

**Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials
eines Lipopeptidphosphoglykans
aus *Entamoeba histolytica***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Hannah Stephanie Bernin
Hamburg, 2014

Tag der Disputation: 13.03.2015

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Egbert Tannich und unter der Anleitung von PD Dr. Hannelore Lotter am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Hannelore Lotter

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

2. Gutachter: PD Dr. Sabine Lühje

Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg
Abteilung Molekulare Pflanzenphysiologie
Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg

Diese Dissertation wurde gefördert durch ein Stipendium der Werner-Otto-Stiftung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungs- & Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort von Männern und Frauen	9
1.2 Amöbiasis	9
1.2.1 Krankheitsbild und Therapie	10
1.2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Amöbenleberabszess	11
1.3 Natürliche Killer T Zellen	12
1.3.1 Definition	13
1.3.2 Entwicklung von iNKT Zellen	14
1.3.3 Aktivierung von iNKT Zellen	14
1.3.4 Effektorfunktionen von iNKT Zellen	17
1.3.5 iNKT Zellen als Target für Immuntherapien	19
1.4 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Kits und Reagenzien	22
2.1.3 Verbrauchsmaterial	22
2.1.4 Geräte	23
2.1.5 Antikörper und Isotyp-Kontrollen	23
2.1.6 Medium und Zusätze	24
2.1.8 Puffer und Lösungen	24
2.1.7 Stimulanzen	25
2.1.8 <i>Entamoeba histolytica</i>	25
2.1.9 Mäuse	26
2.1.10 Software	26
2.2 Spenderzellen und -gewebe	26
2.3 Zellbiologische Methoden	27
2.3.1 Kultivierung von <i>E. histolytica</i>	27
2.3.2 Kryokonservierung eukaryotischer Primärzellen	27
2.3.3 Isolierung von Leukozyten aus eukaryotischem Gewebe und Blut	27
2.3.4 Zellzahlbestimmung	29
2.3.5 Durchflusszytometrie	29
2.3.6 Antikörper-Färbung von Oberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie	30
2.3.7 Intrazelluläre Antikörper-Färbung für die Durchflusszytometrie	30
2.3.8 Generierung von Dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark	31
2.3.9 Pan T-Zell-Isolierung mit MACS® Zellseparation	31
2.3.10 <i>in vitro</i> -Stimulationsassays	31
2.3.11 Humaner iNKT-Zellzytokinexpressionsassay	31
2.3.12 Murine iNKT-Zellzytokinexpressionsassays	32
2.3.13 <i>In vitro</i> Test zur Bestimmung der anti-Leishmanien Aktivität von <i>EhLPPG</i>	33
2.4 Biochemische Methoden	34
2.4.1 Bestimmung der Lebertoxizität mittels ALT	34
2.4.2 ELISA	34
2.4.3 Aufreinigung von <i>Entamoeba histolytica</i> Lipopeptidphosphoglycan (<i>EhLPPG</i>)	35
2.4.4 Cytometric Bead Array (CBA)	36

2.5 <i>in vivo</i> Infektionsmodelle und Krebsmodelle	37
2.5.1 Mammakarzinom-Modell	37
2.5.2 Hepatozelluläres Karzinoma (HCC) Modell in Mdr2ko-Mäusen	37
2.5.3 <i>Leishmania major</i> -Infektions-Modell für kutane Leishmaniose	39
2.6 Statistische Analysen	39
3. Ergebnisse	40
3.1 Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in den Frequenzen und der Aktivierung humaner und muriner Immunzellen des angeborenen Immunsystems	40
3.1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen humaner Immunzellen	40
3.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Zytokinprofil humaner Immunzellen nach Stimulation mit α GalCer und <i>EhLPPG</i>	49
3.1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der iNKT-Zell-Frequenz der Maus	56
3.1.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede in dem Zytokinprofil von iNKT Zellen der Maus	57
3.2 Zytokinprofil humaner und muriner iNKT Zellen nach Stimulation mit synthetischen <i>EhPI</i> Analoga	59
3.2.1 Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulierung mit synthetischen <i>EhPI</i> Analoga	60
3.2.2 Zytokinproduktion muriner iNKT Zellen nach Stimulierung mit synthetischen <i>EhPI</i> Analoga	62
3.3. Evaluierung der Toxizität von αGalCer und <i>EhLPPG</i>	64
3.4 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von <i>EhLPPG</i>	66
3.4.1 Einfluss von <i>EhLPPG</i> auf eine Infektion mit <i>Leishmania major</i> <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	66
3.4.2 Einfluss von <i>EhLPPG</i> auf ein <i>in vivo</i> Modell für das Mammakarzinom	70
3.4.3 Einfluss von <i>EhLPPG</i> auf ein <i>in vivo</i> Modell für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) in Mdr2ko-Mäusen	72
4. Diskussion	75
4.1 Charakterisierung geschlechtsspezifischer Unterschiede in den Frequenzen humaner und muriner Immunzellen	76
4.1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen humaner und muriner iNKT Zellen	76
4.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Frequenz humaner Monozyten und der Monozytenrekutierung durch das Chemokin CCL2	78
4.2 Geschlechtsspezifisches Zytokinprofil humaner und muriner iNKT Zellen	80
4.2.1 Geschlechtsspezifisches Zytokinprofil humaner iNKT Zellen	80
4.2.2 Geschlechtsspezifisches Zytokinprofil muriner iNKT Zellen	81
4.3 Charakterisierung der Aktivierung von humanen und murinen iNKT Zellen durch Stimulation mit synthetischen <i>EhPI</i> Analoga des <i>EhLPPGs</i>	82
4.4 Immuntherapeutisches Potential von <i>EhLPPG</i>	84
4.4.1 Leberschädigung durch <i>EhLPPG</i>	84
4.4.2 Antileishmanienaktivität von <i>EhLPPG</i>	84
4.4.3 Antitumoraktivität von <i>EhLPPG</i>	86
4.5 Ausblick	88
5. Literatur	90
6. Zusammenfassung & Abstract	101
6.1 Zusammenfassung	101
6.2 Abstract	102
7. Eigene Publikationen und Patenteinreichung	103
Danksagung	104
Eidesstattliche Versicherung	105

Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verbreitung von <i>E. histolytica</i>	10
Abb. 2: Direkte und indirekte iNKT Zellaktivierung	15
Abb. 3: CD1d-Molekül	15
Abb. 4: Struktur des α GalCer und EhLPPG	16
Abb. 5: Immuntherapeutische Anwendungen von iNKT Zellen	20
Abb. 6: Schema Lebertoxizität	34
Abb. 7: Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von iNKT Zellen des Menschen	42
Abb. 8: Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von Monozyten des Menschen und in der CCL2-Konzentration in Serumproben von <i>E. histolytica</i> -infizierten Individuen	45
Abb. 9: Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Frequenz von Natürlichen Killer Zellen im peripheren Blut gesunder Probanden	47
Abb. 10: Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Frequenz von konventionellen T-Zellen gesunder Probanden	48
Abb. 11: iNKT Zellfrequenzen nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG	50
Abb. 12: Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG	52
Abb. 13: Zytokinprofil humaner iNKT-Subpopulationen nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG	54
Abb. 14: Zytokinprofil konventioneller T-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG	56
Abb. 15: Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von iNKT Zellen der C57BL/6 Maus	57
Abb. 16: Zytokinprofil muriner konventioneller und nicht-konventioneller T-Zellen (iNKT) nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG	59
Abb. 17: Native und synthetische EhPI-Anker	60
Abb. 18: Intrazelluläres Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulation mit α GalCer, EhLPPG und den synthetischen EhPI Analoga	62
Abb. 19: IFN γ -Produktion in murinen Milzlymphozyten und isolierten iNKT Zellen nach Stimulation mit synthetischen EhPI Analoga	64
Abb. 20: Serum Alanin-Aminotransferase-Werte nach Applikation von α GalCer und EhLPPG in den Mausstämmen C57BL/6 Mäusen und FVB/N	66
Abb. 21: Effekt von α GalCer und EhLPPG auf <i>L. major</i> -infizierte Makrophagen	68
Abb. 22: Bestimmung der optimalen Infektionsmenge für die Infektion von <i>L. major</i> in einem <i>in vivo</i> Modell für die kutane Leishmaniose	69
Abb. 23: Therapeutischer Einfluss von EhLPPG im Tiermodell für die kutane Leishmaniose	70
Abb. 24: Einfluss von α GalCer- und EhLPPG-stimulierten DC auf ein <i>in vivo</i> Modell für das Mammarkarzinom	72
Abb. 25: Einfluss von α GalCer- und EhLPPG-stimulierten DCs in einem Tiermodell für das Hepatozelluläre Karzinoma (HCC) in Mdr2ko-Mäusen	74

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Anti-human Antikörper	23
Tab. 2: Anti-Maus Antikörper	24
Tab. 3: Stimulanzen	25
Tab. 4: Verwendete Mausstämmen	26

Abkürzungsverzeichnis

α	anti (teilweise abweichend alpha)
α -C-GalCer	alpha-glykolisiertes Galactosylceramid
α GalCer	alpha-Galactosylceramid
μ	mikro
Abb.	Abbildung
ALA	Amöbenleberabszess
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigen-presenting cell Antigen-präsentierende Zelle
ASC	Asymptomatische E. histolytica Carrier
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMM	Bone marrow macrophage Knochenmarksmakrophage
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Bref A	Brefeldin A
BSA	<i>bovine serum albumin</i> Rinderserum
C	Kohlenstoff
°C	Grad
CBA	Cytometric Bead Array
CCL2	C-C Motiv Chemokin Ligand 2
CD	cluster of differentiation
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DC	<i>dendritic cell</i> Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelnegativ
DP	doppelpositiv
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EhLPPG</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> Lipopeptidphosphoglykan
<i>EhPI</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> Phosphatidylinositol
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
F	Frauen
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> Fötales Kälberserum
FSC	Foward Scatter Vorwärtsstreulicht
g	gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	hora Stunde
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
HCC	Hepatocellular Carcinoma Hepatozelluläres Karzinom
i.p.	intraperitoneal
IFN γ	Interferon gamma
IL-	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>

inf.	infiziert
iNKT	invariante Natürliche Killer T Zelle
L	Liter
M	Männer
m	männlich
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
mAb	monoclonal Antibody monoklonaler Antikörper
MACS	Magnet-activated cell sorting
MAIT	<i>mucosal-activated invariant</i> T Zelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 alpha
MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein 1 beta
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mm ²	Quadratmilimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light chain enhancer</i> auf B-Zellen
NK	Natürliche Killer Zelle
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
o.g.	oben genannt
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear cells Periphere Blut Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate Balanced Saline
PLZF	Promyelocytic leukaemia zinc finger protein
PMA	Phorbol-12-Myristat 13-Acetat
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – Reaktive Sauerstoffmoleküle
PRR	Pattern recognition receptors
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.c.	subkutan
SAP	Signaling lymphocyte activation molecule adaptor protein
SLAM	Signaling lymphocyte activation molecule
SSC	Side Scatter Seitstreulicht
Tab.	Tabelle
TcR	<i>T cell receptor</i> T-Zellrezeptor
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TY	Trypticase Yeast
w	weiblich
μ g	mikrogramm

1. Einleitung

1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort von Männern und Frauen

Männer und Frauen sind anders, nicht nur anatomisch, sondern auch in Bezug auf ihre Suszeptibilität gegenüber bestimmten Erkrankungen. Gründe für diese Geschlechtsdimorphismen sind kulturell- und verhaltensbedingte Unterschiede in der Exposition gegenüber bestimmten Erregern, sowie genetische und hormonelle Faktoren (van Lunzen and Altfeld, 2014). Einige Studien legen nahe, dass dieser Geschlechtsunterschied in der unterschiedlichen Immunantwort von Frauen und Männern begründet ist und Geschlechtshormone einen modulierenden Effekt auf die Entwicklung und Reifung von Immunzellen, auf die Regulation von immunologischen Signalwegen und die Expression von X-Chromosom-kodierten Genen der Immunantwort gegenüber Pathogenen haben können (Bouman et al., 2004; Fish, 2008; Klein, 2012; van Lunzen and Altfeld, 2014).

Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Immunantwort von Männern und Frauen sind wahrscheinlich einer der Hauptgründe, warum Männer im Allgemeinen häufiger von Infektionskrankheiten betroffen sind, insbesondere von bakteriell-, viral- oder parasitär-bedingten Infektionserkrankungen, wie Tuberkulose, Hepatitis C und Amöbiasis (Bernin and Lotter, 2014; Bouman et al., 2004; Klein, 2012). Auch bestimmte Tumorarten treten häufiger bei Männern auf als bei Frauen (Hepatozelluläre Karzinoma, Ösophaguskarzinoma und Lungenkarzinoma (Robert Koch Institut, 2009/2010)). Frauen hingegen reagieren auf Vakzinierungen und verschiedene Infektionserreger mit einer verstärkten Immunantwort mit dem Nebeneffekt, dass sie anfälliger für humoral- und Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen sind, wie Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis und systemischer Lupus erythematodes (Bouman et al., 2004).

Geschlechtsspezifische Forschung ist ein bisher nicht ausreichend abgedecktes Forschungsgebiet. Für viele Tierversuche wurden bisher überwiegend weibliche Versuchstiere verwendet, während an klinischen Studien überproportional mehr Männer teilnehmen als Frauen (Pollitzer, 2013). Dabei wäre es wichtig, geschlechtsspezifische Wirtsfaktoren für eine individualisierte Behandlung in Betracht zu ziehen. Daher ist es nötig, die grundlegenden geschlechtsspezifischen Unterschiede in der angeborenen und adaptiven Immunantwort, die zum einen in der Quantität bestimmter Immunzellen als auch in der Qualität und Vielfalt der Zytokinproduktion in Antwort auf aktivierende Stimuli begründet sein können, zu untersuchen und zu verstehen.

1.2 Amöbiasis

Der Amöbenleberabszess (ALA) ist eines der besten Beispiele für einen Geschlechtsdimorphismus, denn Männer sind häufiger von dieser Erkrankung betroffen als Frauen. *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*, SCHAUDINN, 1903) ist ein pathogener Protozoon und der Erreger der Amöbiasis. Nach Malaria und Schistosomiasis ist Amöbiasis eine der wichtigsten Parasitosen, von der jährlich zwischen 50 000 bis 100 000 Menschen bedroht sind (WHO/PAHA/UNESCO, 1997). Der Mensch ist neben einigen wenigen Affenarten der primäre Wirt von *E. histolytica* (van Lunzen et al., 1996). *E. histolytica* ist weltweit verbreitet, besonders an Orten mit mangelnder Hygiene und schlechter sanitärer Versorgung. Infektionen sind durch kontaminiertes Wasser und Lebensmittel möglich (Denis

and Chadee, 1989a). *E. histolytica*-Infektionen sind endemisch in Mexiko, Indien, Südafrika und einigen südamerikanischen und asiatisch-pazifischen Ländern (Wertheim, 2012, Abb. 1)).

Die Infektion erfolgt durch fäkal-orale Aufnahme von vierkernigen Zysten. Die säureresistenten Zysten passieren den Magen, exzystieren im unteren Dünndarm und entwickeln sich zu achtkernigen Trophozoiten, die sich durch Kern- und Plasmateilungen zu einkernigen Trophozoiten weiterentwickeln und den oberen Teil des Dickdarms besiedeln (Marshall et al., 1997). Dort können sie als Kommensale leben, ohne das Wirtsgewebe zu verletzen, und vermehren sich asexuell durch Zweiteilung. Im unteren Dickdarm können die Trophozoiten erneut einzystieren. Die Zysten werden über den Stuhl ausgeschieden und können bei erneuter Aufnahme durch einen Wirt neue Infektionen auslösen.

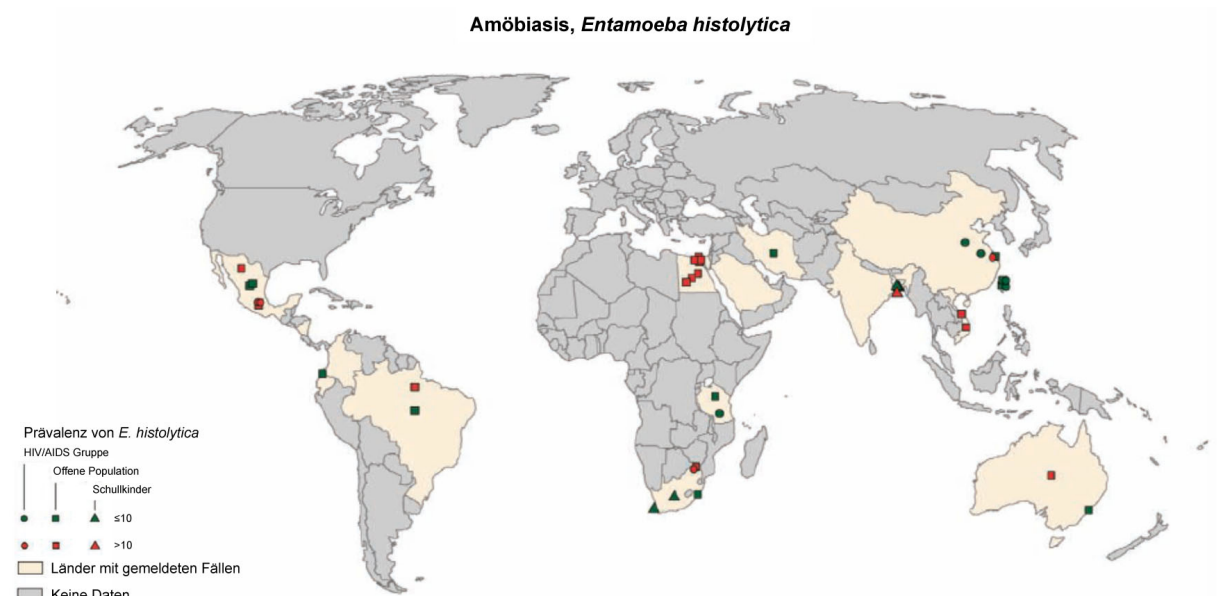


Abb. 1: Verbreitung von *E. histolytica*. *E. histolytica*-Infektionen sind endemisch in Mexiko, Indien, Südafrika und einigen südamerikanischen und asiatisch-pazifischen Ländern (modifiziert nach (Wertheim et al., 2012)).

1.2.1 Krankheitsbild und Therapie

In den häufigsten Fällen entwickelt sich eine *E. histolytica*-Infektion inapparent. Nur ca. 10% aller Personen, in deren Stuhl Zysten von *E. histolytica* nachgewiesen werden, entwickeln eine invasiv-intestinale Erkrankung, die Amöbenkolitis. Bei dieser Form der Amöbiasis werden Trophozoiten invasiv und dringen in die Darmmukosa ein, was zu massiven Gewebeverletzungen führen kann (Stanley, 2003). Typische Symptome der Amöbenkolitis sind Bauchschmerzen und starke, teils blutige Durchfälle (Burchard and Tannich, 2004). In <1% der Fälle können Trophozoiten mit dem Blutstrom in weitere Organe gelangen. Diese extraintestinale Verlaufsform führt zur Entstehung von Abszessen in den betroffenen Organen. Die häufigste Form der extraintestinalen Amöbiasis ist mit 95% der Amöbenleberabszess (ALA). Hier entstehen fokale Läsionen im Leberparenchym. Symptome sind Fieber und Schmerzen im rechten Oberbauch (Burchard and Tannich, 2004).

Durch eine frühe Diagnose, adäquate Behandlung und durch die beachtliche Regenerationsfähigkeit der Leber können Amöbenleberabszesse komplett ausheilen. Unbehandelt gehen Amöbenleberabszesse mit einer hohen Letalität einher. Gegen die intestinale Amöbiasis werden

Kontaktamöbizide eingesetzt, die nur im Darmlumen wirken, wie Furamid und Paromomycin. Gegen die intestinale und extraintestinale Amöbiasis werden systemisch wirkende Nitroimidazol-Derivate, wie Metronidazol, Ornidazol und Tinidazol, gefolgt von einem Kontaktamöbizid zur Eliminierung der Darmlumenformen verabreicht (Burchard and Tannich, 2004; Haque et al., 2003; Powell, 1969). Metronidazol führt innerhalb von 10 Tagen zu einer Elimination der Amöben, indem unter anaeroben Bedingungen Nitroradikale entstehen, welche DNA, Proteine und Lipide des Parasiten schädigen. Da sich nach einer Amöbeninfektion keine ausreichende Immunität entwickelt, sind Reinfektionen möglich.

1.2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Amöbenleberabszess

Obwohl *E. histolytica*-Infektionen in Frauen und Kindern eine höhere Prävalenz aufweisen, sind Männer viel häufiger von Amöbenleberabszessen betroffen (über 80%) (Blessmann et al., 2003a; Blessmann et al., 2002). Dieser Geschlechtsdimorphismus ist unabhängig von ethnischen oder kulturellen Faktoren, denn auch Reisende können bei ihrem Besuch in endemische Länder infiziert werden und einen ALA entwickeln (Acuna-Soto et al., 2000; McGarr et al., 2003; Shandera et al., 1998; Walderich et al., 1997). Die Männer-zu-Frauen-Rate beträgt in dieser Erkrankung ungefähr 7:1. Interessanterweise steigt mit dem Alter und dem Eintritt in die Pubertät das Risiko für Männer, an einem ALA zu erkranken, an und erreicht einen Höhepunkt zwischen dem 30.-50. Lebensjahr. Die Zunahme und Abnahme der Amöbenleberabszesserkrankungen korreliert mit den Serumwerten des männlichen Geschlechtshormons Testosteron (Travison et al., 2007) und könnte somit die Entstehung des ALA beeinflussen.

Darüber hinaus ist bekannt, dass bei der Entstehung des ALA neben Parasiten-spezifischen Effektormolekülen (Bruchhaus et al., 2003; Leippe and Muller-Eberhard, 1994; Petri, 1996) auch immunpathologische Prozesse verantwortlich sind. Da bisher nur wenige immunologische Untersuchungen im Menschen durchgeführt wurden, behilft man sich zum Studium des ALA bestimmter Kleintiermodelle (Hasen, Hamster und Wüstenrennmäuse), bei denen *E. histolytica* Trophozoiten intrahepatisch injiziert werden (Bos and van de Griend, 1977; Chadee and Meerovitch, 1984; Fastag de Shor et al., 1972; Lushbaugh et al., 1978). Aufgrund mangelnder immunologischer Werkzeuge ist jedoch das Studium des ALA in diesen Modellen limitiert. Seit 2006 ermöglicht ein immunkompetentes Mausmodell in C57BL/6-Mäusen das Studium der Entwicklung des ALA auch in Hinblick auf den Geschlechtsdimorphismus (Lotter et al., 2006). Wie auch im Menschen sind männliche Mäuse suszeptibler für Amöbenleberabszesse. Auch histologisch gleicht das Tiermodell der Situation im Menschen. Abszesse sind charakterisiert durch die Infiltration von Neutrophilen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und aktivierten CD68⁺ Makrophagen (Ventura-Juarez et al., 2003). Im Tiermodell waren darüber hinaus auch Natürliche Killer (NK) Zellen, $\gamma\delta$ T Zellen und Natürliche Killer T (NKT) Zellen im Abszess nachweisbar (Lotter et al., 2006). Testosteron-Behandlung von zuvor resistenten weiblichen Mäusen führte zu größeren Läsionen und einer höheren Parasitenlast. Umgekehrt führte Gonadektomie von männlichen Tieren und der einhergehenden Mangel an Testosteron, wie auch im weiblichen Tier, zu kleineren Läsionen (Lotter et al., 2013).

Durch die Sekretion von Interferon (IFN) γ spielen NKT Zellen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des ALA (Lotter et al., 2009; Seydel et al., 2000). Mäusen, denen NKT Zellen (CD1d^{-/-}) oder invariante

NKT Zellen ($J\alpha 18^{-/-}$) fehlen, können die Abszessentwicklung schlechter kontrollieren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass $IFN\gamma$ zudem durch die Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten eine erhöhte amöbicide Aktivität und Zytotoxizität gegenüber *E. histolytica* vermittelt (Denis and Chadee, 1989b). Auch Neutralisation von $IFN\gamma$ oder Inhibition des $IFN\gamma$ -Rezeptors führen dazu, dass weibliche Tiere die Abszessentwicklung nicht mehr kontrollieren können (Lotter et al., 2006).

Bei näherer Betrachtung der Produktion von $IFN\gamma$ durch NKT Zellen zeigte sich, dass NKT Zellen weiblicher Tiere nach Stimulation mit α Galactosyl-Ceramid (α GalCer; s. Abschnitt 1.3.3.1) und einem Lipophospholipid aus der Membran von *E. histolytica* (*EhLPPG*; s. Abschnitt 1.3.3.1) signifikant mehr $IFN\gamma$ produzieren, was mit den anderen Ergebnissen den Schluss nahe legt, dass NKT Zell-produziertes $IFN\gamma$ in weiblichen Tieren protektiv wirkt. Dieses Ergebnis wird verstärkt durch die Tatsache, dass kastrierte männliche Tiere einen Anstieg in der $IFN\gamma$ -Produktion aufweisen (Lotter et al., 2013). Außerdem führte die Behandlung von Tieren mit α GalCer und *EhLPPG* vor intrahepatischer Injektion mit *E. histolytica* Trophozoiten zu signifikant kleineren Abszessen (Lotter et al., 2009).

Weibliche Tiere bzw. Frauen können die ALA-Entwicklung besser kontrollieren, dennoch blieb bisher die Frage offen, warum männliche Tiere bzw. Männer anfälliger sind und schwerwiegendere Gewebeschädigungen davontragen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass inflammatorische Monozyten und Kupferzellen über die Produktion des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) α die Schädigung des Leberparenchyms vermitteln (Bernin et al., 2013).

Anhand dieser Daten scheinen Unterschiede in der frühen Zytokinsekretion, der Rekrutierung von bestimmten Immunzellen, sowie Geschlechtshormone entscheidenden Einfluss auf den Geschlechtsdimorphismus zu haben (Bernin et al., 2013; Bernin et al., 2014 im Druck; Lotter et al., 2009; Lotter et al., 2006).

Da die zugrunde liegenden geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Qualität der Zytokinsekretion und der Quantität der Immunzellen im Menschen, auch im Bezug auf den ALA, noch nicht ausreichend erforscht sind, sollten diese in verschiedenen Immunzellpopulationen, jedoch insbesondere in NKT Zellen des Menschen, untersucht werden.

1.3 Natürliche Killer T Zellen

Allgemein wird das Immunsystem in zwei Komponenten unterteilt, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören unter anderem dendritische Zellen (*dendritic cells* – DC), Makrophagen, Natürliche Killer (NK) Zellen, eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten. In der frühen Phase eines Pathogenbefalls oder in der Anfangsphase einer Erkrankung sind diese Zellen bei der Entscheidung über die Art der Immunantwort von entscheidender Bedeutung.

Das adaptive Immunsystem besteht aus T- und B-Lymphozyten. T-Lymphozyten spielen eine Rolle bei der Zell-Zell-vermittelten Immunantwort und B-Lymphozyten bei der humoralen Immunantwort. Das adaptive Immunsystem ist in der späten Phase einer Infektion vermehrt aktiv (Abbas et al., 2010).

Für manche Zellen ist jedoch nicht ganz klar, zu welcher Komponente der Immunantwort sie gehören, weil diese Zellen Eigenschaften sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort vereinen. Hierzu zählen z.B. verschiedene Subpopulationen von $\gamma\delta$ Zellen, Marginale Zone (MZ) B-Zellen, *mucosal-associated invariant T* (MAIT) Zellen und invariante Natürliche Killer T (iNKT) Zellen (Van Kaer et al., 2011). In diesem Abschnitt soll besonders auf iNKT Zellen eingegangen werden.

1.3.1 Definition

NKT Zellen sind eine Subpopulation von T-Zellen, die sowohl Oberflächenmarker charakteristisch für T-Zellen als auch NK Zellen exprimieren (Bendelac et al., 2007; Godfrey et al., 2004; Taniguchi et al., 2003). Konventionelle T-Zellen und NKT Zellen exprimieren beide T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptor* (TcR)), jedoch im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen, die Proteinantigene durch Präsentation von *major histocompatibility complex* (MHC) I und II erkennen, reagieren NKT Zellen mit Lipid- oder Glykolipidantigenen, die durch das MHC I-ähnliche CD1d präsentiert werden. Das Glykoprotein CD1d wird hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen und antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen oder Makrophagen und CD4⁺CD8⁺ Thymozyten exprimiert (Van Kaer et al., 2011).

Man unterscheidet drei NKT Zell-Typen: NKT-ähnliche Zellen, die für ihre Reifung und Reaktivität nicht CD1d-restringiert sind, variante NKT Zellen, die viele verschiedene TcR exprimieren können wie konventionelle T Zellen und invariante NKT (iNKT) Zellen, die einen semi-invarianten TcR exprimieren, der spezifisch Glykolipide durch Präsentation durch CD1d erkennt (Godfrey et al., 2004). Im Folgenden soll es nur um iNKT Zellen und ihre Eigenschaften gehen.

iNKT Zellen weisen Oberflächenmarker der NK Zelllinie auf, in Mäusen NK1.1 und CD161 im Menschen, sowie verschiedene, meist inhibitorische Oberflächenmarker der Ly49-Familie. Außerdem exprimieren iNKT Zellen konstitutiv CD25, CD69 und CD122, Marker charakteristisch für Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen.

Der semi-invariante TcR der iNKT Zellen entsteht aus V(D)J-Kettenrearrangement und besteht aus einer V α 24-J α 18 und V β 11 Kette im Menschen und aus einer V α 14-J α 18 und V β 8 Kette in der Maus. iNKT Zellen sind in zahlreichen Orten des Körpers nachweisbar: im Blut, in der Milz, der Leber und im Knochenmark. Ihre Anzahl im Gewebe und in den Lymphknoten ist sehr gering. Darüber hinaus weisen Menschen weniger iNKT Zellen in den meisten Organen auf als Mäuse. Im Menschen konnten iNKT Zell-Frequenzen im peripheren Blut von 0,01-5,15% (Crough et al., 2004; Fereidouni et al., 2010; Jing et al., 2007; Kee et al., 2012; Molling et al., 2005; Montoya et al., 2007; Sandberg et al., 2003; Snyder-Cappione et al., 2010) nachgewiesen werden. Dies macht deutlich, dass humane iNKT Zellen sehr stark Individuen-abhängig variieren können. Außerdem zeigten einige Studien, dass die iNKT-Frequenz in Männern und Frauen unterschiedlich ist und Frauen mehr iNKT Zellen im peripheren Blut aufweisen als Männer (Kee et al., 2012; Molling et al., 2005; Montoya et al., 2007; Sandberg et al., 2003). Andere Studien hingegen fanden keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in der iNKT-Frequenz (Fereidouni et al., 2010; Jing et al., 2007; Snyder-Cappione et al., 2010). In humaner Leber sind bis zu 0,5% iNKT Zellen (Kenna et al., 2003). In der Maus sind ca. 0,5% iNKT Zellen im Blut und peripheren Lymphknoten, 2,5% in der Milz und bis zu 30% in der Leber (Bendelac et al., 2007).

1.3.2 Entwicklung von iNKT Zellen

Die Entwicklung von iNKT Zellen des Menschen und der Maus findet wie bei konventionellen T-Zellen im Thymus durch positive und negative Selektion statt. Die positive Selektion erfolgt durch die Interaktion von $CD4^+CD8^+$ (doppelpositiven – DP) Thymozyten, die einen semi-invarianten TcR exprimieren (Vorläufer iNKT Zellen), mit CD1d. Die Expression von CD1d scheint sehr wichtig, denn in CD1d-defizienten Mäusen können keine iNKT Zellen nachgewiesen werden (Bendelac et al., 2007) (Godfrey and Berzins, 2007). Außerdem muss CD1d auch von anderen Zellen außer den kortikalen Thymusepithelzellen exprimiert werden, die für die normale Selektion von MHC I-restringierten T-Zellen zuständig sind, wie z.B. kortikalen Thymozyten. Es zeigte sich, dass auch die positive Selektion durch CD1d-exprimierende DP Thymozyten Einfluss auf die positive Selektion von iNKT Zellen hat. Dies ist ein Mechanismus, der für die Selektion von T-Zellpopulationen, die durch nicht-klassische MHC I Moleküle selektiert werden, wie H2-M3 und Qa1, weit verbreitet ist (Rodgers and Cook, 2005). Diese Co-Signale, die zwischen zwei DP Thymozyten entstehen, sind von Bedeutung für die Entwicklung von iNKT Zellen.

Zum einen gehört dazu das Signaling durch Rezeptoren der *Signalling lymphocytic activation molecule* (SLAM)-Familie und Aktivierung dieser durch das SLAM Adapterprotein (SAP). In Mäusen und auch in Patienten mit SAP-Defekt fehlen iNKT Zellen (Chung et al., 2005; Ma et al., 2007; Nichols et al., 2005; Pasquier et al., 2005). Zum anderen ist der Transkriptionsfaktor Promyelozytische Leukämische Zinkfingermotiv (*promyelocytic leukemia zinc finger* – PLZF) essentiell für den Erwerb von angeborenen Effektorfunktionen und die Expansion (Kovalovsky et al., 2008; Van Kaer et al., 2011). Darüber hinaus zeigten Studien mit Mäusen, die Defekte im intrazellulären CD1d Trafficking und der Lipidantigenbeladung aufwiesen, dass die positive Selektion von iNKT Zellen die Präsentation eines Lipid-Selbstantigens durch CD1d erfordert (Bendelac et al., 2007). In Mäusen wurde das iGb3 identifiziert, ein Glykosphingolipid, das im Thymus exprimiert wird. Jedoch zeigten andere Studien, dass das Fehlen der iGb3-Synthetase, welches wichtig für die iGb3-Synthese ist, keine Defekte in der iNKT Zellentwicklung herbeiführt (Porubsky et al., 2007). Im Menschen wird die iGb3-Synthase nicht exprimiert (Christiansen et al., 2008). Bisher ist somit nicht bekannt, welches endogene Antigen oder welche endogenen Antigene für die iNKT Zell-Selektion verantwortlich sind.

