Linie generiert, die T-Zellen wurden je Mausstamm aus fünf infizierten Tieren isoliert und gepoolt. Technische Replikate wurden angefertigt. Die statistische Signifikanz wurde demnach nicht festgestellt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Abb. 9 zeigt, dass auch BMDCs aus BALB/c - Mäusen, welche über Nacht mit *Leishmania major* oder SLA inkubiert wurden, CD4⁺ T-Zellen aktivieren können. Es spielt dabei keine Rolle, ob es sich um promastigote oder amastigote Parasiten handelte. Allerdings konnte der Anteil der proliferierenden T-Zellen tendenziell leicht erhöht werden, wenn den BMDCs zusätzlich zu den Parasiten Curdian ins Medium gegeben wurde (Abb. 9A, 9B). Im Gegensatz dazu veränderte sich der Anteil der proliferierenden CD4⁺ T-Zellen aus C57BL/6 – Mäusen nicht, verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen. Die Proliferation der T-Zellen war bei diesem Mausstamm ebenfalls unabhängig von der Stimulation der BMDCs (Abb. 9C, 9D). Außerdem zeigt die Abbildung 9, dass eine unspezifische Aktivierung der T-Zellen durch BMDCs, welche bei Zugabe von Curdian, aber ohne Leishmanien, reiften, nicht stattfindet. Der Anteil der proliferierenden Zellen in diesem Ansatz ohne Parasiten oder deren Antigen war immer vergleichbar mit dem der unstimulierten BMDCs.

Als nächstes sollte die Fähigkeit der stimulierten BMDCs zur Aktivierung CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Dies geschah ebenfalls mit Hilfe von FACS-Analysen.

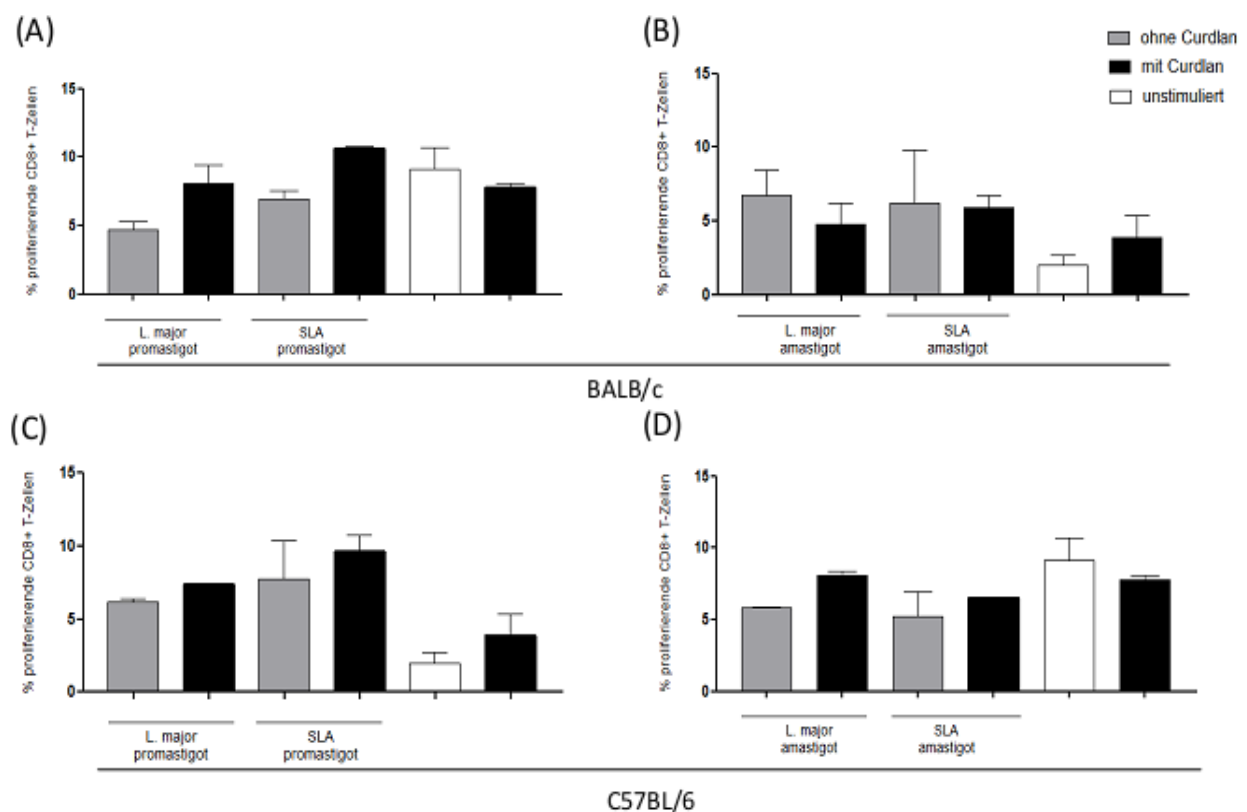


Abbildung 10: Aktivierung CD8⁺ T-Zellen durch BMDCs.

BMDCs wurden auch hier 10 Tage nach Generierung über Nacht mit *L. major* oder SLA, jeweils in An- oder Abwesenheit von Curdian, stimuliert. Die Fähigkeit der Zellen zur

Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen wurde untersucht, indem die Prolifertion der T-Zellen analysiert wurde. (A) Der Anteil proliferierender CD8⁺ T-Zellen aus BALB/c – Mäusen ist tendenziell erhöht, wenn die Stimulation der BMDCs, zusätzlich zu den promastigoten *Leishmanien* oder deren Antigen, mit Curdlan erfolgte. (B) Die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen ändert sich durch die Zugabe von Curdlan nicht, wenn die BMDCs mit amastigoten Parasiten stimuliert wurden. (C) Der Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen blieb weitgehend gleich wenn die BMDCs mit promastigoten *Leishmanien* stimuliert wurden. (D) Wurden die BMDCs mit lebenden amastigoten Parasiten inkubiert erhöhte, sich der Anteil der proliferierenden T-Zellen in Anwesenheit von Curdlan tendenziell. Wurde SLA verwendet war dies nicht der Fall.

Gezeigt ist ein repräsentatives aus zwei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden BMDCs aus je einer Maus pro Mausstamm generiert. Die Isolation der T-Zellen erfolgte aus fünf infizierten Tieren pro Linie, die Zellen wurden dann gepoolt. Technische Replikate wurden angefertigt, daher konnte die statistische Signifikanz nicht festgestellt werden. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Wir konnten zeigen, dass auch der Anteil proliferierender CD8⁺ T-Zellen aus BALB/c – Mäusen nur tendenziell leicht erhöht war, wenn die verwendeten BMDCs zusätzlich zu promastigoten *Leishmania*-Parasiten mit Curdlan stimuliert wurden (Abb. 10A). Bei Verwendung von amastigoten Parasiten zur Stimulation der BMDCs ließ sich der Anteil der proliferierenden T-Zellen durch Curdlan ebenfalls nicht weiter erhöhen (Abb. 10B). Auch der Prozentsatz proliferierender CD8⁺ T-Zellen, die aus C57BL/6 – Tieren isoliert wurden, war identisch, egal womit die zur Aktivierung zugegebenen BMDCs stimuliert waren (Abb. 10C). Jedoch ließ dieser Anteil sich durch Zugabe von Curdlan zu den BMDCs tendenziell erhöhen, wenn amastigote Parasiten verwendet wurden (Abb. 10D).

Für eine effektive Immunantwort gegen *Leishmanien* spielen auch Zytokine eine große Rolle, besonders das Zytokin Interferon (IFN) γ . Es ist für die Polarisierung der T-Zellen zu Th1 – Zellen entscheidend, welche wiederum zur Ausbildung einer protektiven Immunreaktion von Bedeutung sind. Da die Proliferation der T-Zellen durch den Kontakt mit BMDCs, die mit Curdlan stimuliert wurden, nicht deutlich beeinflusst wird, sollte überprüft werden, ob durch diese Interaktion die Polarisierung der Zellen zu Th1- oder Th2-Zellen verändert wird. Die Sekretion des Th1-Zytokins IFN- γ sollte aus diesem Grund analysiert werden. Die Überstände der T-Zellen, welche drei Tage zusammen mit den BMDCs kokultiviert wurden, wurden abgenommen. Die Menge des darin enthaltenen IFN- γ wurde mittels eines ELISAs bestimmt.

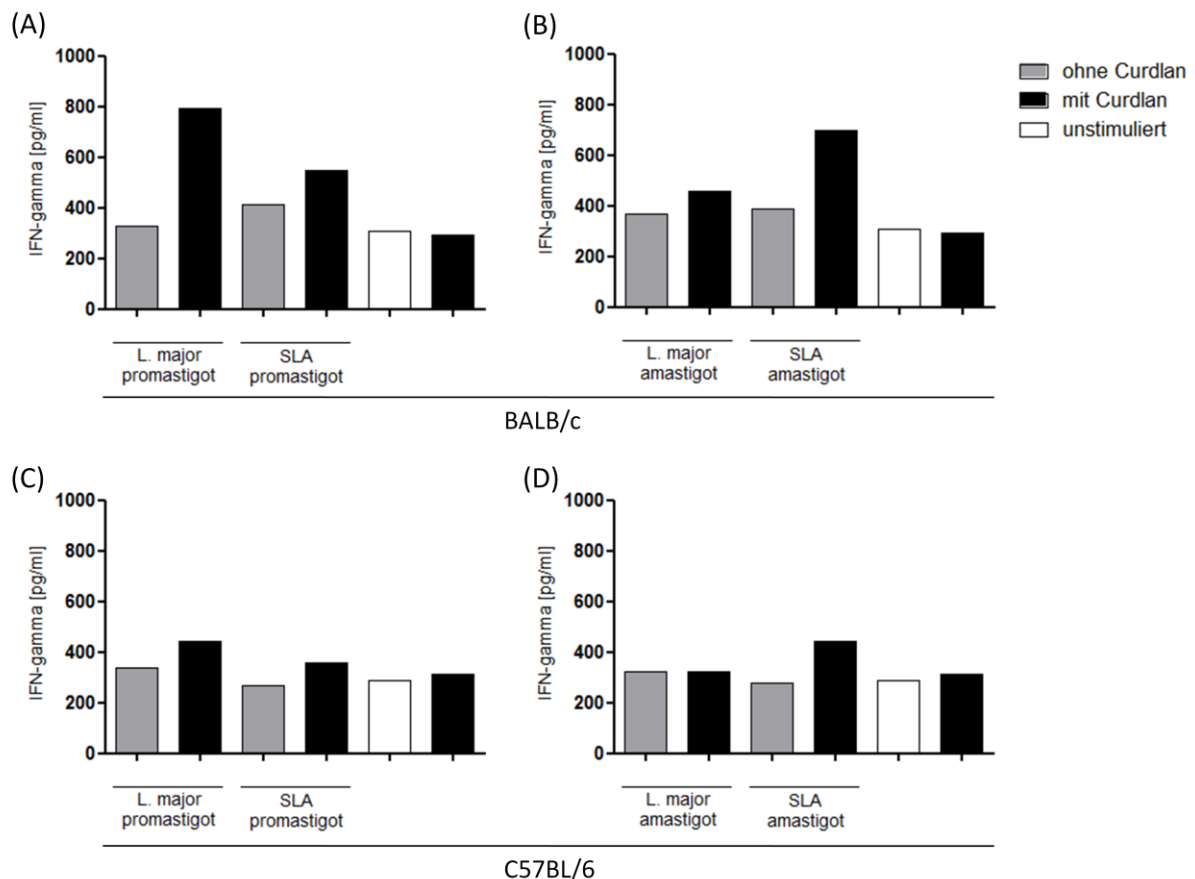


Abbildung 11: IFN- γ Sekretion der mit den BMDCs kokultivierten T-Zellen.

Die Menge an IFN- γ in den Überständen der T-Zellen (isoliert aus Lymphknoten 10 Tage lang infizierter Mäuse) aus Abb. 9, 10 wurde mit Hilfe eines ELISAs ermittelt. (A und B) Die Menge des gemessenen IFN- γ Gehaltes steigt bei T-Zellen aus BALB/c – Mäusen an, wenn die zur Aktivierung der T-Zellen verwendeten BMDCs zusätzlich zu den promastigoten (A) oder amastigoten (B) Leishmanien mit Curdian inkubiert wurden. (C und D) Die IFN- γ Sekretion der Zellen aus C57BL/6 ist dagegen nur leicht erhöht, auch wenn zu den promastigoten (C) oder amastigoten (D) Leishmanien zusätzlich Curdian im Medium der zur Aktivierung verwendeten BMDCs vorhanden war.

Die Überstände wurden gepoolt (technische Replikate). Je Mausstamm wurden die T-Zellen aus den Lymphknoten fünf infizierter Tiere isoliert und gepoolt.

In Abbildung 11 kann man erkennen, dass die Sekretion von IFN- γ ansteigt, wenn die T-Zellen über BMDCs aktiviert wurden, deren Reifung sowohl mit *Leishmania*-Parasiten in Kombination mit Curdian ausgelöst wurde. Dabei war die Induktion der Sekretion am größten, wenn Zellen aus BALB/c – Mäusen verwendet wurden und die BMDCs mit promastigoten Parasiten und dem β -Glucan behandelt waren (Abb. 11A). Außerdem konnte bei Zellen dieser Mauslinie auch eine Steigerung der IFN- γ Produktion erzielt werden, wenn SLA promastigoter als auch amastigoter *Leishmanien* zusammen mit Curdian zur Reifung der

BMDCs verwendet wurde (Abb. 11A, 11B). Bei Zellen aus C57BL/6 – Tieren konnte nur noch eine leichte Steigerung der Sekretion des IFN- γ erreicht werden, auch wenn die zur Aktivierung verwendeten BMDCs zusätzlich mit Curdlan stimuliert wurden.

Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass der Reifungsgrad von *in vitro* generierten BMDCs erhöht wird, wenn die Zellen mit dem β -Glucan Curdlan stimuliert wurden. Diese Reifung findet auch in infizierten Zellen statt, die normalerweise nicht in der Lage sind zu maturieren. Mit *Leishmania*-Parasiten und Curdlan zur Reifung angeregte BMDCs verändern außerdem das Zytokinprofil von T-Zellen, mit denen sie interagieren, so dass diese vermehrt das Th1-Zytokin IFN- γ sezernieren. Dies konnte tendenziell vor allem in suszeptiblen BALB/c – Mäusen, aber auch resistenten C57BL/6 – Mäusen gezeigt werden.

2.2 *In vivo* - Studien zur Rolle von Dectin-1 im experimentellen Modell der Leishmaniose

Wie bereits erwähnt konnten durch Stimulation von BMDCs mit dem β -Glucan Curdlan in den verwendeten Mausstämmen BALB/c und C57BL/6 verschiedene Effekte nachgewiesen werden, durch die eine Immunantwort gegen *Leishmania major* möglicherweise so beeinflusst wird, dass der Krankheitsverlauf abgeschwächt verläuft. Ob diese Effekte *in vivo* eine Rolle spielen, und ob dabei das C-Typ-Lektin Dectin-1 als Rezeptor für Curdlan tatsächlich von Bedeutung ist, sollte nachfolgend geklärt werden.

Um diese Frage beantworten zu können wurden wie unter II. 2.1.3 beschrieben *L. major* aufgereinigt. Suszeptible BALB/c – sowie resistente C57BL/6 – Mäuse wurden dann mit den Parasiten alleine oder in Kombination mit Curdlan infiziert (vgl. II. 2.2.1). Die Schwellungen der infizierten Füße wurde wöchentlich gemessen und zu der Dicke des jeweiligen nicht infizierten Fußes in Relation gesetzt.

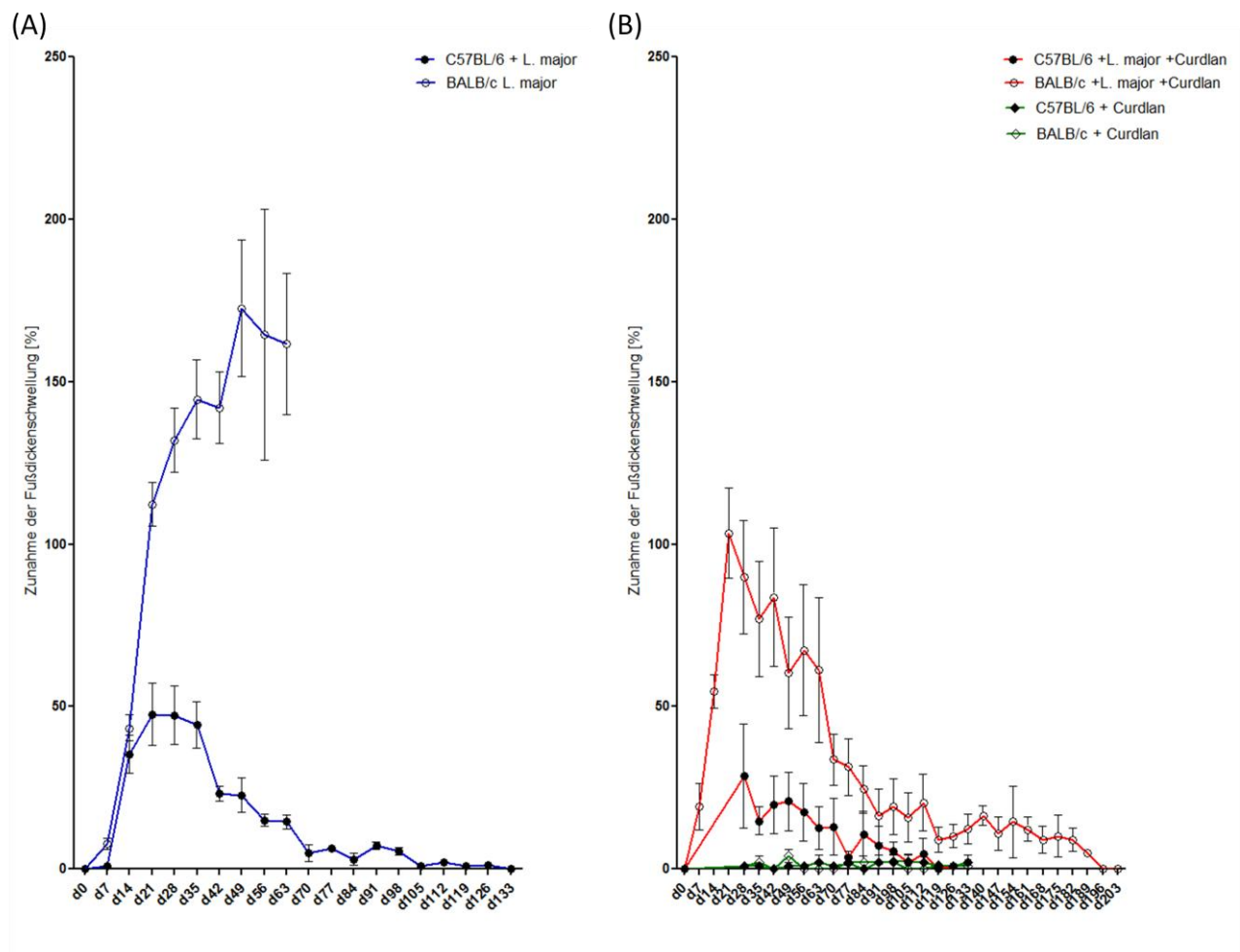


Abbildung 12: Schwellung von Füßen nach Infektion mit *L. major* mit und ohne Curdlan.

BALB/c – und C57BL/6 – Mäusen wurden 3×10^6 *Leishmania major* in 30 μ l PBS oder in 30 μ l PBS + Curdlan ($c = 50 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) in die Hinterpfote injiziert. Im Abstand von 7 Tagen wurden die Dicken der Füße gemessen und daraus die Schwellung in Prozent berechnet. (A) Typischer Verlauf einer *Leishmania*-Infektion in BALB/c – und C57BL/6 – Tieren. (B) Krankheitsverlauf der Leishmaniose, wenn den Mäusen Parasiten in curdlanhaltigem PBS gespritzt wurden. BALB/c – Mäuse sind dann in der Lage die Infektion zu bekämpfen, so dass die Schwellung abklingt.

Fehlerbalken kennzeichnet den Standardfehler.

(BALB/c + *L. major*: $n=19$; BALB/c + *L. major* + Curdlan: $n=16$ (davon resistent: $n=13$, aus dem Versuch genommen: $n=3$); BALB/c + Curdlan: $n=3$; C57BL/6: jede Gruppe $n=3$)

Der Krankheitsverlauf der experimentellen Leishmaniose konnte in BALB/c – Mäusen durch die gleichzeitige Injektion von Parasiten und Curdlan eindeutig verändert werden. Wie Abbildung 12A zeigt, waren BALB/c – Mäuse, denen nur *Leishmania major* injiziert wurde, erwartungsgemäß nicht in der Lage die Leishmaniose selbstständig zu bekämpfen, so dass sie nach spätestens 2 Monaten auf Grund nekrotisierender Läsionen getötet werden

mussten. C57BL/6 – Tiere hingegen konnten die Infektion ausheilen. Dagegen entwickelten BALB/c – Mäuse, denen Parasiten in Kombination mit Curdlan gespritzt wurden, zunächst auch eine deutliche Schwellung der Pfoten. Doch diese Tiere konnten die Infektion erfolgreich bekämpfen. Spätestens 200 Tagen nach Infektion war keine Schwellung der Füße mehr messbar. Der Krankheitsverlauf in den resistenten Mäusen wurde im Gegensatz dazu durch Curdlan jedoch nicht weiter verbessert. Die Injektion von Curdlan in die Pfoten von Tieren beider Mauslinien zeigte ebenfalls keinen Effekt (Abb. 12B).

Die infizierten Mäuse wurden dann aus dem Experiment genommen, wenn der Zustand der Mauspfoten dies tierschutzrechtlich nötig machte. Das bedeutet, dass Tiere, deren Füße nekrotisches Gewebe aufwiesen, ein deutliches Zeichen einer fortgeschrittenen Leishmanioseinfektion, durch zervikale Dislokation getötet wurden. Die folgende Abbildung zeigt Pfoten von Mäusen an Tag 28 nach der Infektion. Die Maus in der oberen Reihe wurde mit 3×10^6 Parasiten in PBS infiziert. Der Maus in der unteren Reihe hatte man die gleiche Anzahl Parasiten injiziert, wobei die Pathogene diesmal in PBS mit Curdlan ($c = 50 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) aufgenommen waren.

(A)
+ *L. major*
ohne Curdlan



(B)
+ *L. major*
+ Curdlan



Abbildung 13: Mauspfoten von BALB/c – Mäusen nach Infektion mit *Leishmania major*.

Gezeigt sind hier repräsentative Aufnahmen von Mauspfoten und deren Zustand nach Infektion mit den Parasiten in PBS im Vergleich zur Infektion mit dem Parasiten in curdlanhaltigem PBS.

BALB/c – Mäusen wurden 3×10^6 *Leishmania major* in PBS (A) oder in PBS + 50 µg / µl Curdlan (B) infiziert. Wenn an den Pfoten nekrotisches Gewebe auftrat (A, links) und eine deutliche Schwellung der Füße erkennbar wurde (A, rechts), wurden die entsprechenden Versuchstiere aus dem Experiment genommen und getötet. Die Bilder entstanden an Tag 28 nach einer Infektion.