Nach der Entwicklung im Thymus migrieren der Hauptteil der iNKT Zellen in Abhängigkeit von IL-15 in die Peripherie und nur ein kleiner Teil verbleibt als reife iNKT Zellen im Thymus (Matsuda et al., 2002; Van Kaer et al., 2011).

1.3.3 Aktivierung von iNKT Zellen

iNKT Zellen können auf zwei Wegen aktiviert werden: direkt oder indirekt. Die direkte Aktivierung von iNKT Zellen erfolgt durch Lipid- oder Glykolipidantigene, die von CD1d-exprimierenden Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells* – APC) präsentiert werden und mit dem invarianten TcR der iNKT Zellen interagieren (Abb. 2, a). Die indirekte Aktivierung von iNKT Zellen wird über *toll-like receptor* (TLR) Agonisten und Zytokine (Interleukin (IL)-12, IL-18 und $IFN\alpha/\beta$) vermittelt. Hier ist manchmal auch eine Ko-Stimulation des invarianten TcR durch endogene Glykolipide für die optimale Aktivierung involviert (Abb. 2, b) (Van Kaer et al., 2011).

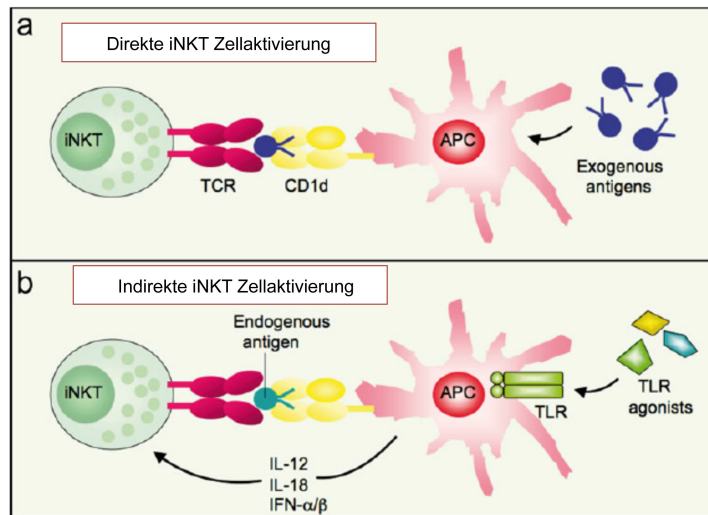


Abb. 2: Direkte und indirekte iNKT Zellaktivierung. Direkte iNKT Zell Aktivierung (a) erfolgt durch Lipid- oder Glykolipidantigene, die von CD1d präsentiert werden und mit dem invarianten TcR der iNKT Zellen interagieren (Abb. X, a). Die indirekte Aktivierung von iNKT Zellen wird über *toll-like receptor* (TLR) Agonisten und Zytokine (IL-12, IL-18 und IFN α/β) vermittelt. Eine zusätzliche Stimulation des invarianten TcR durch endogene Glykolipide ist für die Aktivierung manchmal auch involviert. (modifiziert nach van Kaer 2011).

1.3.3.1 Direkte Aktivierung

Die direkte Aktivierung der iNKT Zellen wird über das CD1d-Molekül vermittelt. CD1d ist ein konserviertes, nicht polymorphisches MHC I-ähnliches Molekül und gehört zu der Familie der CD1-Moleküle. Allgemein gibt es fünf CD1 Isoformen im Menschen (CD1a-e), in der Maus eine homologe CD1d Isoform. Allen Isoformen ist gemein, dass sie Lipidantigene für nicht MHC-restringierte T-Zellen präsentieren (Anderson et al., 2013; Brennan et al., 2013). Die Struktur des CD1 umfasst eine schwere Kette mit extrazellulärer Antigenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Teil für intrazelluläres Trafficking. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einem MHC mit zwei anti-parallelen α -Helices ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), flankiert von einem sechs-strängigen α -Blatt. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Helix wird außerdem durch die $\alpha 3$ -Helix verstärkt, welche nicht-kovalent an das $\beta 2$ Microglobulin ($\beta 2m$) gebunden ist (Abb. 3, modifiziert nach (Girardi and Zajonc, 2012)). Die Bindungsgrube der CD1-Familie kann zwei bis vier so genannte *pockets* umfassen. CD1d weist zwei *pockets* auf, eine A' und F' *pocket* (Ly and Moody, 2014). Das CD1d-Molekül kann viele verschiedene Verbindungen präsentieren: darunter Sphingolipide, Diacylglycerole und hydrophobe Peptide (Moody et al., 2005). Einer der bekanntesten CD1d-Liganden ist das α Galactosyl-Ceramid (α GalCer, syntetisches Analog KRN7000) (Abb. 4), welches aus dem marinen Schwamm *Agelas mauritanus*, während eines Screenings zur Suche nach chemischen Molekülen mit anti-metastatischer Aktivität in Mäusen, isoliert wurde (Kawano et al., 1997). α GalCer besteht aus einer α -Galaktose mit einer Acyl- und Sphingosinkette am anomeren Zentrum (Veerapen et al., 2010). Neuere Studien legen nahe, dass α GalCer eigentlich von Bakterien der Gattung *Novosphingobium* (früher *Sphingomonas*) stammt, die den Schwamm besiedeln. Denn in *Novosphingobium* spp. wurden einige Glykolipide isoliert, die dem α GalCer strukturell sehr ähnlich sind (Kinjo et al., 2005; Mattner et al., 2005). Auch in anderen Bakterienarten konnten Glykolipide mit iNKT-stimulierender Aktivität nachgewiesen werden, in *Ehrlichia* Bakterien und *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger

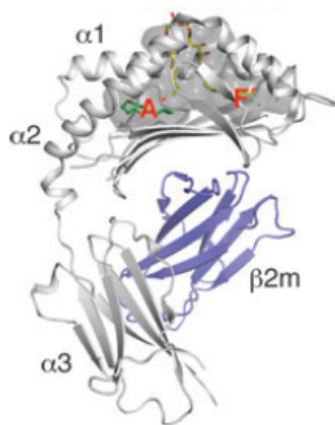


Abb. 3: CD1d-Molekül. CD1d besteht aus drei α -Helices (grau) und einem $\beta 2$ -Microglobulin (lila), sowie einer A' und F' *pocket* (rot) (modifiziert nach Girardi 2012).

et al., 2005). Einer der bekanntesten CD1d-Liganden ist das α Galactosyl-Ceramid (α GalCer, syntetisches Analog KRN7000) (Abb. 4), welches aus dem marinen Schwamm *Agelas mauritanus*, während eines Screenings zur Suche nach chemischen Molekülen mit anti-metastatischer Aktivität in Mäusen, isoliert wurde (Kawano et al., 1997). α GalCer besteht aus einer α -Galaktose mit einer Acyl- und Sphingosinkette am anomeren Zentrum (Veerapen et al., 2010). Neuere Studien legen nahe, dass α GalCer eigentlich von Bakterien der Gattung *Novosphingobium* (früher *Sphingomonas*) stammt, die den Schwamm besiedeln. Denn in *Novosphingobium* spp. wurden einige Glykolipide isoliert, die dem α GalCer strukturell sehr ähnlich sind (Kinjo et al., 2005; Mattner et al., 2005). Auch in anderen Bakterienarten konnten Glykolipide mit iNKT-stimulierender Aktivität nachgewiesen werden, in *Ehrlichia* Bakterien und *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger

der Lyme-Borreliose (Kinjo et al., 2006). Murine und humane iNKT Zellen lassen sich jedoch nicht nur durch bakterielle Glykolipide stimulieren, sondern auch durch Phospholipide, *lyso*-Phospholipide, Gangliosid GD3 aus Tumoren, Lipophosphoglykanen aus *Leishmania donovani* und dem Lipopeptidphosphoglycan aus der Membran von *E. histolytica* (Amprey et al., 2004; Fox et al., 2009; Gumperz et al., 2000; Lotter et al., 2009; Wu et al., 2003). Das *E. histolytica* Lipopeptidphosphoglycan (*EhLPPG*) ist über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Membran fixiert, der dem α GalCer strukturell sehr ähnelt (Elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt *EhLPPG*-Detektion mittels anti-*EhLPPG* Antikörpern (modifiziert nach (Marinets et al., 1997)(Abb. 4). Strukturanalysen zeigten auch, dass ein $\text{Gal}_1\text{Man}_2\text{GlcN}$ -myo-inositol-Motiv mit einem Phosphoserin-Rückgrat verknüpft ist, welches durch eine Kohlenhydrat-Kette mit der Struktur $[\text{Glc}\alpha 1-6](n)\text{Glc}\beta 1-6\text{Gal}$ substituiert ist (extrazellulärer Zuckerrest). Dieser Polysachharidrest ist über $\alpha 1-6$ Bindungen an das Polypeptid gebunden (Moody-Haupt et al., 2000).

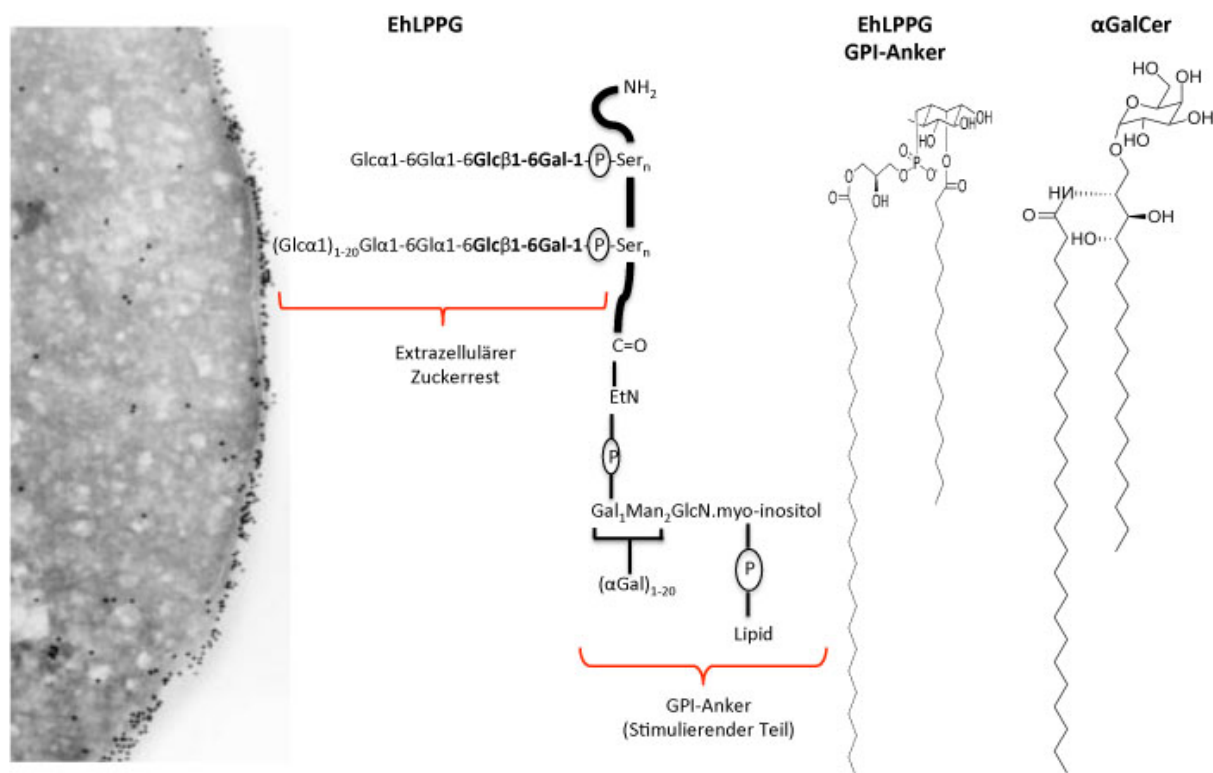


Abb. 4: Struktur des α GalCer und *EhLPPG*. *EhLPPG* aus der Membran von *E. histolytica* besteht aus einem extrazellulären Zuckerrest und einem GPI-Anker, der hauptsächlich für die Aktivierung von iNKT Zellen zuständig ist. Der *EhLPPG* GPI-Anker ist dem α GalCer strukturell sehr ähnlich (Bildnachweis: Marinets 1997).

Der GPI-Anker des *EhLPPG*, ein diacetyliertes Phosphoinositol (PI), auch *EhPIb* genannt, kann iNKT Zellen aktivieren. Im Unterschied zu α GalCer wird *EhLPPG* nicht direkt auf CD1d-Moleküle geladen, sondern muss in Lysosomen oder späten Endosomen prozessiert und dort auf CD1d geladen werden. Außerdem ist die iNKT Zellaktivierung durch *EhLPPG* auch abhängig von TLR-Stimulation und Sekretion von IL-12 durch Antigen-präsentierende Zellen (s. 1.3.3.2) (Lotter et al., 2009).

1.3.3.2 Indirekte Aktivierung

Es wurde schon erwähnt, dass die indirekte Aktivierung von iNKT Zellen über TLR Agonisten und Zytokine, wie IL-12, IL-18 und IFN α/β vermittelt wird. Dies bedeutet, dass iNKT Zellen auch durch Mikroorganismen aktiviert werden können, die keine Glykolipidantigene aufweisen. Die indirekte Aktivierung von iNKT Zellen wurde als erstes für das Bakterium *Salmonella typhimurium* beschrieben, das Lipopolysaccharide (LPS) in seiner Zellwand aufweist (Brigl et al., 2003). Hier zeigte sich, dass die Stimulierung von DC mit *Salmonella* oder Salmonellen-LPS allein IFN γ -Produktion in iNKT Zellen auslöste und diese Aktivierung abhängig war von TLR4-, CD1d-Expression und IL-12-Produktion von DC, sowie der Präsentation von endogenen Glykolipiden. Auch andere bakterielle LPS, wie von *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* können durch zusätzliche Zytokinproduktion von IL-12 und IL-18 und durch Induktion der CD1d-Expression in DC iNKT Zellen aktivieren (Nagarajan and Kronenberg, 2007; Raghuraman et al., 2006). Diese Studien zeigen, dass die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells* – APC) via *pattern recognition receptors* (PRR), wie TLRs, zu einer Zytokinproduktion führen kann, die mit oder ohne gleichzeitige Stimulation mit endogenen Glykolipiden und der Stimulation des CD1d iNKT Zellen aktiviert (Matsuda et al., 2008; Tupin et al., 2007). Besonders interessant ist hierbei auch, dass Studien zeigen konnten, dass TLR Agonisten die Lipidbiosynthese modulieren können und somit Lipidantigene verändern, die auf CD1d geladen werden und damit auch die iNKT Zellaktivierung beeinflussen können (Muindi et al., 2010; Salio et al., 2007). Wie oben erwähnt benötigt EhLPPG für die optimale Stimulation von iNKT Zellen zum einen die Präsentation über CD1d (direkt), aber zum anderen auch TLR-Stimulation und IL-12 (indirekt). Somit ist die Aktivierung von iNKT mit EhLPPG ein Hybrid zwischen direkter und indirekter iNKT-Aktivierung und ein Beispiel dafür, dass die Grenzen zwischen diesen beiden Aktivierungsarten fließend sein können und sich gegenseitig nicht ausschließen. Untersuchungen mit APCs von Mäusen, die Knockouts für MyD88, TLR2 und TLR6 aufwiesen, induzierten kein IFN γ in iNKT Zellen nach EhLPPG-Stimulation. Auch die Produktion von IL-12 war für die optimale Aktivierung von iNKT Zellen durch EhLPPG nötig. APC von Mäusen mit nicht-funktionellem IL-12 (IL-12p40 $^{-/-}$ Mäusen) konnten iNKT Zellen nach EhLPPG-Stimulation nicht mehr aktivieren (Lotter, 2009 #41).

1.3.4 Effektorfunktionen von iNKT Zellen

Eine besondere Eigenschaft der iNKT Zellen ist, dass sie nach ihrer Aktivierung rasch und in großen Mengen Zytokine produzieren können, die pro-inflammatorisch oder anti-inflammatorisch wirken. Zahlreiche Studien belegen, dass das Zytokinrepertoire sowohl in humanen als auch murinen iNKT Zellen folgende Zytokine und Chemokine umfassen kann: IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IL-22, *Tumor growth factor* (TGF) β , *Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor* (GMCSF), *Macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α und MIP-1 β (Mallevaey and Selvanantham, 2012; Reilly et al., 2010) (Bendelac et al., 2007; Godfrey et al., 2010). Es können somit Zytokine der Th1-, Th2- und auch Th17-Anwort produziert werden. Die Zytokinproduktion ist dabei zusätzlich Organ-spezifisch, abhängig von der Aktivierungsart, dem stimulierenden Lipidantigen und Geschlechtshormonen (Gourdy et al., 2005; Lotter et al., 2013; Van Kaer et al., 2011). Studien konnten zeigen, dass iNKT Zellen weiblicher Mäuse mehr IFN γ produzieren als iNKT Zellen männlicher Mäuse. Grund dafür ist,

dass das weibliche Geschlechtshormon Östrogen die IFN γ -Produktion von iNKT Zellen *in vitro* und *in vivo* selektiv verstärken kann. Dieser Geschlechtsunterschied wurde in Östrogenrezeptor-defizienten Mäusen und weiblichen Mäusen, die einer Ovariectomie unterzogen wurden, aufgehoben (Gourdy et al., 2005). Die geringe IFN γ -Produktion von iNKT Zellen männlicher Tiere ist auf das männliche Geschlechtshormon, Testosteron zurückzuführen. Dementsprechend inhibierte die Substitution von weiblichen Tieren mit Testosteron die IFN γ -Produktion von iNKT Zellen (Lotter et al., 2013).

Auch die Subpopulationen der iNKT Zellen weisen funktionelle Unterschiede auf. Bei Menschen produzieren CD4⁺ iNKT Zellen Th1- und Th2-Zytokine, während CD4⁻ iNKT Zellen nur Th1-Zytokine sezernieren. Bei Mäusen produzieren CD4⁺ und CD4⁻CD8⁻ iNKT Zellen zusätzlich Th2-Zytokine, wie IL-4 (La Cava et al., 2006). Aktivierungsmarker der iNKT Zellen sind CD25 und CD69. Die vor allem sehr schnelle Produktion von IFN γ und IL-4 von iNKT Zellen nach Stimulation liegt an der konstitutiven Expression von mRNA dieser beiden Zytokine (Matsuda et al., 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften können iNKT Zellen immunregulatorisch wirken. In erster Linie durch Transaktivierung von anderen angeborenen und adaptiven Immunzellen. iNKT Zellen können DC und Makrophagen anregen, IL-12, TNF α und IFN γ zu produzieren. Das IL-12 wiederum kann NK Zellen aktivieren IFN γ zu produzieren. Außerdem induzieren iNKT Zellen die Expression von ko-stimulierenden Molekülen in B-Zellen, welche helfen, das Überleben von Plasmazellen zu verlängern. iNKT Zellen können auch Neutrophile rekrutieren und konventionelle T-Zellen und regulatorische T-Zellen transaktivieren (Van Kaer et al., 2011). Diese Beispiele zeigen deutlich, dass iNKT Zellen Immunantworten maßgebend mitgestalten können.

Aufgrund dessen ist die Rolle von iNKT Zellen in vielen Erkrankungen auch sehr unterschiedlich und kann von protektiv, immunsuppressiv bis Toleranz-induzierend sein. Protektiv wirken iNKT Zellen bei Infektionen mit *Ehrlichia*, *Novosphingobium* und *Borrelia* (Van Kaer et al., 2011), bei der Kontrolle des Amöbenleberabszesses ausgelöst durch *E. histolytica* (Lotter et al., 2009), sowie bei anderen Erkrankungen durch Bakterien, Pilze und Viren, die keine iNKT-spezifischen Lipidantigene aufweisen. Außerdem vermitteln iNKT Zellen Toleranz in Modellen für Toleranz gegenüber Lebertransplantaten, oraler Toleranz und verhindern die Entstehung von Transplantat-Wirt-Abstoßungsreaktionen (Nowak and Stein-Streilein, 2007; Pillai et al., 2007).

Eine pathogene oder immunsuppressive Rolle wird iNKT Zellen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Rheumathoider Arthritis, Systemischer Lupus erythematoses, sowie Asthma, Concavalin A-induzierten Lebererkrankungen und *Chlamydia muridanum*-Infektionen zugesprochen (Van Kaer et al., 2011). Der Einfluss von iNKT Zellen ist außerdem Mausstamm-abhängig. In einem Modell für das Respiratorische-Synzytial-Virus, schützten iNKT Zellen in BALB/c Mäusen, jedoch verschlechterten sie das Krankheitsbild in C57BL/6 Mäusen (Johnson et al., 2002). Immunpathologien entstehen wahrscheinlich durch iNKT Zellen-produzierte Zytokine, die andere Immunzellen transaktivieren.

Darüber hinaus können aktivierte iNKT Zellen noch einen zytotoxischen Phänotyp ausbilden und Perforin, Granzyme und FasL exprimieren, welches iNKT Zellen ermöglicht in Zielzellen Apoptose auszulösen (Van Kaer et al., 2011).

1.3.5 iNKT Zellen als Target für Immuntherapien

iNKT Zellen sind aufgrund ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten geeignete Zielzellen für Immuntherapien. Die Aktivierung von iNKT Zellen und der Einsatz von Glykolipiden können auf verschiedenen Wegen für die Beeinflussung von Erkrankungen nutzbar gemacht werden.

Zunächst verwendet man bisher für Immuntherapien hauptsächlich die pro-inflammatorischen Eigenschaften der iNKT Zellen, z.B. durch Applikation von Th1-stimulierenden iNKT Zell-Liganden (Abb. 5 (1), modifiziert nach (Pilonis et al., 2012)), wie α GalCer oder seiner Analoga. Hier zeigte sich z.B. in Tiermodellen der Malaria, dass die Applikation von α GalCer oder seines C-glykosylierten Analogs α -C-GalCer vermittelt durch $\text{IFN}\gamma$, eine starke anti-Malaria-Immunantwort auslöste und verhinderte, dass Sporoziten in das Leberstadium übergehen konnten (Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2000; Schmiege et al., 2003). Auch in einem Modell für ein T-Zelllymphom konnte die Applikation eines weiteren α GalCer-Analogs, des β -Glucosyl-Ceramids (β GluCer) eine erhöhte Zytotoxizität gegen Tumorzellen induzieren und die Metastasenentwicklung inhibieren (Inafuku et al., 2012). Ein weiterer Weg iNKT Zellen zu aktivieren kann über die Stimulierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) mit einem Glykolipid erfolgen (Abb. 5 (2)). Hierbei wird im Menschen über Leukopherese CD14^+ Monozyten isoliert und *ex vivo* zu APC generiert, mit Glykolipiden stimuliert und diese stimulierten APC über eine Infusion dem Patienten verabreicht. In zahlreichen Studien sowohl im Menschen als auch in Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von α GalCer-stimulierten APC eine vermehrte iNKT Zellproliferation, mit gleichzeitigem Anstieg der $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration und der Anzahl an tumor-infiltrierenden Lymphozyten in verschiedenen Tumormodellen induziert, in einem B16-Melanoma-Mausmodell (Fujii et al., 2002), einem Lebertumor-Mausmodell (Toura et al., 1999) und in Patienten mit Kopf- und Nackentumoren (Kurosaki et al., 2011), sowie in Patienten mit anderen Tumorarten (Nieda et al., 2004).

Professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie DC sind nicht die einzigen Zellen, die für die Präsentation von Glykolipiden genutzt werden können. Auch CD1d -exprimierende Tumorzellen (Abb. 5 (3)), die zuvor aus Tumorpatienten isoliert wurden, können mit Glykolipiden stimuliert werden. Shimizu et al. 2007 zeigte, dass B16-Tumorzellen beladen mit α GalCer eine stärkere $\text{IFN}\gamma$ -Produktion auslösten als α GalCer-stimulierte DC und dass solch beladene Tumorzellen keine Tumore mehr auslösten (Shimizu et al., 2007).

Die Kombinationstherapie, z.B. bestehend aus einer Kombination aus der Aktivierung von iNKT und Immun-, Chemo- oder Radiotherapie, ist eine weitere Therapiemöglichkeit (Abb. 5 (4)). In Patienten wurde gezeigt, dass die Gabe von α GalCer-beladenen APC vor der chirurgischen Resektion eines Lungentumors zu einem Anstieg an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und einer verstärkten $\text{IFN}\gamma$ -Produktion führte (Nagato et al., 2012). Auch in Patienten mit Kopf- und Nackenkarzinom zeigte eine Kombinationstherapie, bestehend aus α GalCer-beladenen APC und *in vitro* expandierten $\text{V}\alpha 24$ iNKT Zellen, die intraarteriell appliziert wurden, eine verbesserte Antitumorantwort (Kunii et al., 2009). In einem Modell für Tuberkulose, ausgelöst durch *Mycobacterium tuberculosis*, konnte die Applikation von α GalCer und Isoniazid das Bakteriumwachstum in behandelten Mäusen stärker senken als α GalCer allein (Sada-Ovalle et al., 2010).

Ein Glykolipid als Adjuvant für Vakzine zu benutzen (Abb. 5 (5)), um protektive Immunantworten zu verstärken, wurde schon für α GalCer gezeigt (Cerundolo et al., 2009; Shimizu et al., 2007) (Enomoto et al., 2007; Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2002). Die Applikation von α GalCer und bestrahlten Malaria-Sporozoiten oder eines rekombinanten Malaria-Antigen-exprimierenden Viruses verstärkte die protektive Anti-Malaria-Immunität und beweist eine Adjuvantsfunktion von iNKT Zellen (Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2002). Auch die nasale Applikation von α GalCer mit einem Influenza Virus-Antigen schützte Mäuse vor einer Influenza-Infektion (Ko et al., 2005).

Da iNKT Zellen nicht in jeder Erkrankung eine protektive Wirkung aufweisen, kann auch die Inhibition von regulatorischen iNKT Zellen mittels eines gegen CD1d-gerichteten Antikörpers eine Therapieform darstellen (Abb. 5 (6)). Studien zeigten, dass zumindest in einigen Modellen, iNKT Zellen regulatorische Funktionen übernehmen und Immunantworten supprimieren können (Pilonis et al., 2009). Manche Tumore können anscheinend CD1d-Liganden sezernieren und Antitumorantworten von iNKT Zellen beeinflussen (Webb et al., 2008).

Hier zeigt sich, dass die Aktivierung oder Inhibition von iNKT Zellen zahlreiche Möglichkeiten für die Therapie von infektiösen Erkrankungen, Autoimmun- und Tumorerkrankungen bietet und die Grenzen der Möglichkeiten noch nicht ausgereizt sind.

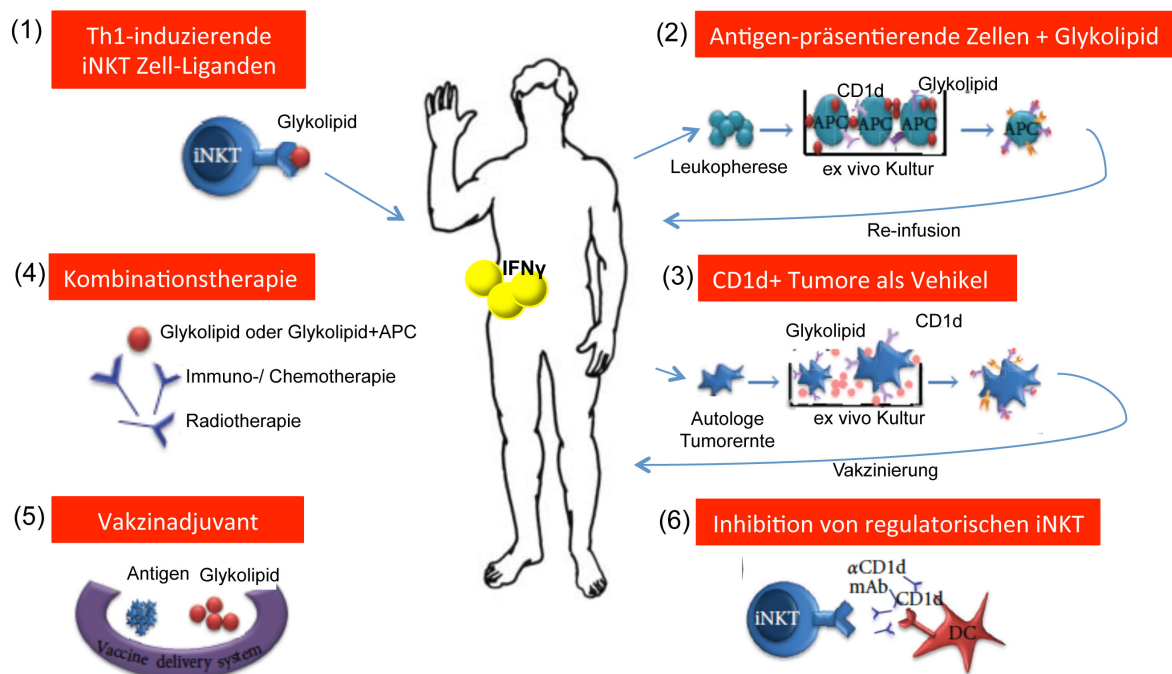


Abb. 5: Immuntherapeutische Anwendungen von iNKT Zellen. iNKT Zellen können auf verschiedenen Wegen immuntherapeutisch genutzt werden: (1) durch Applikation von Th1-induzierenden iNKT Zell-Liganden, (2) durch Applikation von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) stimuliert mit Glykolipiden, die zuvor mittels Leukopherese isoliert und in einer ex vivo Kultur zu APC generiert wurden und (3) durch Re-infusion von CD1d⁺ Tumorzellen als Vehikel, die aus Tumorpatienten autolog isoliert und mit Glykolipiden beladen wurden. (4) Durch die zusätzliche Aktivierung von iNKT Zellen in einer Kombinationstherapie mit gleichzeitiger Immuno-, Chemo- oder Radiotherapie oder (5) als Vakzinadjuvant und (6) durch Inhibition von regulatorischen iNKT mit anti-CD1d-Antikörpern (modifiziert nach Pilonis 2012).

1.4 Zielsetzung

In vielen Erkrankungen gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede, doch es ist nicht genau bekannt, worin diese begründet sind. Die Quantität von angeborenen und adaptiven Immunzellen sowie die Qualität der Zytokinproduktion und viele weitere Faktoren haben Einfluss auf die Suszeptibilität von Männern und Frauen gegenüber bestimmten Erkrankungen. Der geschlechtsspezifische Unterschied in der Entwicklung des Amöbenleberabszesses wird im Mausmodell in weiblichen Tieren durch protektiv-wirkendes IFN γ von iNKT Zellen und in männlichen Tieren durch Testosteron und eine erhöhte Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten vermittelt (Bernin et al., 2013).

Die Erkenntnisse aus Tiermodellen helfen geschlechtsspezifische Unterschiede in bestimmten Erkrankungen zu verstehen, aber auch neue Therapieansätze für die Behandlung dieser und anderer Erkrankungen zu finden.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, inwiefern sich humane Immunzellen des angeborenen Immunsystems und auch murine iNKT Zellen in ihrer Frequenz, aber auch in ihrem Zytokinprofil nach α GalCer und *Eh*LPPG-Stimulation, geschlechtsspezifisch unterscheiden. Wegen der iNKT Zell-aktivierenden Eigenschaften des *Eh*LPPGs und des immuntherapeutischen Potentials von iNKT Zellen sollte darüber hinaus die iNKT Zell-aktivierende Fähigkeit von vier synthetischen Analoga der *Eh*PI-Anker des *Eh*LPPGs in humanen und murinen iNKT Zellen getestet werden, um später eventuell diese Analoga als Immuntherapeutikum nutzbar zu machen. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Erkrankungsmodellen für infektiöse und Tumorerkrankungen sollte der Einfluss des nativen *Eh*LPPGs untersucht werden. Somit gliedert sich die Arbeit in vier Themenbereiche:

1. Charakterisierung der geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Frequenzen peripherer humaner Immunzellen und des Zytokinprofils humaner iNKT Zellen nach α GalCer und *Eh*LPPG-Stimulation.
2. Geschlechtsspezifische Analyse der Frequenzen und des Zytokinprofils muriner iNKT Zellen der Leber nach Stimulation mit α GalCer und *Eh*LPPG.
3. Bestimmung der Zytokinproduktion humaner und muriner iNKT Zellen nach Stimulation mit synthetischen *Eh*PI Analoga.
4. Analyse des Einflusses von *Eh*LPPG auf verschiedene Erkrankungsmodelle:
 - 4.1 Anti-Leishmanien-Aktivität von *Eh*LPPG in einem Modell für die *in vitro* Infektion von Makrophagen mit *Leishmania major* und in einem *in vivo* Mausmodell für die kutane Leishmaniose
 - 4.2 Antitumoraktivität von *Eh*LPPG in einem induzierbaren Mausmodell für das Mammakarzinom in WAP-T-NP8 Mäusen
 - 4.3 Antitumoraktivität von *Eh*LPPG in einem Mausmodell für das Hepatozelluläre Karzinom in Mdr2ko-Mäusen

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Ascorbinsäure
 Bovines Serum Albumin (BSA)
 Brefeldin A
 Diamond Vitamin Tween 80 Lösung
 Fötale Kälberserum (FCS)
 Gentamycin
 GM-CSF-enthaltender Überstand
 transfizierter X63-mGM-CSF Hybridom-Zellen
 Hefeextrakt
 IMDM
 Isofluran Forene® 100% (v/v)
 L-Glutamin
 M-CSF-enthaltender Überstand der
 Fibroblasten-Zelllinie L929
 Penicillin/Streptomycin
 Rinderserum
 RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)
 Trypticase Pepton
 X-VIVO™ 15 (mit Gentamycin)

VWR Internation GmbH
 SERVA Electrophoresis GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 JRH Biosciences
 PAA Laboratories GmbH
 PAA Laboratories GmbH
 BNITM, Abteilung Immunologie

Becton Dickinson
 Sigma Aldrich
 Abbot GmbH & Co. KG
 PAA Laboratories GmbH
 BNITM, AG Clos

PAA Laboratories GmbH
 PAA Laboratories GmbH
 Gibco by Life Technologies
 Becton Dickinson
 Lonza Group Ltd.

2.1.2 Kits und Reagenzien

Bicoll
 CBA
 DPBS
 ELISA IFN γ murin
 Fixable Viability Dye eFluor® 506
 Fixation Buffer
 Pan T Cell Isolation Kit II, mouse
 Perm/Wash-Puffer (10x)
 Trypanblau 0,4%

Biochrom AG
 BD Biosciences
 PAN
 R&D Systems
 ebioscience
 BioLegend
 Miltenyi Biotec (MACS)
 BioLegend
 Gibco by Life Technologies

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial des normalen Laborbedarfs werden nicht separat aufgeführt.

8-well chamber slides
 BD Microtainer® SST™ Tubes
 Costar Cluster Tubes
 FACS-Röhrchen
 High-Binding 96-Well ELISA Mikrotiterplatte
 Kryokonservierungsröhrchen
 MACS® Separation Columns LS
 Multi-Adapter für S-Monovette®
 Petrischale für Zellkultur
 S-Monovette®
 Tissue Culture Plates 6-Well Flat bottom
 Venenpunktionsbesteck Venofix A 19G

Nunc®
 BD Biosciences
 Fisher Scientific
 Sarstedt
 Greiner bio-one
 Carl Roth GmbH
 Miltenyi Biotec
 Sarstedt
 Sarstedt
 Sarstedt
 Sarstedt
 B. Braun

2.1.4 Geräte

Geräte des normalen Laborbedarfs werden nicht separat aufgeführt.

Accuri® C6 Flow Cytometer	BD Biosciences
Cobas Integra® 400 Plus Analyzer	Roche
ClinScan 7 T MRT	Bruker
ELISA-Reader MRXII	Dynex Technologies
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf
FACS Aria™ III	BD Biosciences
FACS Calibur™	BD Biosciences
FACS LSR II	BD Biosciences
Sonorex Super Ultraschallbad	Bandelin

2.1.5 Antikörper und Isotyp-Kontrollen

Folgende anti-human und -Maus Antikörper wurden für die durchflusszytometrischen Analysen verwendet.

2.1.5.1 Anti-human Antikörper

Aufgelistete anti-human Antikörper wurden für die durchflusszytometrische Analyse von PBMC verwendet (s. Tab. 1).

Tab. 1: Anti-human Antikörper

Name	Klon	Konjugat	Verwendung	Hersteller
Anti-human TNF α	Mab11	FITC	FACS	BioLegend
Anti-human IL-4	MP4-25D2	PE	FACS	BioLegend
Anti-human IFN γ	4S.B3	PE-Cy7	FACS	BioLegend
Anti-human IL-17A	BL168	BV421	FACS	BioLegend
Anti-human CD3	UCHT1	PerCP	FACS	BioLegend
Anti-human CD4	RPA-T4	AF700	FACS	BioLegend
Anti-human CD8 α	RPA-T8	APC-Cy7	FACS	BioLegend
Anti-human TCR V α 24-J α 18	6B11	APC	FACS	BioLegend
Anti-human CD14	M5E2	AF700	FACS	BioLegend
Anti-human CD16	3G8	PerCP	FACS	BioLegend
Anti-human CD16	3G8	APC-Cy7	FACS	BioLegend
Anti-human CD56	HCD56	PE/Cy7	FACS	BioLegend
Mouse IgG1 kappa iso ctrl	MOPC-21	FITC	FACS	BioLegend
Rat IgG1, kappa iso ctrl	RTK2071	PE	FACS	BioLegend
Mouse IgG1, kappa iso ctrl	MOPC-21	PE-Cy7	FACS	BioLegend
Mouse IgG1 iso ctrl	MOPC-21	BV421	FACS	BioLegend

2.1.5.2 Anti-Maus Antikörper

Folgende anti-Maus Antikörper wurden für die durchflusszytometrischen Analyse von murinen Zellen verwendet (s. Tab. 2).

Tab. 2: Anti-Maus Antikörper

Name	Klon	Konjugat	Verwendung	Hersteller
CD3	145-2C11	FITC	FACS, Sort	BioLegend
CD4	RM4-5	APC	FACS, Sort	BioLegend
CD80	160A1	FITC	FACS	BD Bioscience
CD86	GL1	PE	FACS	BD Bioscience
CD11c	N418	APC	FACS	BioLegend
α GalCer-CD1d-Tetramer	PBS-57	PE	FACS, Sort	NIH
Unloaded-CD1d-Tetramer		PE	FACS, Sort	NIH

2.1.6 Medium und Zusätze

In dieser Arbeit wurden folgende Kulturmedien und Zusätze verwendet:

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM):

55% IMDM (ohne Glutamin), 10% inaktiviertes FCS (30 min, 56°C), 5% Pferdeserum, 30% ÜS von L929 Zellen, 20µg/ml Gentamycin

TY-I-S-33-Medium (TY-Medium)(Diamond et al., 1987):

Inkomplettes TY: 80 g Trypticase, 40 g Hefeextrakt, 40 g Glucose, 8 g NaCl, 4 g K₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄, 4 g L-Cystein, 0,8 g Ascorbinsäure, 91,2 mg Fe-Ammoniumcitrat, ad. 3480 ml Aqua bidest, pH 6,8 mit NaOH eingestellt, autoklaviert; 400 ml TY-I-S-33-Medium zum Komplettieren (komplettes TY-Medium) mit 50 ml inaktiviertem Rinderserum (2x 30 min bei 56°C), 15 ml Vitamin-Mix *Diamond Vitamin Tween 80*, 60 mg Streptomycin und 50 mg Penicillin versetzen.

RPMI-Medium:

500 ml RPMI 1640, 50 ml FCS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Natriumpyruvat, 500 µl β-Mercaptoethanol (Stock: 100 ml 0,9% NaCl+70 µl β-Mercaptoethanol), 2,5 ml Gentamycin (50µg/ml)

X-VIVO™ 15-Medium:

50 ml X-VIVO™ 15 Medium, 500 µl Penicillin/Streptomycin (Stock: 100x)

2.1.8 Puffer und Lösungen

In dieser Arbeit wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet.

ELISA-Substratlösung:

200 µl TMB Stammlösung (6 mg TMB/ml DMSO), 1,2 µl H₂O₂ (30%), 12 ml ELISA-Substratpuffer

ELISA-Substratpuffer:

0,1 M Phosphat pH 5,5, 15,6 g NaH₂PO₄x 2 H₂O in 500 ml H₂O_{bidest} lösen, pH 5,5 einstellen, add. 1 l H₂O_{bidest}

ELISA-TMB-Stammlösung:

30 mg Tetramethylbenzidin (TMB), 5 ml DMSO

FACS-Puffer:

990 ml 1x PBS, 10 ml FCS (1%), 0,5-1g NaN₃ (0,1%)

NaPBS (10x):

23,86 g Na₂HPO₄x2H₂O (67mM), 10,28g NaH₂PO₄x2H₂O (33mM), 163,6 g NaCl (1,4 M) in 2 l H₂O_{bidest} lösen, pH auf 6,8 einstellen

PBS (20x):

8 g KCl, 8 g KH₂HPO₄, 46 g Na₂HPO₄, 320 g NaCl, add 2 l H₂O_{bidest}

PBS/1% BSA:

5 g BSA auf 500 ml 1x PBS, steril filtrieren und in Aliquots bei -20°C aufbewahren

Pan T-Zell-Puffer:

200 ml 1x PBS, pH 7,2, 1g BSA (0,5%), 800 µl 0,5M EDTA (2mM), steril filtriert

2.1.7 Stimulanzen

In dieser Arbeit wurden folgende Stimulanzen verwendet (s. Tab. 3).

Tab. 3: Stimulanzen

Stimulanz	Konzentration	Hersteller
Maus anti-human CD28 unkonjugiert	0,5 mg/ml	BD Biosciences
PMA	0,5 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie
Ionomycin	1 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie
α GalCer	1 mg/ml	Alexis/Enzo
<i>EhLPPG9</i>	1 mg/ml	BNITM
<i>EhLPPG10</i>	1 mg/ml	BNITM
<i>EhLPPG11</i>	1 mg/ml	BNITM
<i>EhLPPG12</i>	1 mg/ml	BNITM
<i>EhPIa</i> C30:1 cis	1 mg/ml	Prof. Yukari Fujimoto, Keio University, Prof. Koichi Fukase, Universität Osaka, Japan
<i>EhPIb</i> C30:1 cis	1 mg/ml	Prof. Yukari Fujimoto, Keio University, Prof. Koichi Fukase, Universität Osaka, Japan
<i>EhPIb</i> C30:1 trans	1 mg/ml	Prof. Yukari Fujimoto, Keio University, Prof. Koichi Fukase, Universität Osaka, Japan
<i>EhPIb</i> C28:0	1 mg/ml	Prof. Yukari Fujimoto, Keio University, Prof. Koichi Fukase, Universität Osaka, Japan

In allen Experimenten, in denen die Stimulanzen α GalCer, *EhLPPG* und synthetische *EhPI* Analoga (*EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 trans, *EhPIb* C28:0) eingesetzt worden sind, wurden diese für 10 min im Ultraschallbad (Sonorex Super, Bedelin) beschallt, um Mizellenbildung zu verhindern.

2.1.8 *Entamoeba histolytica*

Systematik:

Domäne: Eukaryota
 Stamm: Amoebozoa
 Klasse: Archamoeba
 Gattung: *Entamoeba*
 Art: *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903)

In dieser Arbeit wurde für die Isolierung des *Entamoeba histolytica* Lipopeptidphosphoglykans (*EhLPPG*) der virulente Klon B2 der *E. histolytica*-Zelllinie B verwendet, der im Rahmen der Dissertation von Dr. Jenny Matthiesen generiert wurde. Die Zelllinie B des BNI (Biller et al., 2009) entstand aus dem ursprünglichen Kultursolat HM-1:IMSS (*American Type Culture Collection* (ATCC), Katalog-Nummer 30459). Charakteristisch für die Zelllinie B ist eine hohe Pathogenität sowohl im Tiermodell der Wüstenrennmaus als auch im immunkompetenten Tiermodell der C57BL/6-Maus. Die Zelllinie B und ihre Klone wurden seit ihrer Isolierung durchgängig in axenischer, mikroaerophiler Kultur ohne Wirtspassage gehalten, was ihre Pathogenität jedoch nicht beeinflusst hat.

2.1.9 Mäuse

Systematik:

Domäne: Eukaryota
 Stamm: Chordata
 Klasse: Mammalia
 Ordnung: Rodentia
 Überfamilie: Muroidae
 Familie: Muridae
 Unterfamilie: Murinae
 Gattung: *Mus*
 Art: *Mus musculus* (LINNAEUS, 1958)

Die Tierversuche wurden unter den Voraussetzungen nach §8 des Tierschutzgesetzes Deutschland durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg genehmigt (48/12; 46/13; 133/13). In Tab. 4 sind die verwendeten Mausstämme aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Mausstämme

Mausstamm	Hintergrund	bezogen von	Phänotyp
C57BL/6J	-	Hauszucht BNI	Wildtyp
TgV α 14-J α 18	C57BL/6J	Hauszucht BNI	Erhöhte Anzahl an NKT Zellen
BALB/c	-	Hauszucht BNI	Wildtyp
WAP-T-NP8	BALB/c	Dr. Florian Wegwitz, Prof. Wolfgang Deppert, UKE	Expression des SV40 large Tumorantigens, Bildung eines duktales Mammakarzinoms (Schulze-Garg et al., 2000)
FVB/N	-	Dr. Gabriele Sass, Dr. Roja Barikbin, UKE	Wildtyp Inzuchtstamm für Transgen-Analysen (Taketo et al., 1991)
FVB.129P2-Abcb4 ^{tm1Bor} (Mdr2-Knock out (Mdr2ko))	FVB/N	Dr. Gabriele Sass, Dr. Roja Barikbin, UKE	Homozygote Mutation des Abcb4 ^{tm1Bor} , Gallenstau führt zur Hepatozellulären Karzinoma-Bildung

2.1.10 Software

Die folgende Software wurde für diese Arbeit benutzt:

FACSDiva™	BD Biosciences
FlowJo 7.6.3	Treestar
OsiriX DICOM Viewer	www.osirix-viewer.com
(Open-Source Version 3.7.1 32-bit)	
PRISM®5 for Mac OSX	GraphPad Software Inc.

2.2 Spenderzellen und -gewebe

Die Versuche zur Bestimmung der Immunzellfrequenzen im Menschen und der intrazellulären Zytokinproduktion von iNKT Zellen wurden mit humanen mononukleären Blutzellen (PMBC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden entweder angereicherte Lymphozytenfilme (*Buffy coats*, zur Verfügung gestellt von der Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) oder frisch isolierte PBMC aus Spenderblut verwendet.

Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigt (PV3551). Mononukleäre Zellen aus Lebergewebe wurden aus Gewebespenden in Zusammenarbeit mit Prof. Jakob Izbicki, Prof. Daniel Perez und Dr. Alexander El Gammal (Allgemeine Viszeral- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) unter der Genehmigung der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer (WF-053/13) isoliert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *E. histolytica*

Der pathogene *E. histolytica*-Klon B2 wurde in kompletten TY-I-S-33-Medium (TY-Medium) (Diamond et al., 1978) bei 37°C mit maximal 5% O₂ in Kulturflaschen kultiviert. Die Kultivierung der Amöben wurde von Dr. Jenny Matthiesen durchgeführt und die benötigten Amöben für die *Eh*LPPG-Isolierung von ihr zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Kryokonservierung eukaryotischer Primärzellen

Humane oder murine Primärzellen, die nicht sofort verwendet wurden, wurden kryokonserviert. Die Isolierung und Kultivierung der Zellen fand unter sterilen Bedingungen statt. Eukaryotische Zellen können über einen langen Zeitraum bei -196°C in flüssigem Stickstoff konserviert werden. Zellen wurden bei 1200 rpm, 4°C, 8 min sedimentiert und in FCS mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen in den Zellen. Die Zellen wurden anschließend in Kryo-Reaktionsgefäßen langsam in Schritten von 1°C pro Minute auf -80°C heruntergekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Weiterverwendung der Zellen wurde diese wie folgt aufgetaut: Die Zellen wurden dem Stickstoff entnommen, in der Hand leicht angetaut und zügig in 10 ml RPMI-Medium (murine Zellen) oder in 10 ml X-VIVO™ 15-Medium (humane Zellen) resuspendiert und bei 1200 rpm, 4°C, 8 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde noch einmal mit 5 ml RPMI-Medium oder X-VIVO™ 15-Medium gewaschen, um DMSO-Reste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für *in vitro*-Stimulationsassays verwendet (s. 2.3.10).

2.3.3 Isolierung von Leukozyten aus eukaryotischem Gewebe und Blut

Zur Verwendung und Analyse verschiedener eukaryotischer Leukozyten-Populationen wurden diese aus humanem Blut und Leber oder aus Knochenmark, Leber und Milz von Mäusen isoliert.

2.3.3.1 Isolierung von Leukozyten aus humanem Blut

Die Isolierung von humanen Leukozyten, auch peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMC), erfolgte aus Buffy coats (angereicherter Lymphozytenfilm) oder frischem Spenderblut in Heparin-Blutentnahmeröhrchen. 15 ml Blut wurden mit 15 ml sterilem PBS temperiert auf RT 1:2 verdünnt. 15 ml Biocoll wurden vorsichtig mit 30 ml Blut/PBS-Suspension überschichtet und für 30 min, RT bei 1500 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation entstehen vier Phasen (von oben nach unten): eine gelbliche Plasmaphase, eine trübe Leukozyten- und Thrombozytenphase, eine klare Ficollphase und eine rote Erythrozytenphase. Die gelbliche Plasmaphase wurde bis auf 1-2 cm des

trüben Leukozytenrings abgenommen und verworfen. Im Anschluss wurde die trübe Leukozytenphase komplett abgenommen und in neues 50 ml-Falcon überführt. Hierbei wurden immer zwei Fraktionen in ein 50 ml-Falcon gepoolt. Die 50 ml-Falcons wurden mit kaltem sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 1200 rpm, 4°C, 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das 50 ml-Falcon waagrecht gehalten und Thrombozyten mit einer 1000µl-Pipette entfernt. Leukozyten-Pellets wurden in 1 ml sterilem PBS resuspendiert, gepoolt, mit 20 ml sterilem PBS aufgefüllt und bei 1200 rpm, 4°C, 12 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand erneut dekantiert, Thrombozyten entfernt und das Zellpellet in 1 ml X-VIVO™ 15-Medium oder sterilem PBS resuspendiert. Die PBMC wurden für *in vitro*-Stimulationsassays verwendet (s. 2.3.10).

2.3.3.2 Isolierung von Leukozyten aus humaner Leber

Die Isolierung von humanen Leukozyten erfolgte aus Resektionsmaterial der Leber, welches von Patienten, die sich einer invasiven Behandlung maligner und benigner Tumore und einer Resektion der Leber bedurften, entnommen wurde. Ungefähr 1 g Lebergewebe wurde in 20 ml sterilem PBS aufgenommen. Anschließend wurde das Lebergewebe mit Hilfe eines 70 µm Falcon-Siebs auf einem 50 ml-Falcon zerrieben und mit 10 ml kaltem sterilem PBS nachgespült. Die Zellen wurden bei 1200 rpm, 4°C, 8 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml 80% Percoll™ (5 ml 100% Percoll™ (1 Teil Percoll™ + 1 Teil 10x PBS) + 1,25 ml X-VIVO™ 15-Medium, RT) resuspendiert und in ein 15 ml-Falcon überführt. Die 80%-Percoll™-Zellsuspension wurde anschließend vorsichtig mit 5 ml 40% Percoll™ (2,5 ml 100% Percoll™ + 3,75 ml VIVO™ 15-Medium) überschichtet. Der so entstandene Gradient wurde im Anschluss bei 2000 rpm, 21°C, 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere gelb-braune Schicht zügig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde der Lymphozytenring abgenommen und in ein neues 15 ml-Falcon überführt, auf 10 ml mit kaltem sterilem PBS aufgefüllt und bei 1200 rpm, 4°C, 8 min sedimentiert. Die humanen Lebergewebe wurden für die Durchflusszytometrie verwendet (s. 2.3.5).

2.3.3.3 Isolierung von Leukozyten aus murinem Knochenmark

Zur Generierung von Dendritischen Zellen (*dendritic cells* – DC) wurden Leukozyten aus dem Knochenmark benötigt. Hierzu wurden Femur und Tibia der Hinterbeine freipräpariert. Die Knochen wurden zum Sterilisieren für 2 min in 70% Isopropanol eingelegt. Anschließend wurden die Enden der Knochen mit einer sterilen Schere entfernt und diese mit Hilfe einer feinen Kanüle mit RPMI-Medium durchgespült. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falcon überführt und für 5-10 min auf Eis stehen gelassen, damit Knochenbestandteile absinken. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml-Falcon überführt und bei 1200 rpm, 4°C, 8 min sedimentiert. Die Zellen wurden zur Generierung von Dendritischen Zellen aus murinen Knochenmarkszellen (s. Abschnitt 2.3.8) verwendet.

2.3.3.4 Isolierung von Leukozyten aus murinem Milzgewebe

Zur Analyse der Zytokinproduktion von T-Zellen *in vitro* und zur Aufreinigung von Pan T-Zellen, sowie zur Sortierung nicht-konventioneller T-Zellpopulationen wurden murine Milzzellen benötigt. Die Milz wurde entfernt und in kaltem RPMI aufgenommen. Mit Hilfe einer Kanüle wurde die Milz mit RPMI-

Medium so lange durchspült bis sie eine helle Färbung angenommen hatte. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falcon überführt und bei 1200 rpm, 4°C, 8 min pelletiert. Die Milzzellen wurden entweder für Pan T-Isolierung (s. 2.3.9) oder für *in vitro*-Stimulationsassays (s. 2.3.10) verwendet.

2.3.3.5 Isolierung von Leukozyten aus murinem Lebergewebe

Zur Analyse der Zytokinproduktion von T-Zellen *in vitro* und zur Aufreinigung von Pan T-Zellen, sowie zur Sortierung nicht-konventioneller T-Zellpopulationen wurden murine Leberzellen benötigt. Die komplette Leber wurde entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in kaltem PBS aufbewahrt. Anschließend wurde das Lebergewebe mit Hilfe eines 70 µm Falcon-Siebs auf einem 50 ml-Falcon zerrieben und mit 10 ml kaltem PBS nachgespült. Die Zellen wurden bei 1200 rpm, 4°C, 8 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml 80% Percoll™ (5 ml 100% Percoll™ (1 Teil Percoll™ + 1 Teil 10x PBS) + 1,25 ml RPMI-Medium, RT) resuspendiert und in ein 15 ml-Falcon überführt. Die 80% Percoll™-Zellsuspension wurde anschließend vorsichtig mit 5 ml 40% Percoll™ (2,5 ml 100% Percoll™ + 3,75 ml RPMI-Medium) überschichtet. Der so entstandene Gradient wurde im Anschluss bei 2000 rpm, 21°C, 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere gelb-braune Schicht zügig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde der Lymphozytenring abgenommen und in ein neues 15 ml-Falcon überführt, auf 10 ml mit kaltem PBS aufgefüllt und bei 1200 rpm, 4°C, 8 min sedimentiert. Die Leberzellen wurden entweder für Pan T-Isolierung (s. 2.3.9) oder für *in vitro*-Stimulationsassays (s. 2.3.10) verwendet.

2.3.4 Zellzahlbestimmung

Vor der Verwendung von humanen oder murinen Zellen wurde deren Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm², Marienfeld, Deutschland) bestimmt. Je 10 µl einer Zellsuspension von geeigneter Verdünnung (1:10 bis 1:100) in Trypanblau (Trypanblau 0,4%, Gibco, 1:10 verdünnt in 1x PBS) wurden verwendet, vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl pro ml mit folgender Rechnung bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl eines Großquadrates/ausgezählte Großquadrate}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Verwendung von Trypanblau ermöglichte gleichzeitig die Unterscheidung lebender und toter Zellen. Dieser Farbstoff gelangt ausschließlich in tote Zellen, wodurch diese blau erscheinen während lebendige Zellen transparent bleiben. Zur Zellzahlbestimmung wurden jeweils nur lebendige Zellen gezählt.

2.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) genannt, ist ein Verfahren zur quantitativen und qualitativen Analyse von Zellen mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper. Die Analyse der Zellen beruht darauf, dass die markierten Zellen in einem Hüllstrom vereinzelt von einem Laserstrahl erfasst werden, es kommt zur Lichtstreuung sowie zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren.

Man erhält für jeden Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal. Außerdem lässt sich, unabhängig vom gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, eine Aussage über die Größe der Zelle und deren Granularität treffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Messungen mit dem Accuri® C6, FACS LSR II, FACSCalibur™ oder FACSAria II (alle BD Biosciences) vorgenommen.

Während der Messung wurden zunächst die Leukozyten im SSC-A (*Sidescatter*, Seitwärtsstreulicht) und im FSC-A (*Forwardscatter*, Vorwärtsstreulicht) nach ihrer Granularität und Größe aufgeteilt. Dies ermöglicht den Ausschluss von Zelldetritus, Partikeln und kleinen Zellen, wie Erythrozyten im Probengemisch. Anschließend wurden durch Auftragung der Zellen von SSC-A gegen SSC-H Zelldoubletten ausgeschlossen. Bei dieser Auftragung liegen alle Einzelzellen in einer Diagonale. Sie wurden eingegrenzt und einer Lebend-Tot-Diskriminierung mit Hilfe eines Vitalfarbstoffes (Fixable Viability Dye eFluor® 506, eBioscience) unterzogen, der tote Zellen anfärbt. Nur lebende Zellen wurden für die Analyse verwendet. Nach dieser Vorselektion wurden die Zellen anhand ihrer Fluoreszenz-Markierungen mittels Antikörper weiter analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CFlow®Plus ANALYSIS, FACSDiva™ (BD Biosciences) und FlowJo (Treestar). Die hierfür verwendeten Antikörper sind unter Abschnitt 2.1.5 aufgeführt. Die jeweilige Analyse-Strategie zur Identifizierung der spezifischen Färbungen sind im Ergebnisteil beschrieben.

2.3.6 Antikörper-Färbung von Oberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie

Zur Analyse von humanen und murinen Immunzellen hinsichtlich der Expression von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie wurde das Zellsediment in 1-10 ml kaltem FACS-Puffer gelöst und bei 1400 rpm, 4°C, 4 min erneut sedimentiert. Pro Färbung wurden 5×10^5 - 2×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, erneut bei 1400 rpm, 4°C, 4 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Für die Lebend-Tot-Färbung wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer gelöst und 1 µl 1:10 verdünntes Fixable Viability Dye eFluor 506 (eBioscience) hinzugegeben und für 15 min, RT, dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl FACS-Puffer gewaschen und bei 1400 rpm, 4°C, 4 min sedimentiert. Handelte es sich um murine Zellen wurden diese Zellen in 50-100 µl Fc-Block-Lösung für 15-20 min bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen der Zellen an den Fc-Teil der Antikörper zu verhindern. Humane Zellen wurden nicht geblockt. Nach dem Blockschritt wurde der Antikörpermix im Falle der murinen Zellen direkt zu der Block-Zellsuspension gegeben oder im Falle humaner Zellen in das Residualvolumen und für maximal 1h bei 4°C oder 15-30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 1400 rpm, 4°C, 4 min und zweimaliges Waschen mit bis zu 300 µl FACS-Puffer. Im Anschluss wurde das Zellsediment in 150-200 µl FACS-Puffer aufgenommen und die Zellen mittels Durchflusszytometrie charakterisiert.

2.3.7 Intrazelluläre Antikörper-Färbung für die Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.3.10 Humaner iNKT Zellzytokinexpressionsassay stimuliert und intrazellulär gefärbt. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 600 µl FACS-Puffer gewaschen und bei 1400 rpm, 4°C, 4 min sedimentiert. Für die Lebend-Tot-Färbung wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer gelöst und 1 µl 1:10 verdünntes Fixable Viability Dye eFluor 506 (eBioscience) hinzugegeben und für 15 min, RT, dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen

zweimal mit 300µl FACS-Puffer gewaschen und bei 1400 rpm, 4°C, 4 min sedimentiert. Fixierung der Zellen erfolgte in 200µl Fixation Puffer (BioLegend) für 20 min, RT, dunkel. Nach der Fixierung wurden die Zellen gewaschen, sedimentiert und in 200µl 1:10 in H₂O_{bidest} verdünntem Permeabilisationspuffer (Perm/Wash) (BioLegend) gelöst und für 20 min, RT, dunkel, inkubiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit 200µl Perm/Wash und Sedimentation bei 1400 rpm, 4°C, 4 min. Das Zellpellet wurde erneut in 50µl Perm/Wash gelöst und direkt zu dieser Lösung wurde der Antikörpermix, bestehend aus sowohl Oberflächen- als auch intrazellulären Antikörpern, hinzugegeben und für 45 min, RT, dunkel inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurden die Zellen zweimal mit Perm/Wash gewaschen und das Pellet im Anschluss für die Analyse mittels Durchflusszytometrie in 150-200µl FACS-Puffer gelöst.

2.3.8 Generierung von Dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark

Zur Durchführung von *in vitro*-Stimulationsassays und zur Behandlung von Mäusen mit stimulierten Dendritischen Zellen (*dendritic cells* - DC) wurden Dendritische Zellen benötigt, die aus verschiedenen Mausstämmen (C57BL/6J, BALB/c und FVB/N) generiert wurden. Knochenmarkszellen der Tiere wurden isoliert (s. 2.3.3.3) und anschließend nach dem Protokoll von Lutz et al. mit GM-CSF in RPMI-Medium für sieben Tage kultiviert (Lutz et al., 1999). Die generierten DC wurden entweder frisch verwendet oder in flüssigen Stickstoff kryokonserviert (s. 2.3.2) und bei Bedarf aufgetaut. Nach dem Auftauen der DC mussten die Zellen einen Tag vor Verwendung über Nacht in 20 ml RPMI-Medium mit GM-CSF bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert werden. Das verwendete GM-CSF wurde aus dem Zellüberstand der Hybridoma-Zelllinie X63-mGM-CSF gewonnen. Die Entwicklung zu DC wurde durch Durchflusszytometrie mit den Markern CD11c, CD80 und CD86 verifiziert (s. 2.3.5).

2.3.9 Pan T-Zell-Isolierung mit MACS® Zellseparation

Bei der MACS® Zellseparation kann aus einem Zellgemisch über das Aussortieren magnetisch-markierter Zellen, die an einer magnetisierten Säule adhären, eine gewünschte Zellpopulation isoliert werden. Bei diesem Vorgang, den man positive Selektion nennt, wird die gewünschte Zellpopulation nicht markiert und kann daher für funktionelle Studien weiter verwendet werden.

Die Pan T-Zell-Isolierung schließt sich der Isolierung muriner Leber- und Milzzellen an, sie ermöglicht die Aufreinigung von T-Zellen aus einem Zellgemisch über MACS® Zellseparation. Die Zellen wurden nach Herstellerangaben mit dem Pan T Cell Kit II von Miltenyi Biotech markiert und über eine gekühlte LS Column aufgereinigt. Die aufgereinigten T-Zellen wurden für *in vitro*-Stimulationsassays (s. 2.3.10) oder für die Sortierung von iNKT (s.2.3.12.1) verwendet.

2.3.10 *in vitro*-Stimulationsassays

2.3.11 Humaner iNKT-Zellzytokinexpressionsassay

Um das Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulierung mit *Eh*LPPG oder synthetischen *Eh*PI Analoga zu bestimmen, wurde ein leicht modifizierter iNKT-Zellzytokinexpressionsassay nach Sandberg et. al., 2003 durchgeführt. Die Stimulierung der humanen iNKT Zellen erfolgte nach der Isolierung humaner Leukozyten (PBMC) aus Blut (s. Abschnitt 2.3.3.1). Je Stimulanz wurden 4-fach Ansätze a 1x10⁶ PBMC in 100µl X-VIVOTM-15-Medium in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die PBMC

wurden mit 10 µg/ml *EhLPPG*, 1 µg/ml α GalCer, 0,1-5 µg/ml synthetische *EhPI* Analoga, 3 µg/ml α CD28 oder 500 ng/ml Ionomycin und 20 ng/ml PMA stimuliert. Die Stimulanzien wurden 2-fach konzentriert in 100 µl X-VIVOTM-15-Medium angesetzt und zu den PBMC gegeben. Um die iNKT Zellen optimal zu stimulieren, wurde zu den Ansätzen mit *EhLPPG* und α GalCer als Co-Stimulanz 3 µg/ml α CD28 gegeben. Als Kontrolle dienten PBMC in Medium mit 3 µg/ml α CD28. Die PBMC wurden zuerst für 1 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, um die Zytokinproduktion anzuregen. Nach dieser Inkubation wurde zu jedem Ansatz 10 µg/ml Brefeldin A gegeben. Brefeldin A löst einen rückläufigen Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum aus, wodurch es zu einer Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum kommt. Diese Akkumulation ermöglicht, dass man Proteine später mittels intrazellulärer Antikörperfärbung nachweisen kann. Nach Zugabe von Brefeldin A wurden die PBMC für 15 h über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die PBMC eingesammelt und für die intrazelluläre Antikörperfärbung verwendet (s. 2.3.7).

2.3.12 Murine iNKT-Zellzytokinexpressionsassays

Um die Sekretion von IFN γ muriner iNKT Zellen nach Stimulierung mit *EhLPPG* und synthetischen *EhPI* Analoga zu untersuchen, wurden murine iNKT-Zellzytokinexpressionsassays durchgeführt. Dazu wurden zwei Assays verwendet. Zum einen ein Assay der MACS® aufgereinigte Pan T-Zellen verwendete, sowie ein Assay in den mit α GalCer-CD1d-Tetramer-gesortete iNKT Zellen eingesetzt wurden.

2.3.12.1 Muriner iNKT-Zellzytokinexpressionsassay mit MACS® aufgereinigten Pan T-Zellen

Für den murinen iNKT-Zellzytokinexpressionsassay mit MACS® aufgereinigten T-Zellen wurden zunächst 5x10⁴ DC in 50 µl RPMI-Medium (s. Generierung von Dendritischen Zellen 2.3.8) in eine Mikrotiterplatte in Dublikaten ausgesät und mit 1 µg/ml α GalCer, 20 µg/ml LPPG9 oder 0,01-1 µg/ml synthetischen *EhPI*-Ankern in 50 µl RPMI-Medium für 3 h, 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1x10⁵ MACS® aufgereinigte Pan T-Zellen der Milz (s. 2.3.9) in 100 µl RPMI-Medium hinzugegeben. Inkubation erfolgte für 72h bei 37°C, 5% CO₂. Zu den Zeitpunkten 48h und 72h wurden 60-140 µl Überstand abgenommen und bis zur Verwendung für den murinen IFN γ -ELISA bei -20°C eingefroren (s. 2.4.2 und 2.6.4.1).