Wie man in Abbildung 15 erkennen kann, wiesen Pfoten von BALB/c – Mäusen bei Fortschreiten der Infektion nekrotisches Gewebe auf (Abb. 13A, linkes Bild). War die Leishmaniose so weit fortgeschritten, was in der Regel vier bis acht Wochen nach Infektion eintrat, wurden die Tiere getötet. In diesem Stadium der Krankheit konnte auch eine deutliche Schwellung der infizierten Pfoten festgestellt werden (Abb. 13A, rechtes Bild). Im Gegensatz dazu schwollen die Pfoten der BALB/c – Mäuse, die mit Parasiten in Kombination mit Curdlan infiziert waren, im selben Zeitraum p.i. auch an, aber bei mehr als 80 % der Versuchstiere (13 von 16) trat zu keinem Zeitpunkt der Infektion eine Nekrose auf (Abb. 13B). Die Leishmaniose heilte anschließend aus.

Nach vollständiger Abheilung der Leishmaniose wurden die in Abbildung 12 gezeigten Tiere erneut mit lebenden Parasiten infiziert. Auf diese Weise konnte man untersuchen, ob die Tiere auch eine Resistenz gegenüber einer erneuten Infektion entwickelt hatten.

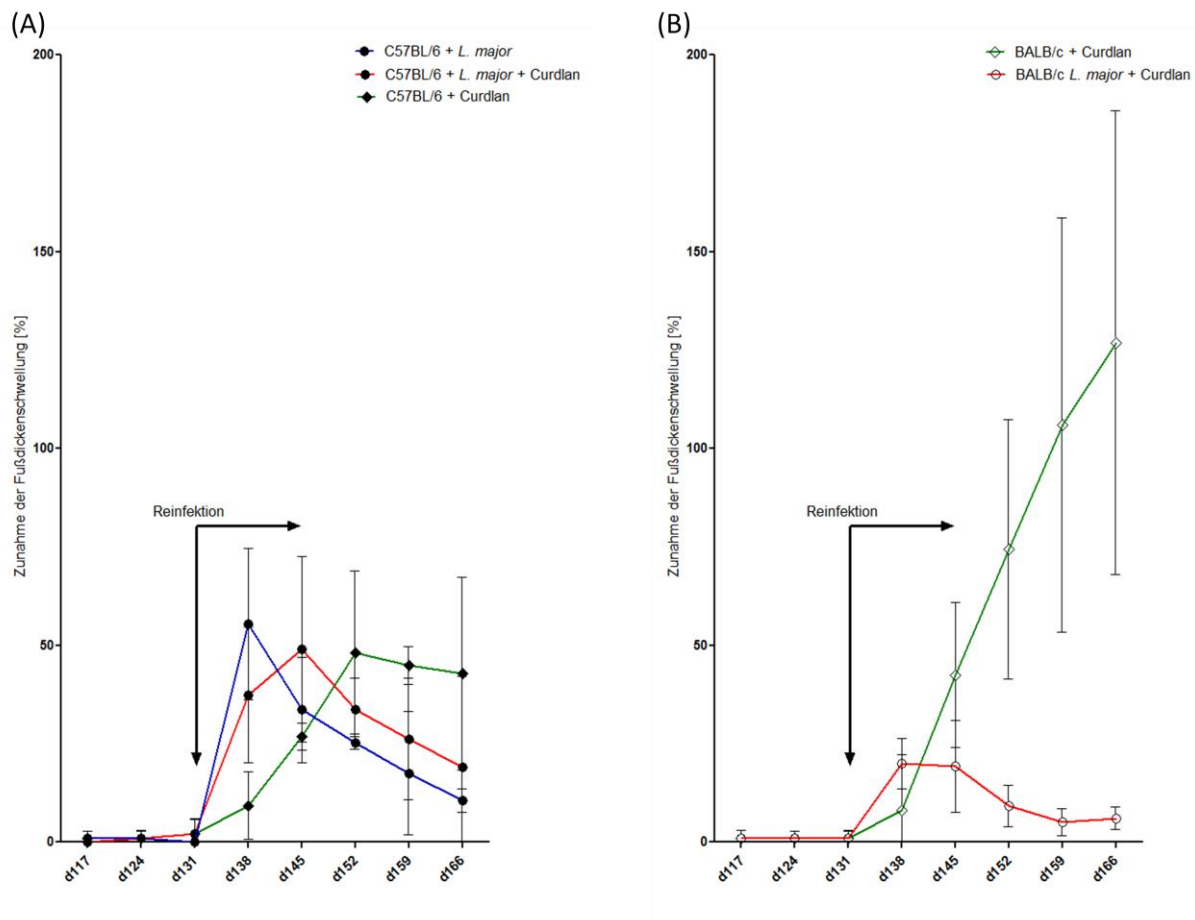


Abbildung 14: Reinfektion von BALB/c - Mäusen.

C57BL/6 – sowie BALB/c – Mäuse, die eine *Leishmania*-Infektion ausheilen konnten, wurden erneut mit den Parasiten infiziert. (A) C57BL/6 – Tiere waren unabhängig von ihrer Vorbehandlung resistent gegenüber einer erneuten Infektion mit lebenden Leishmanien. (B) BALB/c – Mäuse, die bisher keinen Kontakt mit den Parasiten sondern nur mit Curdlian hatten zeigten bei der Reinfektion einen normalen Krankheitsverlauf der Leishmaniose und mussten letzten Endes aus dem Versuch genommen werden (grün). Dagegen hatten die Tiere, denen zuvor Parasiten und Curdlian injiziert wurde, eine Resistenz auch gegenüber einer erneuten Infektion entwickelt (rot).

Gezeigt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Ein Messpunkt wurde aus den Werten dreier Tiere gebildet (n = 3).

Alle C57BL/6 – Mäuse waren, wie erwartet, resistent gegen eine erneute Infektion mit dem Leishmaniose-Erreger. Nach einer schnellen Schwellung der Pfoten begannen die Füße der Tiere aller Gruppen innerhalb von 4 Wochen zu heilen. Dabei schwollen und heilten die Pfoten der Mäuse schneller, wenn sie zuvor bereits Kontakt mit Leishmanien hatten (Abb. 14A, blaue und rote Linie). BALB/c – Mäuse, die bereits eine Leishmaniose-Infektion

abwehren konnten, da sie in Anwesenheit von Curdlan Kontakt mit den Erregern hatten, waren auch gegenüber einer erneuten Infektion mit den Parasiten resistent, sogar dann wenn bei der Reinfektion kein Curdlan zusätzlich verabreicht wurde (rote Linie). Tiere, die bisher nur Curdlan erhalten hatten, entwickelten dagegen wie erwartet eine typische leishmaniosebedingte Schwellung der Füße und mussten bei einsetzender Nekrotisierung aus dem Versuch genommen werden (grüne Linie) (Abb. 14B).

Anschließend untersuchten wir, ob BALB/c – Mäuse, die bereits einmal eine Leishmanioseinfektion bekämpfen konnten, ein immunologisches Gedächtnis auf zellulärer Ebene entwickelt hatten. Dies lässt sich mit Hilfe der sog. *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH) – Reaktion überprüfen. Während resistente C57BL/6 – Mäuse eine DTH-Reaktion entwickeln können, sind susceptible BALB/c – Mäuse dazu nicht in der Lage (Wilhelm et al., 2001). Um zu untersuchen, ob BALB/c – Tiere, die durch Curdlan eine Leishmanioseinfektion bekämpfen konnten, ebenso reagieren wurde den Tieren SLA injiziert. Die Schwellung der Füße wurde daraufhin täglich gemessen.

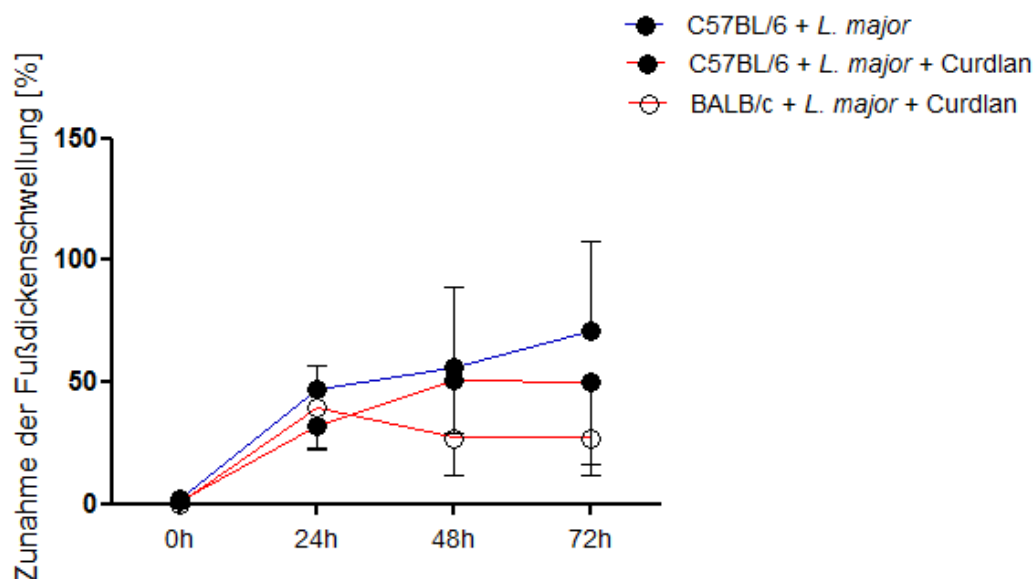


Abbildung 15: DTH – Reaktion.

Nach Injektion von *Leishmania*-Antigen wurde die Schwellung der Pfoten alle 24 Stunden gemessen. Bei C57BL/6 – Mäusen konnte unabhängig von der Vorbehandlung über 48 Stunden eine Zunahme der Pfootendicke beobachtet werden, die auch nach 72 Stunden nicht abnahm. Auch die Pfoten der BALB/c – Mäuse schwellen deutlich an, wenn auch diese Schwellung etwas schneller zurück ging.

Ein Messpunkt wird aus den Werten dreier Tiere gebildet. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (Statistische Signifikanz konnte nicht festgestellt werden).

Wie Abbildung 15 zeigt, unterscheiden sich die Kurven, die sich aus der Fußschwellung der Mäuse ergeben, kaum. Wie erwartet entwickelten die genetisch resistenten C57BL/6 – Mäuse eine deutliche DTH-Reaktion mit konstant steigender (C57BL/6 infiziert mit *L. major*) bzw. nach 48 h konstant gleichbleibender (C57BL/6 infiziert mit *L. major* und Curdlan) Schwellung der Pfoten (Wilhelm et al., 2001). Die normalerweise suszeptiblen BALB/c – Mäuse zeigten innerhalb der ersten 24 Stunden eine Schwellung der Füße, die vergleichbar mit der der C57BL/6 – Tiere war. Nach 48 und 72 h war die Schwellung zwar wieder leicht rückgängig, jedoch noch immer deutlich messbar (Abb. 15). Zum Zeitpunkt der Durchführung der DTH-Reaktion waren alle BALB/c – Mäuse, die mit Leishmanien ohne Curdlan infiziert waren, bereits aus dem Versuch genommen.

Es ist bekannt, dass BALB/c – Mäuse eine Infektion mit *Leishmania*-Parasiten bekämpfen und sogar eine Resistenz gegenüber einer erneuten Infektion ausbilden können, wenn nur wenige der Krankheitserreger (etwa 100 - 1000) in den Organismus gelangen (Courret et al., 2003). Da Curdlan nicht komplett in PBS löslich ist sind die Bedingungen somit erschwert, eine gleichbleibende, und vor allen Dingen vergleichbare Menge an Parasiten in die Mauspfoten zu injizieren. Aus diesem Grund sollte nachfolgend untersucht werden, ob die gleiche Anzahl an Parasiten in die Pfoten gespritzt wurde, wenn die Leishmanien einmal in PBS und einmal in Curdlanlösung aufgenommen waren. Dazu wurden Mäuse drei Tage nach der Infektion getötet und die Parasitendichte in den Pfoten mit Hilfe einer quantitativen PCR bestimmt.

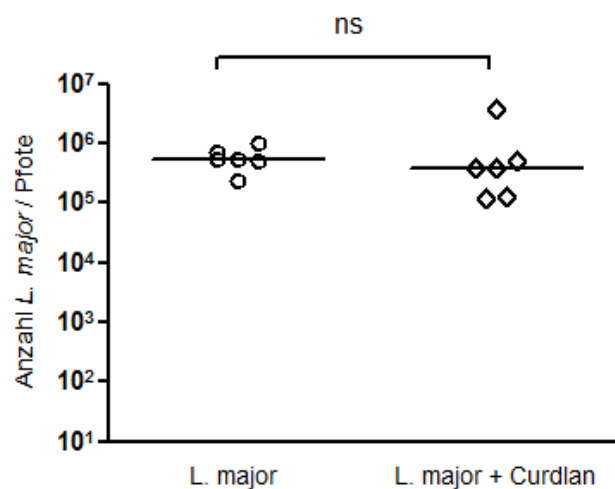


Abb. 16: Legende siehe Seite 76.

Abbildung 16: Anzahl der *Leishmania*-Parasiten 3 Tage p.i..

Die Anzahl an *Leishmania major* wurde drei Tage p.i. bestimmt. Die Messung ergab, dass es keinen Unterschied macht, ob die Parasiten in reinem PBS oder in PBS mit Curdlan aufgenommen waren, da die Anzahl der Leishmanien in den Pfoten zu diesem Zeitpunkt identisch ist.

Statistik: Student's t-Test (Gruppengröße n = 6)

Um sicherzustellen, dass die Resistenz der BALB/c – Mäuse, die mit *Leishmania major* in Kombination mit Curdlan infiziert wurden, nicht darin begründet liegt, dass durch Curdlan weniger Leishmanien in die Pfoten injiziert werden konnten, bestimmte man die Anzahl der Parasiten drei Tage p.i.. Wir konnten zeigen, dass die Parasitenlast zu diesem Zeitpunkt in den Mäusen beider Gruppen identisch ist (Abb. 16).

Des Weiteren überprüften wir, ob Curdlan auf die Parasiten toxisch wirkt. Dazu wurden *Leishmania major* eine Woche in RPMI-Medium inkubiert, das 50 µg / µl Curdlan enthielt. Anschließend wurden BALB/c – Mäuse mit diesen Parasiten infiziert, um auch deren Virulenz zu überprüfen. Weder das Wachstum noch die Virulenz der Leishmanien unterschied sich, verglichen mit Parasiten, die in Medium ohne Curdlan kultiviert wurden (Daten nicht gezeigt).

Um ein genaueres Bild des durch Curdlan veränderten Krankheitsverlaufes der Leishmaniose zu bekommen, wurde die Parasitendichte in den Füßen von Tieren bestimmt, die in An- oder Abwesenheit von Curdlan infiziert wurden. Als Analysezeitpunkte haben wir Tag 14 und Tag 40 nach Infektion gewählt. Außerdem wurden Füße von BALB/c – Mäusen untersucht, bei denen die Leishmanioseinfektion abgeheilt war (Tag 84 nach Infektion).

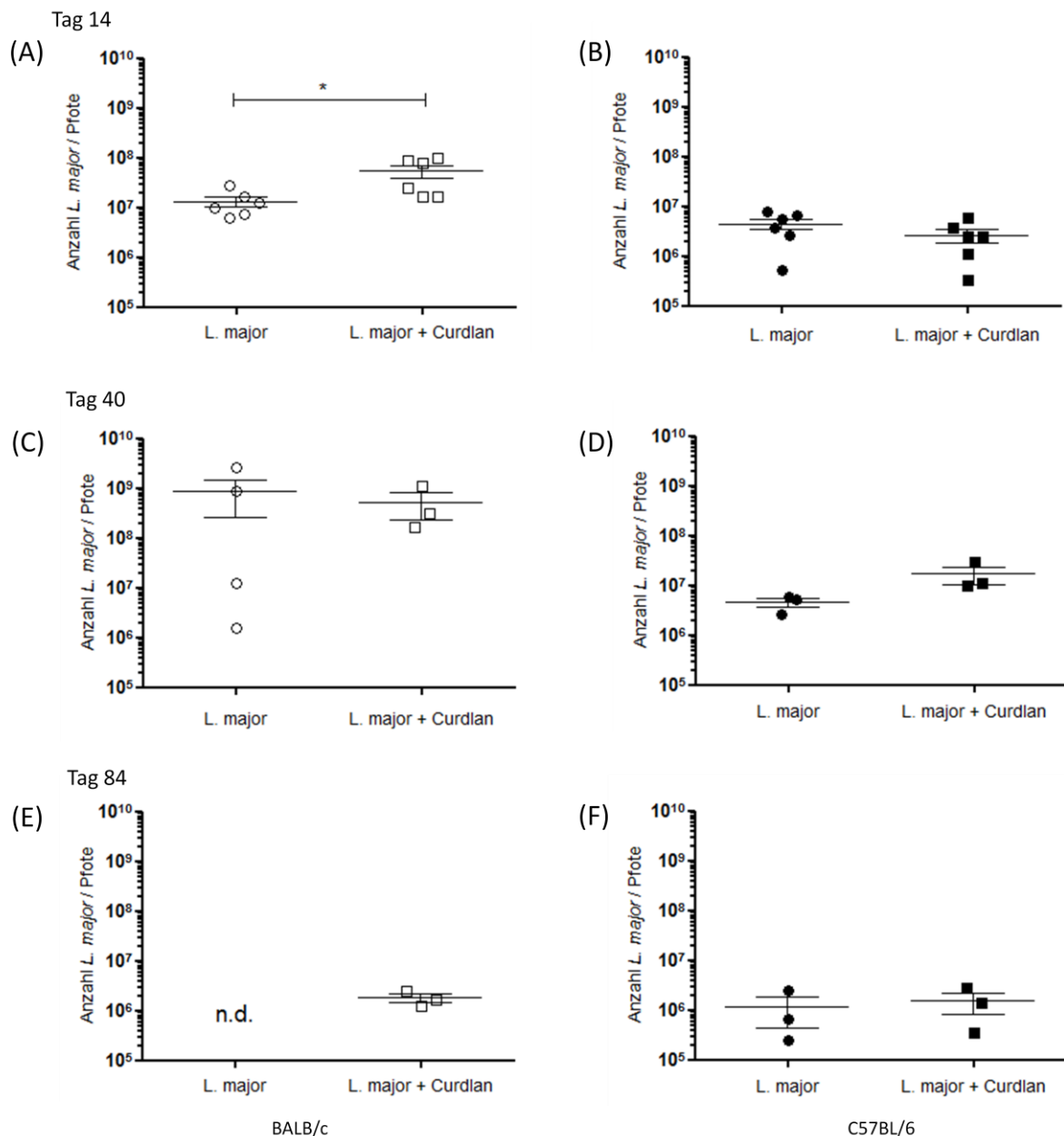


Abbildung 17: Parasitendichte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion.

Die Anzahl der Leishmanien am Infektionsherd wurde mit Hilfe quantitativer PCR bestimmt. (A und B) Die Anzahl der Leishmanien in den BALB/c – Mäusen war mit Curdlan an Tag 14 p.i. signifikant erhöht. In C57BL/6 – Mäusen konnte kein Unterschied festgestellt werden. (C und D) Die Parasitenmengen in den Füßen der Mäuse an Tag 40 p.i. waren unabhängig von der Behandlung identisch. (E und F) Die Anzahl der Parasiten war in allen Füßen im Vergleich zu Tag 40 p.i. verringert.

n=6 (Tag 14), n=3 (Tag 40 und Tag 84). Statistik: Student's t-Test

In Abbildung 17 sind die Mengen der Leishmanien in infizierten Füßen von BALB/c – und C57BL/6 – Mäusen zu sehen. Dabei war der Unterschied der Parasitenlast zwischen Tieren,

denen nur Parasiten gespritzt wurden, und Mäusen, denen zusätzlich Curdlan injiziert wurde, von besonderem Interesse. Es zeigte sich, dass 14 Tage nach der Infektion die Anzahl der Leishmanien in Füßen von BALB/c - Mäusen, denen zusätzlich zu den Parasiten auch Curdlan gespritzt wurde, signifikant höher war. In Pfoten von C57BL/6 – Mäusen war die Anzahl der Parasiten dagegen in beiden Gruppen vergleichbar. Außerdem war die Parasitenlast in den C57BL/6 – Mäusen nach 14 Tagen insgesamt etwas geringer als in BALB/c – Mäusen (Abb. 17A, 17B). An Tag 40 p.i. war die Anzahl der Leishmanien in den Pfoten beider Gruppen in beiden Mausstämmen untereinander vergleichbar. Allgemein war zu diesem Zeitpunkt die Parasitenlast in den BALB/c – Mäusen deutlich höher als in den C57BL/6 – Tieren (Abb. 17C, 17D). An Tag 84 waren alle BALB/c – Mäuse, die nur mit Parasiten infiziert waren, bereits auf Grund nekrotisierender Läsionen aus dem Versuch genommen worden. Die zweite Gruppe, welche zusätzlich Curdlan enthielt, zeigte jedoch eine deutlich verringerte Anzahl an Parasiten in den Füßen, die vergleichbar war mit der Leishmaniendichte in den Füßen von C57BL/6 – Mäusen zum selben Zeitpunkt (Abb. 17E, 17F).

Um weitere Hinweise zu erhalten, wie die Aktivierung von DCs durch Curdlan im Verlauf der Leishmaniose die Immunantwort beeinflusst, wurde infizierten Tieren 25 Tage nach der Infektion Blut aus der Schwanzvene entnommen. Daraus wurde Serum gewonnen und mit Hilfe eines ELISAs der Titer *Leishmania*-spezifischer IgG1 und IgG2a Immunglobuline bestimmt.