2.3.12.2 Muriner iNKT Zellzytokinexpressionsassay mit α GalCer-CD1d-Tetramer-gesorteten iNKT Zellen

Für den murinen iNKT Zellzytokinexpressionsassay mit α GalCer-CD1d-Tetramer-gesorteten iNKT Zellen wurden zunächst 2x10⁴ DC in 50 µl RPMI-Medium (s. Generierung von Dendritischen Zellen 2.3.8) in eine Mikrotiterplatte in Dublikaten oder Triplikaten ausgesät und mit 1 µg/ml α GalCer, 20 µg/ml LPPG9 oder 0,01-1 µg/ml synthetischen *EhPI* Analoga in 50 µl RPMI-Medium für 3 h, 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Um iNKT Zellen mit Hilfe des α GalCer-CD1d-Tetramers zu sortieren, wurden zunächst Pan T-Zellen mittels MACS®-Aufreinigung isoliert (s. 2.3.9) und mit α GalCer-CD1d-Tetramer-PE (NIH) gefärbt. Am FACS AriaTM III (BD Biosciences) wurden iNKT Zellen wie folgt heraussortiert: Zunächst wurde im SSC-A und FSC-A die Lymphozytenpopulation definiert, dann im

SSC-W und FSC-W Zelldoubletten ausgeschlossen und mit Hilfe von FITC und PE α GalCer-CD1d-Tetramer-PE positive iNKT Zellen bestimmt. α GalCer-CD1d-Tetramer-PE positive iNKT Zellen wurden aus dem Zellgemisch herausortiert.

Nach der Inkubation der Dendritischen Zellen wurden 2×10^4 - 1×10^5 iNKT in 100 μ l RPMI-Medium hinzugegeben. Inkubation erfolgte für 72h bei 37°C, 5% CO₂. Zu den Zeitpunkten 48h und 72h wurden 60-140 μ l Überstand abgenommen und bis zur Verwendung für den IFN γ -ELISA bei -20°C eingefroren (s. 2.6.2.1).

2.3.13 *In vitro* Test zur Bestimmung der anti-Leishmanien Aktivität von EhLPPG

Um den Einfluss von EhLPPG auf *Leishmania major*, den Erreger der kutanen Leishmaniose, zu untersuchen, wurden Knochenmarksmakrophagen mit in Kultur-generierten Promastigoten *in vitro* infiziert. Dies diente der Analyse der Proliferationskinetik von intrazellulären Amastigoten und ermöglichte uns Voruntersuchungen zur Behandlung einer intrazellulären Leishmanieninfektion.

Für die Generierung von Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow macrophages* – BMM) wurde Knochenmark aus C57BL/6J-Mäusen isoliert (s. 2.3.8) und zur Generierung M-CSF (macrophage colony stimulating factor) aus dem Überstand der Fibroblasten-Zelllinie L929 hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte in IMDM bei 37°C, 5% CO₂ für 10 Tage in einer 175 cm² Zellkulturflasche mit Filterdeckel (T175, Sarstedt). Ausdifferenzierte BMM wurden nach 10 Tagen zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (0,5mg/ml Trypsin, 0,2mg/ml EDTA in PBS) abgelöst und im Anschluss gezählt.

Für den *in vitro* Test wurden anschließend 2×10^5 ausdifferenzierte BMM in 500 μ l IMDM pro Kammer in einer 8-well chamber slides (Nunc®) ausgesät. Nach 48 h bei 37°C, 5% CO₂ erfolgte die Infektion der BMM mit *Leishmania major* 5ASKH (*L. major* 5ASKH) aus der stationären Wachstumsphase. Die Leishmanien wurden von Dr. Eugenia Bifeld, Arbeitsgruppe PD Joachim Clos, BNITM, zur Verfügung gestellt. Für die Bestimmung der Zelldichte wurden Parasiten aus der stationären Wachstumsphase verwendet. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden die Parasiten bei 1600 rpm, 4°C, 10 min sedimentiert, einmal mit IMDM gewaschen und anschließend in IMDM resuspendiert. Das Infektionsverhältnis betrug 1:10. Die benötigte Parasitenanzahl wurde in 300 μ l IMDM auf den einmal mit vorgewärmten PBS gewaschenen Makrophagenrasen gegeben und für 4 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Makrophagenrasen zweimal mit warmen PBS gewaschen und 8 μ g/ml EhLPPG mit und ohne 4×10^5 Milzzellen (Verhältnis 1:2) in 500 μ l IMDM ohne M-CSF (L929 ÜS) oder 4 μ g/ml α GalCer mit und ohne 4×10^5 Milzzellen (Verhältnis 1:2) in 500 μ l IMDM ohne M-CSF (L929 ÜS) dazugegeben. Als Kontrolle dienten unbehandelte infizierte Makrophagen. Die Inkubation mit den beiden Glykolipiden erfolgte für 48 h bei 37°C, 5% CO₂.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Zellrasen erneut mit warmen PBS gewaschen, die Zellen kurz luftgetrocknet und entweder anschließend DAPI gefärbt. Für die DAPI-Färbung wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 10 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert oder sofort mit DAPI gefärbt. Für die DAPI-Färbung wurden die fixierten Makrophagen 5 min bei RT mit je 500 μ l Waschpuffer (1x PBS, 0,01 Triton-X-100) pro Kammer auf einem Horizontalschüttler gewaschen und die Zellmembran anschließend permeabilisiert. Dafür wurden die

Zellen in einer Feuchtkammer 15 min, RT mit 250µl Permeabilisierungslösung (50 nM NH₄Cl, 1x PBS, 0,1% Triton-X-100) pro Kammer inkubiert. Der DAPI-Farbstoff (1µg/µl) wurde 1:50 in Blocklösung (2% w/v BSA in 1x PBS, 0,1% Triton-X-100) verdünnt und im Anschluss 150µl DAPI pro Kammer in die Permeabilisierungslösung für 1 h auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln. Nach der Inkubation erfolgten je drei 5-minütige Waschschrte mit 500µl Waschpuffer auf einem Horizontalschüttler, bevor die Zellen mit einem Tropfen Mowiol Eindeckmedium (25% Glycerol, 0,1 M Tris-HCl (pH8,5), 10% w/v Mowiol 4-88) konserviert wurden. Die Auswertung erfolgte am Epi-Fluoreszenzmikroskop (Leica). Die Parasitenlast wurde durch das Auszählen der Kinetoplasten der Leishmanien-Amastigoten pro Makrophage bestimmt.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Lebertoxizität mittels ALT

Viele chemische Stoffe, insbesondere Medikamente sind für die Leber bzw. Leberzellen zytotoxisch. Besonders bei Medikamenten muss nachgewiesen werden, ob sie lebertoxisch wirken können. Um die den Grad einer etwaigen Leberschädigung aufgrund einer Applikation von *EhLPPG* und α GalCer in Mäusen zu bestimmen, wurde im Serum der Tiere die Konzentration der Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt.

C57BL/6 oder FVB/N Mäuse wurden intraperitoneal (i.p.) einmal wöchentlich über vier Wochen (s. Abb. 6 Schema Lebertoxizitätstest) mit 200µl PBS (Kontrolle), 50µg/ml, 25µg/ml, 10µg/ml oder 1µg/ml *EhLPPG* oder 10µg/ml, 1µg/ml oder 0,1µg/ml α GalCer behandelt. Jeweils drei Tage nach Applikation wurde submandibulär Blut für die Serumgewinnung abgenommen. Der Blutkuchen und das Serum wurde mit Hilfe von BD Microtainer® SST™ Tubes nach Herstellerangaben gewonnen.

Die Messung des ALT erfolgte an einem Cobas Integra® 400 Plus Analyzer nach Herstellerangaben. Die Seren wurden 1:10 in H₂O_{bidest} verdünnt.

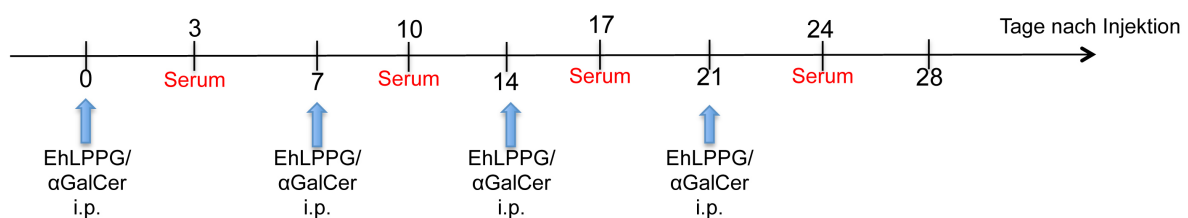


Abb. 6: Schema Lebertoxizität. C57BL/6 oder FVB/N Mäuse wurden unterschiedliche Konzentrationen *EhLPPG* und α GalCer i.p. injiziert. Die Applikation erfolgte vier Wochen lang einmal wöchentlich. Je drei Tage nach Applikation wurde Blut für die Serumgewinnung abgenommen und der ALT bestimmt.

2.4.2 ELISA

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) ist eine Methode zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen mittels spezifischer Antikörper. Zunächst wurde dazu ein gegen das gewünschte Protein gerichteter Antikörper (*capture* Antikörper) auf die Polystyrol-Oberfläche einer Mikrotiterplatte (Greiner bio-one) über Nacht bei 4°C beschichtet. Zur Entfernung von nicht-gebundenen Antikörpern wurde die Mikrotiterplatte mit PBS/0,05% Tween gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit PBS/1% BSA für 2 h bei RT blockiert. Die Blocklösung wurde verworfen

und die Zellüberstände in einer geeigneten Verdünnung in die Platte gegeben und diese über Nacht 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS/0,05% Tween wurde das Zielprotein mit einem spezifischen Biotin-konjugierten Detektionsantikörper für 1 h bei RT detektiert. Zur Verstärkung der Signalintensität wurde für 30 min bei RT ein Komplex aus Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes (HRP, horse radish peroxidase) und Streptavidin, der an das Biotin des Detektionsantikörpers bindet, hinzugefügt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der Farbumschlag gemessen, der durch die Reaktion der HRP mit einer TMB-haltigen Substratlösung entstanden war. Der Farbumschlag korreliert mit der gebundenen Proteinmenge und kann nach Abstoppen der Reaktion mit 2 M H₂SO₄ mittels photometrischer Messung (ELISA-Reader MRXII, Dynex Technologies) quantifiziert werden.

2.4.2.1 Muriner IFN γ ELISA

Gesammelte Überstände von *in vitro*-Stimulationsassays wurden für die Quantifizierung von murinem IFN γ verwendet. Die Bestimmung erfolgte mittels des murinen IFN γ ELISA-Kits von R&D Systems nach Herstellerangaben. Die Zellüberstände wurden in Duplikaten oder Triplikaten analysiert.

2.4.3 Aufreinigung von *Entamoeba histolytica* Lipopeptidphosphoglycan (*EhLPPG*)

Um *EhLPPG* aus den Membranen von *E. histolytica* Trophozoiten zu gewinnen, benötigt man ca. 100 große Zellkulturflaschen mit axenisch-kultivierten Amöben, die einen dichten Monolayer ausgebildet haben.

Die Trophozoiten wurden aus 100 Kulturflaschen (250 ml) nach Inkubation auf Eis abgelöst, bei 1200 rpm, 4°C, 4 min zentrifugiert und zweimal mit kaltem NaPBS gewaschen. Die Zellpellets wurden gepoolt und in 1 Volumen LPS-freiem Wasser gelöst. Um die Zellmembranen zu isolieren, wurde das Pellet dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem 37°C warmen Wasserbad 5 min aufgetaut. Daraufhin wurde das Pellet bei 900 rpm, 4°C, 10 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit einer Einmalglaspipette abgenommen und in einen Ultrazentrifugenbecher überführt. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei ca. 38.600 rpm, 4°C, 40 min. Das entstandene Pellet wurde in LPS-freiem Wasser durch Vortexen und Sonifizieren gelöst. Im Anschluss wurde das gelöste Pellet bei 0,03 mbar über Nacht lyophilisiert.

In dem lyophilisierten Pellet befinden sich nun *EhLPPG*, Glykolipide und Phospholipide. Um die Phospholipide herauszureinigen, extrahiert man diese mit einem Chloroform/MeOH/LPS-freiem H₂O-Gemisch (10 ml/10ml/3ml) heraus. Es wurden 10 ml des Gemisches auf die lyophilisierte Probe gegeben, kurz gevortext und anschließend für 10 min sonifiziert bis es homogenisiert war. Die gelöste Probe wurde in ein Glaszentrifugenröhrchen überführt und bei 8000 rpm, 4°C, 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich ein Pellet und ein Überstand. Der Überstand wurde in einem neuen Glasröhrchen gesammelt und das Pellet noch zweimal mit dem Chloroform/MeOH/LPS-freiem H₂O-Gemisch extrahiert. Der gesammelte Überstand wurde mit Stickstoff begast, um Chloroform zu entfernen. Danach wurde die Probe erneut über Nacht lyophilisiert.

Am nächsten Tag wurde eine Phenol-Extraktion durchgeführt. Dafür wurde das lyophilisierte Pellet in 7 ml H₂O und 7 ml 90% Phenol gelöst und 30 min in einem 68°C warmen Wasserbad rühren

gelassen. Im Anschluss stellt man das Röhrchen für 15 min auf Eis und zentrifugiert es anschließend bei 7000 rpm, 4°C 30 min. Die obere wässrige Phase, die das *Eh*LPPG enthält wird vorsichtig abgenommen und gesammelt. Die Phenol-Extraktion wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Das extrahierte *Eh*LPPG wurde im Anschluss gegen Millipore H₂O dialysiert. Die Dialyse erfolgte drei Tage lang, rührend, wobei dreimal täglich das Wasser gewechselt wurde. Nach der Dialyse wurde das *Eh*LPPG lyophilisiert, gewogen und in LPS-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1mg/ml eingestellt. Lagerung erfolgte bei -20°C in Aliquots in Glasfläschchen.

2.4.4 Cytometric Bead Array (CBA)

Die Methode des CBA ermöglicht die Analyse mehrerer Zytokine gleichzeitig in einer Probe mit einem geringen Volumen. Hierbei werden fluoreszierende Beads, die mit spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Zytokine und Chemokine konjugiert sind mit Serum oder Zellüberständen inkubiert. Die Beads können anhand ihrer bekannten Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden. Es wurden zwei CBAs verwendet, einer zur Bestimmung des Zytokinprofils muriner iNKT Zellen und einer zur Bestimmung der C-C Chemokin Ligand 2 (CCL2)-Konzentration in humanen Serumproben.

2.4.2.1 CBA zur Bestimmung des Zytokinprofils muriner iNKT Zellen

Für die Bestimmung des Zytokinprofils (IFN γ , TNF α , IL-12p40, IL-4, IL-17, IL-6) muriner iNKT Zellen wurde der Zellüberstand von gesorteten iNKT Zellen aus MACS® Pan T-Zellen der Leber verwendet. Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt (CBA Flex Set Mouse, BD Biosciences). Die Analyse der Proben wurde mittels FACS Array™ (BD Biosciences) und die anschließende Auswertung mit FCAP Array Software für Windows (BD Biosciences) durchgeführt. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Elena Helk im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

2.4.2.2 CBA zur Bestimmung der CCL2-Konzentration

In einer großen Amöbenleberabszess (ALA)-Studie in Vietnam (Blessmann et al., 2003a, Blessmann et al., 2003b) konnte ein einzigartiges Probenkollektiv zur Untersuchung des ALA im Menschen gesammelt werden.

Im Serum von 38 ALA-Patienten (30 Männer, 8 Frauen) und im Serum von 44 asymptomatisch *E. histolytica* Carrier (ASC) (16 Männer, 28 Frauen) aus einem Gebiet endemisch für *E. histolytica* in Vietnam, sowie im Serum von 24 *E. dispar*-infizierten Individuen (18 Frauen, 6 Männer) (Blessmann et al., 2003a, Blessmann et al., 2003b) wurde die CCL2-Konzentration untersucht. Die Serumproben wurden durch den Kundenservice für Probestellung von BioLegend Inc. auf ihre CCL2-Konzentration mittels eines CBA-basierten Multiplex Immunoassays (BioLegend, Inc., San Diego, CA) untersucht (Bernin et al., 2014 im Druck).

2.5 *in vivo* Infektionsmodelle und Krebsmodelle

Der therapeutische Einfluss von *EhLPPG* wurde in verschiedenen Modellen untersucht: in einem Modell für das Mammakarzinom, einem Modell für die Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms in Mdr2ko-Mäusen, sowie in einem Modell für die kutane Leishmaniose.

2.5.1 Mammakarzinom-Modell

Um den Einfluss von *EhLPPG* auf Mammakarzinoma zu testen, wurde ein induzierbares Mammakarzinom-Modell in Zusammenarbeit mit Dr. Florian Wegwitz und Prof. Dr. Wolfgang Deppert (Tumorbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, TVA Nr. 48/12) verwendet (Schulze-Garg et al., 2000). Transgenen, WAP-T-NP8 positiven weiblichen BALB/c-Mäusen wurde auf Höhe der dritten Brustdrüse eine Zellsuspension bestehend aus 10^3 Mammakarzinomzellen (H8N8-Zellen) und Matrigel (ca. 20-30 μ l; 1:2 in DMEM-Medium) in das Mammagewebe injiziert (Wegwitz et al., 2010). Nach sieben Tagen wurden die Tiere mit 2×10^6 4 μ g/ml *EhLPPG*-stimulierten DC, 1 μ g/ml α GalCer-stimulierten DC, unstimulierten DC oder 200 μ l PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt (Gewinnung und Generierung von DC ist in Abschnitt 2.3.8 beschrieben). Für die Stimulation der DC wurden je 5×10^5 Zellen in 100 μ l RPMI komplett mit entweder 4 μ g/ml *EhLPPG* oder 1 μ g/ml α GalCer in 100 μ l RPMI komplett für 3h, 37°C, 5%CO₂ in einer 96-well-Platte inkubiert. Die Zellen wurden nach Ende der Inkubation gepoolt, gewaschen bei 1200 rpm, 4°C, 8 min und in der benötigten Menge sterilem PBS für die Injektion gelöst. Die Applikation erfolgte einmal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen. Das Tumorwachstum wurde zweimal wöchentlich über einen Gesamtbeobachtungszeitraum von 42 Tagen mit einer Schiebelehre gemessen. Um das Tumolvolumen in cm³ zu berechnen, wurde angenommen, dass der Tumor von der Form her einem verlängerten Rotationsellipsoid ähnelt. Daher wurde zur Tumolvolumenberechnung die Volumenformel eines Rotationselipsoids verwendet:

$$V = \frac{4\pi}{3} ab^2 \quad a = \text{Länge}, b = \text{Breite}$$

2.5.2 Hepatozelluläres Karzinoma (HCC) Modell in Mdr2ko-Mäusen

Um den Einfluss von *EhLPPG* auf Lebertumore zu testen, wurde ein Modell für die Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms (*Hepatocellular carcinoma* - HCC) in Mdr2ko-Mäusen verwendet (TVA Nr. 47/13). Mdr2ko-Mäuse (auch FVB.129P2-Abcb4^{tm1Bor}) weisen eine homozygote Mutation des Abcb4^{tm1Bor}-Gens auf, des sogenannten ABC-Transporters, welche zu einem mangelhaften Abtransport von Galle führt und sich in einer kontinuierlichen Anreicherung von Gallensäure in der Leber äußert. Der Stau der Gallensäure verursacht bereits eine postnatale Fibrose des Lebergewebes die zu Entstehung von Neoplasien (1-2mm) führt, die sich mit fortschreitendem Alter, ca. ab 40-45 Wochen zu Lebertumoren entwickeln können. Das Tumorwachstum wurde ab 40 Wochen alle zwei Wochen mittels Magnetresonanztomographie (s. 2.5.2.1 Bildgebendes Verfahren Magnetresonanztomographie (MRT)) analysiert.

Mit Nachweis eines Tumors mittels MRT wurden die Tiere entweder mit 3×10^6 $4\mu\text{g/ml}$ *EhLPPG*-stimulierten DC, $1\mu\text{g/ml}$ αGalCer -stimulierten DC oder unstimulierten DC (Kontrolle) i.p. behandelt. Die Applikation erfolgte einmal die Woche vier Wochen lang mit Auftreten des Tumors. Gewinnung und Generierung von DC ist in Abschnitt 2.3.8 beschrieben. Die Auswertung erfolgte über die Ermittlung des Tumorumfanges. Um die Tumorumfänge der Tiere vergleichen zu können, wurde die Tumorgroße zum Entdeckungszeitpunkt als 100% bzw. 1 angesehen und die x-fache Tumorgroßenzunahme über die Zeit ermittelt.

2.5.2.1 Bildgebendes Verfahren Magnetresonanztomographie (MRT)

Für die Bestimmung des Erscheinens der Tumore und Bestimmung des Tumorumfanges in *Mdr2ko*-Mäusen wurden die Tiere mittels Magnetresonanztomographie untersucht.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem durch hochfrequente elektromagnetische Strahlung die Atomkerne einer Probe oder eines Individuums angeregt werden. Diese Atomkerne emittieren im angeregten Zustand anschließend ein schwaches elektromagnetisches Signal, welches Informationen über die chemische Umgebung der einzelnen Kerne beinhaltet und entsprechend bildgebend ausgewertet werden kann. Bei einer MRT-Messung wird der Kernspin des Wasserstoff-Isotops ausgenutzt, da Wasserstoff zu einem hohen Anteil in biologischen Gewebe vorhanden ist und durch magnetische Strahlung angeregt werden kann. Durch das starke äußere Magnetfeld, das durch den Magnetresonanztomographen aufgebaut wird, können sich Atomkerne entlang dessen ausrichten. Durch Einstrahlung kurzer intensiver elektromagnetischer Impulse passender Frequenz auf das zu untersuchende Objekt, wird ein Teil der Energie von den Wasserstoff-Atomkernen aufgenommen und dann zeitversetzt wieder abgegeben. Diese elektromagnetische Welle wird von einer Empfängerspule gemessen und in ein visuelles Bild umgerechnet.

Für die Untersuchung der Lebertumore wurde eine sogenannte T_2 -gewichtete Turbo-Spin Echo-Sequenz ($T_2\text{SE}$) verwendet. Die physikalischen Parameter der Sequenz waren 32 mm Field-of-View, 256×256 Bildpunkte, eine Schichtdicke von 0,6 mm, ein Schichtabstand von 0% (Voxelgröße $125 \times 125 \times 600 \mu\text{m}^3$), ein TR von 935 ms (effektives TR = 1500, entsprechend der mittleren Atemrate), ein TE von 51 ms, 4 Mitteilungen, ein Turbofaktor von 14, sowie ein Flipwinkel von 180 Grad. Mittels Verwendung dieser Parameter war der Tumor als weiße Struktur im dunkel erscheinenden Lebergewebe zu identifizieren.

In Kollaboration mit Dr. Harald Ittrich und Thomas Ernst (Zentrum für Radiologie und Endoskopie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurde die Entwicklung der Lebertumore in *Mdr2ko*-Mäusen ab dem Alter von 40 Wochen alle 14 Tage bis zum Alter von 56 Wochen *in vivo* verfolgt. Hierbei wurde ein Kleintier-Magnetresonanztomograph (Bruker ClinScan 7 T, Bruker BioSpin) verwendet, der mit einer Flussdichte von 7 Tesla (T) und der Verwendung einer zirkular polarisierten Sende-Empfang-Volumenspule für Mäuse (Mouse Body Coil, 40 mm Resonatorlänge, 40 mm Innendurchmesser, Bruker BioSpin) arbeitet. Während der gesamten Untersuchung wurden die Mäuse mit einem

Gasgemisch bestehend aus 98% Sauerstoff und 1,5-2,0% Isofluran (Forene®, Abbott) bei einem Gasfluss von 500 ml/min sediert. Um eine Hypothermie der Mäuse zu verhindern, lagen die Tiere während der Messung auf einer 37°C warmen Matte. Zusätzlich wurde die Atemrate der Tiere überwacht, um für die Messung eine geeignete konstante Atmung von 30-40 Atemzügen pro min zu erreichen. Die Messungen fanden idealerweise nur in den Atempausen der Tiere statt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem OsiriX Imaging Software DICOM Viewer. Zur Messung der Tumore wurden die Tumorbereiche digital auf jedem transversalen Schnitt umrandet und anhand dieser Flächen wurde unter Berücksichtigung des Abstandes zwischen den einzelnen gemessenen Schnitten das Volumen der Tumore berechnet

2.5.3 *Leishmania major*-Infektions-Modell für kutane Leishmaniose

2.5.3.1 Bestimmung der geeigneten Infektionsmenge von *L. major* 5ASKH

Um die geeignete Infektionsmenge von *L. major* 5ASKH im Fußschwellungsmodell für kutane Leishmaniose in weiblichen BALB/c zu bestimmen wurden Leishmanien aus der spät-stationären Wachstumsphase verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. Eugenia Bifeld, Arbeitsgruppe PD Dr. Joachim Clos, BNITM). 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 oder 2×10^5 *L. major* 5ASKH in 50µl PBS wurden subkutan (s.c.) in den rechten Hinterlauf einer weiblichen BALB/c Maus injiziert (TVA Nr. 133/13). Ab ca. 2-3 Wochen kommt es in diesem Modell zu einer Schwellung des Hinterlaufs. Der Infektionsverlauf wurde über mehrere Wochen verfolgt und in Form von mehreren wöchentlichen Fußdickenmessungen dokumentiert. Die Läsionsgröße wurde mit einer Schiebelehre in mm bestimmt.

2.5.3.2 Einfluss von *EhLPPG* auf *L. major* 5ASKH *in vivo*

Um den Einfluss von *EhLPPG* auf *L. major* auch *in vivo* zu bestimmen, wurden Leishmanien aus der spät-stationären Wachstumsphase verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. Eugenia Bifeld, AG PD Dr. Joachim Clos, BNITM). 2×10^5 *L. major* 5ASKH in 50µl PBS wurden s.c. in den rechten Hinterlauf einer weiblichen BALB/c Maus injiziert.

Der Infektionsverlauf wurde über mehrere Wochen verfolgt und in Form von mehreren wöchentlichen Fußdickenmessungen dokumentiert. Die Läsionsgröße wurde mit einer Schiebelehre in mm bestimmt. Mit Einsetzen der Fußschwellung wurden die Tiere zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von drei Wochen mit entweder 4µg/ml *EhLPPG* oder 8µg/ml *EhLPPG* in je 25µl PBS subkutan in den infizierten Fuß behandelt. Gemäß der Abbruchkriterien des Tierversuches (TVA Nr. 133/13) wurden die Tiere bei auftretender Läsion abgetötet. Der Zeitpunkt des Eintretens der Ulzeration wurde außerdem zur Bestimmung der Ulzerations-freien Zeit verwendet.

2.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software PRISM® 5 for OSX (Graphpad) durchgeführt. Es wurden der Unpaired Student's t-Test, der parameterfreie Mann-Whitney U-Test, Mantel-Cox-Test, sowie der χ^2 -Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in den Frequenzen und der Aktivierung humaner und muriner Immunzellen des angeborenen Immunsystems

3.1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen humaner Immunzellen

Männer und Frauen unterscheiden sich in ihrer Suszeptibilität gegenüber einer Reihe von Erkrankungen. Im Allgemeinen sind Männer häufiger von parasitären, bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten betroffen (Bernin and Lotter, 2014; Bouman et al., 2004; Klein, 2012), auch bestimmte Tumorarten treten häufiger bei Männern auf als bei Frauen (HCC, Ösophaguskarzinoma, Lungenkarzinoma, (Robert Koch Institut, 2009/2010)). Frauen hingegen reagieren auf Vakzinierungen und verschiedene Infektionserreger mit einer verstärkten Immunantwort und sind anfälliger für humoral- und Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen (Bouman et al., 2004).

Es gibt Hinweise, dass dieser Geschlechtsunterschied in der unterschiedlichen Immunantwort von Frauen und Männern begründet sein könnte und das insbesondere Steroidhormone die Zytokinsekretion dieser Zellen modulieren könnten.

Um geschlechtsspezifische Unterschiede in Erkrankungen zu verstehen, ist es daher nötig die grundlegenden geschlechtsspezifischen Unterschiede in der angeborenen und adaptiven Immunantwort zu untersuchen. Begründet können diese Divergenzen zum einen in der Quantität bestimmter Immunzellen als auch in der Qualität und Vielfalt der Zytokinproduktion in der Antwort auf aktivierende Stimuli sein. In diesem Abschnitt sollten daher verschiedene humane Immunzellpopulationen des angeborenen Immunsystems auf geschlechtsspezifische Frequenzunterschiede und insbesondere das Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulation mit α GalCer und *Eh*LPPG untersucht werden.

3.1.1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von iNKT Zellen des peripheren Blutes und der Leber

Der Amöbenleberabszess (ALA) ist ein Beispiel für einen deutlichen Geschlechtsunterschied, denn er tritt wesentlich häufiger bei Männern als bei Frauen auf (Acuna-Soto et al., 2000; Blessmann et al., 2003b). Frühere Studien im Tiermodell für den ALA konnten zeigen, dass iNKT Zellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des ALA spielen. Darüber hinaus wirkt das männliche Geschlechtshormon Testosteron supprimierend auf die Zytokinproduktion von iNKT Zellen, insbesondere auf die Produktion des protektiven $\text{IFN}\gamma$ (Lotter et al., 2013). Da diese Untersuchungen primär im Mausmodell durchgeführt worden sind, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die im Tiermodell erhobenen Befunde auf den Menschen übertragbar sind. Im Menschen unterscheidet man drei iNKT-Subpopulationen: CD4^+ , CD8^+ und $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ (doppelnegative –DN) iNKT Zellen (O'Reilly et al., 2011).

Um etwaige Unterschiede in der geschlechtsspezifischen Frequenz von iNKT Zellen und deren Subpopulationen im peripheren Blut zu untersuchen, wurde gesunden Probanden Blut abgenommen

oder Buffy coats (angereicherte Lymphozytenfilme) verwendet, PBMCs isoliert, iNKT Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8 und iNKT TcR ($V\alpha 24$ (iNKT) TcR) detektiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Da nur lebende Einzelzellen analysiert werden sollten, wurden nach dem Gating auf die Lymphozytenpopulation im SSC-A/FSC-A zunächst Zelldubletten mittels SSC-A/FSC-H ausgeschlossen, in dem nur einzeln vorliegende Zellen, die eine Diagonale im SSC-A/FSC-H bilden, für die Analyse verwendet wurden. Lebende Zellen wurden von toten Zellen mittels Lebend-Tot-Färbung unterschieden (SSC-A/Lebend-tot) (Abb. 7, A-C).

Die Analyse der 25 Probanden (13 Männer, 12 Frauen) zeigte, dass die Anzahl der peripheren iNKT Zellen zwischen 0,01-1,18% variiert. Eine tendenziell erhöhte Anzahl dieser Zellen konnte bei Frauen (0,19%) im Vergleich zu Männern (0,06%) beobachtet werden (Abb. 7, D). Die iNKT Zell-Frequenz weiblicher Probanden variierte von 0,014-1,18% und die männlicher Probanden zwischen 0,010-0,22%.

Die Analyse der $CD4^{+}$ -, $CD8^{+}$ - und $CD4^{-}CD8^{-}$ (doppelnegativen – DN)-Subpopulationen der peripheren iNKT Zellen zeigte, dass nur geringe tendenzielle Unterschiede zu erkennen waren (Abb. 7 C und E). $CD4^{+}$ iNKT Zellen wiesen mit einem Anteil von 32,2% in Männern und 32,9% in Frauen keinen geschlechtsspezifischen Unterschied auf. $CD8^{+}$ iNKT Zellen der männlichen Probanden wiesen tendenziell mit 29,9% einen höheren Prozentsatz an $CD8^{+}$ iNKT Zellen auf als die weiblichen Probanden mit 25,3%. Weibliche Probanden wiesen mit 40% DN iNKT Zellen, gegenüber männlichen Probanden mit 35,6% DN iNKT Zellen, einen tendenziell höheren Anteil an DN iNKT Zellen auf. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Frauen tendenziell mehr iNKT Zellen im peripheren Blut besitzen als Männer und dass die $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ und DN iNKT Zell-Subpopulationen prozentual annähernd gleich häufig vertreten sind. Männer tendieren zu einer leicht erhöhten Anzahl an $CD8^{+}$ iNKT Zellen und Frauen zu einer leicht erhöhten Anzahl an DN iNKT Zellen.

Um die geschlechtsspezifische Frequenz von iNKT Zellen und deren Subpopulationen in der Leber von Krebspatienten zu untersuchen, wurde von drei Krebspatienten, (zwei Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom und einem Patienten mit Cholangiokarzinom) Leberlymphozyten isoliert und diese mittels Durchflusszytometrie auf ihre iNKT-Frequenzen hin untersucht.

Patient 1 wies eine iNKT-Frequenz von 0,065%, Patient 2 eine iNKT-Frequenz von 0,04% und Patient 3 keine iNKT Zellen in der Leber auf (Abb. 7, F). Die Analyse der $CD4^{+}$ -, $CD8^{+}$ - und DN-Subpopulationen der iNKT Zellen der Leber zeigte deutliche Variationen in der prozentualen Zusammensetzung der Subpopulationen in den Patienten (Abb. 7, G). In Patient 1 konnte mit 57,3% DN iNKT Zellen der prozentuale Hauptteil der iNKT Zellen in der Leber detektiert werden, einen niedrigeren Anteil bildeten $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ iNKT Zellen mit je 21%. In Patient 2 stellten hingegen die $CD8^{+}$ iNKT Zellen den Hauptteil der iNKT Zellen der Leber dar. $CD4^{+}$ iNKT Zellen wiesen 9,21% und DN iNKT Zellen 15,8% der Leber-iNKT Zellen auf.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Frauen tendenziell mehr iNKT Zellen im peripheren Blut aufweisen als Männer und dass die $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ und DN iNKT Zell-Subpopulationen prozentual annähernd gleich häufig vertreten sind. Männer zeigten eine leicht erhöhte Anzahl an $CD8^{+}$ iNKT

Zellen und Frauen eine leicht erhöhte Anzahl an DN iNKT Zellen. Die Analyse der Leberlymphozyten von Krebspatienten ergab eine sehr Individuen-spezifische Variation der Anzahl an iNKT Zellen und deren Subpopulationen.

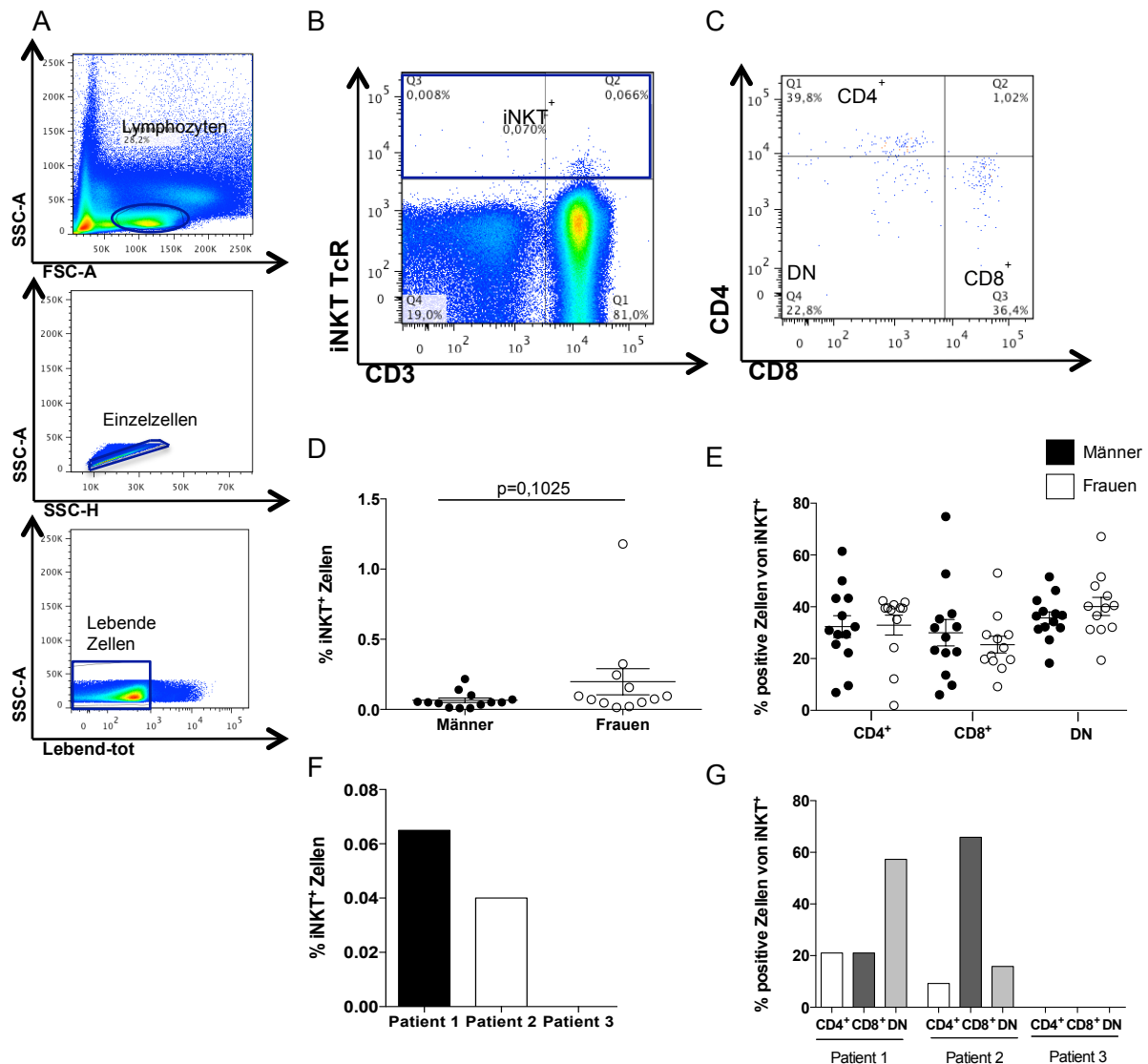


Abb. 7: Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von iNKT Zellen des Menschen. (A) Lymphozyten wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) im SSC und FSC bestimmt, auf Einzelzellen und lebende Zellen vorselektiert und (B) die Frequenz der iNKT Zellen mittels CD3 und iNKT TcR und (C) der iNKT Zell-Subpopulationen mittels CD4 und CD8 bestimmt. (D) Geschlechtsspezifische iNKT Zell-Frequenz und (E) die geschlechtsspezifische Frequenz der iNKT-Subpopulationen. (F) iNKT-Frequenz und (G) Frequenz der iNKT Zell-Subpopulationen der Leber von drei Patienten mit einer Tumorerkrankung. (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, Männer n=13, Frauen n=12)(Mann-Whitney U-test).

3.1.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von Monozyten im peripheren Blut gesunder Probanden

Monozyten gehören zu dem angeborenen Immunsystem, zirkulieren im Blut und können bei Infektionen über die Expression des C-C Chemokin Liganden (CCL) 2 vom Blutstrom in infiziertes Gewebe migrieren. Dort differenzieren sie sich in Abhängigkeit des Zytokinmilieus zu Gewebemakrophagen und dendritischen Zellen. Periphere Monozyten unterscheiden sich anhand ihrer Größe, der Rezeptorexpression und ihrer Fähigkeit sich nach Stimulation mit mikrobiellen

Antigenen und Zytokinen zu differenzieren (Shi C, 2011). Allgemein unterscheidet man zwei Arten von Monozyten: pro-inflammatorische bzw. klassische Monozyten, charakterisiert durch Sekretion von IL-12, IFN γ , TNF α und ROS und anti-inflammatorische bzw. nicht-klassische Monozyten, charakterisiert durch Sekretion von IL-4, IL-10 und IL-13 (Laskin et al., 2011). In Mäusen werden klassische Monozyten anhand der Expression von Ly6C^{hi}CCR2⁺CD115⁺ von nicht-klassischen Monozyten, die Ly6C^{low}CCR2⁻CD115⁺ exprimieren, unterschieden (Geissmann et al., 2003; Serbina et al., 2008; Yona and Jung, 2010). Im Menschen hingegen unterscheidet man drei Monozytenpopulationen: Klassische Monozyten exprimieren CD14⁺⁺, intermediäre Monozyten CD14⁺CD16⁺ und nicht-klassische Monozyten CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺. Im Gegensatz zur Maus haben vor allem humane intermediäre und nicht-klassische Monozyten pro-inflammatorische Eigenschaften (Auffray et al., 2009; Zawada et al., 2012; Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013).

Im Mausmodell für die Entstehung des ALA konnte kürzlich gezeigt werden, dass inflammatorische Monozyten für die Gewebeschädigung beim ALA verantwortlich sind (Bernin et al., 2013). Daher wäre von Interesse, ob humane inflammatorische Monozyten auch einen Einfluss auf die ALA-Entwicklung im Menschen haben könnten und ob geschlechtsspezifische Frequenzunterschiede schon bei gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts in dieser Immunzellpopulation vorhanden sind.

Um etwaige geschlechtsspezifische Unterschiede in der Frequenz von Monozyten zu untersuchen, wurden PBMC aus oben genannten (o.g.) Kollektiv nach Vorselektion auf lebende Zellen (s. Abschnitt 3.1.1.1) mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD16 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 8, A+B). Ergänzend wurden Serumproben eines einzigartigen Kollektivs aus einem *E. histolytica*-endemischen Gebiet in Vietnam untersucht (Blessmann et al., 2003). In den Seren von Amöbenleberabszesspatienten (ALA; n=38), asymptomatischen *E. histolytica*-infizierten Carriern (ASC; n= 44) und *E. dispar*-infizierten Individuen (n=24) wurde mittels eines Multiplex Immunoassays die Konzentration von CCL2 bestimmt. Dies ermöglicht indirekt Rückschlüsse auf die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten unter einer *E. histolytica*-Infektion.

Die Analyse der 25 Probanden zeigte, dass klassische CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten prozentual den größten Anteil der Monozyten im Blut ausmachen (58,8%) und intermediäre CD14⁺CD16⁺ Monozyten mit 4,1% und nicht-klassische CD14⁽⁺⁾CD16⁺ Monozyten mit 9,7% einen geringeren Prozentsatz aufweisen (Abb. 8, C). Die geschlechtsspezifische Untersuchung der drei Monozytenpopulationen zeigte, dass keine Frequenzunterschiede zwischen den Geschlechtern beobachtet werden konnten (Abb. 8, D). Männer wiesen 57,4% CD14⁺⁺CD16⁻, 4,3% CD14⁺CD16⁺ und 9,9% CD14⁽⁺⁾CD16⁺ Monozyten auf. Frauen wiesen mit 55,0% CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten 4,4% CD14⁺CD16⁺ und 8,6% CD14⁽⁺⁾CD16⁺ Monozyten keine Unterschiede zu männlichen CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ und CD14⁽⁺⁾CD16⁺ Monozyten auf.

Das Monozyten-rekrutierende Chemokin CCL2 ist für die Diapedese von Monozyten aus dem Blutstrom in infiziertes Gewebe zuständig. Serumproben, die während zweier Studien (Blessmann 2003a+b) in einem *E. histolytica*-endemischen Gebiet in Vietnam erhalten worden sind, wurden hier

zum ersten Mal auf Serummarker untersucht, die assoziiert sind mit einer Resistenz oder Suszeptibilität gegenüber einer *E. histolytica*-Infektion (Bernin et al., 2014 im Druck). In Bezug auf die im Mausmodell erhobenen Befunde (Bernin 2013), sollte die Serumkonzentration von CCL2 in diesem einzigartigen Kollektiv untersucht werden. Die Untersuchung der CCL2-Level in den Serumproben von ALA-Patienten, ASC und *E. dispar*-infizierten Individuen zeigte zunächst, dass kein Unterschied in den Serumleveln des Monozytenmigrationsfaktors CCL2 zwischen den drei Gruppen gefunden werden konnte (Abb. 8, E). Die geschlechtsspezifische Untersuchung von CCL2 zeigte jedoch, dass die CCL2-Konzentration im Serum männlicher ASC signifikant höher ist als im Serum weiblicher ASC und höher als in männlichen ALA-Patienten (Abb. 8, F). In männlichen und weiblichen ALA-Patienten und *E. dispar*-infizierten Individuen konnte kein Unterschied in der CCL2-Konzentration im Serum festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied in den Frequenzen von Monozyten beobachtet werden. In dem Patientenkollektiv aus Vietnam zeigte sich jedoch, dass männliche asymptomatische *E. histolytica* Carrier (ASC) eine höhere CCL2-Serumkonzentration aufwiesen als weibliche ASC. Im Gegensatz dazu wiesen ALA-Patienten und *E. dispar*-infizierte Individuen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auf.

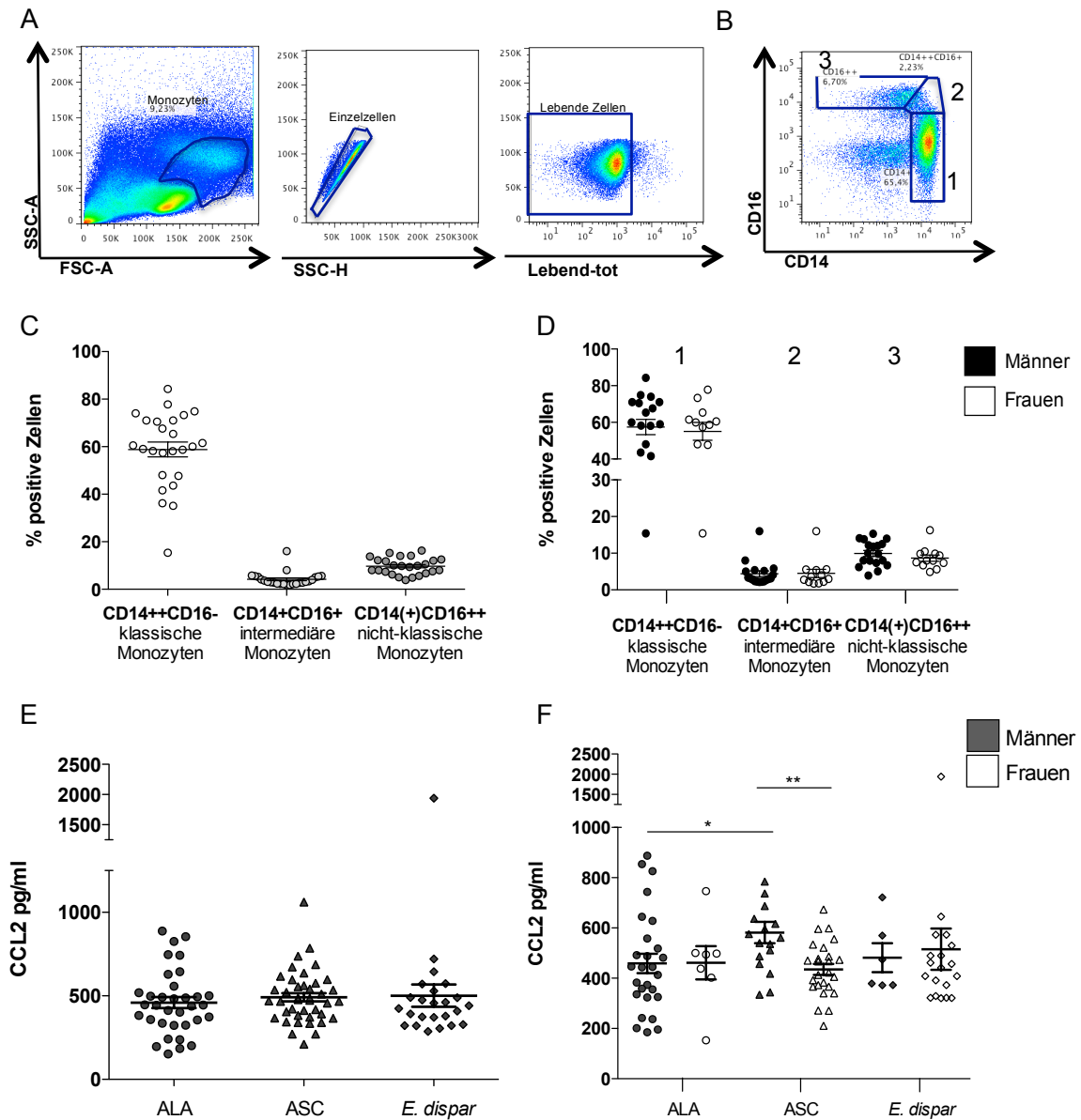


Abb. 8: Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von Monozyten des Menschen und in der CCL2-Konzentration in Serumproben von *E. histolytica*-infizierten Individuen. (A) Monozyten wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) im SSC und FSC bestimmt, auf Einzelzellen und lebende Zellen vorselektiert und (B+C) die drei Monozytenpopulationen nach ihrer Expression von CD14 und CD16 unterschieden. (D) Geschlechtsspezifische Analyse der Monozytenpopulationen. (Mittelwerte±Standardfehler), (Männer n=16, Frauen n=10). (E) CCL2-Konzentration im Serum von ALA-Patienten, ASC und *E. dispar*-infizierten Individuen und (F) nach geschlechtsspezifischer Aufschlüsselung (Mittelwerte±Standardfehler) (ALA n=38, Männer n=30, Frauen n=8; ASC n=44, Männer n=16, Frauen n=28; *E. dispar* n=24, Männer n=6, Frauen n=18)(Mann-Whitney U test, *p≤0,05, **p≤0,001).

3.1.1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen Natürlicher Killer Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden

Natürliche Killer (NK) Zellen sind wichtige Effektorzellen der angeborenen Immunantwort, deren Fähigkeiten zum einen die Vermittlung von Zytotoxizität gegen bestimmte Tumore, Bakterien- und Virus-infizierte Zellen und zum anderen die indirekte Modulation der Immunantwort durch Produktion

von Zytokinen und Chemokinen umfasst (Campbell and Hasegawa, 2013; Freud et al., 2014). NK Zellen spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen, und ein umfassendes Verständnis der Effektorfunktionen von NK Zellen könnte die Entwicklung von Therapien gegen Tumore und Immundefekte verbessern (Freud et al., 2014). Da über geschlechtsspezifische Unterschiede in humanen NKT Zellen relativ wenig bekannt ist, sollte diese Fragestellung mitbearbeitet werden.

Um die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Frequenz von NK Zellen zu untersuchen, wurden PBMC aus o.g. Kollektiv nach Vorselektion auf lebende Zellen (s. Abschnitt 3.1.1.1) mittels Durchflusszytometrie analysiert und die zwei NK Zell-Subpopulationen (CD3⁻)CD56^{dim} und (CD3⁻)CD56^{bright} sowie deren CD16-Expression untersucht (Abb. 9, A+B).

Die Analyse der 19 Probanden (10 Männer, 9 Frauen) zeigte, dass CD56^{dim} NK Zellen mit 9,3% einen höheren prozentualen Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut ausmachen als CD56^{bright} NK Zellen mit 1,7% (Abb. 9, C). Die Frequenz von CD56^{dim} NK Zellen variierte von 3,2 bis 17,3% und die der CD56^{bright} NK Zellen von 0,1 bis 4,8%. Eine tendenziell erhöhte Anzahl an CD56^{dim} NK Zellen konnte bei Männern (10,8%) im Vergleich zu Frauen (8,3%) beobachtet werden (Abb. 9, D). CD56^{bright} NK Zellen wiesen keinen geschlechtsspezifischen Unterschied auf (Männer 1,8%, Frauen 1,6%). Im Vergleich zu CD56^{bright} NK Zellen wiesen CD56^{dim} NK Zellen eine fast 40% höhere CD16-Expression mit 92,7% auf (CD56^{bright}CD16⁺ 54,6%; Abb. 9, E). CD56^{dim}CD16⁺ NK Zellen männlicher Probanden zeigten mit 93,6% keinen geschlechtsspezifischen Unterschied gegenüber CD56^{dim}CD16⁺ NK Zellen weiblicher Probanden mit 91,7% (Abb. 9, F). Jedoch wiesen CD56^{bright}CD16⁺ NK Zellen eine tendenziell niedrigere Anzahl in Frauen (46,5%) als in Männern (60,9%) auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass CD56^{dim} NK Zellen den größeren Anteil an NK Zellen im peripheren Blut ausmachen als CD56^{bright} NK Zellen und dass kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der NK Zell-Frequenz beobachtet werden konnte. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die CD16-Expression in CD56^{bright} NK Zellen männlicher Individuen höher ist als in CD56^{bright} NK Zellen weiblicher Individuen.

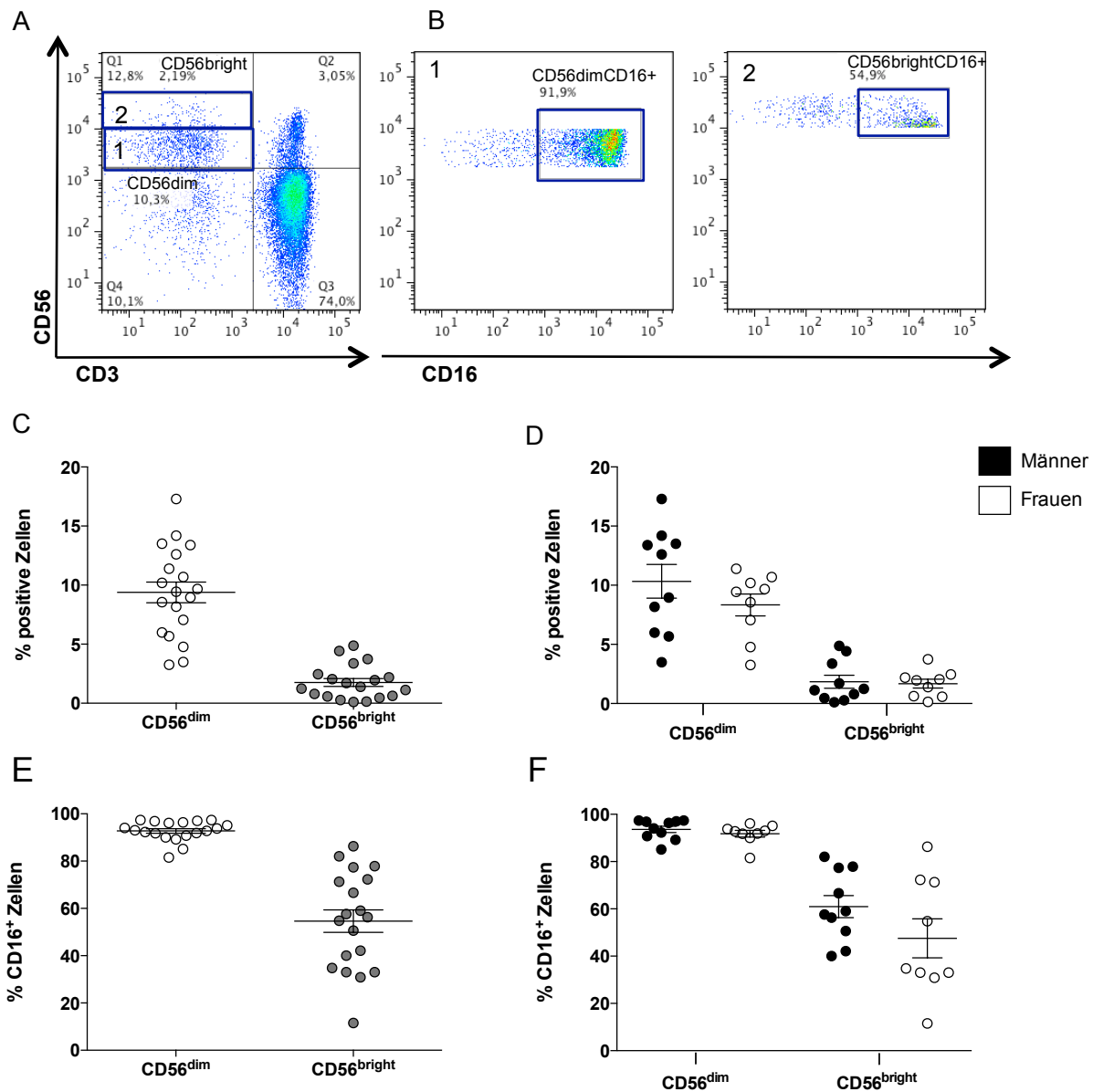


Abb. 9: Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Frequenz von Natürlichen Killer Zellen im peripheren Blut gesunder Probanden. (A) Natürliche Killerzellen wurden mittels FACS entsprechend ihrer Expression von CD3 und CD56 von anderen Immunzellen unterschieden und (B) die CD16-Expression auf CD56^{dim} NK Zellen und CD56^{bright} NK Zellen bestimmt. (C) Frequenzen von CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen im peripheren Blut und (D) in Abhängigkeit des Geschlechts. (E) CD16-Expression von CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen und (F) in Abhängigkeit des Geschlechts. (Mittelwerte±Standardfehler, n=19, Männer n=10, Frauen n=9).

3.1.1.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von konventionellen T-Zellen gesunder Probanden

Konventionelle T-Zellen konstituieren den größten Teil des adaptiven Immunsystems und einige Studien konnten zeigen, dass auch T-Zellen geschlechtsspezifisch-, alters- und erkrankungsbedingt Frequenzunterschiede aufweisen können (Mifsud et al., 2008; Mo et al., 2005; Tracy et al., 2013).

Um der Frage nach geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Frequenz konventioneller T-Zellen in gesunden Probanden aus dem o.g. Kollektiv nachzugehen, wurden die Frequenzen von

CD3⁺ Zellen und deren Subpopulationen anhand der Unterscheidung ihrer Expression von CD4 und CD8 in PBMCs untersucht (Abb. 10, A).

Die Analyse der 25 Probanden zeigte, dass kein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied in der Frequenz konventioneller T-Zellen (CD3⁺ Zellen) zwischen gesunden Männern und Frauen festgestellt werden konnte (Abb. 10, B). Betrachtet man die Subpopulationen der konventionellen T-Zellen, waren CD4⁺ T-Zellen tendenziell in Frauen mit 65,1% CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu Männern mit 61,2% CD4⁺ T-Zellen erhöht (Abb. 10, C). CD8⁺ T-Zellen hingegen waren tendenziell in Männern mit 33,3% erhöht, Frauen wiesen nur 29,1% CD8⁺ T-Zellen auf. DN T-Zellen zeigten keinen geschlechtsspezifischen Unterschied (Männer 4,8%, Frauen 5,0%).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Frauen tendenziell mehr CD4⁺ T-Zellen und Männer tendenziell mehr CD8⁺ T-Zellen aufweisen.

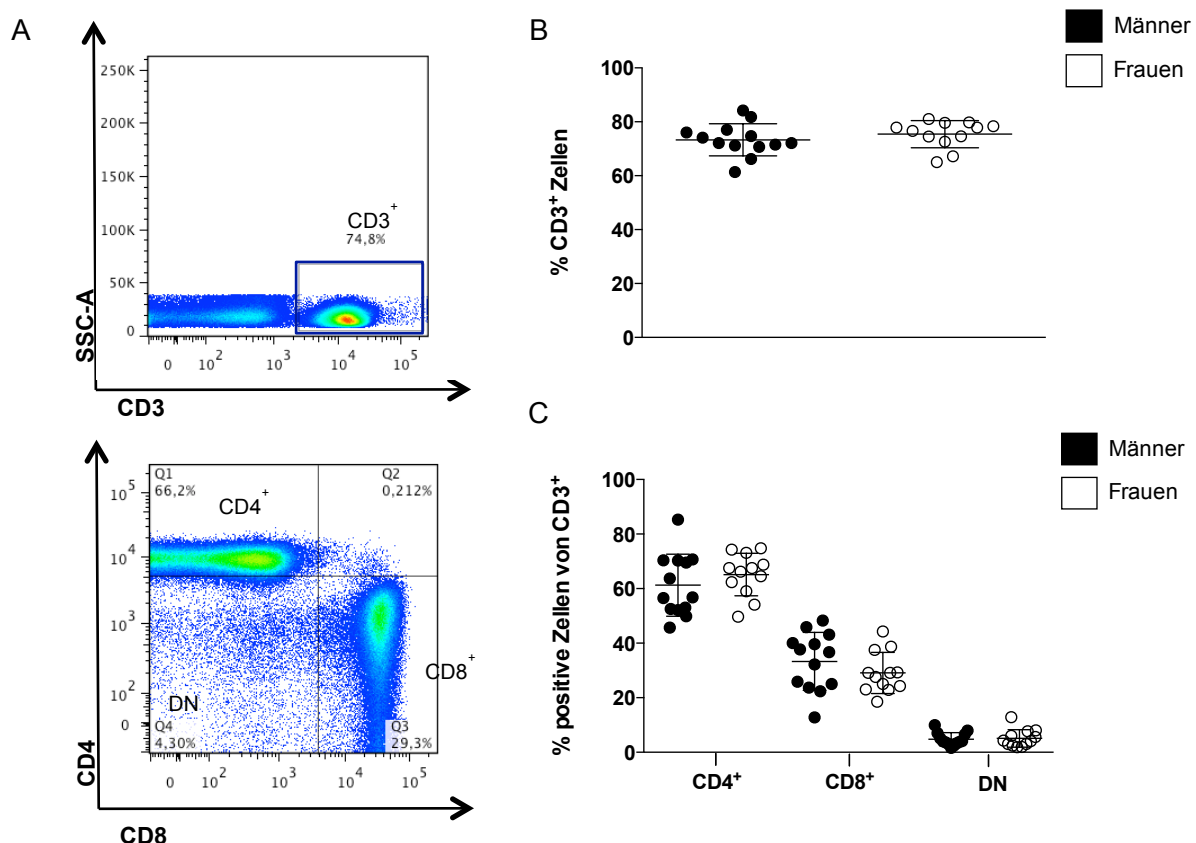


Abb. 10: Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Frequenz von konventionellen T-Zellen gesunder Probanden. (A) Bestimmung der konventionellen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) durch Gating auf CD3⁺ Zellen und Bestimmung der Subpopulationen nach CD4- und CD8-Expression. (B) Geschlechtsspezifische Analyse der konventionellen T-Zell-Frequenzen und (C) der konventionellen T-Zell-Subpopulationen. (Mittelwert±Standardfehler, Männern n=13, Frauen n=12).

3.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Zytokinprofil humaner Immunzellen nach Stimulation mit α GalCer und *EhLPPG*

Im Tiermodell des ALA konnte gezeigt werden, dass iNKT Zellen weiblicher Mäuse nach Stimulation mit den spezifischen iNKT Zell-Liganden α GalCer und *EhLPPG* signifikant mehr IFN γ produzieren als iNKT Zellen männlicher Tiere (Lotter 2013). Auch die Stimulation humaner PBMCs mit α GalCer und *EhLPPG* zeigte eine höhere IFN γ -Produktion in PBMCs weiblicher Herkunft als im Vergleich zu PBMCs männlicher Herkunft (Dobbeck, 2011).

Um den geschlechtsspezifischen Unterschied im Zytokinprofil humaner konventioneller und nicht-konventioneller T-Zellen detaillierter zu untersuchen, wurden o.g. PBMCs 15 h mit α GalCer und *EhLPPG* stimuliert, anschließend mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Zellen, iNKT Zellen und ausgewählte Zytokine (IFN γ , TNF α , IL-4 und IL-17A) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.2.1 iNKT-Frequenzen und Frequenzen der iNKT-Subpopulationen nach α GalCer- und *EhLPPG*-Stimulation

Zunächst wurde bestimmt, ob sich die Frequenzen der humanen iNKT Zellen und deren Subpopulationen nach Stimulierung mit α GalCer und *EhLPPG* verändern (Abb. 11, A+B). Die Analyse der 25 Probanden ergab, dass die iNKT-Zell-Frequenz nach Stimulation mit einem Glykolipid in beiden Geschlechtern abnimmt (Abb. 11, C). In männlichen Probanden nahm die iNKT-Frequenz signifikant von 0,06% iNKT Zellen nach α GalCer-Stimulation auf 0,03% iNKT Zellen (**p=0,012) und nach *EhLPPG*-Stimulation auf 0,01% iNKT Zellen ab (**p=0,006). In weiblichen Probanden nahm die iNKT Frequenz signifikant von 0,19% iNKT Zellen nach α GalCer-Stimulation auf 0,017% iNKT Zellen (**p=0,006) und nach *EhLPPG*-Stimulation auf 0,018% iNKT Zellen (**p=0,0004) ab.

Die Analyse der iNKT-Subpopulationen zeigte (Abb. 11, D), dass je nach Geschlecht und Glykolipid eine Zunahme oder Abnahme einer bestimmten iNKT-Subpopulation beobachtet werden konnte.

iNKT⁺CD4⁺ Zellen nahmen prozentual nach α GalCer-Stimulation in männlichen Probanden ab (von 32,3% auf 24,7%) und blieben nach *EhLPPG*-Stimulation prozentual unverändert (31,6%). In weiblichen Probanden nahmen iNKT⁺CD4⁺ Zellen prozentual nach α GalCer-Stimulation zu (von 32,9% auf 40,6%) und nach *EhLPPG*-Stimulation prozentual ab (28,1%). In den Frequenzen der iNKT⁺CD4⁺ Zellen nach Stimulation konnte ein Geschlechtsunterschied gezeigt werden: iNKT⁺CD4⁺ Zellen weiblicher Probanden wiesen einen tendenziell höheren Anteil mit 40,6% nach α GalCer-Stimulation auf als iNKT⁺CD4⁺ Zellen männlicher Probanden mit 24,7%.

Die Frequenzen von iNKT⁺CD8⁺ Zellen männlicher Probanden (29,9%) blieben nach α GalCer-Stimulation unverändert (30,8%), nahmen jedoch nach *EhLPPG*-Stimulation zu (33,8%). In Frauen konnte nach α GalCer- und *EhLPPG*-Stimulation eine Zunahme von iNKT⁺CD8⁺ Zellen beobachtet werden (von 25,3% auf α GalCer: 32,0%, *EhLPPG*: 43,7%).

In männlichen Probanden nahmen iNKT⁺DN Zellen von 35,6% vor Stimulation auf 39,0% nach α GalCer-Stimulation zu. Nach *EhLPPG*-Stimulation blieb die iNKT⁺DN Zellfrequenz in männlichen

Probanden unverändert (35,1%). In weiblichen Probanden sank die iNKT⁺DN Zellfrequenz nach α GalCer- und *EhLPPG*-Stimulation signifikant (von 40,1% auf α GalCer: 23,7%, *EhLPPG*: 23,5%).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Gesamtfrequenz der iNKT Zellen nach Stimulation in beiden Geschlechtern nach Glykolipid-Stimulation abnimmt und sich auch die iNKT Subpopulationen je nach Glykolipid-Stimulation verändern: Nach α GalCer-Stimulation nahmen in männlichen Probanden iNKT⁺CD4⁺ Zellen ab, iNKT⁺CD8⁺ Zellen blieben unverändert und iNKT⁺DN Zellen nahmen zu. In weiblichen Probanden nahmen iNKT⁺CD4⁺ und iNKT⁺CD8⁺iNKT Zellen zu und iNKT⁺DN Zellen nach α GalCer-Stimulation ab. Nach *EhLPPG*-Stimulation blieb die Frequenz der iNKT⁺CD4⁺ und iNKT⁺DN Zellen in männlichen Probanden unverändert und die Frequenz der iNKT⁺CD8⁺ nahm zu. In weiblichen Probanden nahm die Frequenz der iNKT⁺CD4⁺ und iNKT⁺DN Zellen ab und die der iNKT⁺CD8⁺ Zellen nach *EhLPPG*-Stimulation zu.