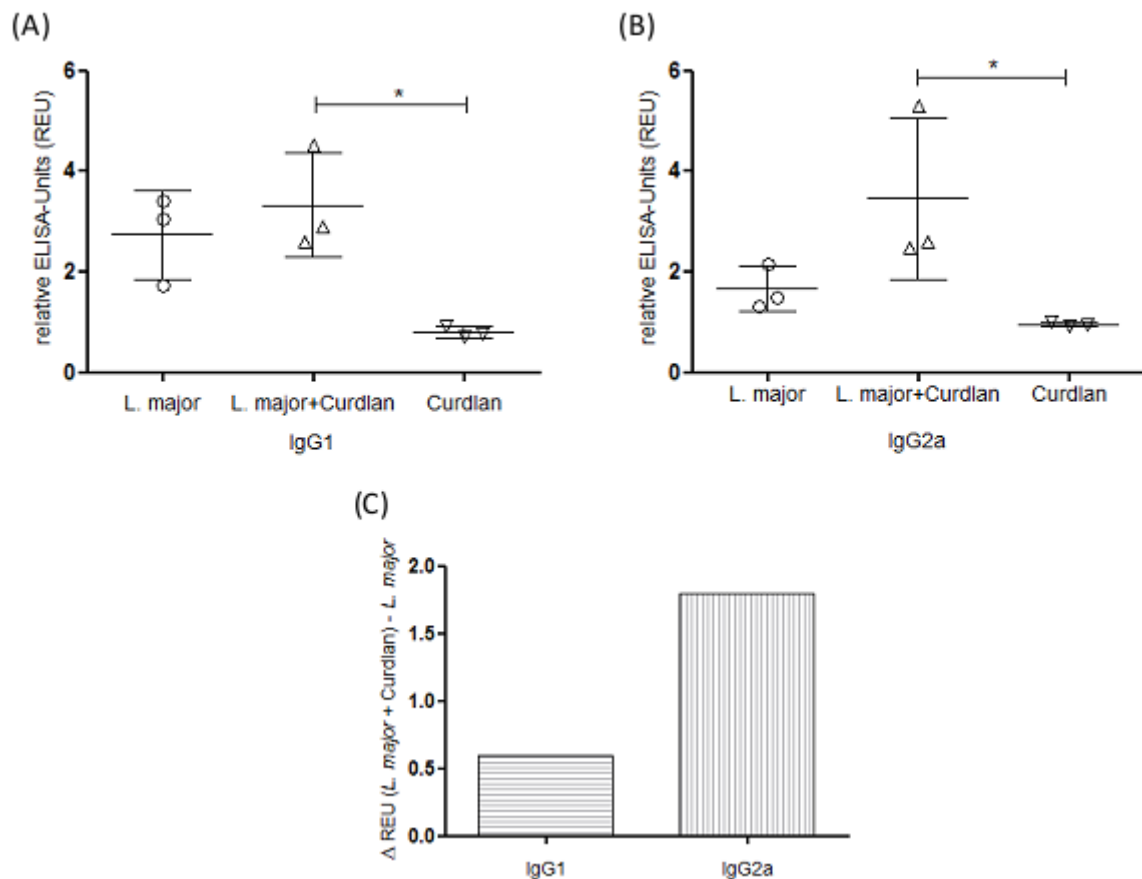


Abbildung 18: ELISA zur Bestimmung *Leishmania*-spezifischer Immunglobulinmengen.

Der Titer parasitenspezifischer Immunglobuline (IgG1 und IgG2a) im Serum infizierter BALB/c - Mäuse wurde analysiert. (A) Die Verabreichung von Parasiten und Curdian führt zu einem signifikant gesteigerten IgG1 – Level im Serum der Tiere verglichen mit naiven Tieren (Tiere, denen nur Curdian ohne Leishmanien injiziert wurde). (B) Durch die Gabe von Leishmanien in Kombination mit Curdian kommt es auch zu einem Anstieg von IgG2a im Serum. (C) Zur Verdeutlichung des Anstieges der Immunglobulinmengen durch Infektion in Anwesenheit von Curdian wurde aus den Mittelwerten der jeweiligen REUs die Differenz gebildet (Δ REU). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der verwendeten Tiere betrug jeweils drei. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: One-Way-ANOVA

Die im ELISA gemessenen optischen Dichten (OD) der verschiedenen Proben wurden auf die OD-Werte naiver Tiere normalisiert. Somit entspricht ein REU (*relative ELISA-Unit*; relative ELISA-Einheit)-Wert von 1 dem Serumlevel eines nicht-infizierten Tieres. Mäuse, denen nur Curdian subkutan injiziert wurde, zeigen keine erhöhten Mengen an Leishmanien-spezifischer IgG1 – oder IgG2a – Immunglobulinen. Dagegen führte die Infektion mit *L. major* in beiden Fällen zu einem erhöhten Titer an IgG1 bzw. IgG2a. Wurde gleichzeitig mit den

Parasiten auch Curdlan in den Fuß injiziert, führte dies zu einem signifikanten Anstieg der IgG1- und IgG2a-Mengen, verglichen mit den Werten naiver Tiere (Abb. 18A, 18B). Um den Anstieg der Immunglobuline mit Curdlan infizierter Tiere im Vergleich zu ohne Curdlan infizierten Tieren zu verdeutlichen, wurde zudem die Differenz aus den Mittelwerten der jeweiligen REUs gebildet ($\Delta \text{REU} = \text{REU} (L. \text{major} + \text{Curdlan}) - \text{REU } L. \text{major}$). Diese Differenz ist für IgG2a deutlich größer als für IgG1 (Abb. 18C), was auf eine Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung Th1 hindeutet.

Nun sollte untersucht werden, ob sich bei einer Immunreaktion, die durch die Injektion von Leishmanien und Curdlan hervorgerufen wird, die Sezernierung bestimmter Zytokine, die für die Polarisierung von T-Zellen zu Th1- oder Th2-Zellen verantwortlich sind, ändert. Deshalb haben wir Lymphknotenzellen infizierter Mäuse 28 Tage p.i. für die Dauer von drei Tagen in Kultur genommen. Während dieser Zeit wurden die Zellen mit SLA restimuliert, so dass sie zur gesteigerten Zytokinsekretion angeregt wurden. Dann wurde der Überstand der Zellen mit Hilfe spezifischer ELISAs analysiert und die Konzentration des im Medium enthaltenen Th2-typischen Zytokins IL – 4 bestimmt. Ebenso wurde die Konzentration des Zytokins IFN- γ ermittelt, das für eine Th1-vermittelte Immunantwort typisch ist.

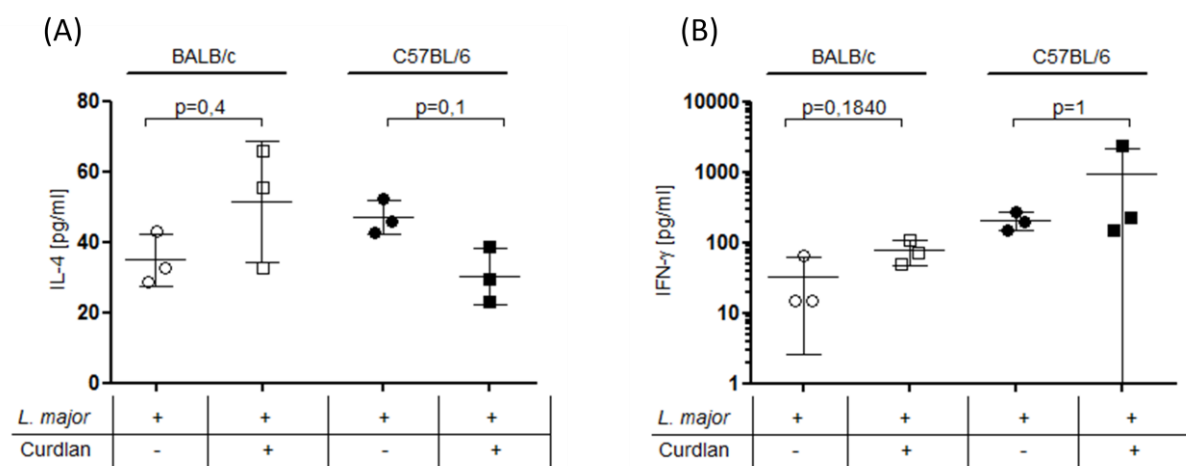


Abbildung 19: ELISA zur Bestimmung der Konzentrationen Th1- und Th2-spezifischer Zytokine.

Lymphknotenzellen aus 28 Tage lang infizierten Tieren wurden 3 Tage mit SLA restimuliert. Die Zytokinmenge im Überstand der Zellen wurde mittels ELISA bestimmt. (A) Durch die zusätzliche Injektion von Curdlan während der Infektion erhöhte sich die von BALB/c – Zellen sezernierte Menge IL-4 tendenziell. Dagegen war die Menge in den Überständen der C57BL/6 – Zellen leicht erniedrigt. (B) Restimulierte BALB/c – Zellen sezernierten tendenziell mehr IFN- γ , wenn den infizierten Tieren zusätzlich Curdlan gespritzt wurde. Der gleiche Effekt konnte mit den Zellen aus C57BL/6 - Tieren beobachtet werden.

Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Jeder Punkt stellt ein Tier dar. Statistik: Mann-Whitney-Test (statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden.)

Abbildung 19 zeigt, dass die sezernierte Menge an IL-4 in den BALB/c – Zellen leicht anstieg, wenn den Tieren zusätzlich zu den Parasiten Curdlan gespritzt wurde. Dagegen ging die Menge dieses Zytokins in den Überständen bei Zellen aus C57BL/6 – Mäusen bei gleicher Behandlung leicht zurück (Abb. 19A). Auch die Sekretion von IFN- γ nahm in der *in vitro* Kultur der Zellen beider Mausstämme durch eine vorausgegangene Curdlanbehandlung tendenziell zu (Abb. 19B).

CD4⁺ T-Zellen gehören zu den typischen Produzenten der Zytokine IL-4 und IFN- γ . Aus diesem Grund untersuchten wir im nächsten Schritt, ob sich der prozentuale Anteil der CD4⁺ T-Zellen zur Gesamtzellzahl nach Infektion mit *L. major* im Vergleich zu einer Infektion mit den Parasiten in Kombination mit Curdlan verändert. Die Analyse wurde mit Lymphknotenzellen von entsprechend behandelten Tieren durchgeführt, die vor der durchflusszytometrischen Messung drei Tage lang mit SLA restimuliert wurden.

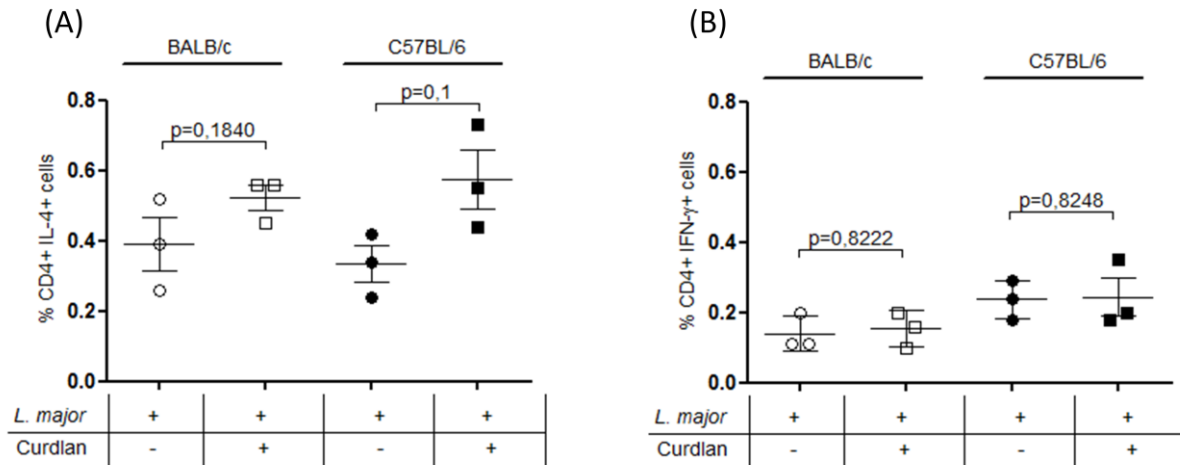


Abbildung 20: Anteil zytokinproduzierender CD4⁺ T-Zellen.

Der Anteil IL-4 – und IFN- γ – sezernierender CD4⁺ T-Zellen zur Gesamtzellzahl wurde durchflusszytometrisch untersucht. Lymphknoten infizierter Tiere wurden dazu nach 28 Tagen entnommen und die Zellen drei Tage lang mit SLA restimuliert. (A) Nach subkutaner Injektion von Parasiten und Curdlan erhöhte sich der Anteil der IL-4 sezernierenden CD4⁺ T-Zellen tendenziell im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese war nur mit Parasiten, aber ohne Curdlan, infiziert. (B) Der Prozentsatz IFN- γ – produzierender CD4⁺ T-Zellen blieb unverändert.

Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Statistik: Mann-Whitney-Test (statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden.)

Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen, die IL-4 (Abb. 20A) bzw. IFN- γ (Abb. 20B) sezernieren, wurde durch die zusätzliche Injektion von Curdlan nicht signifikant verändert. Es konnte dennoch eine tendenzielle Zunahme CD4⁺ IL-4⁺ Zellen festgestellt werden. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen von Zellen aus den drainierenden Lymphknoten. Neuere, vorläufige Daten lassen jedoch darauf schließen, dass der Anteil IFN- γ – sezernierender CD4⁺ T-Zellen am Infektionsherd deutlich höher ist, wenn den Tieren die Parasiten zusammen mit Curdlan injiziert wurden. Dabei erfolgte der Vergleich mit naiven Tieren ebenso wie zu Tieren, denen lediglich Leishmanien gespritzt wurden (Daten nicht gezeigt).

Nachfolgend ist eine Tabelle gezeigt, in der die Konzentrationen typischer Th1- bzw. Th2-vermittelnder Zytokine in den Überständen unterschiedlich stimulierter BMDCs und T-Zellen aufgeführt sind. Die Proben wurden mit Hilfe des BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) - Systems (vgl. II. 2.1.16) analysiert.

(A)

Überstand Lymphknotenzellen (restimuliert mit SLA)	Th1				Th2			
	IL-1 α [pg / ml]	IFN- γ [pg / ml]	TNF [pg / ml]	IL-12 [pg / ml]	IL-4 [pg / ml]	IL-5 [pg / ml]	IL-10 [pg / ml]	IL-13 [pg / ml]
infizierte Tiere	0	101,057	unter Nachweisgrenze	unter Nachweisgrenze	51,223	19,697	15,08	25,7
infizierte Tiere + Curdlan	44,995	176,553	unter Nachweisgrenze	unter Nachweisgrenze	47,28	28,95	6,14	0

(B)

Überstand von T-Zellen (kokultiviert mit BMDCs)	Th1				Th2			
	IL-1 α [pg / ml]	IFN- γ [pg / ml]	TNF [pg / ml]	IL-12 [pg / ml]	IL-4 [pg / ml]	IL-5 [pg / ml]	IL-10 [pg / ml]	IL-13 [pg / ml]
unstimuliert	0	136,81	0	unter Nachweisgrenze	0	32,88	0	0
Curdlan	0	848,18	81,16	unter Nachweisgrenze	32,68	34,53	0	336,35
promastigote <i>L. major</i>	41,72	976,5	0	unter Nachweisgrenze	5704,49	38,83	123,83	1590,75
promastigote <i>L. major</i> + Curdlan	101,29	11383,61	127,95	unter Nachweisgrenze	8392,72	87,36	403,67	6639,26
SLA aus promastigoten <i>L. major</i>	0	2599,22	0	unter Nachweisgrenze	6439,96	39,38	95,53	3805,62
SLA aus promastigoten <i>L. major</i> + Curdlan	0	5393,8	57,59	unter Nachweisgrenze	6488,92	57,26	388,2	5363,31
amastigote <i>L. major</i>	0	1905,33	0	unter Nachweisgrenze	6688,5	73,69	103,95	2852,61
amastigote <i>L. major</i> + Curdlan	75,69	3173,54	104,12	unter Nachweisgrenze	2962,48	45,72	101,13	3113,89
SLA aus amastigoten <i>L. major</i>	0	2372,77	0	unter Nachweisgrenze	6999,34	76,94	129,59	3867,73
SLA aus amastigoten <i>L. major</i> + Curdlan	89,29	6658,84	148,87	unter Nachweisgrenze	7052,52	111,68	388,2	5621,3

Tabelle 1: Nachweis von Th1- und Th2-Zytokinen in Zellkulturüberständen.

Mit Hilfe des BD™ CBA – Systems wurden die Konzentration von Th1- und Th2-Zytokinen in Zellkulturüberständen bestimmt. (A) 28 Tage nach Infektion wurden die Lymphknoten infizierter Mäuse entnommen und die Zellen drei Tage lang mit SLA restimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und die Zytokin-Konzentrationen bestimmt. (B) T-Zellen wurden aus den Lymphknoten von Mäusen, die 10 Tage lang infiziert waren, isoliert. Sie wurden 3 Tage lang mit BMDCs kokultiviert, die wie in der Tabelle angegeben stimuliert waren.

Die Zahlen entsprechen dem genauen Wert des jeweiligen Zytokins im Überstand in [pg / ml]. Die blauen Balken dienen der Visualisierung der Mengenverhältnisse.

Die Ergebnisse zweier von 6 verschiedenen Experimenten sind gezeigt.

Die auf Seite 82 abgebildete Tabelle 1 zeigt, dass eine Stimulation von Zellen mit Curdlan zu einer erhöhten Ausschüttung der typischen Th1-Zytokine IL-1 α , IFN- γ und TNF führte. Dies war sowohl bei promastigoten Parasiten, amastigoten *Leishmanien* und auch SLA in Kombination mit dem β -Glucan der Fall. Es erfolgte jeweils der Vergleich zu der Gruppe mit gleicher Stimulation, ohne Curdlan. Aus der Tabelle kann man außerdem ablesen, dass es auch Th2-Zytokine gibt, deren Ausschüttung durch Curdlan erhöht wird. Dabei handelt es sich in erster Linie um IL-5 und IL-10. Allerdings ist hier die zunehmende Sezernierung nicht so ausgeprägt wie die der Th1-Zytokine (Tabelle 1).

Bisher haben wir die Effekte von Curdlan auf die Immunantwort gegen *Leishmanien* untersucht. Nun sollte überprüft werden, ob der β -Glucan – Rezeptor Dectin-1, welcher als wichtigster Rezeptor für dieses Kohlehydrat bekannt ist, für diese Effekte von Bedeutung ist. Dazu verwendeten wir Mäuse, die den genetischen Hintergrund suszeptibler BALB/c – Mäuse besitzen, jedoch auf der Oberfläche ihrer Immunzellen den Rezeptor Dectin-1 nicht exprimieren (Dectin-1^{-/-} – Mäuse) (Taylor et al., 2006). Diese Tiere haben wir freundlicherweise von Prof. Dr. Gordon Brown, Universität Aberdeen, erhalten. Bevor diese Tiere in einem Versuch verwendet wurden, musste mittels PCR kontrolliert werden, ob es sich um homozygote *Knock-Out* – Tiere handelt.

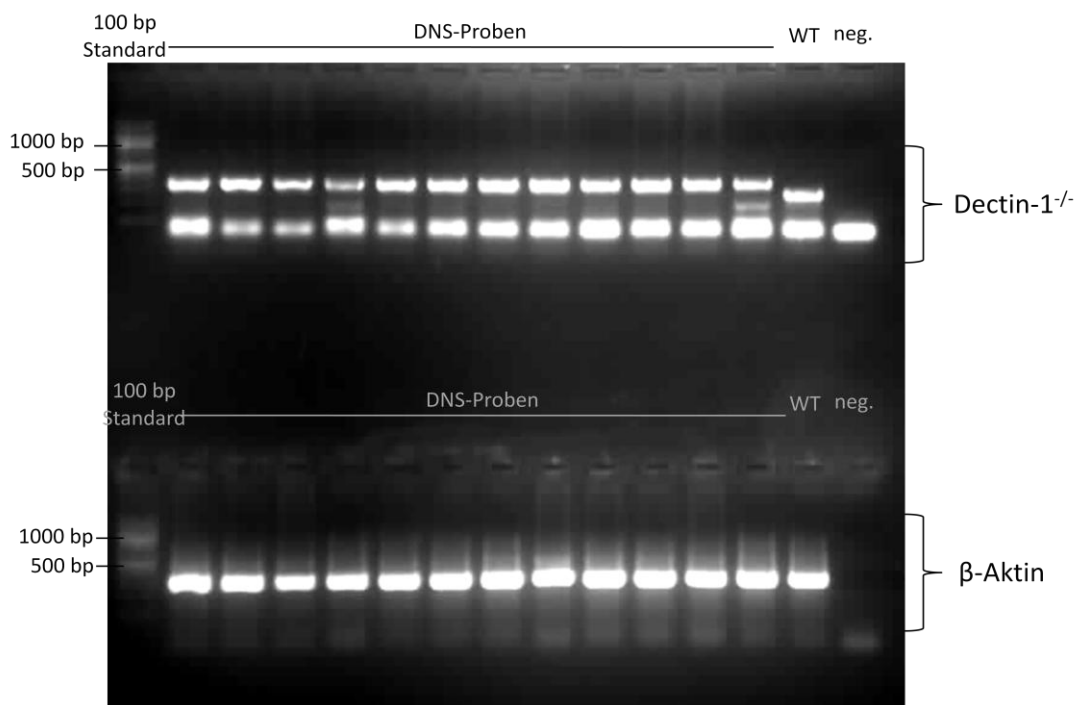


Abbildung 21: Genotypisierung der Dectin-1^{-/-} - Mäuse.

Kontrolle des Gen-*Knock-Outs* der Dectin-1^{-/-} - Mäuse. Alle hier getesteten Tiere sind *Knock-Out* – Mäuse. Die Bande des entsprechenden Allels ist auf der Höhe von 400 bp erkennbar. Eine Bande wie sie typisch für eine Wildtyp – Maus wäre, bei etwa 300 bp, ist nicht sichtbar (obere Reihe). Die Isolation der DNS war aus allen Mausschwänzen erfolgreich und das Gel gleichmäßig beladen (untere Reihe).

Auf dem in Abbildung 21 dargestellten Agarosegel kann man die PCR – Produkte der Dectin-1^{-/-} - Mäuse auf Höhe der 400 bp – Bande des Standards erkennen. Die Bande des Wildtyp-Allels dagegen ist bei etwa 300 bp sichtbar (siehe WT-Kontrolle). Heterozygote Tiere würden beide Banden aufweisen (Abb. 21 oben). Die Ladekontrolle stellte sicher, dass die DNS-Extraktion aller Proben funktioniert hatte (Abb. 21 unten). Alle in einem Versuch eingesetzten *Knock-Out* – Mäuse wurden zuvor auf diese Weise genotypisiert, um sicherzustellen, dass es sich um homozygote *Knock-Out* – Tiere handelt.

Um die Relevanz des C-Typ-Lektins Dectin-1 bei der Curdlan-vermittelten Resistenz gegenüber *L. major* untersuchen zu können, wurden Dectin-1^{-/-} - Mäuse mit genetischem BALB/c – Hintergrund (Hg) mit den Parasiten infiziert. Außerdem verabreichte man auch hier einer weiteren Gruppe dieser Mäuse *Leishmania*-Parasiten in Kombination mit 50 µg Curdlan je µl. Zur Kontrolle wurden auch hier BALB/c-Wildtypmäuse auf die gleiche Weise infiziert.