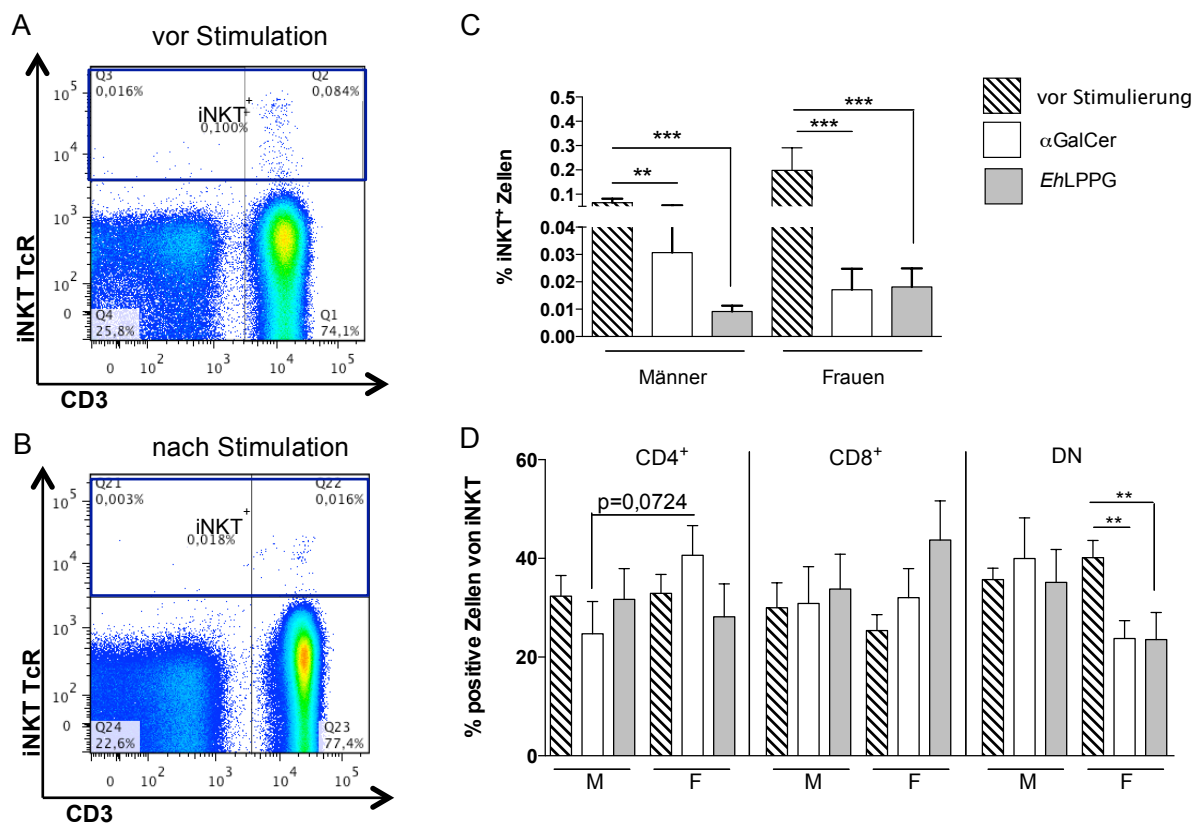


Abb. 11: iNKT Zellfrequenzen nach Stimulation mit α GalCer und *EhLPPG*. iNKT-Zellfrequenz (A) vor und (B) nach Stimulation mit α GalCer und *EhLPPG*. (C) Geschlechtsspezifische Analyse der iNKT-Subpopulationen und (D) der iNKT-Subpopulationen nach Stimulation mit α GalCer und *EhLPPG*. (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, Männer n=13, Frauen n=12) (Mann-Whitney U test, **p $\leq$ 0,001).

3.1.2.2 Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach α GalCer- und *EhLPPG*-Stimulation

IFN γ und TNF α sind wichtige Zytokine bei der Vermittlung des Geschlechtsunterschieds im ALA (Bernin et al., 2013; Lotter et al., 2009). Außerdem zeigte sich, dass auch IL-17A bei der Entstehung des ALA eine Rolle spielt (unveröffentlichte Daten). IL-4, ein anti-inflammatorisches Zytokin wird in Mäusen hauptsächlich durch α GalCer induziert, aber nicht durch *EhLPPG* (Lotter et al., 2009). Daher wurden iNKT Zellen auf ihre geschlechtsspezifische Produktion von IFN γ , TNF α , IL-17A und IL-4 nach Stimulation mit α GalCer und *EhLPPG* untersucht.

Die Untersuchung des Zytokinprofils humaner iNKT Zellen der 25 Probanden nach Stimulation mit α GalCer und *EhLPPG* (Abb. 12, A) ergab, dass Frauen nach α GalCer-Stimulation deutlich mehr iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen (15,62%) als Männer (7,2%) aufweisen ($p=0,1$) (Abb. 12, B). Nach *EhLPPG*-Stimulation zeigte sich kein Unterschied in der Frequenz iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen zwischen den Geschlechtern (Männer: 12,4%, Frauen: 11,8%).

Die Analyse der Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF α zeigte, dass keine iNKT⁺TNF α ⁺ Zellen in Männern nach Glykolipid-Stimulation nachgewiesen werden konnten. Frauen hingegen zeigten eine signifikant höhere Anzahl an iNKT⁺TNF α ⁺ Zellen nach α GalCer-Stimulation (0,9%, $*p=0,024$) und tendenziell eine höhere Anzahl nach *EhLPPG*-Stimulation (0,12%) (Abb. 12, C).

Der Anteil an iNKT⁺IL-17A⁺ Zellen waren signifikant höher in weiblichen Probanden (α GalCer: 5,5%, *EhLPPG*: 1,9% $*p=0,034$), sowohl nach α GalCer- als auch *EhLPPG*-Stimulation (Männer: α GalCer: 0,08%, *EhLPPG*: 0,07%) (Abb. 12, D). Außerdem wiesen Frauen prozentual mit 23,0% mehr iNKT⁺IL-4⁺ Zellen nach α GalCer-Stimulation auf als Männer (5,6% iNKT⁺IL-4⁺ Zellen)($p=0,056$) (Abb. 12, E). *EhLPPG*-Stimulation führte zu keinen Unterschieden in dem Anteil an iNKT⁺IL-4⁺ Zellen in Männern (15,3%) und Frauen (15,7%).

Zusammenfassend weisen weibliche Probanden nach Stimulation mit α GalCer und *EhLPPG* nicht nur eine höhere Frequenz an Zytokin-produzierenden iNKT Zellen auf als männliche Probanden, sondern sezernieren neben IFN γ und IL-4 auch TNF α und IL-17A.

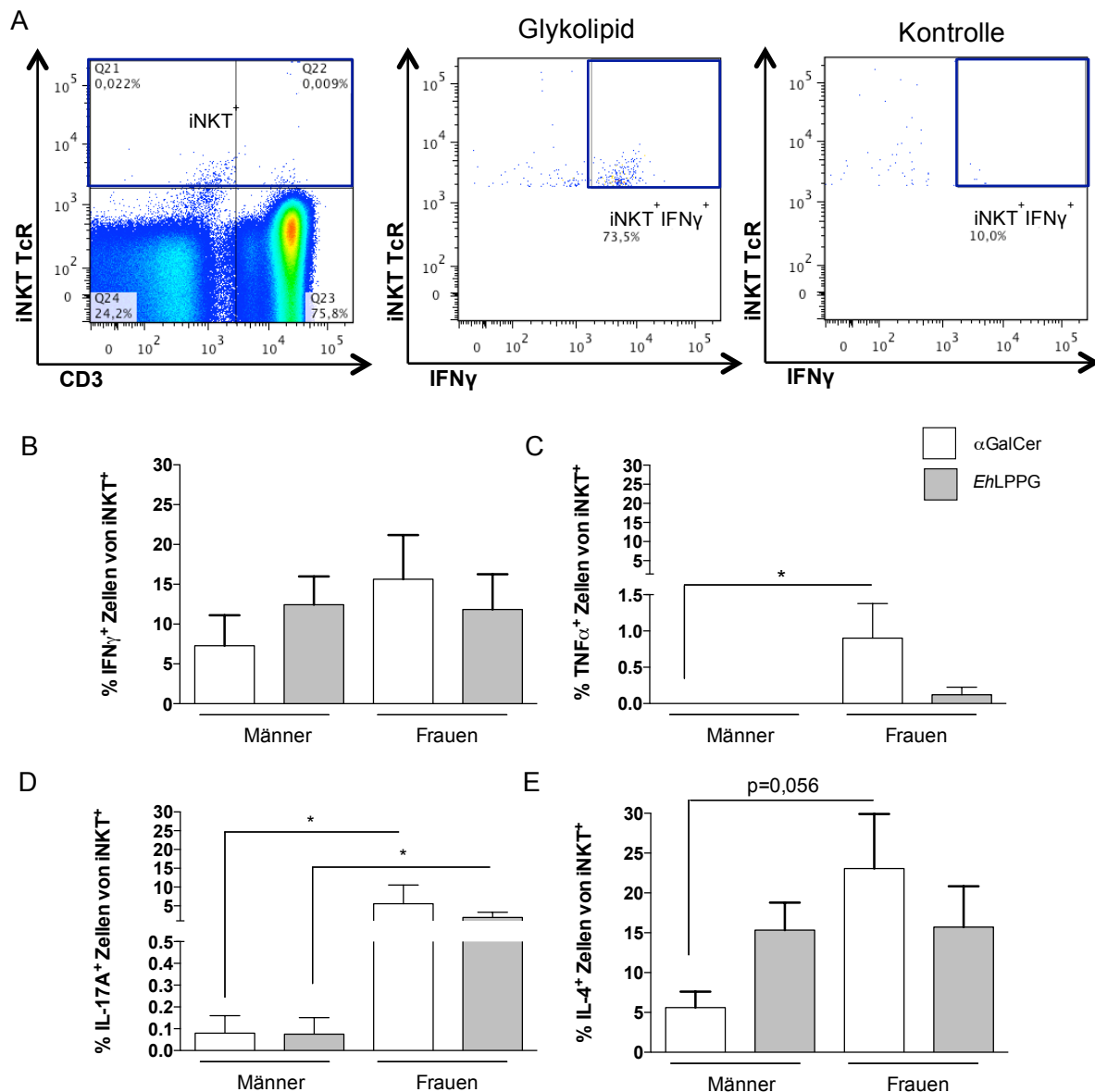


Abb. 12: Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG. (A) Repräsentative Gating-Strategie für die Analyse von iNKT Zellen. (B) Prozentualer Anteil an iNKT $^{+}$ IFN γ^{+} , (C) iNKT $^{+}$ TNF α^{+} , (D) iNKT $^{+}$ IL-17A $^{+}$ und (E) iNKT $^{+}$ IL-4 $^{+}$ Zellen in Abhängigkeit des Geschlechts. (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, Männer n= 13, Frauen n=12) (Mann-Whitney U test, *p $\leq$ 0,05).

3.1.2.3 Zytokinprofil humaner iNKT-Subpopulationen nach α GalCer- und EhLPPG-Stimulation

Im folgenden Abschnitt wurde die geschlechtsspezifische Zytokinproduktion humaner iNKT-Subpopulationen nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG untersucht. Abb. 13, A zeigt die repräsentative Gating-Strategie für die Bestimmung der Zytokinexpression der CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ und DN NKT Zell-Subpopulationen.

iNKT $^{+}$ CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} Zellen wiesen einen tendenziell höheren Anteil in weiblichen Probanden (19,4%) nach α GalCer-Stimulation auf als iNKT $^{+}$ CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} Zellen männlicher Probanden (11,6%). Nach EhLPPG-Stimulation konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Frequenz von iNKT $^{+}$ CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} Zellen beobachtet werden (Männer: 23,3%, Frauen: 22,85%) (Abb. 13, B). Männer

und Frauen wiesen nur eine geringe Anzahl an $\text{iNKT}^+\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+$ Zellen nach Stimulation auf (Männer: αGalCer 0%, *EhLPPG* 0,71%; Frauen: αGalCer 0,85%, *EhLPPG* 0,71%). Auch der Anteil an $\text{iNKT}^+\text{DN IFN}\gamma^+$ Zellen war niedriger als der Anteil an $\text{iNKT}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+$ Zellen. αGalCer -Stimulation induzierte einen höheren Anteil an $\text{iNKT}^+\text{DN IFN}\gamma^+$ Zellen (4,2%) in weiblichen Individuen als in männlichen Individuen (1,92 % $\text{iNKT}^+\text{DN IFN}\gamma^+$ Zellen). Der Anteil an $\text{IFN}\gamma^+\text{DN iNKT}$ Zellen war nach *EhLPPG*-Stimulation in beiden Geschlechtern nahezu identisch (Männer: 1,83%, Frauen: 1,54%).

Wie schon für die gesamte iNKT-Zellpopulation gezeigt wurde, konnten keine $\text{TNF}\alpha^+$ iNKT-Subpopulationen in männlichen Probanden beobachtet werden (Abb. 13, C). In weiblichen Probanden hingegen war jede iNKT-Zellsubpopulation nach αGalCer -Stimulation gering positiv für $\text{TNF}\alpha$ ($\text{iNKT}^+\text{CD4}^+$ 0,92%, $\text{iNKT}^+\text{CD8}^+$ 0,76%, iNKT^+DN 1,94%). Nach *EhLPPG*-Stimulation exprimierten nur $\text{iNKT}^+\text{CD8}^+$ Zellen (0,04%) und iNKT^+DN Zellen (0,23%) $\text{TNF}\alpha$.

In männlichen Probanden waren nach Stimulation nur eine geringe Anzahl an $\text{iNKT}^+\text{IL-17A}^+$ Zellsubpopulationen zu beobachten (Abb. 13, D). Bei weibliche Probanden konnten jedoch signifikant mehr $\text{iNKT}^+\text{CD4}^+\text{IL-17A}^+$ Zellen nach αGalCer -Stimulation (7,4%) und tendenziell mehr nach *EhLPPG*-Stimulation (3,5%) festgestellt werden. Ebenso konnten tendenziell mehr $\text{iNKT}^+\text{CD8}^+\text{IL-17A}^+$ und $\text{iNKT}^+\text{DN IL-17A}^+$ Zellen in Frauen nach Glykolipid-Stimulation festgestellt werden ($\text{iNKT}^+\text{CD8}^+\text{IL-17A}^+$ αGalCer 0,59%, *EhLPPG* 0,54% und $\text{iNKT}^+\text{DN IL-17A}^+$ αGalCer 6,46%, *EhLPPG* 4,53%) als in Männern.

$\text{iNKT}^+\text{CD4}^+\text{IL-4}^+$ Zellen wiesen einen tendenziell höheren Anteil in Frauen nach αGalCer -Stimulation auf (17,9%) und einen niedrigeren Anteil nach *EhLPPG*-Stimulation (14,56%) als in Männern mit 9,6% $\text{iNKT}^+\text{CD4}^+\text{IL-4}^+$ Zellen nach αGalCer -Stimulation und 22,9% $\text{iNKT}^+\text{CD4}^+\text{IL-4}^+$ Zellen nach *EhLPPG*-Stimulation (Abb. 13, E). Mehr $\text{iNKT}^+\text{CD8}^+\text{IL-4}^+$ Zellen konnten nach *EhLPPG*-Stimulation in Männern (4,3%) als in Frauen beobachtet werden (0,02%). Umgekehrt verhielt es sich mit den $\text{iNKT}^+\text{CD8}^+\text{IL-4}^+$ Zellen nach αGalCer -Stimulation. Hier war mit 1,39% der Anteil an $\text{iNKT}^+\text{CD8}^+\text{IL-4}^+$ Zellen in Frauen höher als in Männern. Darüberhinaus wiesen Frauen nach αGalCer -Stimulation signifikant mehr $\text{iNKT}^+\text{DN IL-4}^+$ Zellen (8,10%) auf als Männer (* $p=0,034$). *EhLPPG*-Stimulation führte nur zu einer tendenziell höheren Anzahl an $\text{iNKT}^+\text{DN IL-4}^+$ Zellen mit 9,92% in männlichen Probanden im Vergleich zu weiblichen Probanden mit 7,83% $\text{iNKT}^+\text{DN IL-4}^+$ Zellen.

Zusammengefasst, konnten signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede in der Anzahl von $\text{iNKT}^+\text{CD4}^+\text{IL-17A}^+$ Zellen und $\text{iNKT}^+\text{DN IL-4}^+$ Zellen nach αGalCer -Stimulation beobachtet werden, in dem Frauen eine signifikant höhere Anzahl dieser Populationen aufwiesen als Männer. Darüber hinaus variierte die Anzahl an Zytokin-positiven iNKT-Subpopulationen je nach Glykolipid-Stimulation und Geschlecht teilweise stark.

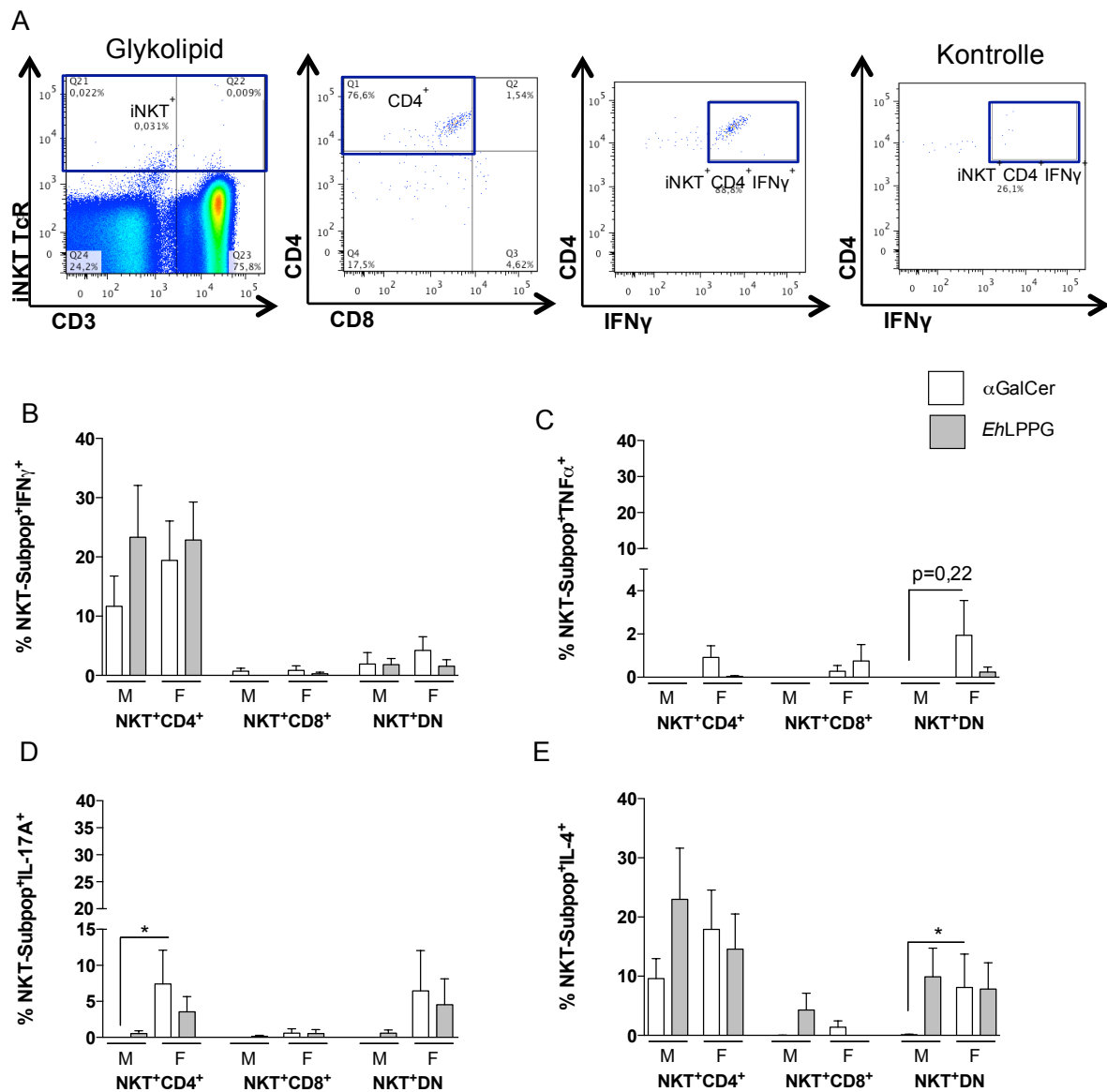


Abb. 13: Zytokinprofil humaner iNKT-Subpopulationen nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG. (A) Repräsentative Gating-Strategie für die Bestimmung der iNKT-Subpopulationen (CD4⁺, CD8⁺ und DN iNKT) mittels Durchflusszytometrie (FACS). Geschlechtsspezifische Analyse der Anteile an (B) IFN γ ⁺, (C) TNF α ⁺, (D) IL-17A⁺ und (E) IL-4⁺ iNKT Zell-Subpopulationen. (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, Männer n= 13, Frauen n=12) (Mann-Whitney U test, *p $\leq$ 0,05).

3.1.2.4 Zytokinprofil konventioneller T-Zellen nach α GalCer- und EhLPPG-Stimulation

Es ist bekannt, dass iNKT Zellen andere Immunzellen transaktivieren können (Bricard et al., 2010). Daher sollten konventionelle CD3⁺ T-Zellen auf eine mögliche Transaktivierung nach Stimulierung mit den iNKT Zell-Liganden α GalCer und EhLPPG hin untersucht werden. Die Subpopulationen der konventionellen T-Zellen wurden entsprechend ihrer Oberflächenmarker in (CD3⁺)CD4⁺, (CD3⁺)CD8⁺ und (CD3⁺)DN T-Zellen eingeteilt.

Die Analyse der Zytokinproduktion der drei konventionellen CD3⁺ T-Zellsubpopulationen zeigte, dass hauptsächlich DN T-Zellen nach α GalCer und EhLPPG-Stimulation IFN γ -, TNF α - und IL-17A-positiv

waren (Abb. 14, A-D). $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen waren für diese Zytokine sowohl in Männern als auch Frauen nur sehr gering positiv. Ein Geschlechtsunterschied konnte nicht nachgewiesen werden. IL-4-positive konventionelle T-Zellen konnten in allen drei Subpopulationen beobachtet werden (Abb. 14, E). In männlichen Probanden konnten mehr $CD4^+IL-4^+$ T-Zellen (3,0%) nach α GalCer-Stimulation nachgewiesen werden als in weiblichen Probanden (0,8% $CD4^+IL-4^+$ T-Zellen).

EhLPPG-Stimulation ergab keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in $CD4^+IL-4^+$ T-Zellen T-Zellen (Männer 0,8%, Frauen 0,6%). In der $CD8^+$ T-Zellsubpopulation zeigten Frauen einen tendenziell höheren Anteil an $CD8^+IL-4^+$ T-Zellen T-Zellen sowohl nach α GalCer- (1,9%) als auch *EhLPPG*-Stimulation (0,26%) als Männer (α GalCer 0,22%, *EhLPPG* 0,002% $CD8^+IL-4^+$ T-Zellen).

DN konventionelle T-Zellen wiesen nach α GalCer-Stimulation in Männern mit 2,5% DN $IL-4^+$ T-Zellen eine größere Anzahl auf als Frauen mit 0,65%. In Frauen und Männern konnte hingegen nach *EhLPPG*-Stimulation kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Anzahl an DN $IL-4^+$ T-Zellen detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass hier nur eine geringe Transaktivierung von konventionellen T-Zellen zu beobachten war. Die Produktion von $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-17A wurde überwiegend nur bei konventionellen DN T-Zellen beobachtet während eine IL-4-Produktion hingegen bei allen drei Subpopulationen festgestellt werden konnte. Hier zeigten sich auch tendenzielle geschlechtsspezifische Unterschiede, in dem in männlichen Probanden nach α GalCer-Stimulation ein höherer Anteil an $CD4^+IL4^+$ und DN $IL4^+$ T-Zellen nachgewiesen werden konnte als in weiblichen Probanden. In weiblichen Probanden hingegen konnten nach α GalCer-Stimulation mehr $CD8^+IL-4^+$ T-Zellen nachgewiesen werden als in männlichen Probanden. Eine Stimulation mit *EhLPPG* induzierte keine geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Zytokinproduktion konventioneller T-Zellen.

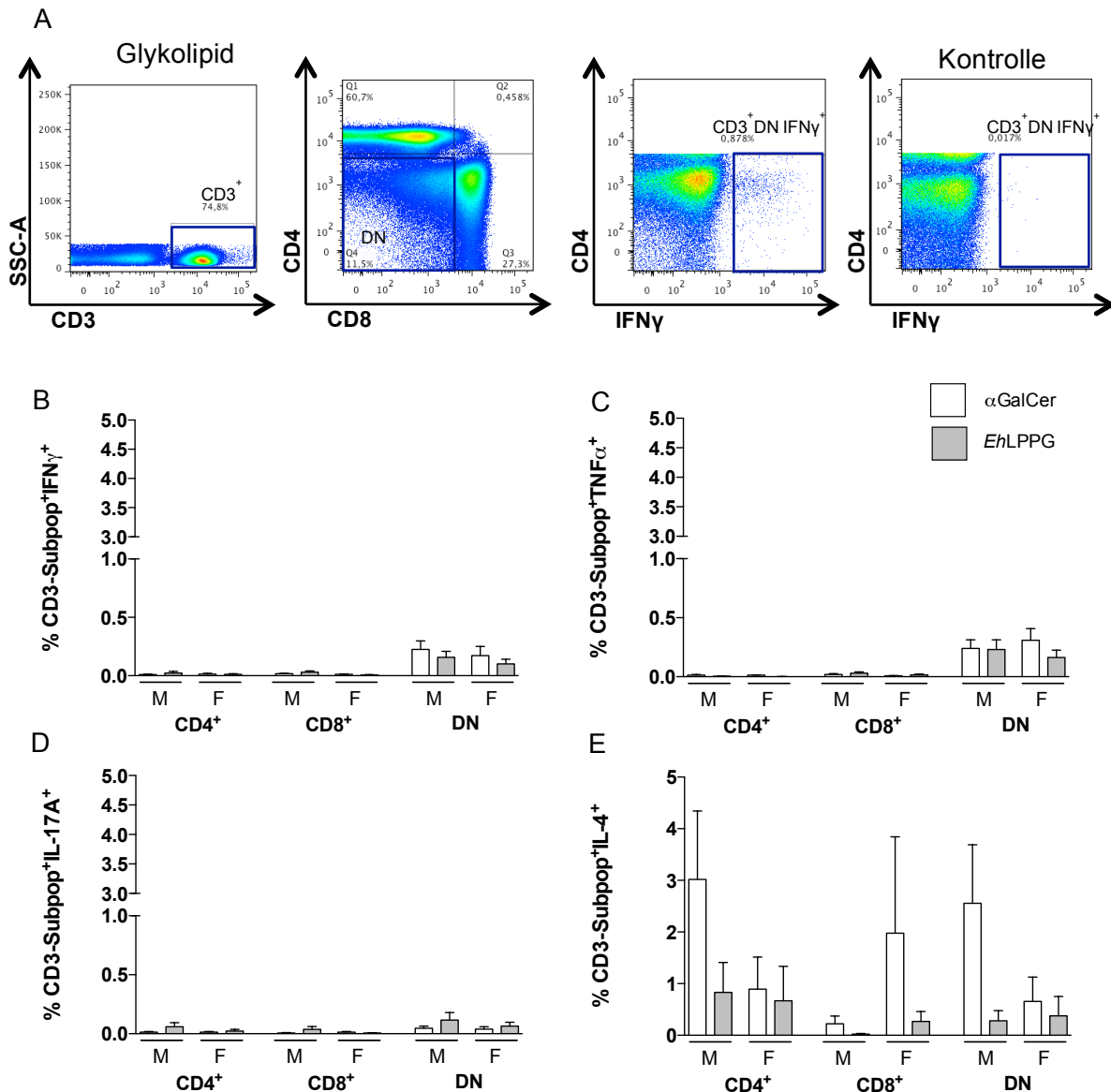


Abb. 14: Zytokinprofil konventioneller T-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG. (A) Repräsentative Gating-Strategie für die Bestimmung der CD3⁺ T-Zell-Subpopulationen (CD4⁺, CD8⁺ und DN T-Zellen) mittels Durchflusszytometrie (FACS). Geschlechtsspezifische Analyse der Anteile an (B) IFN γ ⁺, (C) TNF α ⁺, (D) IL-17A⁺ und (E) IL-4⁺ T-Zell-Subpopulationen in gesunden Probanden (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, Männer n= 13, Frauen n=12) (Mann-Whitney U test, *p $\leq$ 0,05).

3.1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der iNKT-Zell-Frequenz der Maus

Es ist bekannt, dass iNKT Zellen bei der Kontrolle des Amöbenleberabszesses eine wichtige Rolle spielen (Lotter et al., 2009). Um jedoch herauszufinden, ob Unterschiede in der Quantität der iNKT Zellen für den Geschlechtsunterschied verantwortlich sind, wurden die Frequenzen der iNKT Zellen der Leber nach Färbung mit α GalCer-CD1d-Tetramer und CD3 mittels Durchflusszytometrie in männlichen und weiblichen Mäusen verschiedenen Alters bestimmt (Abb. 15, A). Die Analyse zeigte, dass junge Tiere (6-8 Wochen) eine geringere Anzahl an iNKT Zellen aufwiesen als ältere Tiere (9-11 und 16-18 Wochen) (Abb. 15, B). Es konnte jedoch kein geschlechtsspezifischer Unterschied in den iNKT-Zellfrequenzen der Tiere festgestellt werden (publiziert in (Lotter et al., 2013)).

Zusammengefasst, nehmen iNKT Zellen mit dem Alter in Mäusen zu, weisen jedoch keinen Geschlechtsunterschied auf.

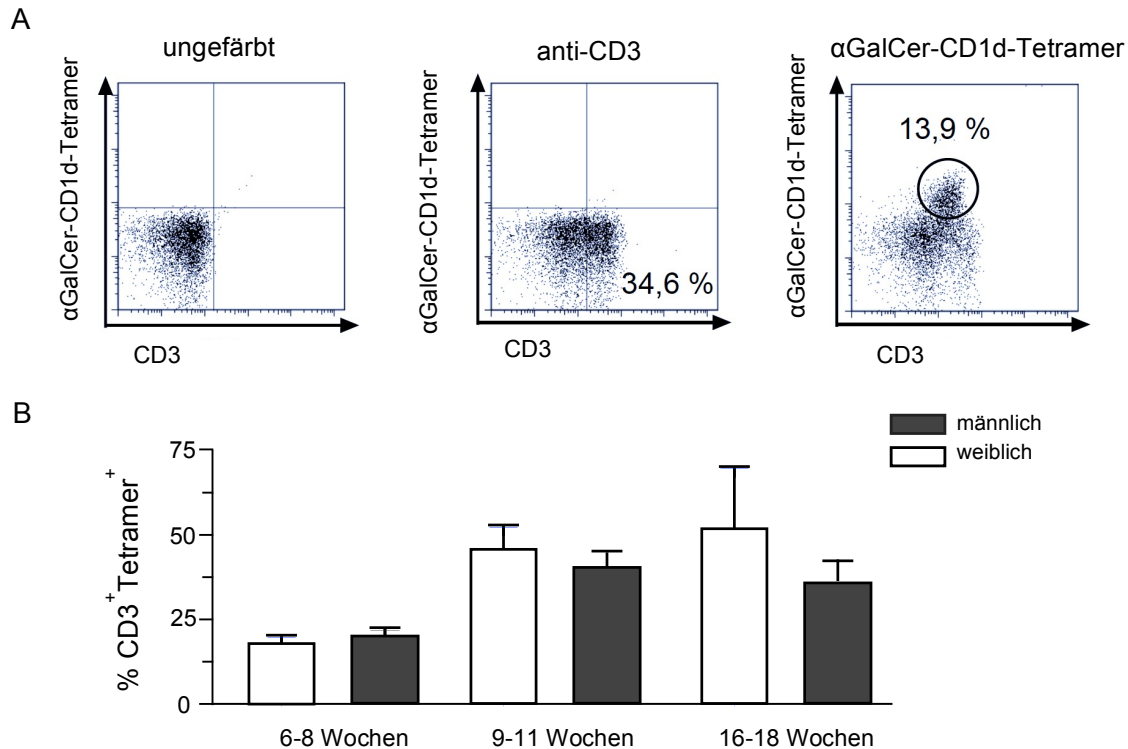


Abb. 15: Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von iNKT Zellen der C57BL/6 Maus. (A) Bestimmung der iNKT Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) mit Hilfe von CD3 und des iNKT Zell-spezifischen α GalCer-CD1d-Tetramers und (B) der iNKT Zellfrequenzen in männlichen und weiblichen Mäusen verschiedenen Alters (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, n=4 pro Gruppe).

3.1.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede in dem Zytokinprofil von iNKT Zellen der Maus

Anders als im Menschen, weisen Mäuse nur zwei iNKT Zellsubpopulationen auf: CD4⁺ iNKT und CD4⁻ iNKT Zellen (Tupin et al., 2007).

Um das geschlechtsspezifische Zytokinprofil von murinen iNKT Zell-Subpopulationen zu untersuchen, wurden α GalCer-Tetramer⁺iNKT Zellen anhand ihrer Expression von CD4 unterschieden und mittels Durchflusszytometrie sortiert. In einem Stimulationsassay mit α GalCer- und *Eh*LPPG-stimulierten DC wurde anschließend die IFN γ -Produktion der zwei iNKT-Subpopulationen (CD4⁺ und CD4⁻ iNKT) und der Pan T-Zellen (Gesamtheit aller T-Zellen, bestehend aus konventionellen und nicht-konventionellen T-Zellen (Kontrolle)) im Überstand mittels ELISA untersucht (Abb. 16, A). Dieser Versuch in Zusammenarbeit mit Dr. Elena Helk im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

Die Analyse der IFN γ -Produktion ergab, dass sowohl Pan T-Zellen, CD4⁺ als auch CD4⁻ iNKT Zellen nach α GalCer und *Eh*LPPG-Stimulation IFN γ produzieren (Abb. 16, B). Darüber hinaus wiesen Pan T-Zellen weiblicher Tiere und insbesondere CD4⁻ iNKT Zellen eine signifikant erhöhte IFN γ -Produktion im Vergleich zu Pan T-Zellen und CD4⁻ iNKT Zellen männlicher Tiere auf (**p<0,001, ***p<0,0001) (Abb. 16, B).