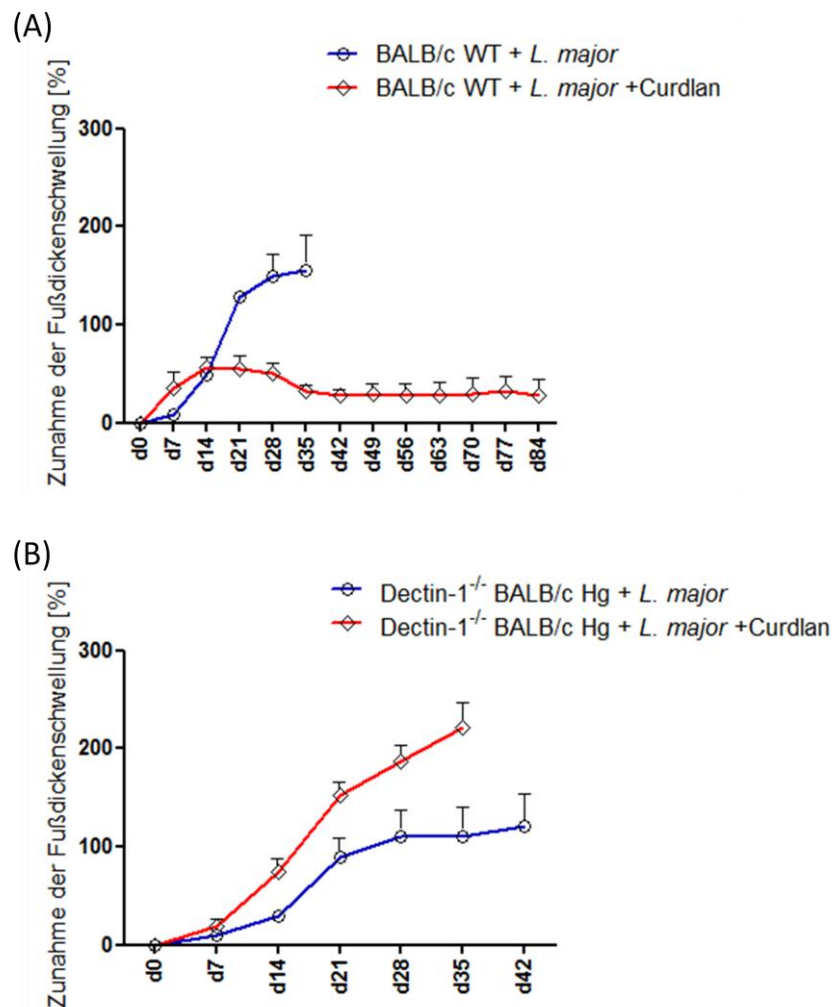


Abbildung 22: Infektion von Dectin-1^{-/-} - Mäusen mit *L. major*.

Die Rolle des β -Glucan - Rezeptors Dectin-1 bei der curdianvermittelten Resistenz von BALB/c – Mäusen gegenüber einer *L. major* – Infektion wurde untersucht. Dazu wurden Dectin-1^{-/-} - Mäuse mit genetischem BALB/c – Hintergrund (Hg) infiziert. (A) BALB/c – WT – Mäuse wurden als Kontrolltiere infiziert. Die Tiere der Gruppe ohne Curdian mussten aus dem Versuch genommen werden, während die Mäuse der Gruppe mit Curdian die Infektion offenbar kontrollieren kann. (B) Dectin-1^{-/-} - Mäuse sind auch dann nicht resistent gegenüber *L. major*, wenn ihnen zeitgleich mit den Parasiten Curdian ($c = 50 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) injiziert wurde. Die Tiere wurden nach oben beschriebenen Kriterien bewertet und, falls tierschutzrechtlich nötig, aus dem Versuch genommen. (Gruppengröße BALB/c - WT: $n = 5$; Dectin-1^{-/-} - BALB/c: $n = 7$)

Wie erwartet konnten die zur Kontrolle infizierten BALB/c-WT – Mäuse die Leishmanieninfektion nicht bekämpfen (vgl. Abb. 12), wenn ihnen lediglich Parasiten in die Pfoten injiziert wurden. Sie mussten nach 35 Tagen aus dem Experiment genommen werden. Dagegen entwickelten die Tiere, denen man zusätzlich zeitgleich Curdian mit den

Parasiten verabreichte, eine Resistenz gegenüber dem Erreger. Die anfängliche Schwellung der Füße ging etwa 28 Tage p.i. zurück (Abb. 22A). Im Gegensatz dazu waren die Dectin-1^{-/-} - Mäuse nicht in der Lage, die *L. major* – Infektion zu bekämpfen. Bei diesen Tieren spielte es keine Rolle, ob die Parasiten den Mäusen alleine oder in Kombination mit Curdlan injiziert wurden. Die Mäuse, die das C-Typ-Lektin Dectin-1 nicht exprimierten, waren trotz Curdlanbehandlung suszeptibel. Außerdem kam es durch das β -Glucan zu einem schwereren Infektionsverlauf, was an der stärkeren Schwellung der Füße zu sehen war. Die Tiere mussten bereits an Tag 35 p.i. getötet werden, während die Tiere der zweiten Gruppe erst an Tag 42 auf Grund von nekrotischem Gewebe am Fuß aus dem Experiment genommen wurden (Abb. 22B).

Es stellte sich die Frage, ob bereits die Injektion von SLA bei gleichzeitiger Verabreichung von Curdlan die Resistenz gegenüber einer späteren Infektion hervorrufen kann. Aus diesem Grund injizierten wir BALB/c – Mäusen das Äquivalent von 3×10^6 *L. major* in Kombination mit 50 μg / μl Curdlan. In einem Zeitraum von vier bis acht Wochen nach dieser Immunisierung erfolgte kontralateral die Infektion mit lebenden Parasiten. Im Abstand einer Woche wurden die Schwellungen der Pfoten gemessen.

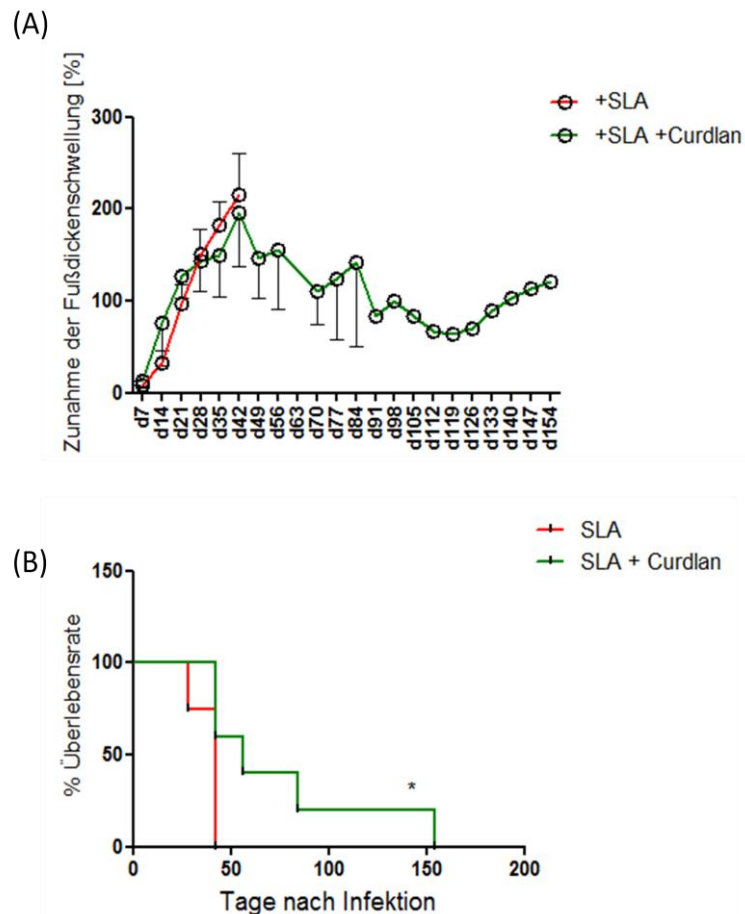


Abbildung 23: Infektion von BALB/c – Mäusen nach Immunisierung mit SLA und Curdlan.

BALB/c – Mäuse wurden mit lebenden *L. major* infiziert. Vorausgegangen war eine Immunisierung mit SLA in An- oder Abwesenheit von Curdlan. (A) SLA alleine konnte keine protektive Immunreaktion gegen die Parasiten bewirken. Die Tiere mussten spätestens sechs Wochen nach Infektion aus dem Versuch genommen werden. (B) Die Tiere, die mit SLA und Curdlan vorbehandelt wurden, überlebten signifikant länger.

Jede Gruppe bestand zu Beginn des Experimentes aus 11 Tieren. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Statistik: Gehan-Breslow-Wilcoxon Test

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der wöchentlichen Pfotenmessung (Abb. 23A). Man kann erkennen, dass die Mäuse, die nur SLA erhalten hatten, nach Infektion mit den Parasiten eine Leishmaniose entwickelten und nach spätestens 6 Wochen aus dem Versuch genommen werden mussten. Dagegen hatten die Tiere, die zusätzlich Curdlan zum SLA erhalten hatten, zwar deutlich geschwollene Pfoten. Auch mussten sie, bis auf ein Tier, auf Grund fortschreitender Nekrose des Gewebes aus dem Versuch genommen werden. Allerdings zeigt Abbildung 23, dass diese Tiere signifikant länger überlebten (Abb. 23B) und

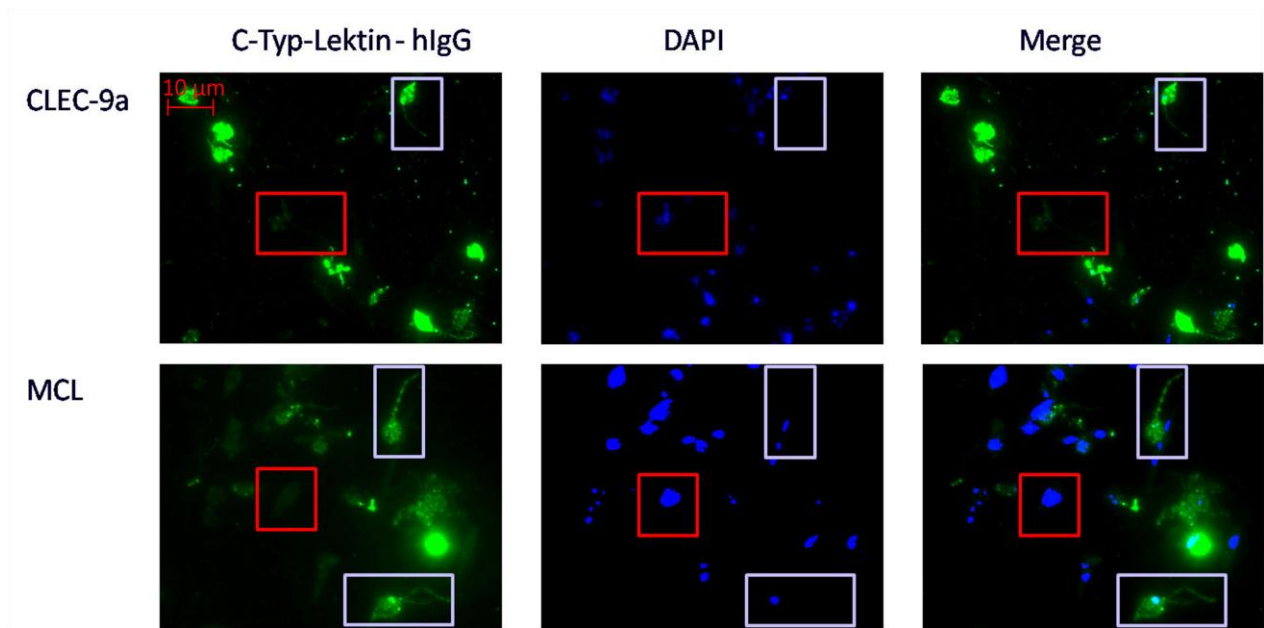
der Krankheitsverlauf deutlich abgeschwächer verlief (Abb. 23A). Der Zustand der Mäuse wurde nach den oben bereits erwähnten tierschutzrechtlichen Kriterien bewertet.

Es gelang uns zu zeigen, dass durch die Infektion von suszeptiblen Mäusen mit *L. major* und zeitgleicher Injektion von Curdlan eine protektive Immunantwort hervorgerufen werden kann. Das hat zur Folge, dass ein Großteil der Tiere in der Lage war, die Krankheit zu bekämpfen. Auch zeigten sie Resistenz gegenüber einer erneuten Infektion. Die Anwesenheit von Curdlan während einer Leishmanieninfektion führte zur vermehrten Ausschüttung Th1-spezifischer Zytokine und erhöhter Immunglobulinproduktion. Durch eine Immunisierung der BALB/c – Mäuse mit SLA und Curdlan konnte kein vollständiger Schutz gegen *L. major* erreicht werden. Dennoch wurde der Krankheitsverlauf deutlich abgeschwächt und die Tiere überlebten signifikant länger.

3. Parasitologische Untersuchungen zur Expression von C-Typ-Lektin– Liganden auf *Leishmania major*

In den beiden letzten Kapiteln haben wir nachgewiesen, dass die Anzahl der Immunzellen, die den C-Typ-Lektin Rezeptor Dectin-1 exprimieren, nach einer *Leishmania*-Infektion erhöht ist. Aktivierung der Zellen über den Rezeptor ruft mehrere Effekte hervor, die schließlich eine protektive Immunantwort der ansonsten suszeptiblen BALB/c – Mäuse ermöglichen. Es stellte sich die Frage, in wie weit die Anwesenheit der Parasiten selbst zu einer Aktivierung der dendritischen Zellen über Dectin-1 führt. Um dies beantworten zu können musste untersucht werden, ob die Leishmanien Liganden für C-Typ-Lektine, insbesondere Dectin-1, tragen. Hierfür stellte uns die Arbeitsgruppe von Dr. Bernd Lepenies, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Berlin, freundlicherweise Fusionsproteine zur Verfügung. Diese Proteine bestanden aus einem C-Typ-Lektin, welches an ein humanes Immunglobulin (hIgG) gekoppelt war. Wie unter II. 2.1.18 beschrieben verwendeten wir diese Fusionsproteine zum Nachweis der Expression von Liganden für die C-Typ-Lektine CLEC-2, CLEC-9a, Dectin-1, MCL, MGL und MICL auf Leishmanien.

(A)



(B)

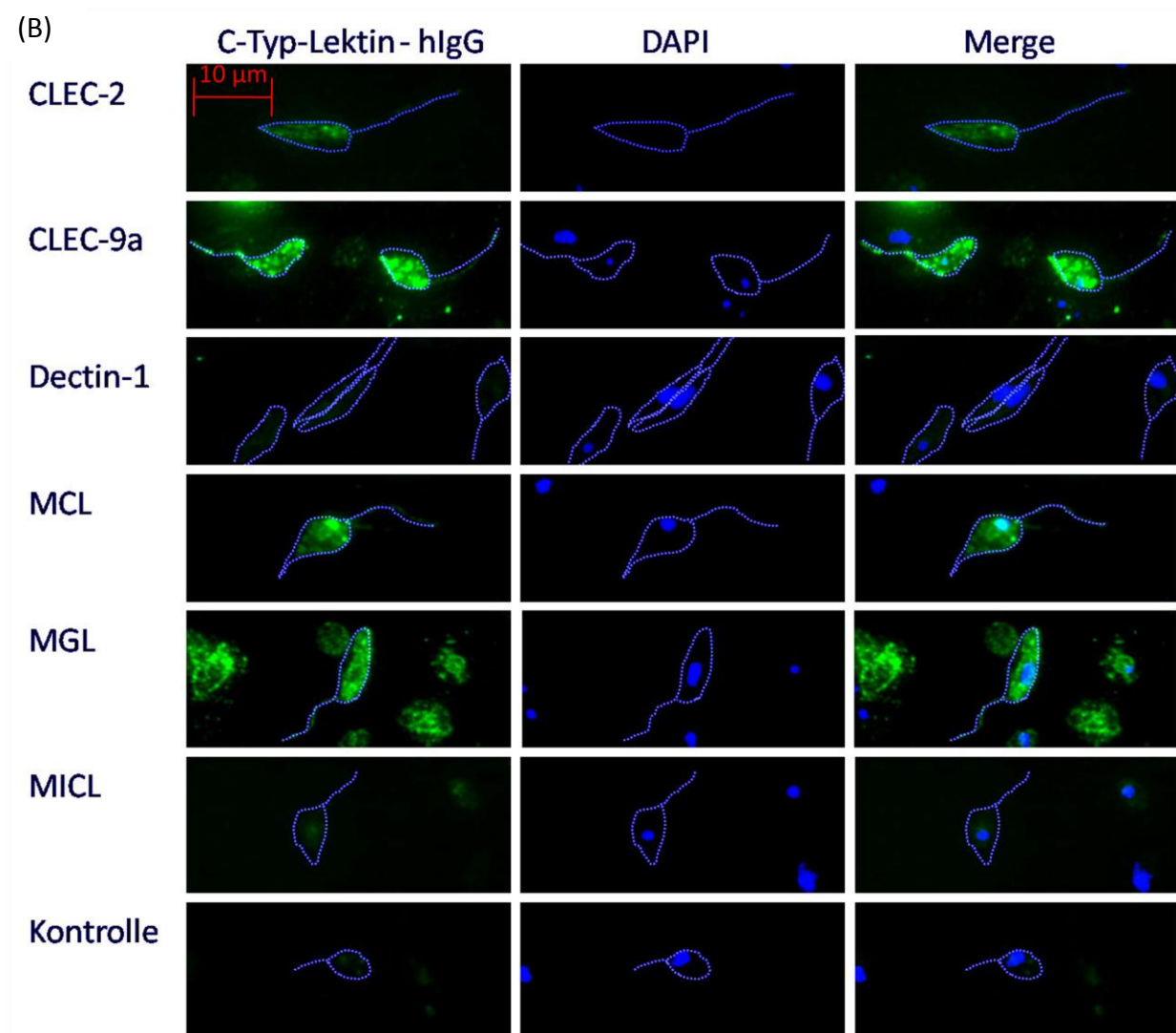


Abbildung 24: Expression von C-Typ-Lektin-Liganden auf promastigoten *L. major*.

Mit Hilfe von C-Typ-Lektin – humanIgG – Fusionsproteinen wurde die Expression von Liganden für die C-Typ-Lektine CLEC-2, CLEC-9a, Dectin-1, MCL, MGL und MICL auf promastigoten *L. major* untersucht. Gebundene Fusionsproteine wurden mit einem anti-hIgG-Antikörper mit konjugiertem FITC – Fluorochrom sichtbar gemacht (grün). Die DNS wurde mit DAPI angefärbt (blau). (A) Übersichtsaufnahme von Parasiten, die mit CLEC-9a - und MCL – Fusionsproteinen inkubiert wurden. Rote Kästchen kennzeichnen Leishmanien, die wenige Fusionsproteine gebunden hatten, weiße Kästchen markieren Parasiten, die den jeweiligen Liganden stark exprimierten. (B) Einzelne Leishmanien sind vergrößert dargestellt. Die gestrichelte Linie verdeutlicht den Umriss der Parasiten.

Eine Kontrollfärbung wurde durch Inkubation der Parasiten mit dem Fc-Teil humaner IgGs durchgeführt. Alle Bilder wurden mit gleicher Belichtungszeit aufgenommen. Die Vergrößerung betrug 630-fach.

Wie Abbildung 24 zeigt, exprimieren promastigote *L. major* die Liganden für die C-Typ-Lektine, welche wir getestet hatten, unterschiedlich stark. Während eine starke Bindung von CLEC-9a, MCL und MGL nachgewiesen werden konnte, war die Bindung von CLEC-2 weniger stark. Von MICL und Dectin-1 konnte dagegen kaum eine Bindung an die Parasiten nachgewiesen werden (Abb. 24B). Zudem zeigt die Abbildung exemplarisch, dass die Liganden auch innerhalb der Leishmanienpopulation unterschiedlich stark exprimiert werden. Während die Parasiten in den roten Kästchen kaum Fusionsproteine gebunden hatten, kennzeichnen die weißen Kästchen Leishmanien mit vergleichsweise vielen gebundenen Fusionsproteinen (Abb. 24A). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Hilfe der anderen, hier nicht gezeigten Fusionsproteine erzielt, vor allem dann, wenn der jeweilige Ligand grundsätzlich stark exprimiert wurde (nicht gezeigt). Um sicherzugehen, dass die Fusionsproteine nicht unspezifisch an die Pathogene binden, z.B. über den Fc-Teil des humanen IgGs, wurde eine Kontrollfärbung mit den hFc-Teilen auf gleiche Weise durchgeführt. Abbildung 24B zeigt, dass eine Bindung über die Immunglobuline an die Parasiten nicht stattfindet.

Um die Menge des an die Parasiten gebundenen C-Typ-Lektins Dectin-1 im Verhältnis zu anderen C-Typ-Lektinen genauer abschätzen zu können, wurde die Fluoreszenzintensität von gebundenem CLEC-9a, dessen Liganden stark exprimiert werden, mit der des Dectin-1 verglichen. Hierfür wurde die Software TissueQuest von TissueGnostics verwendet. Diese Darstellung der Daten bestätigte, dass deutlich mehr CLEC-9a als Dectin-1 an die Parasiten binden konnte (17 % im Vergleich zu 10,15 %) (Daten nicht gezeigt).

In den Säugetierwirten liegen die *Leishmania*-Parasiten normalerweise nicht in promastigoter, sondern in amastigoter Form vor. Aus diesem Grund haben wir auch Parasiten in diesem Entwicklungsstadium, die uns freundlicherweise von Dr. Ger van Zandbergen zur Verfügung gestellt wurden, mit den Fusionsproteinen inkubiert.

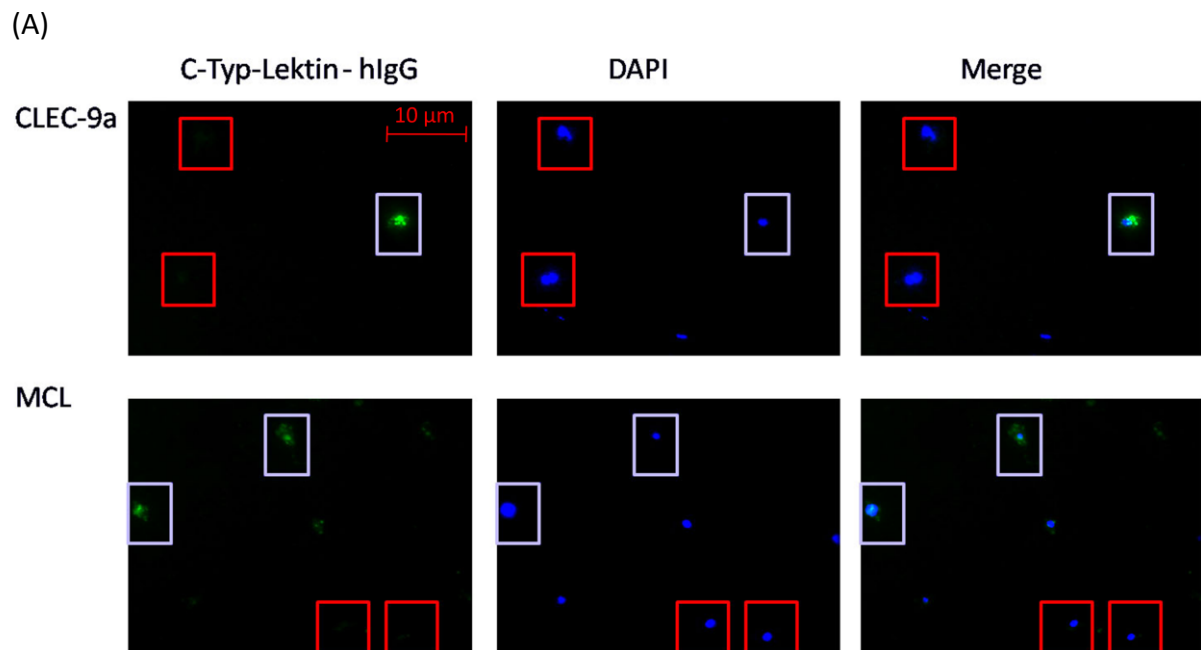


Abb. 25B sowie Legende: Siehe Seite 92.

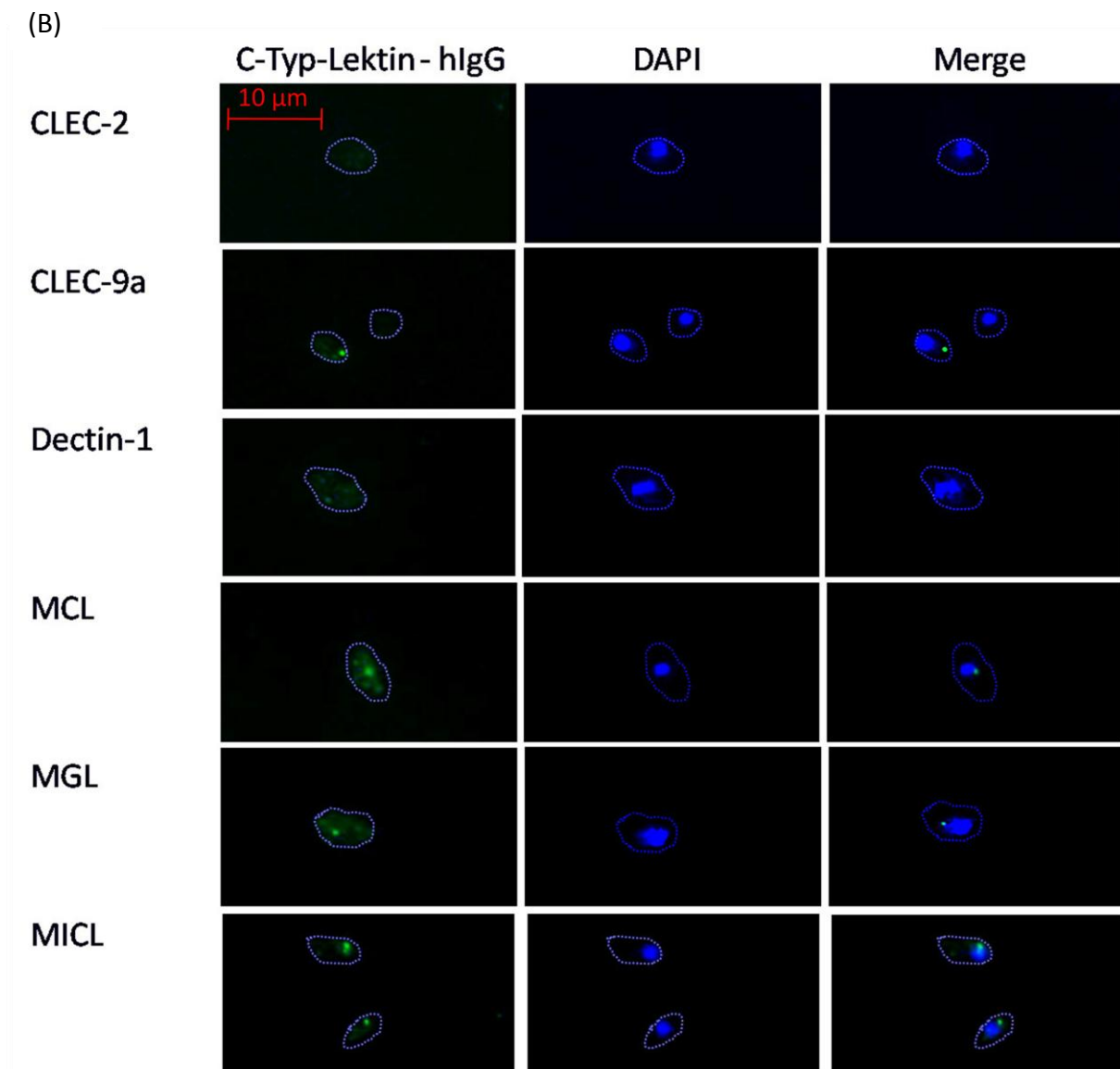


Abbildung 25: Expression von C-Typ-Lektin-Liganden auf amastigoten *L. major*.

C-Typ-Lektin – hIgG – Fusionsproteine wurden zur Analyse der Ligandenexpression auf amastigoten *L. major* verwendet. Bei den hier gezeigten Fusionsproteinen war humanes IgG an die C-Typ-Lektine CLEC-2, CLEC-9a, Dectin-1, MCL, MGL und MICL gekoppelt. Sie konnten mittels eines anti-hIgG-FITC – Antikörpers sichtbar gemacht werden, wenn sie an den Parasiten banden (grün). DNS wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). (A) Übersichtsaufnahme, die Parasiten zeigt, welche mit CLEC-9a - und MCL – Fusionsproteinen inkubiert wurden. Durch die roten Kästchen sind Leishmanien markiert, die wenige Fusionsproteine gebunden hatten, während die weißen Kästchen Parasiten kennzeichnen, die den jeweiligen Liganden stark exprimierten. (B) Einzelne Leishmanien sind vergrößert dargestellt. Die gestrichelte Linie verdeutlicht den Umriss der Parasiten. Die Belichtungszeit war bei allen aufgenommenen Bildern identisch. Die Vergrößerung betrug 630-fach.

Auch amastigote *L. major* exprimieren Liganden für C-Typ-Lektine. Vergleichbar mit der Expression auf promastigoten Parasiten unterscheidet sich auch auf den amastigoten *Leishmanien* die Expressionsstärke der verschiedenen Liganden, wie in Abbildung 25B erkennbar ist. Die amastigoten Parasiten zeigten ebenso wie die promastigoten eine starke Expression der Liganden für MCL und MGL. Dagegen war die Bindung von CLEC-9a und CLEC-2 im Vergleich zu den promastigoten *Leishmanien* verringert. Die C-Typ-Lektine MICL und Dectin-1 banden hingegen vermehrt an diese Form der Parasiten, verglichen mit Abb. 24B. Ebenso wie die promastigoten Parasiten unterschieden sich auch einzelne *Leishmanien* einer Population im amastigoten Stadium in der Expression der Liganden der C-Typ-Lektine, wie Abb. 25A exemplarisch anhand der Bindung der CLEC-9a- und MCL-Fusionsproteine zeigt. *Leishmania major* exprimieren auf ihrer Oberfläche Liganden für verschiedene C-Typ-Lektine. Wir konnten zeigen, dass diese Expression stark variiert, abhängig davon, um welchen Liganden es sich handelt. Außerdem konnten wir aus diesen Untersuchungen die wichtige Erkenntnis ziehen, dass die Bindungspartner von Dectin-1 sowohl auf promastigoten als auch auf amastigoten Parasiten eher schwach bis mittelmäßig stark exprimiert werden. Dagegen können andere C-Typ-Lektine, wie beispielsweise MCL, zahlreich an die *Leishmanien* binden. Insgesamt konnten wir zeigen, dass die Menge der Liganden auf der Oberfläche der Pathogene auch davon abhängt, in welchem Entwicklungsstadium sich die Krankheitserreger befinden.

IV. Diskussion

In ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC) sind dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) für die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort gegen *Leishmania major* von großer Bedeutung (Ritter and Osterloh, 2007). Ebenso ist die aktivierende Wirkung von β -Glucan auf Leukozyten und deren Produktion inflammatorischer Zytokine bekannt (Brown et al., 2003). Darüber hinaus haben verschiedene Studien bereits die resistenzfördernde Wirkung von β -Glucanen gegen *Leishmania major* und *Leishmania donovani* nachgewiesen, wobei der genaue Mechanismus bisher unbekannt war (Goldman and Jaffe, 1991; Holbrook and Cook, 1983; Holbrook et al., 1981). Basierend auf diesen Daten war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle des β -Glucan – Rezeptors Dectin-1, ein C-Typ-Lektin, das u. a. auf DCs exprimiert ist, im Verlauf der experimentellen Leishmaniose zu untersuchen.

1. Die Infektion mit *L. major* steigert die Anzahl Dectin-1⁺ dendritischer Zellen am Ort der Infektion und im drainierenden Lymphknoten

Während in naiven Mäusen keine nennenswerte Anzahl an proliferierenden DCs nachgewiesen werden konnte, war 6 Tage nach der Infektion bereits ein Anstieg der Anzahl proliferierender Zellen erkennbar. Nach 20 Tagen konnte dessen signifikante Erhöhung gegenüber naiven Tieren gezeigt werden (Abb. 2). Im sog. *low-dose* Modell, bei dem etwa 10^2 Parasiten in den Wirt injiziert werden, und das am ehesten die natürlichen Bedingungen einer Leishmaniose widerspiegelt, wandern DCs erst etwa sechs Wochen p.i. am Ort der Infektion ein, um anschließend die adaptive Immunantwort zu aktivieren (Lira et al., 2000; Stebut, 2007). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *high-dose* Modell (3×10^6 Parasiten), setzte dieser Vorgang jedoch, wie in der Literatur beschrieben, deutlich früher ein, nämlich in unserem Fall etwa drei Wochen p.i. (Lira et al., 2000). Dabei war auffällig, dass ein

signifikant erhöhter Anteil der proliferierenden DCs im drainierenden Lymphknoten, speziell in BALB/c – Mäusen, am Infektionsherd nach 20 Tagen das C-Typ-Lektin Dectin-1 exprimierte (Abb. 2,3). Mehrere Studien haben bereits die Rolle dieses β -Glucan – Rezeptors bei der Immunantwort gegen verschiedene Pathogene, beispielsweise *Mykobakterium tuberculosis*, oder Pilzinfektionen untersucht (Taylor et al., 2006; Zenaro et al., 2009). Somit deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass der Rezeptor auch bei der Immunantwort gegen *L. major* von Bedeutung sein könnte.

Obwohl die Anzahl Dectin-1⁺ DCs anstieg, ergab die Messung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI), dass die Anzahl der Rezeptoren auf den Zellen nicht zunahm (Abb. 4). Studien mit humanen Zelllinien zeigten, dass die Dectin-1 – Expression nach Infektion mit *Mykobakterium tuberculosis* oder *Aspergillus fumigatus* induziert wird (Lee et al., 2009; Sun et al., 2012). Dass dies im murinen Modell der experimentellen Leishmaniose nicht der Fall ist, könnte damit begründet werden, dass *Leishmania major* auf der Oberfläche sehr wenige Liganden für Dectin-1 exprimieren, verglichen mit der Ligandenexpression anderer C-Typ-Lektine (Abb. 24, 25). Dies könnte als sog. „Escape“-Mechanismus der Parasiten angesehen werden, eine Strategie, um von den Immunzellen des Wirtes nicht entdeckt zu werden. Folglich würde die Dectin-1 – Expression nicht zusätzlich induziert werden. Die einwandernden Dectin-1⁺ DCs würden dann den bei Leishmanioseinfektion vorhandenen CD8 α ⁻ DCs bzw. dDCs entsprechen (Carter et al., 2006; Ng et al., 2008). Diese exprimieren Dectin-1, auch wenn keine Infektion im Organismus vorliegt. Durch die fehlende Expression von Dectin-1 – Liganden auf den Leishmanien werden die Dectin-1⁺ DCs nicht aktiviert, was sich jedoch ändert, verabreicht man β -Glucan in Kombination mit den Parasiten (Ghosh et al., 2013). Für diese Theorie spricht, dass auch *in vitro* durch Kokultivierung von BMDCs mit den Parasiten zwar der Anteil CD11c⁺ Dectin-1⁺ Zellen erhöht werden konnte, jedoch die Expressionsstärke auf den Zellen hier ebenfalls unverändert blieb und somit keine Induktion der Expression durch Leishmanien statt fand (Abb. 5,6).

Wir konnten zeigen, dass durch eine Infektion mit dem Parasiten *Leishmania major* die Proliferation von DCs in den drainierenden Lymphknoten und am Infektionsherd verstärkt wird. Die Tatsache, dass ein deutlicher Teil dieser proliferierenden Zellen das C-Typ-Lektin

Dectin-1 exprimiert, ließ uns vermuten, dass dieser β -Glucan – Rezeptor eine Rolle bei der Immunantwort gegen Leishmanien spielt.

2. Curdlan induziert die Reifung von DCs, wodurch die T-Zellproliferation jedoch nicht beeinflusst wird

Im Jahr 2007 zeigten LeibundGut-Landmann et. al. dass durch die Stimulation von murinen BMDCs mit Curdlan diese über den Dectin-1 – Signalweg zur Reifung angeregt werden. Außerdem wiesen sie nach, dass auf diese Weise aktivierte DCs vermehrt proinflammatorische Zytokine ausschütten, darunter IL-6 und die IL-12 – Untereinheit IL-12p40 (LeibundGut-Landmann et al., 2007). Agrawal et. al. veröffentlichten wenig später Daten von Studien mit humanen DCs, die sie aus Monozyten generiert hatten. Auch sie wiesen nach, dass die Stimulation der Zellen mit Curdlan zur Produktion von u. a. IL-6 und IL-12p70 führt (Agrawal et al., 2010). 2012 publizierten Soltani et. al. Studien, die darauf hindeuteten, dass eine Stimulation von DCs mit Curdlan weder zu deren Reifung beiträgt, noch die Ausschüttung von IL-6 oder IL-12 begünstigt. Sie verwendeten hierfür DCs aus Milzen von Mäusen, die sie in Kultur mit dem β -Glucan stimulierten (Soltani et al., 2012). Aus diesem Grund haben wir zunächst untersucht, welchen Einfluss die Stimulation von BMDCs aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen mit Curdlan auf deren Reifung hat.

Die verwendeten BMDCs reiften zehn Tagen in Kultur und exprimierten daher vermehrt Reifungsmarker wie CD86 oder MHC Klasse-II (Lutz et al., 1999). Aus diesem Grund haben wir zur Analyse den Anteil der CD11c⁺ Zellen herangezogen, welcher nach Inkubation mit Curdlan bzw. LPS CD86^{high} (= CD86⁺⁺⁺) exprimierte.

Es zeigte sich, dass die Stimulation der BMDCs aus BALB/c – sowie C57BL/6 – Mäusen mit Curdlan deren Reifung induzierte. Dies war vor allem anhand der gesteigerten CD86 – Expression erkennbar. Somit konnten wir die Daten von LeibundGut-Landmann et. al. bestätigen, die besagen, dass eine Reifung von *in vitro* generierten murinen BMDCs durch das β -Glucan Curdlan induziert werden kann (Daten nicht gezeigt).

Unveröffentlichten Daten zufolge (persönliche Kommunikation: Prof. Dr. Uwe Ritter) wird durch eine Infektion mit *Leishmania major* die Reifung von DCs unterdrückt. Dies hat zur Folge, dass die Wanderung der Zellen zum drainierenden Lymphknoten sowie die dortige Präsentation des Leishmanienantigens zur Aktivierung der T-Zellantwort inhibiert sind. Diesen Mechanismus kann der Parasit dazu nutzen, die Immunabwehr seines Wirtes zu schwächen. Da unsere Daten zeigten, dass Curdlan die Reifung von DCs induziert, stellte sich die Frage, ob die Maturierung der Zellen auch dann noch statt findet, wenn die DCs mit *Leishmania*-Parasiten infiziert sind. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden BMDCs über Nacht mit Parasiten kokultiviert. Die Parasiten waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert, so dass Zellen, die von den Protozoen infiziert waren, bei der durchflusszytometrischen Analyse CFSE⁺ erschienen. Auf diese Weise konnten sie von den nicht-infizierten Zellen unterschieden werden. Da das in den Versuchen verwendete Curdlan aus dem Bakterium *Alcaligenes faecalis* gewonnen wird, wurden in diesem und nachfolgenden Versuchen nur mit Curdlan stimulierte Zellen als Negativkontrolle verwendet, um eine LPS-Verunreinigung des β -Glucans ausschließen zu können. Wie erwartet stieg der Anteil der CD86^{high} – exprimierenden CFSE⁺ BMDCs weder in BALB/c – noch in C57BL/6 – Tieren an, wenn die Zellen infiziert waren. Damit bestätigten wir zunächst die unveröffentlichten Daten und zeigten, dass durch die Aufnahme lebender Parasiten die Reifung der Zellen unterdrückt wird. Wenn die DCs jedoch zusätzlich mit Curdlan behandelt wurden, konnte trotz der Infektion mit den Leishmanien eine signifikante Steigerung des Anteils der reifen BMDCs erreicht werden. Der Anteil der MHC Klasse-II – exprimierenden Zellen wurde durch Curdlan nicht weiter erhöht. Ein möglicher Grund hierfür könnte die bereits relativ hohe MHC Klasse-II - Expression auf unstimulierten Zellen sein, die sich auch durch Curdlan nicht weiter steigern ließ (Abb. 7). Diese Ergebnisse konnten auch dann bestätigt werden, wenn anstelle von lebenden *Leishmania major* das lösliche Antigen dieses Parasitenstammes zur Stimulation verwendet wurde. Der Anteil der reifen BMDCs war, anders als bei Infektion mit lebenden Parasiten, jedoch auch dann erhöht, wenn die Zellen mit SLA alleine stimuliert wurden (Abb. 8).

Da *in vivo* die mit lebenden Leishmanien infizierten DCs nicht reifen können, muss die T-zellvermittelte Immunantwort demzufolge von den DCs eingeleitet werden, die lediglich Leishmanienantigen aufgenommen haben. Wir konnten zeigen, dass der Anteil der Zellen,

die nach Aufnahme des Antigens reifen, durch die Zugabe von Curdlan weiter erhöht wird und die adaptive Immunantwort so möglicherweise effektiver ablaufen kann. Neben einer signifikanten Erhöhung des CD86^{high} – Anteils des BMDCs konnte so auch die tendenzielle Induktion der MHC Klasse-II – Expression gezeigt werden.

Die Daten liefern einen Hinweis darauf, dass Curdlan im Krankheitsverlauf der Leishmaniose eine Wirkung besitzt, welche die Immunantwort des Wirtes gegenüber den Parasiten unterstützt. Durch die curdlaninduzierte Reifung von mit Leishmanien infizierten Zellen wird einer der möglichen Mechanismen der Parasiten, die ihn vor der Immunreaktion des Wirtes schützen sollen, außer Kraft gesetzt. Die Aktivierung einer T-zellvermittelten Immunreaktion gegen die Leishmanien ist so zumindest theoretisch möglich, da die reifen DCs in den Lymphknoten Leishmanienantigen präsentieren können. Zudem können sie durch die erhöhte CD86 – Expression den T-Zellen vermehrt kostimulatorische Signale über das auf den T-Zellen exprimierte CD28 vermitteln. Dadurch könnte eine protektive zelluläre Immunreaktion durch die zusätzliche Applikation von Curdlan induziert werden.

Um dies beweisen zu können haben wir BMDCs entweder mit promastigoten oder amastigoten *Leishmania major*, bzw. deren Antigen jeweils mit und ohne Curdlan über Nacht inkubiert. Dann wurden die auf diese Weise vorbehandelten Zellen zu aufgereinigten T-Zellen gegeben. Diese T-Zellen wurden aus den Lymphknoten von Mäusen isoliert, die 10 Tage mit *Leishmania*-Parasiten infiziert waren. Nach drei Tagen analysierten wir die Proliferation der T-Zellen, welche zu diesem Zweck mit CFSE markiert waren. Bei CFSE handelt es sich um einen Farbstoff, der in seiner Ursprungsform membrangängig ist. In der Zelle spalten Esterasen den Farbstoff, der dadurch seine Membrangängigkeit verliert und zu fluoreszieren beginnt. Bei Zellteilung verteilt er sich gleichmäßig auf die Tochterzellen, wodurch die Fluoreszenz abnimmt (Parish, 1999). Auf diese Weise lassen sich proliferierende Zellen durchflusszytometrisch identifizieren. Wir konnten mit Hilfe dieser Methode jedoch in keiner der verwendeten Mauslinien eine erhöhte Proliferation weder der CD4⁺ T-Zellen, noch der CD8⁺ T-Zellen, nachweisen, wenn die BMDCs mit Parasiten und Curdlan stimuliert waren. Es waren zwar auch BMDCs, die mit lebenden Parasiten inkubiert wurden, in der Lage T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Dies lässt sich jedoch vermutlich darauf zurückführen, dass auch in der Leishmanienkultur Fragmente toter Parasiten vorhanden sind, bzw. durch die Aufreinigung entstehen. Diese Fragmente werden von den BMDCs aufgenommen, so

dass diese Zellen dann maturieren und die T-zellvermittelte Immunantwort anregen (Abb. 9, 10).

Da wir die Vermutung, dass die durch Curdlan induzierte Reifung von DCs zu erhöhter T-Zellproliferation führt, nicht bestätigen konnten, wurden weitere mögliche Effekte des β -Glucans auf die Immunantwort des Wirtes gegen die Parasiten untersucht. Erste Entdeckungen, dass die adaptive Immunantwort über die Bindung von β -Glucan an Dectin-1 in Richtung einer Th1-vermittelten Reaktion moduliert wird, wurden in der Krebsforschung gemacht. Sie zeigten, dass sich das Zytokinprofil der Lymphozyten von Mäusen mit Mammatumoren von überwiegend IL-4 produzierend zu IFN- γ sezernierend verschob, wenn den Tieren anti-Tumorantikörper in Verbindung mit β -Glucan verabreicht wurde (Baran et al., 2007). Später wurden diese Befunde untermauert, indem gezeigt wurde, dass diese Modulation durch β -Glucan auch bei Pilzinfektionen oder Infektionen mit *Mykobakterium tuberculosis* möglich ist.

Obwohl wir keine erhöhte Proliferationsrate der T-Zellen nachweisen konnten, die mit BMDCs kokultiviert wurden, deren Reifung curdlaninduziert in Anwesenheit von Leishmanien statt fand, war es uns möglich deutlich mehr IFN- γ in den Überständen dieser T-Zellen nachzuweisen (Abb. 11). Die Applikation von Curdlan würde demzufolge zwar nicht zu einer Erhöhung der Anzahl an T-Zellen beitragen, jedoch scheint es die Entstehung einer protektiven T-Zellantwort in der Form zu unterstützen, indem es die Differenzierung vorhandener T-Zellen in Richtung Th1-Zelle fördert. Dies ließ uns vermuten, dass DCs, die mit Leishmanien und Curdlan stimuliert wurden, die Entwicklung von T-Zellen in Richtung Th1-Zellen forcieren können, indem sie IFN- γ sezernieren (Stober et al., 2001; Zhu and Paul, 2010). Demnach scheint eine Verschiebung der T-zellvermittelten Immunantwort von Th2- in Richtung Th1-vermittelt auch im Verlauf einer Leishmanioseinfektion möglich zu sein.

3. Curdlan führt in BALB/c – Mäusen zu einer Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung der Th1-vermittelten Immunantwort im experimentellen Modell der Leishmaniose

Leishmania major sind obligat intrazelluläre Parasiten. Damit eine protektive Immunantwort gegen sie aktiviert wird, muss, ebenso wie zur Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses gegen die Erreger, die zelluläre Immunantwort Th1-vermittelt ablaufen (Locksley et al., 1987). Aus diesem Grund sind besonders Substanzen, die zur Verschiebung des Th1/Th2-Zytokinprofils zu Gunsten der Th1-Antwort führen, immer wieder im Fokus der Untersuchungen, die zur Entwicklung einer Vakzinierung gegen Leishmaniose führen sollen (für weitere Informationen siehe: Singh and Sundar, 2012).