Darüber hinaus wurden Pan T-Zellen aus der Leber von männlichen und weiblichen Mäusen isoliert und mit α GalCer und *Eh*LPPG stimuliert und mittels CBA auf ihr Zytokinprofil untersucht (Abb. 16, C). Pan T-Zellen aus weiblichen Mäusen produzierten signifikant mehr $\text{IFN}\gamma$ nach α GalCer und *Eh*LPPG-Stimulation als Pan T-Zellen männlicher Mäuse ($***p < 0,0001$, $**p > 0,001$). α GalCer-Stimulation führte auch zu einer signifikant höheren und *Eh*LPPG zu einer tendenziell höheren IL-12p40-Produktion in weiblichen Mäusen als in männlichen Mäusen. Die Stimulation mit α GalCer induzierte eine hohe Produktion von IL-4 in Pan T-Zellen weiblicher und männlicher Mäuse. *Eh*LPPG hingegen induzierte mehr IL-4 in Pan T-Zellen männlicher Mäuse als in Pan T-Zellen weiblicher Mäuse (Abb. 16, C).

IL-17 wurde in signifikant höheren Mengen in weiblichen Mäusen nach α GalCer- und *Eh*LPPG-Stimulation produziert. IL-6 wurde von Pan T-Zellen weiblicher und männlicher Herkunft produziert. Pan T-Zellen weiblicher Tiere produzierten tendenziell nach α GalCer-Stimulation mehr IL-6 als Pan T-Zellen männlicher Tiere. *Eh*LPPG-Stimulation ergab keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Wie schon in humanen iNKT Zellen beobachtet, induzierte die Stimulation mit den beiden Glykolipiden keine $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in Pan T-Zellen männlicher Tiere bzw. konnte nicht detektiert werden. Pan T-Zellen weiblicher Tiere schienen tendenziell mehr $\text{TNF}\alpha$ nach α GalCer und *Eh*LPPG-Stimulation zu produzieren.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Pan T-Zellen weiblicher Tiere deutlich größere Mengen an Zytokinen nach Glykolipid-Stimulierung produzieren als Pan T-Zellen männlicher Tiere, insbesondere signifikant mehr $\text{IFN}\gamma$, IL-12p40 und IL-17.

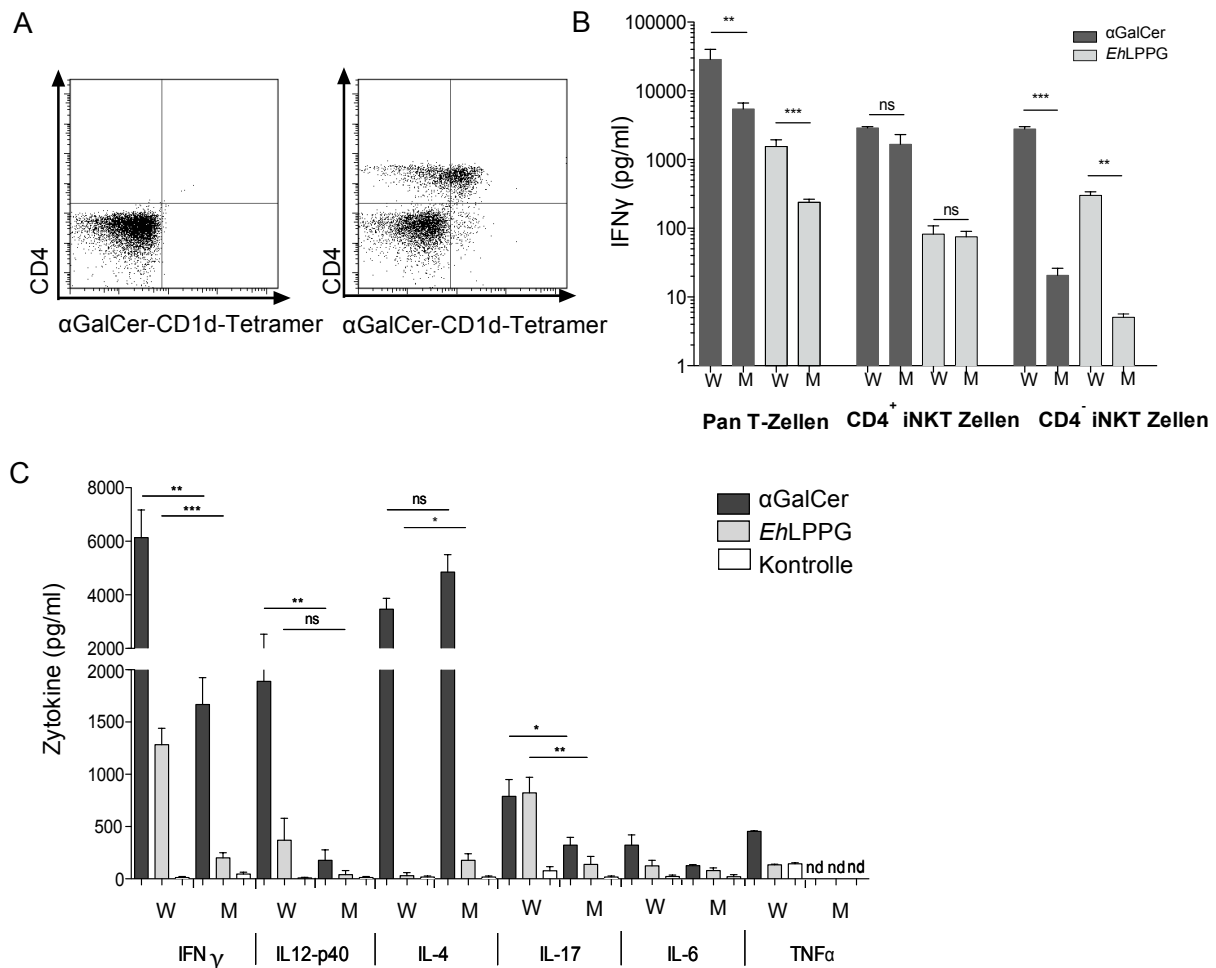


Abb. 16: Zytokinprofil muriner konventioneller und nicht-konventioneller T-Zellen (iNKT) nach Stimulation mit α GalCer und EhLPPG. (A) Bestimmung der Frequenzen von iNKT Zellen anhand der Expression von CD4 und α GalCer-CD1d-Tetramer und (B) IFN γ -Produktion von Pan T-Zellen, CD4⁺ und CD4⁻ iNKT Zellen männlicher und weiblicher Tiere im Überstand nach Inkubation mit α GalCer- und EhLPPG-stimulierten DCs (ELISA). (C) Zytokinprofil von Pan T-Zellen weiblicher und männlicher Mäuse nach Inkubation mit α GalCer- und EhLPPG-stimulierten DC (CBA) (Versuchsdurchführung: Dr. Elena Helk) (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n=4 pro Gruppe) (Mann-Whitney U test, *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,001, ***p $\leq$ 0,0001).

3.2 Zytokinprofil humaner und muriner iNKT Zellen nach Stimulation mit synthetischen EhPI Analoga

Strukturell und funktionell weist EhLPPG große Ähnlichkeiten zu α GalCer auf. Zu α GalCer existiert inzwischen ein synthetisches Analogon, welches für immuntherapeutische Anwendungen beim Menschen verwendet wird (Ishikawa et al., 2005; Motohashi et al., 2009), das KRN7000 (Kyowa Hakko Kirin Company, Funakoshi company, United States Patent # 5,936,076). Da die Isolierung und Aufreinigung des nativen EhLPPGs sehr anspruchsvoll und zeitaufwendig ist, bietet die Herstellung synthetischer Analoga große Vorteile gegenüber dem nativen EhLPPG und erlaubt die Einführung von Modifikationen zur Optimierung der Aktivierung von iNKT Zellen. In Zusammenarbeit mit den japanischen Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Yukari Fujimoto (Keio Universität, Yokohama, Japan) und von Prof. Dr. Koichi Fukase (Universität Osaka, Osaka, Japan) wurden bisher vier synthetische EhLPPG Analoga hergestellt (Abb. 17).

Aus einer Vielzahl von Synthesestufen unter Verwendung von Schutzgruppenchemie und stereoselektiven Katalysatoren aus kommerziell erhältlichen Ausgangsverbindungen wurden Analoga zu den beiden nativen *EhPI*-Ankern, *EhPIa* und *EhPIb* des *EhLPPG*s, synthetisiert (Abb. 17, A+B). Beide Anker sind aus *EhLPPG* durch eine Spaltung durch Hydrogennitratdesaminierung entstanden. *EhPIa* und *EhPIb* enthalten Glycerol, Inositol und Fettsäuren der Länge C30:1, C28:0 und C16:0. Die beiden nativen *EhPI* unterscheiden sich in ihrer Acylierung. *EhPIa* (Abb. 17, A) weist am Phosphatidylinositolring an Position 1 eine C28:0 Fettsäurekette auf, kann jedoch auch eine Fettsäurekette der Länge C30:1 aufweisen (1-O-(28:0)-lyso-glycero-3-phosphatidylinositol). Im Gegensatz dazu besteht *EhPIb* (Abb. 17, B) aus einem Phosphatidylinositolring und zwei Fettsäureketten, einer längeren C28:0 bzw. C30:1 Kette an Position 1 und einer kürzeren C16:0 Kette an Position 2 des Inositols (1-O-[(28:0)-lyso-glycero-3-phosphatidyl-] 2-O-(16:0)-inositol) (Lotter et al., 2009).

Es wurde zum *EhPIa*-Anker ein synthetisches Analog, das *EhPIa* C30:1 cis synthetisiert, mit einer cis-Doppelbindung (Abb. 17, C). Drei Analoga wurden nach *EhPIb* synthetisiert: das *EhPIb* C30:1 cis (Abb. 17, D), *EhPIb* C30:1 trans (Abb. 17, E) und das *EhPIb* C28:0 (Abb. 17, F). Sie unterscheiden sich in der Länge ihrer Fettsäureketten und ihrer Saturierung. Diese synthetischen *EhPI*-Analoga wurden auf ihre Fähigkeit iNKT Zellen zu aktivieren, untersucht.

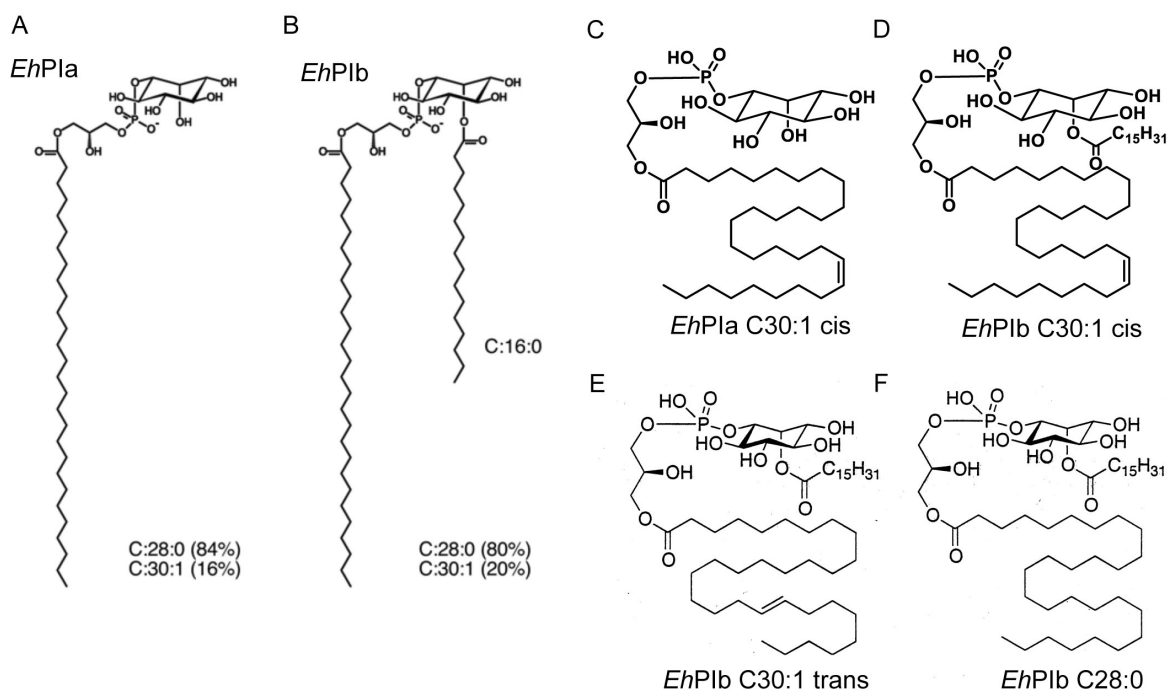


Abb. 17: Native und synthetische *EhPI*-Anker. *EhLPPG* besteht aus zwei *EhPI*-Ankern, (A) *EhPIa* und (B) *EhPIb*. (C) *EhPIa* C30:1 cis, (D) *EhPIb* C30:1 cis, (E) und *EhPIb* C28:0 wurden analog zu den beiden nativ vorkommenden Ankern synthetisiert.

3.2.1 Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulierung mit synthetischen *EhPI* Analoga

Um das Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulierung mit synthetischen *EhPI* Analoga zu untersuchen, wurden PBMC isoliert und 15 h mit α GalCer, *EhLPPG*, sowie den vier synthetischen

EhPI Analoga stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Zytokinproduktion (IFN γ , TNF α , IL-4 und IL-17A) der iNKT Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Die Analyse der humanen iNKT Zellen nach Stimulierungen mit synthetischen *EhPI* Analoga ergab, dass hauptsächlich iNKT⁺IFN γ ⁺ und iNKT⁺IL-4⁺ Zellen detektiert werden konnten (Abb. 18, A+D). iNKT⁺IL-17A⁺ und iNKT⁺TNF α ⁺ Zellen waren nur in geringen Mengen nachweisbar (Abb. 18, B+C).

Konzentrationsabhängig konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen (Abb. 18, A) in α GalCer-, *EhLPPG*-, *EhPIa* C30:1 cis-, *EhPIb* C30:1 cis- und *EhPIb* C30:1 trans-stimulierten PBMC im Vergleich zur α CD28-Kontrolle beobachtet werden (12-35% iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen, * $p \leq 0,05$) (für eine vereinfachte Darstellung wurde die α CD28-Kontrolle abgezogen und nur die Werte nach Subtraktion gezeigt). *EhPIb* C28:0-stimulierte PBMC wiesen nur eine tendenziell höhere Anzahl an iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen auf. Es konnten geringe Unterschiede in dem prozentualen Anteil an iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen zwischen den vier *EhPI*-Ankern festgestellt werden: Die verwendeten Konzentrationen der *EhPIb* C30:1 cis-, *EhPIb* C30:1 trans- und *EhPIb* C28:0-Analoga induzierten in humanen PBMC relativ ähnliche prozentuale Anteile an iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen. Im Gegensatz dazu induzierten höhere Konzentrationen des Analogs *EhPIa* C30:1 cis (1 und 5 μ g/ml) niedrigere Mengen an iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen.

Innerhalb der drei *EhPIb*-Anker zeigte sich, dass *EhPIb* C30:1 trans den höchsten Anteil an iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen induzierte und *EhPIb* C28:0 und *EhPIb* C30:1 cis einen niedrigeren, aber untereinander ähnlichen Anteil an iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen induzierten (iNKT⁺IFN γ ⁺ Zellen: *EhPIb* C30:1 trans > *EhPIb* C28:0 $\geq$ *EhPIb* C30:1 cis).

In Abhängigkeit der Konzentration konnte ein tendenziell erhöhter Prozentsatz an iNKT⁺IL-4⁺ Zellen in α GalCer-, *EhLPPG*-, *EhPIa* C30:1 cis-, *EhPIb* C30:1 cis- und *EhPIb* C30:1 trans- und *EhPIb* C28:0-stimulierten PBMC beobachtet werden (Abb. 18, D). Jedoch kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

Zwischen den vier *EhPI*-Ankern konnten geringe Unterschiede in dem Anteil an iNKT⁺IL-4⁺ Zellen beobachtet werden. *EhPIb* C30:1 trans- und *EhPIb* C28:0-stimulierte PBMC wiesen eine höhere Anzahl an iNKT⁺IL-4⁺ Zellen auf als *EhPIa* C30:1 cis- und *EhPIb* C30:1 cis-stimulierte PBMC (iNKT⁺IL-4⁺ Zellen: *EhPIb* C30:1 trans $\geq$ *EhPIb* C28:0 > *EhPIa* C30:1 > *EhPIb* C30:1 cis). Eine niedrige Konzentration von *EhPIa* C30:1 cis und auch *EhPIb* C30:1 cis induzierten mehr iNKT⁺IL-4⁺ Zellen als höhere Konzentrationen der jeweiligen synthetischen *EhPI*-Anker.

Die synthetischen *EhPI* Analoga induzieren in humanen iNKT Zellen IFN γ und IL-4, jedoch nur wenig TNF α und IL-17A. Außerdem konnten nur geringe Unterschiede zwischen *EhLPPG* und seinen synthetischen *EhPI* Analoga beobachtet werden. Die Anzahl an Zytokin-positiven Zellen war nahezu identisch. *EhPIb* C30:1 trans scheint jedoch bisher eines der stärksten *EhPI* Analoga in der Induktion von IFN γ und IL-4 in humanen iNKT Zellen zu sein.

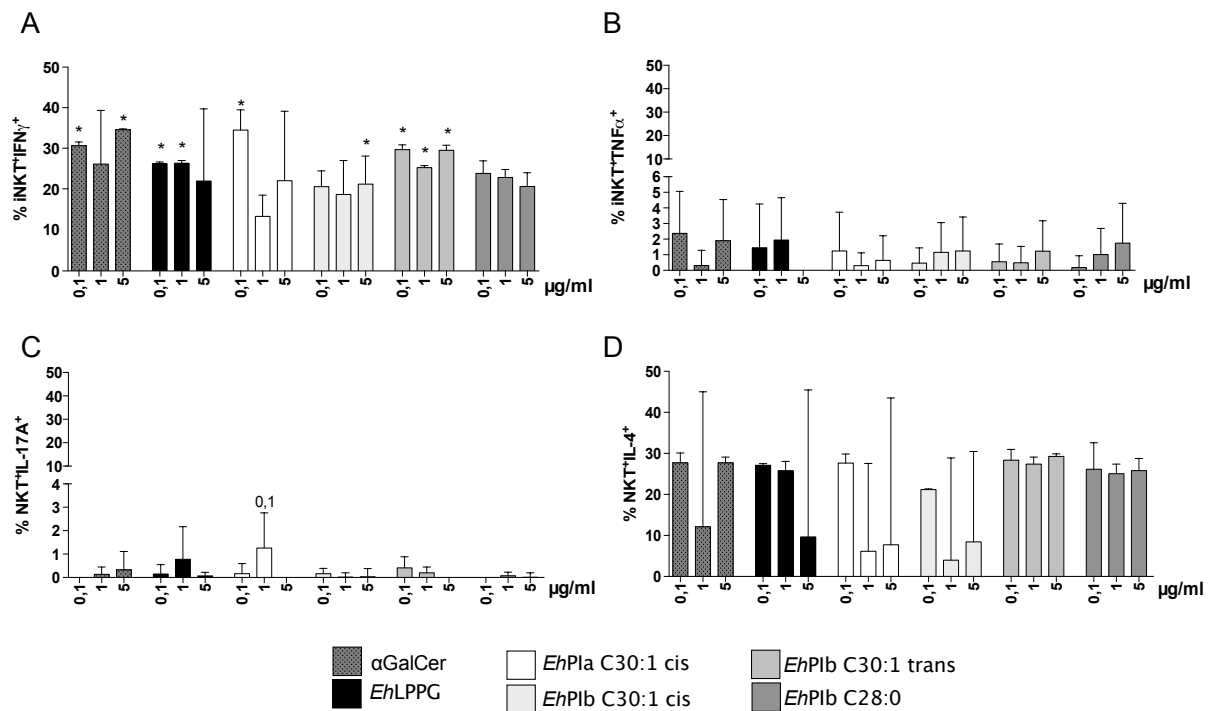


Abb. 18: Intrazelluläres Zytokinprofil humaner iNKT Zellen nach Stimulation mit α GalCer, EhLPPG und den synthetischen EhPI Analoga. Humane iNKT Zellen ($CD3^+iNKT\ TcR^+$) wurden in PBMCs gesunder Probanden mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Analyse der Anteile an (A) $IFN\gamma^+$, (B) $TNF\alpha^+$, (C) $IL-17A^+$ und (D) $IL-4^+$ iNKT Zellen nach 15-stündiger Stimulation mit α GalCer, EhLPPG, sowie EhPIa C30:1 cis, EhPIb C30:1 cis, EhPIb C30:1 trans und EhPIb C28:0 in den indizierten Konzentrationen (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler nach Abzug der α CD28-Kontrolle, 2 unabhängige Experimente) (*unpaired Student's t test*, * $p \leq 0,05\%$).

3.2.2 Zytokinproduktion muriner iNKT Zellen nach Stimulierung mit synthetischen EhPI Analoga

Um die Zytokinproduktion muriner iNKT Zellen nach Stimulierung mit synthetischen EhPI zu untersuchen, wurden aus der Milz von Mäusen Lymphozyten isoliert. Mit Hilfe von MACS® Separation wurden Pan T-Zellen aufgereinigt und diese zu vorher mit α GalCer-, EhLPPG- und synthetischen EhPI Analoga-stimulierten DC gegeben. Der Nachweis von $IFN\gamma$ erfolgte im Überstand mittels ELISA.

Zunächst wurde bestimmt welche Konzentration der EhPI Analoga eine $IFN\gamma$ -Produktion auslöst. Da vorherige Untersuchungen gezeigt hatten, dass eine zu hohe Konzentration der EhPI Analoga zum Absterben der Zellen führte (Daten nicht gezeigt), wurden die EhPI Analoga in den Konzentrationen 0,001-1 μ g/ml verwendet (Abb. 19, A). Im Vergleich zu α GalCer-stimulierten Zellen, die eine Konzentration von 467,4-717,0 pg/ml $IFN\gamma$ aufwiesen, wiesen EhLPPG-stimulierte Zellen eine niedrigere Konzentration von 79,3 pg/ml $IFN\gamma$ und die synthetischen EhPI Analoga-stimulierten Zellen noch niedrigere Mengen an $IFN\gamma$ auf (1-48,3 pg/ml $IFN\gamma$). Es zeigte sich, dass 0,1 μ g/ml der EhPI Analoga die beste $IFN\gamma$ -Produktion auslöst (16,4-48,3 pg/ml $IFN\gamma$).

In zwei Folgeexperimenten wurde nun 0,1 μ g/ml der EhPI Analoga eingesetzt (Abb. 19, B). Die Analyse der Stimulation der murinen Pan T-Zellen der Milz zeigte, dass α GalCer (812,1 pg/ml, * $p=0,01$) und EhLPPG (114,5 pg/ml, ** $p=0,003$) gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant mehr $IFN\gamma$

induzieren. Die *EhPI* Analoga induzierten weniger IFN γ in Pan T-Zellen als α GalCer und *EhLPPG*. Von den vier *EhPI* Analoga induzierte nur *EhPIb* C30:1 cis signifikant mehr IFN γ als die Kontrolle (54,17 pg/ml, *p=0,035). *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 trans wiesen nur eine geringe IFN γ -Induktion auf. *EhPIb* C28:0 induzierte mehr IFN γ als *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 trans, jedoch weniger als *EhPIb* C30:1 cis.

Um nachzuweisen, dass iNKT Zellen spezifisch durch die *EhPI* Analoga aktiviert werden und IFN γ produzieren, wurden Pan T-Zellen aus der Milz von Mäusen isoliert und iNKT Zellen mittels α GalCer-CD1d-Tetramer aus dem Zellgemisch herausortiert (Abb. 19, C). Die Reanalyse ergab eine Reinheit der iNKT Zellen von 91,2%. Die sortierten iNKT Zellen wurden mit *EhPI* Analoga-stimulierten DC koinkubiert und die IFN γ -Konzentration in den Überständen mittels ELISA untersucht.

Sortierte iNKT Zellen wiesen eine allgemein niedrigere IFN γ -Produktion auf als Pan T-Zellen (Abb. 19, D). α GalCer löste tendenziell und *EhLPPG* signifikant mehr IFN γ -Produktion in sortierten iNKT Zellen aus. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der IFN γ -Produktion ausgelöst durch die vier *EhPI* Analoga beobachtet werden. Hier wurde die größte Menge an IFN γ von *EhPIb* C30:1 trans (160,1 pg/ml) induziert. Im Vergleich zum Assay mit Pan T Zellen induzierte *EhPIa* C30:1 kaum IFN γ (72,8 pg/ml). *EhPIb* C30:1 cis und *EhPIb* C28:0 induzierten IFN γ , jedoch *EhPIb* C28:0 stärker als *EhPIb* C30:1 cis.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass alle vier synthetischen *EhPI* Analoga IFN γ in murinen iNKT und Pan T-Zellen induzierten. Es konnte auch festgestellt werden, dass Unterschiede in der Stimulation der murinen Zellen bestehen: *EhPIa* C30:1 cis induziert nur geringe Mengen an IFN γ , die drei *EhPIb* Analoga, *EhPIb* C30:1 trans, *EhPIb* C30:1 cis und *EhPIb* C28:0 induzieren hingegen größere Mengen an IFN γ . Auch induzieren die vier *EhPI* Analoga allgemein niedrigere Konzentrationen an IFN γ als α GalCer und *EhLPPG*. Es konnte noch kein Analoga identifiziert werden, welches eine annähernd gleich starke oder stärkere IFN γ -Produktion in murinen iNKT Zellen auslöst als α GalCer und *EhLPPG*.

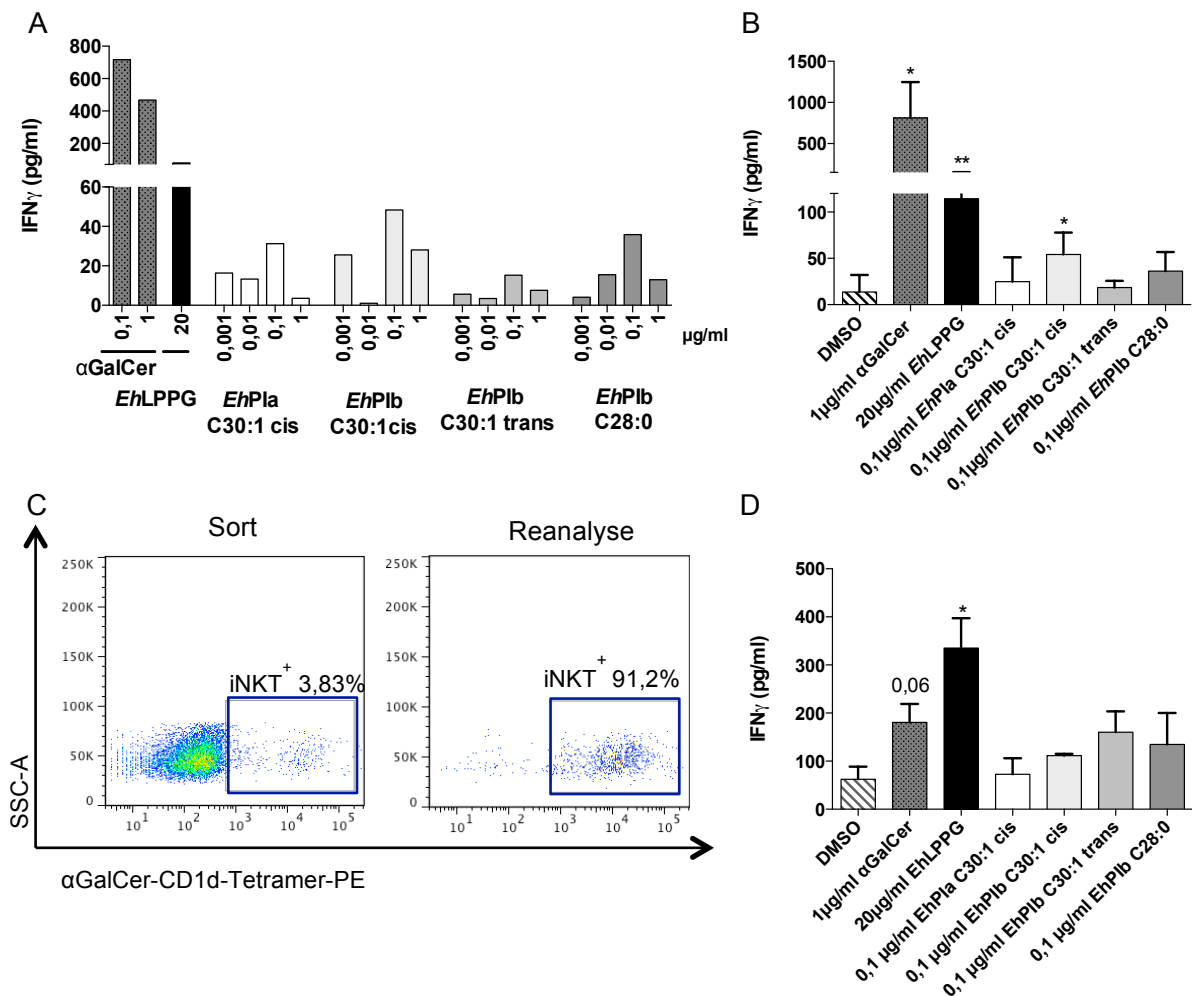


Abb. 19: IFN γ -Produktion in murinen Milzlymphozyten und isolierten iNKT Zellen nach Stimulation mit synthetischen EhPI Analoga. (A) Titrierung der geeigneten Konzentration der synthetischen EhPI Analoga zur Stimulation von Pan T-Zellen der Milz und Analyse der IFN γ -Produktion im Überstand von Pan T-Zellen ko-inkubiert mit α GalCer-, EhLPPG- und synthetischen EhPI Analoga-stimulierten DCs mittels ELISA (B) IFN γ -Produktion im Überstand von Pan T-Zellen ko-inkubiert mit DCs stimuliert mit den indizierten Stimulanzen in zwei unabhängigen Experimenten. (C) Isolation von iNKT Zellen mit Hilfe eines α GalCer-CD1d-Tetramers. (D) IFN γ -Produktion sortierter iNKT Zellen nach Ko-Inkubation mit synthetischen EhPI Analoga-stimulierten DCs (ein Experiment, Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, n=1-2, *unpaired Student's t test*, *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,001).

3.3. Evaluierung der Toxizität von α GalCer und EhLPPG

Um ein neues Molekül als Immuntherapeutikum verwenden zu können, müssen eventuelle Nebenwirkungen untersucht werden. Wichtiger Indikator für die Toxizität eines Moleküls ist die Schädigung der Leber, die über die Messung des Serumlevels verschiedener Enzyme, wie der Alanin-Aminotransferase (ALT), der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alkalischen Phosphatase (ALP) ermittelt werden kann. Um die Leberbelastung ausgelöst durch die Applikation von α GalCer und EhLPPG zu untersuchen, wurden C57BL/6 und FVB/N Mäusen unterschiedliche Konzentrationen α GalCer und EhLPPG injiziert und über einen Zeitraum von ca. vier Wochen die ALT-Werte im Serum gemessen (die schwarzen Pfeile markieren die wöchentliche Applikation der Glykolipide). Da die Leberbelastung eines Therapeutikums abhängig vom verwendeten Mausstamm variieren kann, wurden zwei Mausstämme untersucht.

Im Vergleich zu Kontroll-behandelten Tieren führte die Applikation von α GalCer in C57BL/6 Mäusen konzentrationsabhängig zu leicht erhöhten ALT-Wert (Abb. 20, A). An Tag 3 nach Applikation führten 10 μ g/ml α GalCer zu einem erhöhten ALT-Wert im Serum ($208,5 \pm 92,5$ U/L), der dann jedoch bis Tag 24 ($28,5 \pm 3,7$ U/L) abnahm und gegenüber der Kontrolle nur noch leicht erhöht war. 1 μ g/ml α GalCer erhöhte den ALT-Wert im Serum ($23,5 \pm 5,6$ U/L) der Tiere zu Beginn der Applikation nur leicht, nahm an Tag 10 zu ($77,9 \pm 9,1$ U/L) und blieb bis Tag 24 annähernd gleich ($62,8 \pm 5,6$ U/L). Wie 1 μ g/ml α GalCer erhöhte 0,1 μ g/ml α GalCer den ALT-Wert im Serum der Tiere zu Beginn nur gering ($28,9 \pm 8,9$ U/L). Ein Anstieg des ALT-Wertes im Serum konnte an Tag 17 ($132,8 \pm 105,4$ U/L) beobachtet werden, der jedoch bis Tag 24 wieder abnahm ($28,5 \pm 4,2$ U/L).

EhLPPG erhöhte in weit geringerem Maße den ALT-Wert als α GalCer (Abb. 20, B). In allen vier verwendeten *EhLPPG*-Konzentrationen konnte nach Applikation eine leichte Erhöhung des ALT-Wertes im Serum von $6,06 \pm 3,8$ bis $42,35 \pm 3,3$ U/L über den gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zur Kontrolle ($3,6 \pm 2,5$ bis $18,6 \pm 3,7$ U/L) nachgewiesen werden.

In FVB/N Mäusen konnte sowohl für α GalCer- als auch *EhLPPG*-behandelte Tiere höhere ALT-Werte gemessen werden als in C57BL/6 Mäusen. Auch hier zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die ALT-Werte. Applikationen von hohen Konzentrationen von α GalCer (10 μ g/ml und 1 μ g/ml) erhöhten den ALT-Wert im Serum von FVB/N Mäusen an Tag 3 um bis zu $368,0 \pm 102,2$ U/L. An Tag 10, 17 und 24 nahmen die ALT-Werte dieser Tiere kontinuierlich wieder ab (Tag 24 10 μ g/ml α GalCer: $48,1 \pm 4,0$ U/L; 1 μ g/ml α GalCer $72,5 \pm 15,1$ U/L) (Abb. 20, C).