Der Hinweis aus *in vitro*-Untersuchungen, dass die Stimulation von DCs mit Parasiten und Curdlan zur Entstehung einer Th1-zellvermittelten und somit protektiven Immunantwort in BALB/c – Mäusen führt, wurde *in vivo* überprüft (Abb. 12). Dabei zeigte sich zunächst, dass Curdlan alleine weder eine Schwellung des Fußes nach Injektion hervor rief, noch wurde eine Resistenz gegen eine spätere Leishmanieninfektion vermittelt. Die curdlaninduzierte Reifung der DCs alleine hat somit keinen Effekt auf die Immunreaktion des Wirtes. Des Weiteren zeigte sich, dass die Injektion von Parasiten und Curdlan in resistente C57BL/6 – Tiere ebenfalls keine Wirkung auf den Krankheitsverlauf der Leishmaniose hatte. Der Krankheitsverlauf suszeptibler BALB/c – Mäuse konnte dagegen, wie bereits angedeutet, durch die Kombination von Parasiten und Curdlan massiv beeinflusst werden. Während suszeptible BALB/c - Mäuse normalerweise nach etwa vier bis sechs Wochen p.i. auf Grund fortschreitender Nekrotisierung des infizierten Gewebes aus dem Versuch genommen werden mussten (vgl. Abb. 13), entwickelten BALB/c – Mäuse, denen Leishmanien und Curdlan gespritzt wurde, keine Gewebnekrose, und die während der ersten Wochen nach Infektion auftretende Schwellung der Pfoten heilte im Verlauf der darauf folgenden Wochen vollständig ab. Dies deutet darauf hin, dass Curdlan die Immunantwort in BALB/c – Mäusen in einer Form modifiziert, wie sie in den genetisch resistenten C57BL/6 – Tieren bereits abläuft. Ebenso verlief die Reinfektion von genetisch resistenten C57BL/6 – Tieren, deren Primärinfektion mit Parasiten und Curdlan erfolgte, vergleichbar mit der der Kontrolltiere, die nur mit *L. major* infiziert waren (Abb. 14). Auch dies zeigt, dass die Immunreaktion der

C57BL/6 Tiere nicht durch Injektion von Curdlan beeinflussbar ist. Die BALB/c – Mäuse, die durch die Curdlanapplikation eine Resistenz gegenüber *Leishmania major* erworben hatten, konnten eine Reinfektion ebenfalls bekämpfen, so dass die Pfotenschwellung sogar weit weniger ausgeprägt war als bei den Kontrolltieren der Linie C57BL/6. Auch hier ging die Schwellung nach einigen Wochen schließlich komplett zurück. Einen deutlichen Hinweis darauf, dass diese Resistenz von Typ-1 T-Helferzellen vermittelt wird, erhielten wir, indem wir den resistenten BALB/c – Mäusen Leishmanienantigen kontralateral injizierten und somit eine DTH-Reaktion auslösten (Abb. 17) (Gell, 1967; Titus et al., 1984). Bei einer Th1-vermittelte Immunantwort entstehen T-Gedächtniszellen. Durch den erneuten Kontakt mit dem Antigen werden diese Gedächtniszellen aktiviert, was zur Produktion Th1-spezifischer Zytokine führt, wodurch es anschließend zu einer Entzündungsreaktion kommt. Diese führt innerhalb von 48 h bis 72 h zu einer Schwellung des Gewebes, welche als Indikator für die DTH-Reaktion dient.

Es ist bekannt, dass BALB/c – Mäuse nach *low-dose* Infektion mit *L. major* eine Th1-vermittelte Immunantwort und damit verbunden eine Resistenz gegen die Parasiten entwickeln (Yamakami et al., 2002). Da Curdlan in Wasser nicht vollständig löslich ist und deshalb die Möglichkeit bestand, dass, bedingt durch z.B. Rückstände in der Kanüle, weniger Leishmanien injiziert wurden, wenn Curdlan in der Leishmaniensuspension gelöst war, haben wir 3 Tage nach Infektion die Anzahl der Parasiten in den Füßen der Tiere gemessen (Abb. 18). Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil nach 3 Tagen noch keine adaptive Immunantwort, die möglicherweise durch die Gabe von Curdlan modifiziert wird, gegen die Parasiten stattgefunden hat. Da die Anzahl der Leishmanien in den Füßen der Mäuse, die zusätzlich Curdlan erhalten hatten, vergleichbar mit der in den Füßen von Kontrolltieren war, und auch andere Faktoren des Curdlans auf Wachstum und Virulenz der Parasiten überprüft und ausgeschlossen werden konnten, deuteten auch die bisher *in vivo* erhaltenen Befunde darauf hin, dass durch die Verabreichung von Curdlan die Immunantwort susceptibler BALB/c – Mäuse so manipuliert werden kann, dass die Tiere eine Resistenz gegenüber *Leishmania*-Parasiten entwickelten.

Um abschätzen zu können, wie lange es nach Injektion des Curdlans dauert, bis sich in den BALB/c – Mäusen eine protektive Immunantwort entwickelt, wurde die Anzahl der Parasiten in den Pfoten der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt (Abb. 19).

Dabei zeigte sich, dass 2 Wochen nach der Infektion zunächst die Menge der Leishmanien in den Füßen von Mäusen, die auch Curdlan verabreicht bekamen, signifikant höher ist als in den BALB/c - Kontrolltieren. Dieser Effekt konnte in den auf die gleiche Weise behandelten C57BL/6 – Tieren nicht nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass 14 Tage nach Infektion durch Curdlan noch keine protektive Immunantwort in den BALB/c – Mäusen induziert worden war. Die Erhöhung der Parasitenlast könnte dadurch zu erklären sein, dass durch die Anwesenheit des β -Glucans zunächst die Aufnahme der Parasiten von den Makrophagen, welche ebenfalls den Endozytoserezeptor Dectin-1 sowie den β -Glucanrezeptor Komplementrezeptor 3 (*complement receptor 3*, CR3) exprimieren, begünstigt ist. Die Parasiten könnten sich anschließend in den Phagosomen der Makrophagen vermehren (Kautz-Neu et al., 2012). Durch eine erhöhte Aufnahmerate der Phagozyten wäre somit auch eine größere Menge an Parasiten am Infektionsort zu erklären. An Tag 40 ist in den BALB/c – Mäusen beider Gruppen die gleiche Menge an Parasiten detektierbar. Da jedoch mit durchschnittlich 10^9 Parasiten pro Pfote die Menge der Leishmanien in den Füßen der Mäuse deutlich über der in C57BL/6 – Tieren liegt (10^7 pro Pfote), kann davon ausgegangen werden, dass auch zu diesem Zeitpunkt die protektive Immunantwort noch nicht vollständig ausgebildet ist. Allerdings sprechen sowohl die Angleichung der Parasitenlasten beider Gruppen, als auch der Zustand der Pfoten zu diesem Zeitpunkt dafür, dass die Bekämpfung der Krankheitserreger bereits eingesetzt hat. Während nämlich BALB/c – Mäuse, die nur mit Leishmanien infiziert wurden, zu diesem Zeitpunkt bereits Läsionen aufwiesen und deshalb aus dem Experiment genommen werden mussten, waren die Pfoten der meisten BALB/c – Mäuse, die zusätzlich bei Infektion Curdlan erhielten, zwar deutlich geschwollen, allerdings waren keine Nekrosen erkennbar (vgl. Abb. 13). Wie auch Abbildung 12 zeigt, setzt nach diesem Zeitpunkt die protektive Immunantwort in den curdlanbehandelten BALB/c – Mäusen ein. Nachdem die Pfortenschwellung vollständig abgeklungen war, wurde die Parasitendichte in den Füßen der BALB/c –, sowie der C57BL/6 – Mäuse, bestimmt. Es konnten zwar in allen Tieren noch Leishmanien nachgewiesen werden, allerdings war die Anzahl der Parasiten in den BALB/c – Mäusen nun genau so hoch wie in den genetisch resistenten C57BL/6 – Tieren (Abb. 17). Dies deutet darauf hin, dass sich in den ursprünglich suszeptiblen Mäusen durch die Verabreichung von Curdlan bei Infektion mit *Leishmania major* eine protektive Immunantwort entwickelt hat. Auch die

Persistenz der Leishmanien nach Abheilen einer Infektion ist bekannt und trägt zur Entstehung einer T-Zell - Gedächtnisantwort bei (Moll et al., 1995).

Bisher sprach vieles dafür, dass durch die gleichzeitige Injektion von Curdlan und Leishmanien in susceptible BALB/c – Mäuse eine protektive adaptive Th1-vermittelte Immunantwort generiert wird. Die Bestimmung der Mengen der typischen Th1- bzw. Th2-assoziierten Zytokine IFN- γ und IL-4 mit Hilfe eines ELISAs in den Überständen restimulierter Lymphknotenzellen von Mäusen, die 14 Tage (Daten nicht gezeigt) bzw. 28 Tage lang (Abb. 19) mit Leishmaniose infiziert waren, brachte diesbezüglich jedoch keine Bestätigung, was auch der Messung der IFN- γ Menge in den Überständen der mit BMDCs kokultivierten T-Zellen widerspricht (Abb. 11). Die Menge der entsprechenden Zytokine war in jeweils beiden Gruppen gleich. Dem entsprechend zeigte auch die FACS-basierte Analyse des Anteils der IL-4 – bzw. IFN- γ – produzierenden CD4⁺ T-Zellen keine Unterschiede.

Um tatsächlich eine Aussage über eine Verschiebung der Th1/Th2 – Balance in Richtung Th1 treffen zu können, musste also die Produktion weiterer Zytokine nach Curdlanbehandlung untersucht werden. In Studien mit humanen Zellen wurde der Einfluss von Curdlan auf das Zytokinprofil bereits mehrfach untersucht. So verwendete eine Arbeitsgruppe das Modell der sog. *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR), bei der unstimulierte oder mit Curdlan behandelte DCs mit allogenen CD4⁺ T-Zellen kokultiviert wurden (Ahmann et al., 1979; Puré et al., 1988). Während Curdlan weder einen Effekt auf die IFN- γ –, noch auf die IL-5 - Produktion der in diesen Studien verwendeten humanen Zellen hatte, sezernierten sie nach Curdlanstimulation deutlich mehr IL-17 (Higashi et al., 2010). Auch Agrawal et. al. bestätigten dies weitgehend in Studien mit humanen DCs, die sie aus Monozyten generierten. Sie zeigten die verstärkte Sezernierung Th-17 – assoziierter Zytokine, jedoch weisen sie in diesem Modell auch die signifikante Erhöhung der IFN- γ und IL12-p70 Produktion nach (Agrawal et al., 2010). Die Rolle von Curdlan im murinen Modell der viszeralen Leishmaniose untersuchten 2013 Ghosh et. al., wobei in dieser Studie Makrophagen im Fokus standen. Nachdem den Mäusen 10 bis 20 Tage nach Infektion Curdlan intraperitoneal (i.p.) verabreicht wurde, folgte die Analyse der Zytokinprofile der Zellen. Ghosh et. al. stellten die erhöhte Expression Th1-spezifischer (IL-12, TNF- α und IFN- γ), Th17-induzierender (IL-1 β , IL-6) sowie Th17-spezifischer (IL17, IL23) Zytokine, sowie eine verringerte Ausschüttung des Th2-spezifischen Zytokins IL-10, fest (Ghosh et al., 2013).

Das Zytokinprofil in Überständen von mit SLA restimulierten Zellen von BALB/c – Mäusen, die nach 28 Tagen Leishmanieninfektion in Kombination mit Curdlan aus den Lymphknoten isoliert worden waren, wurde mit Hilfe des BD™ CBA - Systems bestimmt. Es zeigte sich, dass diese Zellen mehr IL-1 α und IFN- γ sezernierten, wenn die Mäuse zusätzlich Curdlan erhalten hatten. Zum Vergleich untersuchten wir auch die Zytokinkonzentration in den Überständen von T-Zellen aus den Lymphknoten infizierter BALB/c - Mäuse, die 3 Tage lang mit unterschiedlich stimulierten BMDCs kokultiviert wurden. Auch die Behandlung der BMDCs mit Curdlan führte zu einer erhöhten Konzentration Th1-spezifischer Zytokine in den Überständen der T-Zellen, mit denen die BMDCs kokultiviert waren. Dagegen blieb die Konzentration der typischen Th2-Zytokine IL-4, IL-5 IL-10 und IL-13 in den Überständen beider Experimente weitgehend gleich oder erhöhte sich nur geringfügig. Unsere Ergebnisse, die wir unter Verwendung des murinen Modells der Leishmaniose erhalten haben, stimmen somit mit den, ebenfalls im murinen Leishmaniosemodell erhaltenen Befunden von Ghosh et. al. weitgehend überein, die auch eine gesteigerte Produktion von Th1-Zytokinen nach Applikation von Curdlan nachweisen konnten (vgl. Tabelle 1). Eine Ausnahme bildet IL-12. Während Ghosh et. al. eine vermehrte Expression dieses Zytokins nachweisen konnten, lag es bei unseren Analysen stets unterhalb der Nachweisgrenze. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied kann darin zu finden sein, dass Ghosh et. al. die Zytokinsezernierung von Makrophagen analysierten, während wir die Zytokinausschüttung von DCs untersuchten. Dazu zeigten Soltani et. al., dass IL-12 durch Stimulation von DCs aus der Milz von Mäusen mittels Curdlan nicht induziert wird. Dazu ist eine weitere Involvierung von TLRs (hauptsächlich TLR4 durch LPS) notwendig (Soltani et al., 2012).

Zusammengenommen deuten diese Studien und unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Ausschüttung Th1- und Th2-spezifischer Zytokine im murinen Modell der Leishmaniose in infizierten BALB/c – Mäusen durch die zeitgleiche Injektion von Leishmanien und Curdlan in Richtung einer Th1-vermittelten, protektiven Immunantwort verschoben wird. Infiziert man BALB/c – Mäuse in Kombination mit Curdlan, können sie diese Primärinfektion ebenso wie eine darauf folgende Reinfektion bekämpfen. Nach Injektion von Leishmanienantigenen entwickeln diese Mäuse eine DTH-Reaktion und durch die Messung der Th1-spezifischen Zytokine konnten wir deren erhöhte Ausschüttung nachweisen. Aus diesem Grund konnten wir auch in den Seren von BALB/c – Mäusen, die in Anwesenheit von Curdlan mit

Leishmaniose infiziert wurden, einen signifikant erhöhten Level an IgG2a messen. Die IgG2a-Produktion wird durch das Th1-Zytokin IFN- γ induziert und wird somit als Marker für eine Th1-vermittelte Immunreaktion gesehen (Snapper and Paul, 1987). Auch der Level der IgG1-Immunglobuline, das Merkmal einer Th2-vermittelten Immunreaktion, ist in den BALB/c – Mäusen, die Curdlan während der Leishmanieninfektion erhalten hatten, gegenüber naiven oder ohne Curdlan infizierten Tieren signifikant erhöht. Wie aber aus Tabelle 10 hervorgeht, wird die Produktion von IL-4, das zur IgG1-Produktion wichtig ist, durch Curdlan nicht erhöht. Die gesteigerte IgG1-Produktion durch Curdlan könnte jedoch durch eine Steigerung anderer Zytokine bedingt sein, welche ihrerseits in der Lage sind, die Wirkung des IL-4 zu verstärken. Beispielsweise ist bekannt, dass IL-9, dessen Menge im Rahmen unserer Untersuchungen nicht bestimmt wurde, die durch IL-4 induzierte IgG1-Produktion verstärken kann (Petit-Frere et al., 1993).

Vieles spricht für dafür, dass die simultane Injektion von *Leishmania major* und Curdlan das Zytokinprofil von BALB/c – Mäusen, die normalerweise genetisch bedingt eine nicht-protektive Th2-vermittelte Immunreaktion gegen Leishmanien entwickeln, so verschoben wird, dass die Tiere eine adaptive Th1-ähnliche Immunantwort zeigen. Neben der vermehrten Produktion von IgG2a konnten wir die Erhöhung der Ausschüttung Th1-spezifischer Zytokine nachweisen. Der stärkste Hinweis jedoch ist die Ausbildung einer Resistenz gegenüber den Parasiten sowie eine positive DTH-Reaktion nach Antigeninjektion resistenter BALB/c – Mäuse. Nachfolgend soll geklärt werden, ob es sich bei Dectin-1 um den Rezeptor handelt, der die durch Curdlan induzierten Effekte vermittelt.

4. Das C-Typ-Lektin Dectin-1 spielt eine Rolle bei der Übermittlung der durch Curdlan induzierten Effekte

Curdlan gilt als ein β -Glucan, das spezifisch an das C-Typ-Lektin Dectin-1 bindet. Dennoch sollte durch die Verwendung gentechnisch veränderter Mäuse sichergestellt werden, dass die beobachteten Effekte tatsächlich von der Bindung des Curdlans an Dectin-1 abhängen. Dectin-1^{-/-} - Mäuse zeichnen sich, wie der Name sagt, dadurch aus, dass sie auf den Zellen kein Dectin-1 exprimieren. Dies wurde durch das Einbringen einer mutierten Dectin-1 – Gensequenz mit Hilfe eines Vektors erreicht (Taylor et al., 2006). Der Genotyp der in den Versuchen verwendeten Tiere wurde mittels PCR regelmäßig überprüft (Abb. 23). Ergab die Überprüfung kein eindeutiges Ergebnis, wurden die entsprechenden Tiere weder für Versuche noch für die Zucht verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Dectin-1^{-/-} - Mäuse verwendet, die den genetischen Hintergrund von BALB/c – Mäusen besaßen. Dies war wichtig, da diese Tiere, ebenso wie BALB/c – Wildtypen, genetisch bestimmt eine Th2-vermittelte Immunantwort entwickeln und somit grundsätzlich suszeptibel auf eine Leishmanieninfektion reagieren. Indem wir Dectin-1^{-/-} - Mäuse mit *Leishmania major* mit bzw. ohne Curdlan infizierten, konnten wir beweisen, dass die Resistenz, die durch Curdlan induziert wird, von der Expression des Dectin-1 abhängt. Während die Dectin-1^{-/-} - Mäuse, die mit Leishmanien, aber ohne Curdlan infiziert wurden, sechs Wochen nach der Infektion wegen nekrotisierender Gewebe an den Füßen getötet werden mussten, wiesen die Füße der Dectin-1^{-/-} - Mäuse, die zusätzlich Curdlan erhalten hatten, bereits nach fünf Wochen Nekrosen am Ort der Infektion auf, so dass sie aus dem Versuch genommen wurden. Zusätzlich war auffällig, dass die Fußdickenschwellung in den Dectin-1^{-/-} - Mäusen, die auch Curdlan erhalten hatten, deutlich schneller voranschritt und die Füße der Tiere bei Beendigung des Versuches offensichtlich mehr angeschwollen waren als ohne Curdlan (Abb. 24). Dies deutet darauf hin, dass Curdlan in diesen Mäusen einen Effekt verursacht, der in Wildtyp-BALB/c durch Dectin-1 überlagert oder inhibiert wird. Es ist bekannt, dass die Bindung eines Liganden an den CR3, ein weiterer Rezeptor für β -Glucan, zur Inhibierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 oder IFN- γ führt. Ebenso wird dadurch die Produktion antimikrobieller Moleküle verhindert (Carter et al., 2009; Marth and Kelsall, 1997). Da Dectin-1 im Vergleich zum CR3 eine höhere Affinität zu β -Glucanen besitzt (Rice et al., 2004) ist es denkbar, dass dieser inhibierende Effekt in

Wildtyp-Mäusen durch die Aktivierung des Dectin-1 – Signalweges verhindert wird. Fehlt die durch Curdlan über Dectin-1 induzierte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine, würde möglicherweise auch die wenig affine Bindung des β -Glucans an CR3 ausreichen, um das Th1/Th2-Gleichgewicht in Richtung Th2-Immunantwort zu verschieben. Außerdem steht durch die fehlende Expression von Dectin-1 mehr freies Curdlan zur Verfügung, das an CR3 binden kann, was diesen Effekt zusätzlich verstärken dürfte. Um dies zu untersuchen, wäre eine Blockade des CR3 mittels eines Antikörpers bzw. eines spezifischen Antagonisten denkbar (Hajishengallis et al., 2007), bevor eine Infektion in Anwesenheit von Curdlan erfolgt.

5. Curdlan in Verbindung mit Leishmanienantigen führt zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf nach Infektion

DCs spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Regulation der Funktionen des Immunsystems. Es wurden bereits mehrere Studien veröffentlicht, in denen man Antigen an einen Liganden konjugierte, um so spezifisch einen Endozytoserezeptor auf den APCs zu aktivieren. Auf diese Weise sollte die Immunantwort gegen das Antigen moduliert werden, da es so leichter und effektiver prozessiert und präsentiert wird. Beispielsweise koppelte man das Modellantigen *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) an einen Antikörper, der das C-Typ-Lektin DC-SIGN erkannte. Auf diese Weise konnte eine antigenspezifische T-Zellantwort hervorgerufen werden (Tacken et al., 2005). Auch wurde bereits gezeigt, dass es möglich ist, über Dectin-1 die Immunantwort gegen ein Antigen zu verstärken. Beispielsweise wurde das Modellantigen OVA an den Dectin-1 – Liganden Laminarin gekoppelt. Nach Aufnahme des Antigens in die Zellen riefen diese eine verstärkte OVA-spezifische CD4⁺ - T-Zellantwort hervor (Xie et al., 2010). Es macht Sinn, zur Adressierung der Endozytoserezeptoren nach Möglichkeit spezifische Moleküle wie

Laminarin oder auch Curdlan zu wählen, da sie, im Gegensatz zu Antikörpern, sowohl einfach als auch günstig herzustellen sind.

Auch die Wirkung von Curdlan als Adjuvant wurde von LeibundGut-Landman in mehreren Studien bereits nachgewiesen. So konnten sie zeigen, dass OT-II – Mäuse, die mit Ovalbumin (OVA) in Kombination mit Curdlan immunisiert wurden, nach Restimulation der Zellen aus dem Lymphknoten mit dem Antigen sowohl deutlich mehr IFN- γ als auch IL-17 ausschütteten, als Lymphknotenzellen von Mäusen, die nur OVA erhalten hatten (LeibundGut-Landmann et al., 2007). Darauf aufbauend veröffentlichten sie eine Studie, in der sie C57BL/6 - Mäuse mit OVA in Kombination mit Curdlan immunisierten. Wurden den Tieren dann B16-Melanomzellen injiziert, die OVA auf der Oberfläche exprimierten, entwickelte sich in diesen Mäusen kein Tumor (LeibundGut-Landmann et al., 2008). Auch die Injektion von Leishmanienantigenen und Curdlan führte in BALB/c – Mäusen zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf nach einer anschließenden Infektion mit lebenden Parasiten. Dies spricht dafür, dass Curdlan auch bei der Immunisierung mit SLA als Adjuvant wirken kann, da es an den Mustererkennungsrezeptor Dectin-1 bindet und so die Anwesenheit der Pathogene imitiert, was zur Verstärkung der adaptiven protektiven Immunantwort führt (LeibundGut-Landmann et al., 2008) (Abb. 23). Da die Tiere die Infektion zwar deutlich länger in Schach halten und somit signifikant länger überleben konnten, jedoch sich kein vollständiger Immunschutz gegen die Infektion entwickelt hatte, ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung der BMDCs durch die Injektion von nicht miteinander konjugiertem, sondern separatem SLA und Curdlan nicht ausreichte, um eine T-Zellantwort zu provozieren, die stark genug zur letztendlich erfolgreichen Bekämpfung der Parasiten war. Dennoch liefert dieses Ergebnis einen guten Hinweis darauf, dass eine DC-vermittelte Vakzinierung gegen Leishmaniose über das C-Typ-Lektin Dectin-1 prinzipiell möglich ist.

6. *Leishmania major* unterscheiden sich anhand der Expression von C-Typ-Lektin – Liganden

Es wurde lange Zeit angenommen, dass sich Parasiten der Gattung *Leishmania* hauptsächlich klonal vermehren (Rougeron et al., 2009; Tibayrenc and Ayala). Allerdings gab es in letzter Zeit gehäuft Hinweise darauf, dass diese Art der Reproduktion nicht so häufig vorkommt, wie ursprünglich vermutet (Akopyants et al., 2009). Zwar weisen sie ein hohes Maß an Homozygotie auf, allerdings kann neueren Erkenntnissen zufolge diese Homozygotie auch eine Folge von Inzucht unter den Parasiten sein. Außerdem existiert ein gewisser Anteil heterozygoter Parasiten in jeder Population, eine Tatsache, die ebenfalls gegen die rein klonale Vermehrung der Parasiten spricht. Untersuchungen zeigen nun, dass es wahrscheinlich ist, dass in einer Leishmanienpopulation sowohl Klonalität, als auch Sexualität auftritt, diese ist allerdings endogamer Natur. Dabei scheint die sexuelle Phase der Parasiten ausschließlich im Vektor, der Sandfliege, vorzukommen, wenn die Parasiten in promastigoter Form vorliegen (Akopyants et al., 2009; Rougeron et al., 2009, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Expression von C-Typ-Lektin – Liganden auf *Leishmania major* untersucht. Auch unsere Ergebnisse passen in das Bild, das davon ausgeht, dass Leishmanien sich nicht ausschließlich klonal vermehren. Indem wir die Ligandenexpression verschiedener C-Typ-Lektine auf promastigoten und amastigoten Parasiten nachweisen konnten, zeigten wir außerdem, dass die Expressionsstärke der Liganden für ein C-Typ-Lektin innerhalb einer Leishmanienpopulation unterschiedlich stark ist. Dies war für alle getesteten Liganden der Fall und traf außerdem für promastigote und amastigote Leishmanien zu. Auffällig war außerdem, dass sowohl promastigote als auch amastigote Leishmanien vergleichsweise wenige Liganden für Dectin-1 exprimierten (Abb. 24, 25). Wie bereits unter IV. 1. erwähnt könnte es sich dabei um einen sog. *Escape Mechanismus* handeln. Durch diesen ist es den Parasiten möglich, von den Dectin-1 – exprimierenden Immunzellen weitgehend unentdeckt zu bleiben, so dass die Zellen durch die Anwesenheit der Leishmanien nicht aktiviert werden und somit die protektive Immunreaktion nicht eingeleitet wird.

7. Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass es auch im murinen experimentellen Modell der Leishmaniose möglich ist, über die Aktivierung des C-Typ-Lektins Dectin-1 die Immunantwort in einer Form zu manipulieren, dass auch genetisch susceptible BALB/c - Mäuse eine protektive Immunantwort generieren können. Allerdings konnte dieser Effekt bisher nur dann beobachtet werden, wenn der Dectin-1 Ligand, Curdlan, gleichzeitig mit den lebenden Parasiten injiziert wurde. Ziel der Forschungen sollte jedoch sein, eine effektive DC-basierte Vakzinierung zu entwickeln, die sich, den gegenwärtigen Ergebnissen zufolge, auf die Aktivierung von Dectin-1 mittels des Liganden Curdlan stützen kann.

Unsere Daten haben diesbezüglich bereits vielversprechende Ergebnisse geliefert. Nach einer Immunisierung von BALB/c – Mäusen mit SLA und Curdlan überlebten die Tiere signifikant länger, wenn sie mehrere Wochen später mit lebenden Leishmanien infiziert wurden. Der Krankheitsverlauf war deutlich abgeschwächt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob SLA, das direkt an Curdlan gekoppelt ist, von den APCs effektiver aufgenommen, prozessiert und präsentiert wird, so dass auch die Th1-vermittelte Immunantwort gegen eine darauf folgende Leishmanieninfektion stark genug verläuft, um die Parasiten bekämpfen zu können. Diese Strategie hat bei Verwendung von Modellantigenen wie OVA oder KLH bereits funktioniert. Ob sie auch im experimentellen Modell der Leishmaniose umsetzbar ist, könnte Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeit sein.

V. Zusammenfassung

Die obligat intrazellulären Parasiten der Gattung *Leishmania (L.) major* zählen zu den Erregern der kutanen Leishmaniose. Über den Biss einer Sandmücke werden die Erreger auf den Säugetierwirt übertragen, wo sie Zellen des mononukleären Systems befallen. Durch das Vorhandensein zweier Mausstämme, die auf Grund genetischer Unterschiede verschieden auf eine Leishmanieninfektion reagieren, konnten die Mechanismen, die über Suszeptibilität oder Resistenz entscheiden, im murinen Modell der Leishmaniose erforscht werden. Heute weiß man, dass zur Beseitigung der Parasiten eine T-Helferantwort vom Typ 1 (Th1-Antwort) notwendig ist. Dadurch schütten $CD4^+$ T-Helferzellen Interferon (IFN) γ aus, wodurch Makrophagen zur Produktion von leishmaniziden Molekülen, wie z.B. Stickstoffmonoxid, angeregt werden. Dies führt schließlich zur Beseitigung der Leishmanien.

Dendritische Zellen (*Dendritic cell*, DC) gelten als wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Sie nehmen Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren sie schließlich antigenspezifischen T-Zellen. Aus diesem Grund erhofft man sich, dass durch die zielgerichtete Aktivierung von Endozytoserezeptoren auf diesen Zellen die Immunantwort gegen einige Krebserkrankungen, aber auch virale Erreger oder Leishmanien so verändert werden kann, dass eine effektive T-Zellantwort induziert wird. Besonders Rezeptoren der C-Typ-Lektin-Familie haben sich in vielen Studien bereits als vielversprechende Ziele erwiesen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch die Aktivierung des C-Typ-Lektins Dectin-1 über seinen Ligand Curdlan die Immunantwort auf eine Infektion mit *L. major* verändert werden kann, so dass susceptible Mäuse eine protektive Th1-Antwort entwickeln.

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Stimulation von *Bone marrow derived DCs* (BMDCs) aus susceptible Mäusen mit Leishmanien in Kombination mit Curdlan nicht nur den Anteil Dectin-1⁺ Zellen in der Kultur erhöht, sondern auch zur Reifung der Zellen führt. Dies lieferte erste Hinweise darauf, dass Dectin-1 für den Verlauf der Leishmaniose wichtig sein könnte, da die Parasiten alleine die Reifung von DCs unterdrücken. Außerdem erhielten wir erste Anhaltspunkte, dass das Zytokinprofil der BMDCs von BALB/c in Richtung einer Th1-Antwort verschoben wird.

Auch *in vivo* konnten wir bestätigen, dass die Anzahl Dectin-1⁺ - Zellen nach Infektion mit *L. major* anstieg. Eine Infektion susceptibler Mäuse in Kombination mit Curdlan führte zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber den Parasiten. Die Tiere konnten die Infektion bekämpfen und waren darüber hinaus bei einer erneuten Infektion ebenfalls resistent. Eine positive *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH) – Reaktion, der Anstieg der IgG2a – Konzentration in den Seren der BALB/c - Mäuse und nicht zuletzt die Messung von Zytokinen in Zellkulturüberständen, die für eine Th1-Antwort typisch sind (etwa IFN- γ), deuteten auf eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th1. Nachdem wir susceptiblen Mäusen Leishmanienantigen in Kombination mit Curdlan injiziert hatten, waren diese Tiere deutlich länger dazu in der Lage, eine darauf folgende Infektion mit lebenden Parasiten in Schach zu halten. Mit Hilfe von Dectin-1 – *Knock-Out* – Mäusen konnten wir schließlich beweisen, dass die durch Curdlan hervorgerufenen Effekte über Dectin-1 vermittelt werden.

Parasitologisch konnten wir nachweisen, dass Leishmanien Liganden verschiedener C-Typ-Lektine auf ihrer Oberfläche exprimieren. Im Vergleich ist die Expression der Dectin-1 – Liganden aber deutlich reduziert, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um einen sog. *Escape* - Mechanismus handelt, durch den die Erreger vom Immunsystem des Wirtes unentdeckt bleiben wollen. Außerdem zeigten die Ergebnisse, dass die Expressionsstärke der Liganden innerhalb einer Leishmanienpopulation unterschiedlich ist, was darauf schließen lässt, dass die sexuelle Reproduktion von Leishmanien häufiger vorkommt als bisher angenommen, was auch durch neuere Studien bestätigt wird.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Immunantwort susceptibler BALB/c – Mäuse auf eine Infektion mit *L. major* mit Hilfe des β -Glucans Curdlan so moduliert werden kann, dass die Tiere eine adaptive protektive Th1-Antwort entwickeln. Dabei spielt das C-Typ-Lektin Dectin-1 eine entscheidende Rolle. Außerdem gelang es uns, susceptible Mäuse zu immunisieren, so dass der Krankheitsverlauf einer nachfolgenden Leishmaniose abgeschwächt verlief. Aus diesem Grund halten wir Dectin-1 für eine vielversprechende Grundlage weiterer Untersuchungen, um eine effektive, auf DCs basierende Vakzinierung gegen Leishmaniose zu entwickeln.

Abstract

Obligatory intracellular parasites of the genus *Leishmania* (*L.*) *major* belong to the causative agents of cutaneous leishmaniasis. The parasites, which are transmitted to the mammalian host via the bite of a sand fly, infect cells of the mononuclear system. The mechanisms deciding on susceptibility or resistance have been investigated using the murine model of leishmaniasis. This animal model has the advantage that two different mouse strains exist, which cope differently with the infection due to certain genetic diversities. Today it is known that for parasite clearance, the development of a protective Th1 response is necessary. CD4⁺ helper T cells produce interferone (IFN) γ , which activates macrophages and induces the production of leishmanicidal molecules, e.g. nitric oxide, Finally leading to the elimination of the parasites.

Dendritic cells are considered to be important for bridging the innate and adaptive immune system. They take up antigens to process and present them to antigen-specific T cells. For this reason, the target-oriented activation of endocytic receptors on this cell type was expected to modify the immune response against cancer, viral pathogens or parasites like *Leishmania* in a way that an effective T cell response is induced. Several studies have shown that especially receptors of the C-type lectin family represent promising targets.

In this thesis we examined if the activation of the C-type lectin dectin-1 by binding to its ligand curdlan leads to an alteration of the immune response against *L. major*, so that susceptible mice can develop a protective Th1 response.

We could show in *in vitro* experiments that stimulation of bone marrow-derived DCs (BMDCs), isolated from susceptible mice, with *Leishmania* and Curdlan leads to an increased portion of dectin-1⁺ cells as well as to the maturation of the BMDCs. These results provided a first hint that dectin-1 could play a role in the course of disease, since stimulation with parasites alone suppresses the maturation of the cells. Moreover, we got evidence for a shift in the cytokine profile of the BMDCs of BALB/c towards a Th1 response.

We could confirm an increase of the number of dectin-1⁺ cells after infection with *L. major in vivo*. Infection in combination with curdlan made susceptible mice resistant to the parasites. Moreover, the animals were also able to successfully mount an immune response after re-infection. A positive delayed type hypersensitivity (DTH) – reaction, an increase of the IgG2a

– concentration in the sera of the BALB/c – mice and, last but not least, the presence of cytokines specific for Th1 responses (e. g. IFN- γ) in cell culture supernatants were indicating a shift of the Th1/Th2 balance in BALB/c – mice towards Th1. After administering *Leishmania*-antigen in combination with curdlan to susceptible BALB/c mice, these animals were able to control a subsequent infection with live parasites for a considerably longer period of time. By using dectin-1 – knock-out mice we were able to explicitly demonstrate that the effects caused by curdlan are mediated by dectin-1.

Concerning parasitology, we were able to show the expression of C-type lectin ligands on the surface of *Leishmania* parasites. Compared to other ligands, the expression of ligands for dectin-1 was clearly reduced, suggesting an escape mechanism which enables the parasites to evade the host immune surveillance. Moreover, the results reveal diverging expression levels of ligands for C-type lectins within a *Leishmania* population, indicating sexual reproduction of *Leishmania* occurs more often than assumed.

The results show that the immune response of susceptible BALB/c mice to an infection with *L. major* can be modulated by using the β -glucan curdlan in a way that animals develop an adaptive protective Th1 response. We were able to identify the C-type lectin dectin-1 as indispensable factor in this mechanism. Moreover, we successfully immunized susceptible mice resulting in a less severe course of disease and a prolonged survival of the animals. Therefore, we consider dectin-1 as a promising target for further investigations leading to the development of an effective DC-based vaccination against leishmaniasis.

- Abramson, S., Miller, R., and Phillips, R. (1977). The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* **145**, 1567–1579.
- Agrawal, S., Gupta, S., and Agrawal, A. (2010). Human Dendritic Cells Activated via Dectin-1 Are Efficient at Priming Th17, Cytotoxic CD8 T and B Cell Responses. *PLoS ONE* **5**, e13418.
- Ahmann, G.B., Nadler, P.I., Birnkrant, A., and Hodes, R.J. (1979). T Cell Recognition in the Mixed Lymphocyte Response I. Non-T, Radiation-Resistant Splenic Adherent Cells Are the Predominant Stimulators in the Murine Mixed Lymphocyte Reaction. *J Immunol* **123**, 903–909.
- Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M., and Sacks, D.L. (2009). Demonstration of Genetic Exchange During Cyclical Development of *Leishmania* in the Sand Fly Vector. *Science* **324**, 265–268.
- Alavi-Naini, R., Fazaeli, A., and O’Dempsey, T. (2012). Topical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. *Prague Med Rep* **113**, 105–118.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *The Adaptive Immune System*.
- Alexander, J., Satoskar, A.R., and Russell, D.G. (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* **112**, 2993–3002.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Boer, M.D., Cañavate, C., Dedet, J.-P., Gradoni, L., Horst, R.T., López-Vélez, R., and Moreno, J. (2008). The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 334–359.
- Angus, K.L., and Griffiths, G.M. (2013). Cell polarisation and the immunological synapse. *Current Opinion in Cell Biology* **25**, 85–91.
- Ank, N., Iversen, M.B., Bartholdy, C., Staeheli, P., Hartmann, R., Jensen, U.B., Dagnaes-Hansen, F., Thomsen, A.R., Chen, Z., Haugen, H., et al. (2008). An Important Role for Type III Interferon (IFN- λ /IL-28) in TLR-Induced Antiviral Activity. *J Immunol* **180**, 2474–2485.
- Bailey, H., and Bishop, W.J. (1959). Leishman-Donovan Bodies and Donovaniasis SIR WILLIAM BOOG LEISHMAN, 1865-1926: CHARLES DONOVAN, 1863-1951. *The British Journal of Venereal Diseases* **35**, 8–9.
- Baldwin, T.M., Elso, C., Curtis, J., Buckingham, L., and Handman, E. (2003). The Site of *Leishmania major* Infection Determines Disease Severity and Immune Responses. *Infect Immun* **71**, 6830–6834.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252.

- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 18, 767–811.
- Bangert, C., Brunner, P.M., and Stingl, G. (2011). Immune functions of the skin. *Clinics in Dermatology* 29, 360–376.
- Baran, J., Allendorf, D.J., Hong, F., and Ross, G.D. (2007). Oral beta-glucan adjuvant therapy converts nonprotective Th2 response to protective Th1 cell-mediated immune response in mammary tumor-bearing mice. *Folia Histochem. Cytobiol.* 45, 107–114.
- Bates, P.A. (1994). The Developmental Biology of *Leishmania* Promastigotes. *Experimental Parasitology* 79, 215–218.
- Beck, G., and Habicht, G.S. (1996). Immunity and the invertebrates. *Sci. Am.* 275, 60–63, 66.
- Belkaid, Y., Butcher, B., and Sacks, D.L. (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania* -infected cells. *European Journal of Immunology* 28, 1389–1400.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., and Sacks, D. (2000). A Natural Model of *Leishmania* major Infection Reveals a Prolonged “Silent” Phase of Parasite Amplification in the Skin Before the Onset of Lesion Formation and Immunity. *J Immunol* 165, 969–977.
- Besteiro, S., Williams, R.A.M., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology* 37, 1063–1075.
- Brewig, N., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Veit, A., Bickert, T., Fleischer, B., Mostböck, S., and Ritter, U. (2009). Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J. Immunol* 182, 774–783.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro* 3, 238–250.
- Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 6, 33–43.
- Brown, G.D., and Gordon, S. (2001). Immune recognition: A new receptor for [beta]-glucans. *Nature* 413, 36–37.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y.C., and Gordon, S. (2002). Dectin-1 Is A Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *J Exp Med* 196, 407–412.

- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S.J., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. *The Journal of Experimental Medicine* 197, 1119–1124.
- Burdek, M., Spranger, S., Wilde, S., Frankenberger, B., Schendel, D.J., and Geiger, C. (2010). Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation. *J Transl Med* 8, 90.
- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C.Y., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L.H., et al. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264–3273.
- Carter, C.R., Whitcomb, J.P., Campbell, J.A., Mukbel, R.M., and McDowell, M.A. (2009). Complement Receptor 3 Deficiency Influences Lesion Progression during *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 77, 5668–5675.
- Carter, R.W., Thompson, C., Reid, D.M., Wong, S.Y.C., and Tough, D.F. (2006). Preferential Induction of CD4⁺ T Cell Responses through In Vivo Targeting of Antigen to Dendritic Cell-Associated C-Type Lectin-1. *J Immunol* 177, 2276–2284.
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). Principles of innate and adaptive immunity.
- Colmenares, M., Kar, S., Goldsmith-Pestana, K., and McMahon-Pratt, D. (2002). Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96, *Supplement 1*, S3–S7.
- Courret, N., Lang, T., Milon, G., and Antoine, J.C. (2003). Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 33, 1373–1383.
- Creus, A.D., Beneden, K.V., Taghon, T., Stolz, F., Debacker, V., Plum, J., and Leclercq, G. (2000). Langerhans Cells That Have Matured In Vivo in the Absence of T Cells Are Fully Capable of Inducing a Helper CD4 as Well as a Cytotoxic CD8 Response. *J Immunol* 165, 645–653.
- Croft, S.L., and Yardley, V. (2002). Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des.* 8, 319–342.
- David, C.V., and Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy* 22, 491–502.
- Davis, D.M., and Dustin, M.L. (2004). What is the importance of the immunological synapse? *Trends in Immunology* 25, 323–327.

- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis. *Bacillus: Cellular and Molecular Biology* 692–693.
- Desjeux, P., and Alvar, J. (2003). Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 97, 3–15.
- Diebold, S.S. (2009). Activation of Dendritic Cells by Toll-Like Receptors and C-Type Lectins. In *Dendritic Cells*, G. Lombardi, and Y. Rizzo-Vasquez, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 3–30.
- Dorlo, T.P.C., Balasegaram, M., Beijnen, J.H., and Vries, P.J. de (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2576–2597.
- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 585–590.
- Drummond, R.A., and Brown, G.D. (2011). The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Current Opinion in Microbiology* 14, 392–399.
- Engels, N., and Wienands, J. (2011). The signaling tool box for tyrosine-based costimulation of lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 23, 324–329.
- Erbacher, A., Gieseke, F., Handgretinger, R., and Müller, I. (2009). Dendritic cells: Functional aspects of glycosylation and lectins. *Human Immunology* 70, 308–312.
- Fagundes, A., Antônio, L., Schubach, A., and Marzochi, K.B.F. (2012). Comparison between in vivo measurement of the Montenegro skin test and paper recording. *International Journal of Dermatology* 51, 618–619.
- Fischer, D., Moeller, P., Thomas, S.M., Naucke, T.J., and Beierkuhnlein, C. (2011). Combining Climatic Projections and Dispersal Ability: A Method for Estimating the Responses of Sandfly Vector Species to Climate Change. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1407.
- Ge, M.Q., Ho, A.W.S., Tang, Y., Wong, K.H.S., Chua, B.Y.L., Gasser, S., and Kemeny, D.M. (2012). NK Cells Regulate CD8+ T Cell Priming and Dendritic Cell Migration during Influenza A Infection by IFN- γ and Perforin-Dependent Mechanisms. *J Immunol* 189, 2099–2109.
- Gell, P.G.H. (1967). Delayed Hypersensitivity: Specific Cell-Mediated Immunity. *Br Med Bull* 23, 1–2.
- Ghosh, K., Sharma, G., Saha, A., Kar, S., Das, P.K., and Ukil, A. (2013). Successful Therapy of Visceral Leishmaniasis With Curdlan Involves T-Helper 17 Cytokines. *J Infect Dis.* 207, 1016–1025.
- Gill, J., Malin, M., Sutherland, J., Gray, D., Hollander, G., and Boyd, R. (2003). Thymic generation and regeneration. *Immunological Reviews* 195, 28–50.

- Goldman, R., and Jaffe, C.L. (1991). Administration of beta-glucan following Leishmania major infection suppresses disease progression in mice. *Parasite Immunol.* 13, 137–145.
- Goodridge, H.S., Reyes, C.N., Becker, C.A., Katsumoto, T.R., Ma, J., Wolf, A.J., Bose, N., Chan, A.S.H., Magee, A.S., Danielson, M.E., et al. (2011). Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a /phagocytic synapse/. *Nature* 472, 471–475.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science* 285, 221–227.
- Guerra, C., Johal, K., Morris, D., Moreno, S., Alvarado, O., Gray, D., Tanzil, M., Pearce, D., and Venketaraman, V. (2012). Control of Mycobacterium tuberculosis growth by activated natural killer cells. *Clin Exp Immunol* 168, 142–152.
- Hajishengallis, G., Shakhatreh, M.-A.K., Wang, M., and Liang, S. (2007). Complement Receptor 3 Blockade Promotes IL-12-Mediated Clearance of Porphyromonas gingivalis and Negates Its Virulence In Vivo. *J Immunol* 179, 2359–2367.
- Haldar, A.K., Sen, P., and Roy, S. (2011). Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Mol Biol Int* 2011.
- Hardison, S.E., and Brown, G.D. (2012). C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* 13, 817–822.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness under Steady State Conditions in Vivo. *J Exp Med* 194, 769–780.
- Herwaldt, B.L. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet* 354, 1191–1199.
- Higashi, T., Hashimoto, K., Takagi, R., Mizuno, Y., Okazaki, Y., Tanaka, Y., and Matsushita, S. (2010). Curdlan Induces DC-Mediated Th17 Polarization via Jagged1 Activation in Human Dendritic Cells. *Allergology International* 59, 161–166.
- Holbrook, T.W., and Cook, J.A. (1983). Immunization of mice against Leishmania donovani by subcutaneous injections of dead promastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 51–53.
- Holbrook, T.W., Cook, J.A., and Parker, B.W. (1981). Immunization against Leishmania donovani: glucan as an adjuvant with killed promastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 762–768.
- Hutloff, D.A. (2011). T-Zell-Kostimulation. *Z. Rheumatol.* 70, 588–591.
- Janeway Jr., C.A. (1989). The role of CD4 in T-cell activation: accessory molecule or co-receptor? *Immunology Today* 10, 234–238.

- Joffre, O., Nolte, M.A., Spörri, R., and Sousa, C.R. e (2009). Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews* 227, 234–247.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22, 439–445.
- Kautz-Neu, K., Schwonberg, K., Fischer, M.R., Schermann, A.I., and Stebut, E. von (2012). Dendritic cells in Leishmania major infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Med Microbiol Immunol* 201, 581–592.
- Kenshi, Y., and Richard, L.G. (2008). Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol* 18, 11–21.
- Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214, 562–575.
- Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2011). Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends Immunol* 32, 151–156.
- Klammt, C., and Lillemeier, B.F. (2012). How membrane structures control T cell signaling. *Front Immunol* 3.
- Klechevsky, E., Flamar, A.-L., Cao, Y., Blanck, J.-P., Liu, M., O’Bar, A., Agouna-Deciat, O., Klucar, P., Thompson-Snipes, L., Zurawski, S., et al. (2010). Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* 116, 1685–1697.
- Kobayashi, K., Kaneda, K., and Kasama, T. (2001). Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microscopy Research and Technique* 53, 241–245.
- Kropf, P., Schopf, L.R., Chung, C.L., Xu, D., Liew, F.Y., Sypek, J.P., and Müller, I. (1999). Expression of Th2 cytokines and the stable Th2 marker ST2L in the absence of IL-4 during Leishmania major infection. *European Journal of Immunology* 29, 3621–3628.
- Kumar, R., and Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front. Immun.* 3, 251.
- Kushwah, R., and Hu, J. (2011). Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 133, 409–419.
- Lee, H.-M., Yuk, J.-M., Shin, D.-M., and Jo, E.-K. (2009). Dectin-1 is Inducible and Plays an Essential Role for Mycobacteria-Induced Innate Immune Responses in Airway Epithelial Cells. *J Clin Immunol* 29, 795–805.
- LeibundGut-Landmann, S., Grosz, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., et al. (2007). Syk- and CARD9-

dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8, 630–638.

LeibundGut-Landmann, S., Osorio, F., Brown, G.D., and Sousa, C.R. e (2008). Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood* 112, 4971–4980.

Leishman, W.B. (1903). ON THE POSSIBILITY OF THE OCCURRENCE OF TRYPANOSOMIASIS IN INDIA. *Br Med J* 1, 1252–1254.

Lemischka, I.R., Raulet, D.H., and Mulligan, R.C. (1986). Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 45, 917–927.

Li, D.-Y., Gu, C., Min, J., Chu, Z.-H., and Ou, Q.-J. (2012). Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Exp Ther Med* 4, 131–134.

Lin, M.-L., Zhan, Y., Villadangos, J.A., and Lew, A.M. (2008). The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol. Cell Biol* 86, 353–362.

Lira, R., Doherty, M., Modi, G., and Sacks, D. (2000). Evolution of Lesion Formation, Parasitic Load, Immune Response, and Reservoir Potential in C57BL/6 Mice following High- and Low-Dose Challenge with *Leishmania major*. *Infect Immun* 68, 5176–5182.

Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews* 234, 45–54.

Locksley, R.M., Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., and Gardner Jr., K.D. (1987). Murine cutaneous leishmaniasis : Susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Annales de l'Institut Pasteur / Immunologie* 138, 744–749.

Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L.J., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* 223, 77–92.

Lynch, J.P., Mazzone, S.B., Rogers, M.J., Arikatt, J.J., Loh, Z., Pritchard, A.L., Upham, J.W., and Phipps, S. (2013). The plasmacytoid dendritic cell: a cell at the cross-roads in asthma. *Eur. Respir. J.*

Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., and Steinman, R.M. (2000). The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, Dec-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II-Positive Lysosomal Compartments. *J Cell Biol* 151, 673–684.

Marth, T., and Kelsall, B.L. (1997). Regulation of Interleukin-12 by Complement Receptor 3 Signaling. *J Exp Med* 185, 1987–1995.

- Masic, A., Hurdal, R., Nieuwenhuizen, N.E., Brombacher, F., and Moll, H. (2012). Dendritic Cell-Mediated Vaccination Relies on Interleukin-4 Receptor Signaling to Avoid Tissue Damage after *Leishmania major* Infection of BALB/c Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 6.
- Maslov, D.A., Podlipaev, S.A., and Lukes, J. (2001). Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 397–402.
- Maurer, M., Kostka, S.L., Siebenhaar, F., Moelle, K., Metz, M., Knop, J., and Stebut, E. von (2006). Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J* 20, 2460–2467.
- McKee, A.S., MacLeod, M.K., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2010). Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biol* 8, 37.
- Mendes, E. (1979). Transfer of delayed hypersensitivity to leishmanin (Montenegro reaction). *Cellular Immunology* 42, 424–427.
- Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 8, 935–947.
- Metcalfe, D.D., Baram, D., and Mekori, Y.A. (1997). Mast cells. *Physiol Rev* 77, 1033–1079.
- Mishra, M., Biswas, U.K., Jha, D.N., and Khan, A.B. (1992). Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. *The Lancet* 340, 1256–1257.
- Moll, H. (1993). Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunology Today* 14, 383–387.
- Moll, H., Flohé, S., and Rölinghoff, M. (1995). Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *European Journal of Immunology* 25, 693–699.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology* 7, 145–173.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., and Saravia, N.G. Advances in leishmaniasis. *The Lancet* 366, 1561–1577.
- Nerren, J.R., and Kogut, M.H. (2009). The selective Dectin-1 agonist, curdlan, induces an oxidative burst response in chicken heterophils and peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 162–166.

- Ng, L.G., Hsu, A., Mandell, M.A., Roediger, B., Hoeller, C., Mrass, P., Iparraguirre, A., Cavanagh, L.L., Triccas, J.A., Beverley, S.M., et al. (2008). Migratory Dermal Dendritic Cells Act as Rapid Sensors of Protozoan Parasites. *PLoS Pathog* 4.
- Okada, T., Lian, Z.-X., Naiki, M., Ansari, A.A., Ikehara, S., and Gershwin, M.E. (2003). Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology* 33, 1012–1019.
- Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M., and Colombo, M.P. (1996). Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 183, 317–322.
- Palucka, K., Banchereau, J., and Mellman, I. (2010). Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* 33, 464–478.
- Parish, C.R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77, 499–508.
- Petit-Frere, C., Dugas, B., Braquet, P., and Mencia-Huerta, J.M. (1993). Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. *Immunology* 79, 146–151.
- Poulin, L.F., Henri, S., Bovis, B. de, Devilard, E., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2007). The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204, 3119–3131.
- Powrie, F., Menon, S., and Coffman, R.L. (1993). Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *European Journal of Immunology* 23, 2223–2229.
- Prasad, N., Ghiya, B.C., Bumb, R.A., Kaushal, H., Saboskar, A.A., Lezama-Davila, C.M., Salotra, P., and Satoskar, A.R. (12). Heat, Oriental sore, and HIV. *The Lancet* 377, 610.
- Puré, E., Inaba, K., and Metlay, J. (1988). Lymphokine production by murine T cells in the mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 168, 795–800.
- Reid, D.M., Montoya, M., Taylor, P.R., Borrow, P., Gordon, S., Brown, G.D., and Wong, S.Y.C. (2004). Expression of the β -glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *Journal of Leukocyte Biology* 76, 86–94.
- Reid, D.M., Gow, N.A., and Brown, G.D. (2009). Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol* 21, 30–37.
- Reiner, S.L., and Locksley, R.M. (1995). The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. *Annual Review of Immunology* 13, 151–177.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476–483.

- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., and Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 581–596.
- Remer, K.A., Roeger, B., Hambrecht, C., and Moll, H. (2010). Natural killer cells support the induction of protective immunity during dendritic cell-mediated vaccination against *Leishmania major*. *Immunology* 131, 570–582.
- Rice, P.J., Lockhart, B.E., Barker, L.A., Adams, E.L., Ensley, H.E., and Williams, D.L. (2004). Pharmacokinetics of fungal (1–3)- β -D-glucans following intravenous administration in rats. *International Immunopharmacology* 4, 1209–1215.
- Ritter, U., and Osterloh, A. (2007). A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 196, 51–59.
- Ritter, U., Mattner, J., Rocha, J.S., Bogdan, C., and Körner, H. (2004). The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes and Infection* 6, 559–565.
- Robinson, M.J., Sancho, D., Slack, E.C., LeibundGut-Landmann, S., and Sousa, C.R. e (2006). Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 7, 1258–1265.
- Ross, R. (1903). NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. *Br Med J* 2, 1261–1262.
- Rougeron, V., Meeûs, T.D., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J.-C., Doncker, S.D., Ray, D.L., et al. (2009). Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *PNAS* 106, 10224–10229.
- Rougeron, V., De Meeûs, T., Kako Ouraga, S., Hide, M., and Bañuls, A.-L. (2010). “Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask)” in *Leishmania* after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. *PLoS Pathog* 6, e1001004.
- Saijo, S., and Iwakura, Y. (2011). Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *International Immunology* 23, 467–472.
- Sakthianandeswaren, A., Foote, S.J., and Handman, E. (2009). The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends in Parasitology* 25, 383–391.
- Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annual Review of Immunology* 30, 491–529.
- Sattler, S., Ghadially, H., and Hofer, E. (2012). Evolution of the C-Type Lectin-Like Receptor Genes of the DECTIN-1 Cluster in the NK Gene Complex. *The Scientific World Journal* 2012, 1–11.

- Schott, M., and Seissler, J. (2003). Dendritic cell vaccination: new hope for the treatment of metastasized endocrine malignancies. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 14, 156–162.
- Schulz, A., Mellenthin, K., Schonian, G., Fleischer, B., and Drosten, C. (2003). Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic Leishmania Organisms by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1529–1535.
- Schwartz, R.H. (2003). T Cell Anergy*. *Annual Review of Immunology* 21, 305–334.
- Segura, E., and Villadangos, J.A. (2011). A Modular and Combinatorial View of the Antigen Cross-Presentation Pathway in Dendritic Cells. *Traffic* 12, 1677–1685.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 209, 653–660.
- Serezani, C.H., Kane, S., Collins, L., Morato-Marques, M., Osterholzer, J.J., and Peters-Golden, M. (2012). Macrophage Dectin-1 Expression Is Controlled by Leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 Axis. *J Immunol* 189, 906–915.
- Shortman, K., and Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151–161.
- Singh, B., and Sundar, S. (2012). Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* 30, 3834–3842.
- Snapper, C.M., and Paul, W.E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944–947.
- Soltani, M.H., Kalantari, T., Karimi, M.H., Erfani, N., and Kamali Sarvestani, E. (2012). Evaluation of the immunomodulatory effect of curdlan on maturation and function of mouse spleen-derived dendritic cells. *Iran J Immunol* 9, 168–174.
- Stebut, E.V. (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *European Journal of Dermatology* 17, 115–122.
- Von Stebut, E. (2007). Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Experimental Dermatology* 16, 340–346.
- Steinman, R., and Swanson, J. (1995). The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 182, 283–288.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J Exp Med* 137, 1142–1162.

- Stober, D., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (2001). IL-12/IL-18-Dependent IFN- γ Release by Murine Dendritic Cells. *J Immunol* *167*, 957–965.
- Sun, W.-K., Lu, X., Li, X., Sun, Q.-Y., Su, X., Song, Y., Sun, H.-M., and Shi, Y. (2012). Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in *Aspergillus*-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*.
- Tacke, P.J., Vries, I.J.M. de, Gijzen, K., Joosten, B., Wu, D., Rother, R.P., Faas, S.J., Punt, C.J.A., Torensma, R., Adema, G.J., et al. (2005). Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* *106*, 1278–1285.
- Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., et al. (2006). Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nature Immunology* *8*, 31–38.
- Thauland, T.J., and Parker, D.C. (2010). Diversity in immunological synapse structure. *Immunology* *131*, 466–472.
- Tibayrenc, M., and Ayala, F.J. How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? *Trends in Parasitology*.
- Titus, R.G., Lima, G.C., Engers, H.D., and Louis, J.A. (1984). Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania* major-specific delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* *133*, 1594–1600.
- Turley, S.J., Fletcher, A.L., and Elpek, K.G. (2010). The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* *10*, 813–825.
- Vazquez-Mendoza, A., Carrero, J.C., and Rodriguez-Sosa, M. (2013). Parasitic Infections: A Role for C-Type Lectins Receptors. *Biomed Res Int* *2013*.
- Villadangos, J.A., and Heath, W.R. (2005). Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: Limitations of the Langerhans cells paradigm. *Seminars in Immunology* *17*, 262–272.
- Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* *7*, 543–555.
- Viriyakosol, S., Jimenez, M. del P., Gurney, M.A., Ashbaugh, M.E., and Fierer, J. (2013). Dectin-1 Is Required for Resistance to *Coccidioidomycosis* in Mice. *mBio* *4*.
- Weigand, K., Voigt, F., Encke, J., Hoyler, B., Stremmel, W., and Eisenbach, C. (2012). Vaccination with dendritic cells pulsed with hepatitis C pseudo particles induces specific immune responses in mice. *World J Gastroenterol* *18*, 785–793.

- Wilhelm, P., Ritter, U., Labbow, S., Donhauser, N., Röllinghoff, M., Bogdan, C., and Körner, H. (2001). Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant C57BL/6 Mice Lacking TNF. *J Immunol* *166*, 4012–4019.
- Willment, J.A., Marshall, A.S.J., Reid, D.M., Williams, D.L., Wong, S.Y.C., Gordon, S., and Brown, G.D. (2005). The human β -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *European Journal of Immunology* *35*, 1539–1547.
- Xie, J., Guo, L., Ruan, Y., Zhu, H., Wang, L., Zhou, L., Yun, X., and Gu, J. (2010). Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *391*, 958–962.
- Yamakami, K., Akao, S., Tadakuma, T., Nitta, Y., Miyazaki, J.-I., and Yoshizawa, N. (2002). Administration of plasmids expressing interleukin-4 and interleukin-10 causes BALB/c mice to induce a T helper 2-type response despite the expected T helper 1-type response with a low-dose infection of *Leishmania major*. *Immunology* *105*, 515–523.
- Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Kobayashi, K., Brown, G.D., Tagami, T., Sakihama, T., Hirota, K., Tanaka, S., Nomura, T., Miki, I., et al. (2005). A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *The Journal of Experimental Medicine* *201*, 949–960.
- Zenaro, E., Donini, M., and Dusi, S. (2009). Induction of Th1/Th17 immune response by *Mycobacterium tuberculosis*: role of dectin-1, mannose receptor, and DC-SIGN. *J Leukoc Biol* *86*, 1393–1401.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* *112*, 1557–1569.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research* *20*, 4–12.

VII. Anhang

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Lebenszyklus und Entwicklungsstadien der <i>Leishmania</i> -Parasiten.....	14
Abbildung 2:	Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation von DCs und der Dectin-1 - Expression auf den Zellen.....	53
Abbildung 3:	FACS-Analyse zum Nachweis Dectin-1 ⁺ DCs am Ort der Infektion.....	54
Abbildung 4:	FACS-Analysen zur Dectin-1 – Expressionsstärke auf DCs nach Infektion..	55
Abbildung 5:	FACS-Analysen zur Dectin-1 – Expression auf BMDCs.....	57
Abbildung 6:	Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Dectin-1 – Expression auf BMDCs.....	58
Abbildung 7:	Effekt des Dectin-1 – Agonisten Curdlan auf infizierte BMDCs.....	61
Abbildung 8:	Wirkung von SLA und Curdlan auf die BMDC-Reifung.....	63
Abbildung 9:	Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen durch BMDCs.....	65
Abbildung 10:	Aktivierung CD8 ⁺ T-Zellen durch BMDCs.....	66
Abbildung 11:	IFN- γ – Sekretion der mit den BMDCs kokultivierten T-Zellen.....	68
Abbildung 12:	Schwellung von Füßen nach Infektion mit <i>L. major</i> mit und ohne Curdlan.....	70
Abbildung 13:	Mauspfoten von BALB/c – Mäusen nach Infektion mit <i>Leishmania major</i>	71
Abbildung 14:	Reinfektion von BALB/c - Mäusen.....	73
Abbildung 15:	DTH-Reaktion.....	74
Abbildung 16:	Anzahl der <i>Leishmania</i> -Parasiten 3 Tage p.i.....	75
Abbildung 17:	Parasitendichte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion.....	77
Abbildung 18:	ELISA zur Bestimmung <i>Leishmania</i> -spezifischer Immunglobulinmengen.....	79
Abbildung 19:	ELISA zur Bestimmung der Konzentration Th1- und Th2-spezifischer Zytokine.....	80
Abbildung 20:	Anteil zytokinproduzierender CD4 ⁺ T-Zellen.....	81
Abbildung 21:	Genotypisierung der Dectin-1 ^{-/-} - Mäuse.....	83
Abbildung 22:	Infektion von Dectin-1 ^{-/-} - Mäusen mit <i>L. major</i>	85
Abbildung 23:	Infektion von BALB/c – Mäusen nach Immunisierung mit SLA und Curdlan.....	87
Abbildung 24:	Expression von C-Typ-Lektin-Liganden auf promastigoten <i>L. major</i>	89
Abbildung 25:	Expression von C-Typ-Lektin-Liganden auf amastigoten <i>L. major</i>	91/92

2. Tabellen

Tabelle 1:	Th1- und Th2-Zytokinproduktion nach Zellstimulation mit und ohne Curdlan..	82
-------------------	--	----

3. Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AMP	antimikrobielle Peptide
APC	<i>antigen presenting cell</i> ; antigenpräsentierende Zelle
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cell</i> ; Knochenmarks-DC
bp	<i>base pair</i> ; Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
cDC	<i>conventional dendritic cell</i> ; konventionelle dendritische Zelle
CFSE	Carboxyfluorescein - succinimidylester
CL	<i>cutaneous leishmaniasis</i> ; kutane Leishmaniose
CLEC-2	<i>C-type lectin-like receptor 2</i>
CLEC-9a	<i>C-type lectin-like receptor 9a</i>
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
CR	<i>complement receptor</i> ; Komplementrezeptor
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i> ; Kohlehydrat-Erkennungsdomäne
cSMAC	<i>central supramolecular activation cluster</i> ; zentrales supramolekulares Aktivierungscluster
CTLD	<i>C-type lectin-like domain</i> ; C-Typ-Lektin-ähnliche Domäne
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat

DC	<i>dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dDC	dermale dendritische Zelle
Dectin-1	<i>dendritic-cell associated C-type lectin-1</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNDR-1	<i>DC, NK lectin group receptor-1</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dSMAC	distales SMAC (s. cSMAC)
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i> ; Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBSS	<i>Hanks'-Balanced-Salt-Solution</i>
HCL	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hg	Hintergrund
hIgG	humanes ImmunglobulinG
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin

iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> , induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IS	immunologische Synapse
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kB	Kilobasenpaare
KLH	<i>keyhole-limpet hemocyanin</i>
L.	<i>Leishmania</i>
LC	<i>Langerhans cell</i> ; Langerhans Zelle
Lox-1	<i>lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MC	Mikro-Cluster
MCL	<i>mouse macrophage C-type lectin</i>
MCL	<i>mucocutaneous leishmaniasis</i> ; mukokutane Leishmaniose
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> ; durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGL	<i>macrophage galactose binding lectin</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
MICL	<i>myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor</i>
min.	Minute
Mincle	<i>macrophage inducible C-type lectin</i>
ml	Milliliter
MLR	<i>Mixed Lymphocyte Reaction</i>
mm	Millimeter
MMR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response gene 88</i>
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NK-Zelle	natürliche Killerzelle

NLR	<i>NOD-like receptor</i> ; NOD-ähnlicher Rezeptor
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
p.i.	<i>post infection</i> ; nach Infektion
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> ; Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> ; Phosphatgepufferte Saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerase Kettenreaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pLN	poplitealer Lymphknoten
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> ; Mustererkennungsrezeptor
pSMAC	peripheres SMAC (s. cSMAC)
REU	relative ELISA-Einheit
RIG	<i>retinoic acid inducible gene</i> ; durch Retinolsäure induzierbares Gen
RLR	<i>RIG-1-like receptor</i> ; RIG-1-ähnlicher Rezeptor
rpm	<i>rotations per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	<i>Standard Deviation</i> ; Standardabweichung
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> ; Standardfehler
SLA	<i>soluble leishmania antigen</i> ; lösliches Leishmanien-Antigen
sog.	sogenannte/-r
SPF	Spezifisch Pathogen - frei
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>

TBS	<i>Tris-buffered Saline</i> ; Tris-gepufferte Saline
TCR	<i>T cell receptor</i> ; T-Zellrezeptor
TLR	<i>Toll-like receptor</i> ; Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
U	<i>Units</i> ; Einheiten
u.a.	unter anderem
V	Volt
vgl.	vergleiche
VL	viszerale Leishmaniose
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
β-Gal	β-Galactosidase

4. Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Manuskripte

Wege AK, Florian C, Ernst W, Zimara N, Schleicher U, Hanses F, Schmid M, Ritter U. (2012) *Leishmania major* infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response. *PLoS Negl Trop Dis.* **6**: e1741

Wenzel UA, Bank E, Florian C, Förster S, Zimara N, Steinacker J, Klinger M, Reiling N, Ritter U, van Zandbergen G. (2012) *Leishmania major* parasite stage-dependent host cell invasion and immune evasion. *FASEB J.* **26**:29-39

Kolbaum J, Ritter U, Zimara N, Brewig N, Eschbach ML, Breloer M. (2011) Efficient control of *Leishmania* and *Strongyloides* despite partial suppression of nematode-induced Th2 response in co-infected mice. *Parasite Immunol.* **33**:226-35

Zur Publikation eingereicht:

Zimara N*, Florian C*, Schmid M, Malissen B, Kissenpfennig A, Männel DN, Edinger M, Hoffmann P, Hutchinson JA, Ritter U. Langerhans cells license follicular helper T cell functionality to promote early germinal center formation after cutaneous antigenic challenge. *beide Autoren haben gleich viel zu der Arbeit beigetragen

In Vorbereitung:

Zimara N, Schmid M, Eriksson M, Maglinao M, Weiss R, Lepenies B, Brown GD, Ritter U. Dectin-1 is indispensable for evoking an adaptive protective Th1-based immune response against *Leishmania major* in BALB/c mice.

5. Präsentationen

Zimara N, Florian C, Männel DN, Ritter U. (2010) *CD11c⁺ DCs from BALB/c and C57BL/6 mice differ in their lectine expression patterns.*

Summer School der Regensburg International Graduate School of Life Sciences (RIGeL), Regen.

Zimara N, Schmid M, Männel DN, Lepenies B, Ritter U. (2012) The impact of C-type lectins on the course of experimental leishmaniasis.

16. Symposium „Infektion und Immunabwehr“, Rothenfels.

6. Auszeichnungen

2. Preis für die beste Präsentation

16. Symposium „Infektion und Immunabwehr“, Rothenfels, 08.03.-10.03.2012

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

.....
Ort, Datum

.....
Nicole Zimara