FVB/N Mäuse, die mit den niedrigen Konzentrationen von *EhLPPG* (1 μ g/ml und 10 μ g/ml) behandelt worden waren (Abb. 20, D), zeigten kaum erhöhte ALT-Werte im Vergleich zu den Kontroll-behandelten Tieren. Höhere Konzentrationen von *EhLPPG* (25 μ g/ml und 50 μ g/ml) führten erst an Tag 17 zu höheren ALT-Werten (bis zu $159,2 \pm 2,5$ U/L) im Vergleich zu den ALT-Werten in Kontrolltieren ($50,8 \pm 1,8$ U/L).

Die Untersuchung zeigte, dass die Behandlung α GalCer und *EhLPPG* in beiden Mausstämmen zu einer unterschiedlich starken Leberbelastung führt. Insgesamt wurden dabei in C57BL/6 Mäusen niedrigere ALT-Werte im Serum induziert als in FVB/N Mäusen.

Es zeigte sich auch, dass die gemessenen ALT-Werte in *EhLPPG*-behandelten Tieren niedriger waren als in α GalCer-behandelten Tieren, was für eine geringere Lebertoxizität von *EhLPPG* spricht.

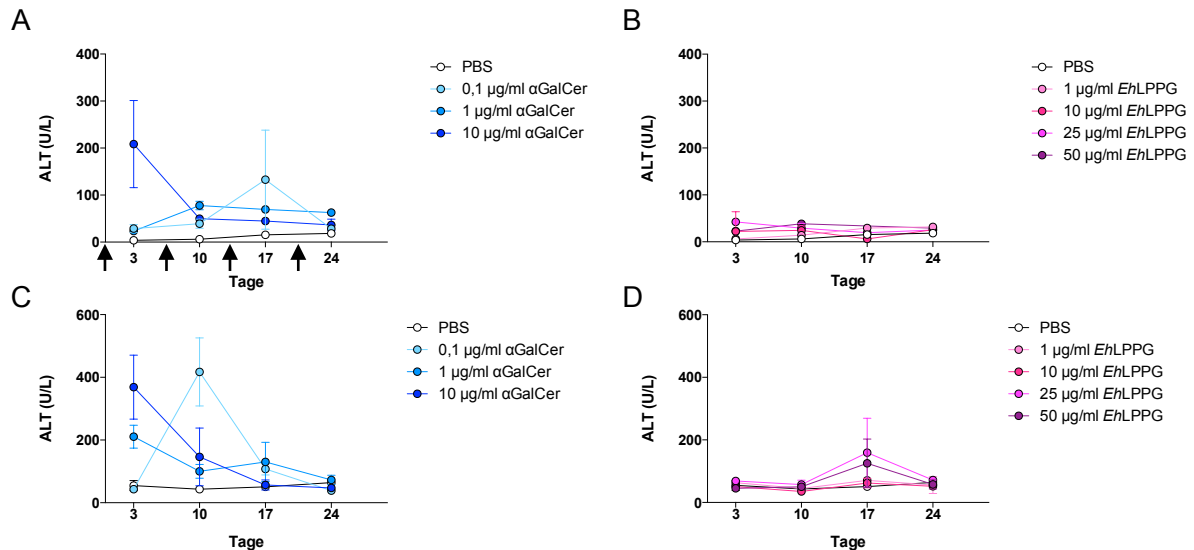


Abb. 20: Serum Alanin-Aminotransferase-Werte nach Applikation von α GalCer und EhLPPG in den Mausstämmen C57BL/6 Mäusen und FVB/N. (A) ALT-Wert im Serum von C57BL/6 Mäusen nach α GalCer-Applikation, und (B) nach EhLPPG-Applikation sowie (C) im Serum von FVB/N Mäusen nach α GalCer-Applikation und (D) nach EhLPPG-Applikation (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, $n=3-4$).

3.4 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von EhLPPG

Immuntherapeutische Anwendungen von α GalCer bzw. die seines synthetischen Analogons, KRN7000 sind sehr breit und reichen über den Einsatz als Adjuvant für Impfungen bis hin zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und malignen Tumoren (Kunii et al., 2009; Kurosaki et al., 2011; Motohashi et al., 2011; Tatsumi et al., 2011). Da das EhLPPG dem α GalCer strukturell sehr ähnlich ist und die gleiche Fähigkeit aufweist, murine aber auch humane iNKT Zellen zu stimulieren, sollte in diesem Abschnitt das therapeutische Potential von EhLPPG in einem Infektionsmodell für die Leishmaniose, sowie in zwei verschiedenen Tumormodellen untersucht werden.

3.4.1 Einfluss von EhLPPG auf eine Infektion mit *Leishmania major* *in vitro* und *in vivo*

3.4.1.1 Einfluss von EhLPPG auf *in vitro* *L. major*-infizierte Knochenmarksmakrophagen

Um den Einfluss einer Behandlung mit EhLPPG auf den intrazellulären Parasiten *Leishmania major*, den Erreger der kutanen Leishmaniose, zu untersuchen, wurden Knochenmarksmakrophagen *in vitro* mit der in Kultur-generierten metazyklischen promastigoten Form der Leishmanien infiziert. In den Makrophagen entwickeln sich die begeißelten Parasiten (Promastigoten) in geißelfreie, abgerundete Leishmanien (Amastigote). Die infizierten Zellen wurden mit α GalCer (4 µg/ml) oder EhLPPG (8 µg/ml) mit und ohne Zugabe von Milzzellen behandelt. Die Färbung der Kinetoplasten-DNA der amastigoten Parasiten mittels DAPI erlaubte sowohl die Bestimmung des Prozentsatzes infizierter Makrophagen, als auch die Bestimmung der Parasitenlast einzelner Makrophagen.

In Abbildung 21, A zeigt *L. major* Parasiten-infizierte Makrophagen in der Giemsa-Färbung (100x Vergrößerung; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Eugenia Bifeld, AG PD Joachim Clos, BNITM). In Abb. 21, B sind die mittels DAPI angefärbten Kinetoplasten im Zytoplasma, sowie der

Zellkern der Wirtszelle (blau) in einem infizierten Makrophagen dargestellt (Abb. 21, B, 100x Vergrößerung, Bild freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Eugenia Bifeld, AG PD Joachim Clos, BNITM).

Die Auswertung ergab, dass die Behandlung von *L. major*-infizierten Makrophagen mit α GalCer signifikant (** $p < 0,001$) und die Behandlung mit *EhLPPG* tendenziell den Prozentsatz an *L. major*-infizierten Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle verringern konnte (Abb. 21, C). Darüber hinaus konnte eine signifikante Abnahme in der Parasitenlast in α GalCer- (** $p < 0,001$) und *EhLPPG*-behandelten Makrophagen (** $p < 0,0001$) gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (Abb. 21, D). Die Behandlung von Makrophagen mit Glykolipiden unter Zugabe von isolierten Milzzellen führte zu einer signifikanten Reduktion des Prozentsatzes an *L. major*-infizierten Makrophagen sowohl in α GalCer- (** $p < 0,001$) als auch *EhLPPG*-behandelten Makrophagen (** $p < 0,0001$) (Abb. 21, E). Die Analyse der Parasitenlast pro Makrophage in beiden Behandlungsgruppen nach Zugabe von Milzzellen zeigte, dass eine signifikant geringere Parasitenlast in α GalCer- und Milzzellen-behandelten Makrophagen (** $p < 0,001$) und eine tendenziell geringere Parasitenlast in *EhLPPG*- und Milzzellen-behandelten Makrophagen ($p = 0,1$) beobachtet werden konnte (Abb. 21, F).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Behandlung *L. major*-infizierter Makrophagen mit *EhLPPG* zu einer Abnahme des Prozentsatzes an infizierten Makrophagen, sowie zur Reduktion der Parasitenlast pro Makrophage *in vitro* führte. Die Zugabe von Milzzellen, wahrscheinlich durch Transaktivierung dieser Zellen durch die stimulierten Makrophagen, konnte die Anzahl an infizierten Makrophagen nach Behandlung mit *EhLPPG* sogar noch stärker senken.

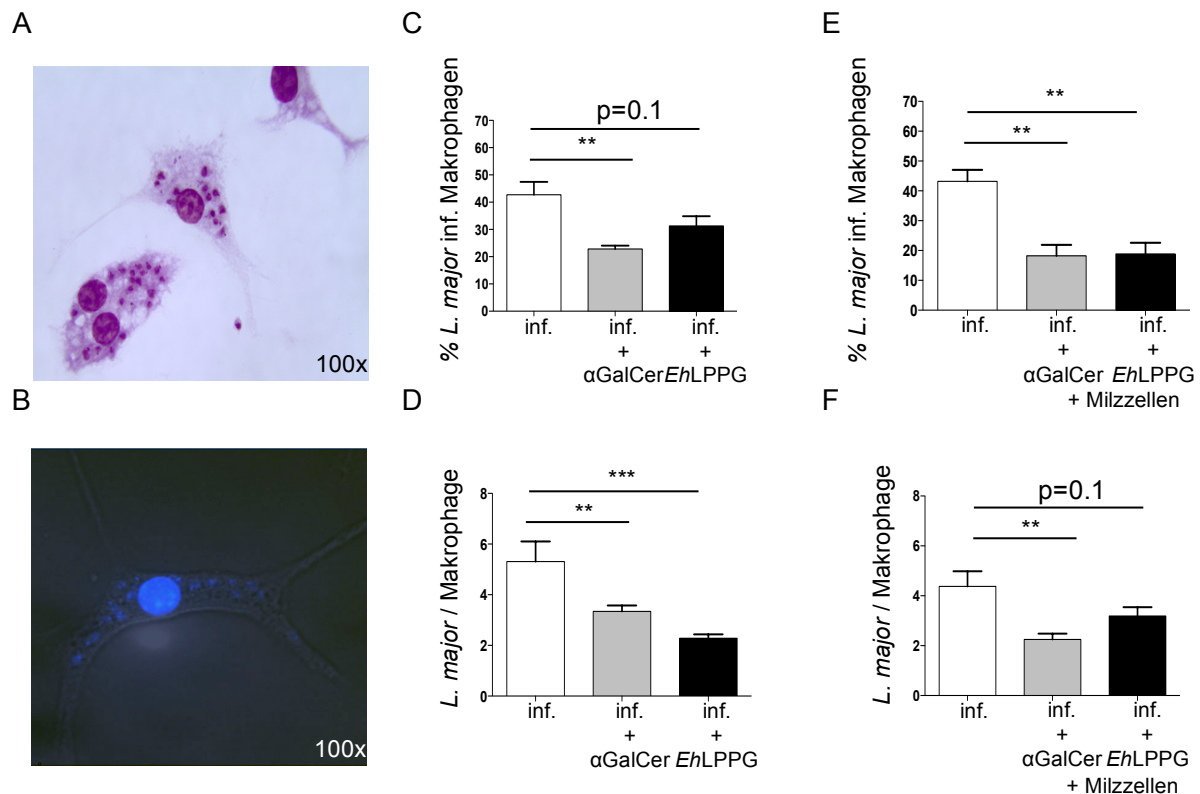


Abb. 21: Effekt von αGalCer und EhLPPG auf *L. major*-infizierte Makrophagen. (A) Giemsa-Färbung *L. major*-infizierter Makrophagen (100x Vergrößerung) und (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DAPI gefärbten *L. major*-infizierten Makrophage im DAPI-Kanal (Absorption: 358 nm, Emission: 461 nm) (100x Vergrößerung). (C) Prozentsatz an *L. major*-infizierten Makrophagen pro Gesamtmakrophagen und (D) Parasitenlast/Makrophage nach Behandlung mit αGalCer und EhLPPG und (E) Prozentsatz an *L. major* infizierten Makrophagen und (F) Parasitenlast nach Behandlung mit αGalCer und EhLPPG unter Zugabe von 4×10^5 Milzzellen (2 unabhängige Experimente, *unpaired Student's t test*, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$) (Bilder A und B wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Eugenia Bifeld, AG PD Joachim Clos, BNITM).

3.4.1.2 Einfluss von EhLPPG auf ein *in vivo* Modell für die kutane Leishmaniose

Nachdem gezeigt werden konnte, dass EhLPPG die Leishmanienlast in Makrophagen *in vitro* reduzierte, sollte nun untersucht werden, ob eine Behandlung mit EhLPPG die Leishmanieninfektion *in vivo* beeinflussen kann. Dazu wurde ein *in vivo* Modell für die kutane Leishmaniose verwendet (AG PD Joachim Clos, BNITM). In diesem Modell werden *L. major* Promastigote direkt in den Fußballen eines Hinterlaufs von BALB/c Mäusen s.c. injiziert. Nach ca. 2-4 Wochen führt die Infektion zu einer Schwellung an der Injektionsstelle, die über einen weiteren Zeitraum in eine Ulzeration übergeht, die den Abbruch des Experiments indiziert. Die Fußdickenzunahme kann mit einer Schiebelehre gemessen werden.

Um die optimale Infektionsrate zu bestimmen und eine überschießende Fußschwellung, die therapeutisch nicht mehr zu beeinflussen wäre, zu vermeiden, wurde zunächst die geeignete Infektionsmenge ermittelt.

BALB/c Mäuse wurden verschiedene Konzentrationen *L. major* s.c. injiziert und die Fußschwellung über einen Zeitraum von 6 Wochen gemessen. Abbildung 22, A zeigt repräsentativ einen nicht

infizierten im Vergleich zu einem *L. major*-infizierten Fuß (B) (Bilder zur Verfügung gestellt von Dr. Eugenia Bifeld, AG PD Joachim Clos, BNITM).

Die Analyse dieser Untersuchung zeigte, dass Infektionsdosen von 2×10^5 und 2×10^6 *L. major* Parasiten zu einer verlässlichen Infektion mit anschließender Fußschwellung führten (Abb. 22, C). Niedrige Infektionsdosen (2×10^2 , 2×10^3 und 2×10^4 *L. major* Parasiten) führten zu keiner Infektion mit anschließender Fußschwellung. 2×10^6 *L. major*-infizierte Tiere wiesen einen steileren Anstieg der Fußschwellungszunahme auf als 2×10^5 *L. major*-infizierte Tiere.

In den nachfolgenden Experimenten wurde eine Inokulationsmenge von 2×10^6 *L. major* verwendet.

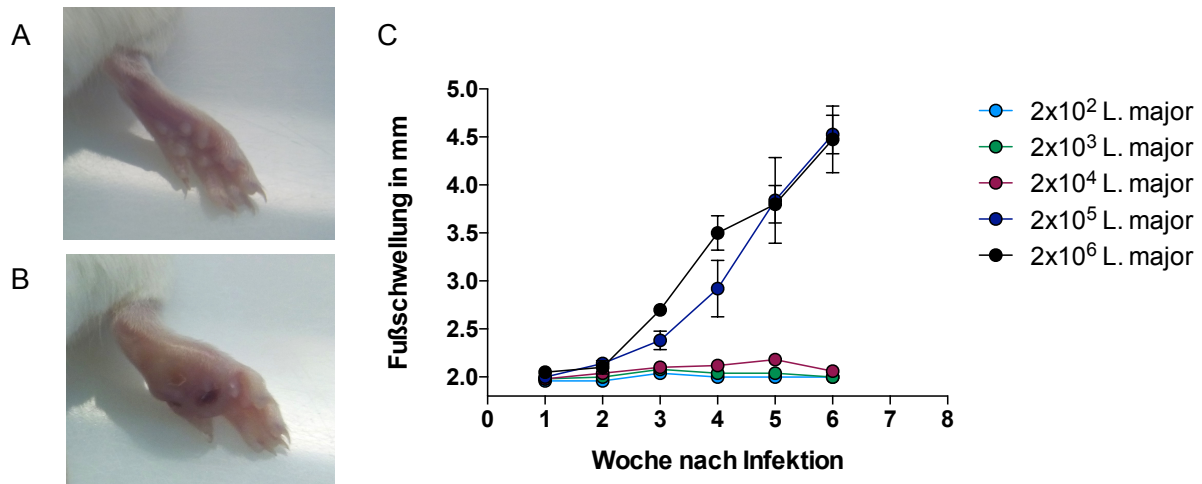


Abb. 22: Bestimmung der optimalen Infektionsmenge für die Infektion von *L. major* in einem *in vivo* Modell für die kutane Leishmaniose. (A) Fuß einer naiven BALB/c Maus und (B) Fußschwellung nach Infektion mit *L. major*. (C) Verlauf der Fußschwellung in BALB/c Mäusen nach Infektion mit *L. major* Parasiten in den indizierten Mengen (n=4-5; Bilder A+B wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Eugenia Bifeld, AG PD Joachim Clos, BNITM) (Mittelwerte±Standardfehler, n=4-5).

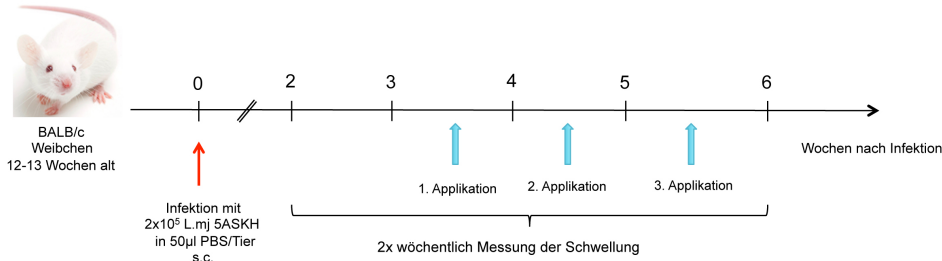
Um nun den therapeutischen Einfluss von *EhLPPG* auf das *in vivo* Modell für die kutane Leishmaniose zu testen, wurden BALB/c mit 2×10^5 *L. major* s.c. in den rechten Fuß infiziert. Mit dem Eintreten der Schwellung wurden die Tiere s.c. mit *EhLPPG* einmal wöchentlich über drei Wochen behandelt (Abb. 23, A). Mit Einsetzen der Ulzeration der Leishmanien-induzierten Läsionen wurden die Tiere abgetötet und die Ulzerations-freie Zeit bestimmt.

Die Messung der Fußschwellung in den Tieren zeigte, dass sich die Schwellung bis ca. 5 Wochen nach Infektion in PBS-, 4 µg/ml und 8 µg/ml *EhLPPG*-behandelten Tieren parallel entwickelte (Abb. 23, B). Vier Wochen nach Infektion erfolgte die erste Behandlung. Nach der zweiten Behandlung in Woche 5 trat eine Verzögerung in der Zunahme der Fußschwellung in den mit 4 µg/ml bzw. 8 µg/ml *EhLPPG*-behandelten Tieren auf die nach 6 Wochen (Tag 46 nach Infektion) signifikant geringer ($3,8 \pm 0,24$ mm/ 4 µg/ml *EhLPPG* (*p=0,02); $3,8 \pm 0,34$ mm/ 8 µg/ml *EhLPPG* (*p=0,03)) gegenüber den PBS-behandelten ($>4,7 \pm 0,16$ mm) war. 48 Tage nach Infektion mussten die PBS-behandelten Kontrolltiere aufgrund eintretender Ulzerationen an der Infektionsstelle (†) abgetötet werden, *EhLPPG*-behandelten Tiere wiesen zu diesem Zeitpunkt noch keine ulzerierenden Läsionen auf.

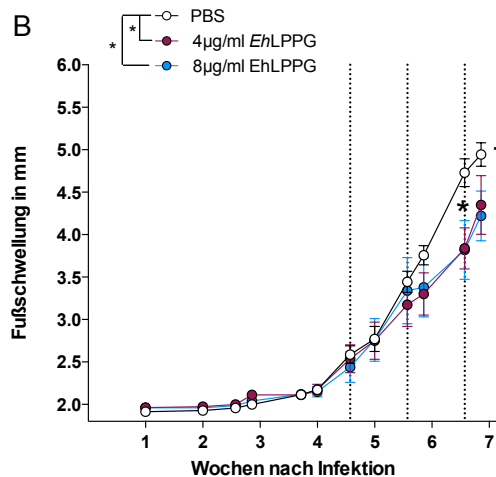
Die Analyse der Ulzerations-freien Zeit ergab (Abb. 23, C), dass die Behandlung mit *EhLPPG* zu einer signifikanten Verlängerung der Ulzerations-freien Zeit im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren führte (13 Tage).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Behandlung mit *EhLPPG* zu einer Verzögerung in der Leishmanien-induzierten Fußschwellung und darüber hinaus die Ulzerations-freie Zeit verlängerte.

A



B



C

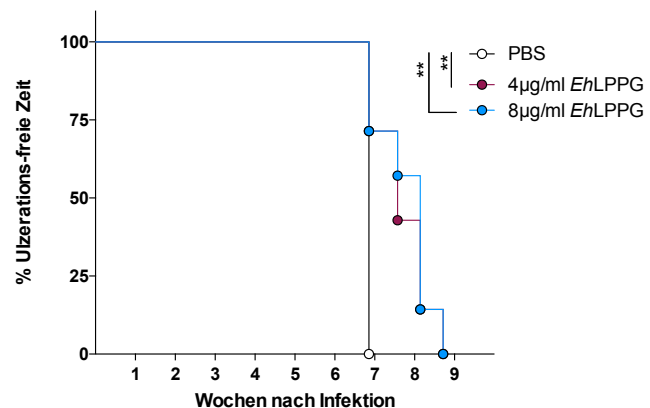


Abb. 23: Therapeutischer Einfluss von *EhLPPG* im Tiermodell für die kutane Leishmaniose. (A) Infektions- und Therapieschema der Leishmanieninfektion in BALB/c Mäusen und (B) Verlauf der Zunahme der Fußschwellung nach Applikation von *EhLPPG* (gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Applikation), (C) Bestimmung des Ulzerations-freien Zeitraums (Mittelwert±Standardfehler, n=7-8)(Mann-Whitney U test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$).

3.4.2 Einfluss von *EhLPPG* auf ein *in vivo* Modell für das Mammakarzinom

Durch die spezifische Aktivierung von iNKT Zellen mit α GalCer können diese eine tumorspezifische Immunantwort auslösen und die Behandlung von verschiedenen Tumorarten verbessern (Pilonis et al., 2012).

In einem Mausmodell für das Mammakarzinom sollte der Einfluss einer Behandlung von *EhLPPG*-stimulierten DC untersucht werden. In diesem Modell werden weiblichen transgenen BALB/c Mäusen (mit WAP-T-N8-Gen) H8N8-Tumorzellen subkutan in die dritte Mamdrüse implantiert (Abb. 24, A). Dies führt über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen zur Entwicklung eines solitären Tumors (Schulze-Garg et al., 2000; Wegwitz et al., 2010).

Zunächst wurde ein Therapieschema entwickelt (s. Abb. 24, A). Demnach wurden die Tiere an Tag 7, 14, 21 und 28 nach Transplantation mit 4 µg/ml *EhLPPG*- bzw. 1 µg/ml α GalCer-stimulierten DCs

(2×10^6) behandelt. Als Kontrolle wurden nicht behandelte DCs bzw. PBS verabreicht. Als Kriterium für einen Therapieerfolg wurde zum einen das initiale Auftreten der Tumore (Tumor-freies Überleben) und zum anderen das Größenwachstum der Tumore (Tumolvolumen) herangezogen.

Der Zeitpunkt bis zur Entstehung des Mammakarzinoms, das so genannte Tumor-freie Überleben der Tiere, konnte durch die Behandlung von *EhLPPG*-stimulierten DC beeinflusst werden (Abb. 24, B). *EhLPPG*-DC-behandelte Tiere wiesen gegenüber α GalCer-DC- (* $p=0,01$), DC- (** $p=0,0076$) und PBS-behandelten Tieren (** $p=0,002$) ein um 7 Tage signifikant verlängertes Tumor-freies Überleben auf. Auch die Tumolvolumina *EhLPPG*-DC-behandelter Tiere war über den Beobachtungszeitraum niedriger als der PBS- und α GalCer-DC-behandelter Tiere. *EhLPPG*-DC- und DC-behandelte Tiere zeigten ähnliche Tumolvolumina (Abb. 24, C).

Insbesondere an Tag 29, 33, 38 und 42 nach Transplantation konnten signifikante Unterschiede in den Tumolvolumina zwischen Tieren, die mit *EhLPPG*-DC behandelt wurden und der PBS Kontrolle festgestellt werden (Abb. 24, D). An Tag 29 und 33 nach Transplantation waren die Tumolvolumina in den PBS Kontrollen gegenüber denen der drei anderen Gruppen signifikant erhöht (Tag 29: PBS vs. DC-Kontrolle ** $p=0,003$, vs. *EhLPPG*-DC ** $p=0,001$, vs. α GalCer * $p=0,016$; Tag 33: PBS vs. DC-Kontrolle *** $p=0,0005$ vs. *EhLPPG*-DC *** $p=0,0003$, vs. α GalCer * $p=0,003$).

An Tag 38 nach Transplantation wiesen *EhLPPG*-DC (* $p=0,01$) und DC-behandelte Tiere (** $p=0,003$) weiterhin signifikant geringere Tumolvolumina auf als die Tiere der PBS-Kontrolle. α GalCer-DC-behandelte Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt gegenüber der Kontrolle keine signifikant kleineren Tumore mehr, jedoch tendenziell größere Tumore gegenüber *EhLPPG*-DC-behandelten Tieren ($p=0,06$).

42 Tage nach Transplantation konnten immer noch signifikant kleinere Tumore in *EhLPPG*-DC- (* $p=0,019$) und DC-behandelten Tieren (* $p=0,016$) im Vergleich zur PBS-Kontrolle festgestellt werden. α GalCer-DC behandelte Tiere wiesen an Tag 42 nach Transplantation zwar kleinere Tumolvolumina im Vergleich zur PBS-Kontrolle auf, aber größere Tumolvolumina im Vergleich zu *EhLPPG*-DC- und DC-behandelten Tieren.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit *EhLPPG*-stimulierten DCs zum einen die Tumor-freie Zeit gegenüber der Behandlung mit PBS-, DC- und α GalCer-stimulierten DCs signifikant verlängern und zum anderen auch das Tumorstadium gegenüber der Behandlung mit PBS- und α GalCer-stimulierten DCs verzögern konnte. DC-behandelte Tiere zeigten zudem auch signifikant niedrigere Tumolvolumina wie *EhLPPG*-DC-behandelte Tiere.

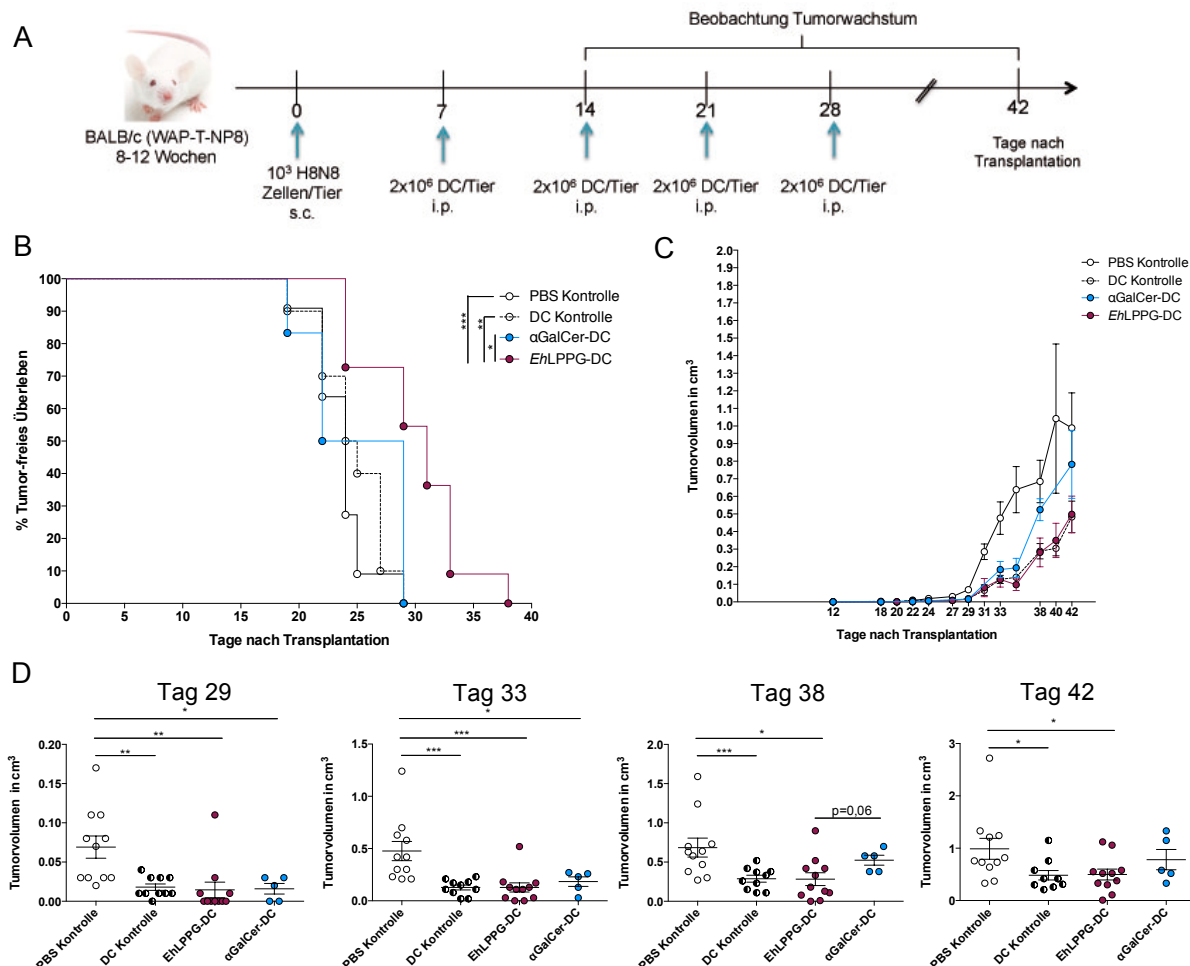


Abb. 24: Einfluss von α GalCer- und EhLPPG-stimulierten DC auf ein *in vivo* Modell für das Mammakarzinom. (A) Transplantations- und Behandlungsschema des Mammakarzinommodells in BALB/c Mäusen mit WAP-T-N8-Gen. (B) Bestimmung des Tumor-freien Überlebens, (C) Verlauf der Tumorzunahme über den Beobachtungszeitraum und (D) Aufschlüsselung der Zunahme des Tumorzunahmes an Tag 29, 33, 38 und 42. (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, n=5-11, 2 unabhängige Experimente)(Mantel Cox Test (χ^2 -test), Mann Whitney U test; *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,001, ***p $\leq$ 0,0001).

3.4.3 Einfluss von EhLPPG auf ein *in vivo* Modell für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) in Mdr2ko-Mäusen

Um den Einfluss einer Behandlung mit EhLPPG-DCs auf die Entwicklung von Lebertumoren zu untersuchen, wurde ein Mausmodell für die Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms (*Hepatocellular carcinoma* - HCC) Modell in Mdr2ko-Mäusen verwendet. In diesem Modell führt die homozygote Mutation des Abcb4^{tm1Bor}-Gens, des sogenannten ABC-Transporters, zu einem mangelhaften Abtransport und zu einer kontinuierlichen Anreicherung von Gallensäure in der Leber (Abb. 25, A). In der Folge entwickeln diese Tiere (Mdr2ko Mäuse (auch FVB.129P2-Abcb4^{tm1Bor})) bereits postnatal eine Fibrose des Lebergewebes, die zur Entstehung von Neoplasien (1-2mm) führt, die sich mit fortschreitendem Alter, ca. ab 40-45 Wochen zu Lebertumoren entwickeln können. Mittels MRT konnte das Tumorwachstum ab der 40. Woche verfolgt werden (Abb. 25, A).

Mit Nachweis tumorartiger Veränderungen der Leber wurden die Tiere entweder mit 3x10⁶ EhLPPG-stimulierten DC (4µg/ml), α GalCer-stimulierten DC (1µg/ml) oder unstimulierten DC (Kontrolle) i.p.

behandelt. Die Applikation erfolgte einmal pro Woche über einen Zeitraum von vier Wochen nach Auftreten des Tumors (Abb. 25, B).

Von 24 Tieren entwickelten während des Beobachtungszeitraumes lediglich 11 Tiere einen endogenen Lebertumor. Um die Tumorumfänge der Tiere vergleichen zu können, wurde die Tumorgöße zum Entstehungszeitpunkt als 100% bzw. 1 angesehen und die x-fache Tumorumfängen Zunahme über die Zeit ermittelt (Abb 25, C).

α GalCer-DC-behandelte Tiere wiesen zwei Wochen nach der ersten Behandlung nur eine 0,4-fache Tumorumfängen Zunahme im Vergleich zu *EhLPPG*-DC-behandelten und DC-behandelten Tieren (beide 1,7-fache Tumorumfängen Zunahme) auf. Die geringere Tumorumfängen Zunahme in Tieren, die mit α GalCer-DC behandelt wurden, war gegenüber Tieren, die mit *EhLPPG*-DC oder DC allein behandelt wurden signifikant (* $p=0,04$). Im Gegensatz zu DC- und *EhLPPG*-DC-behandelten Tieren in denen vier Wochen nach der ersten Behandlung die Tumorumfängen Zunahme auf das bis zu 3,9-fache Anstieg, blieb die Tumorumfängen Zunahme in α GalCer-DC-behandelten Tieren gering (0,7-fach).

In D ist repräsentativ das Tumorumfängen Wachstum in einem Tier im MRT über 8 Wochen dargestellt (Tumor ist rot umrandet).

Zusammengefasst, scheint eine Behandlung mit α GalCer-stimulierten DC im Gegensatz zu einer Behandlung mit *EhLPPG*-stimulierten DCs das Tumorumfängen Wachstum von endogenen Lebertumoren zu beeinflussen. Aufgrund der geringen Fallzahl kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt nicht durch ein allgemein langsames Tumorumfängen Wachstum ausgelöst worden sein könnte.

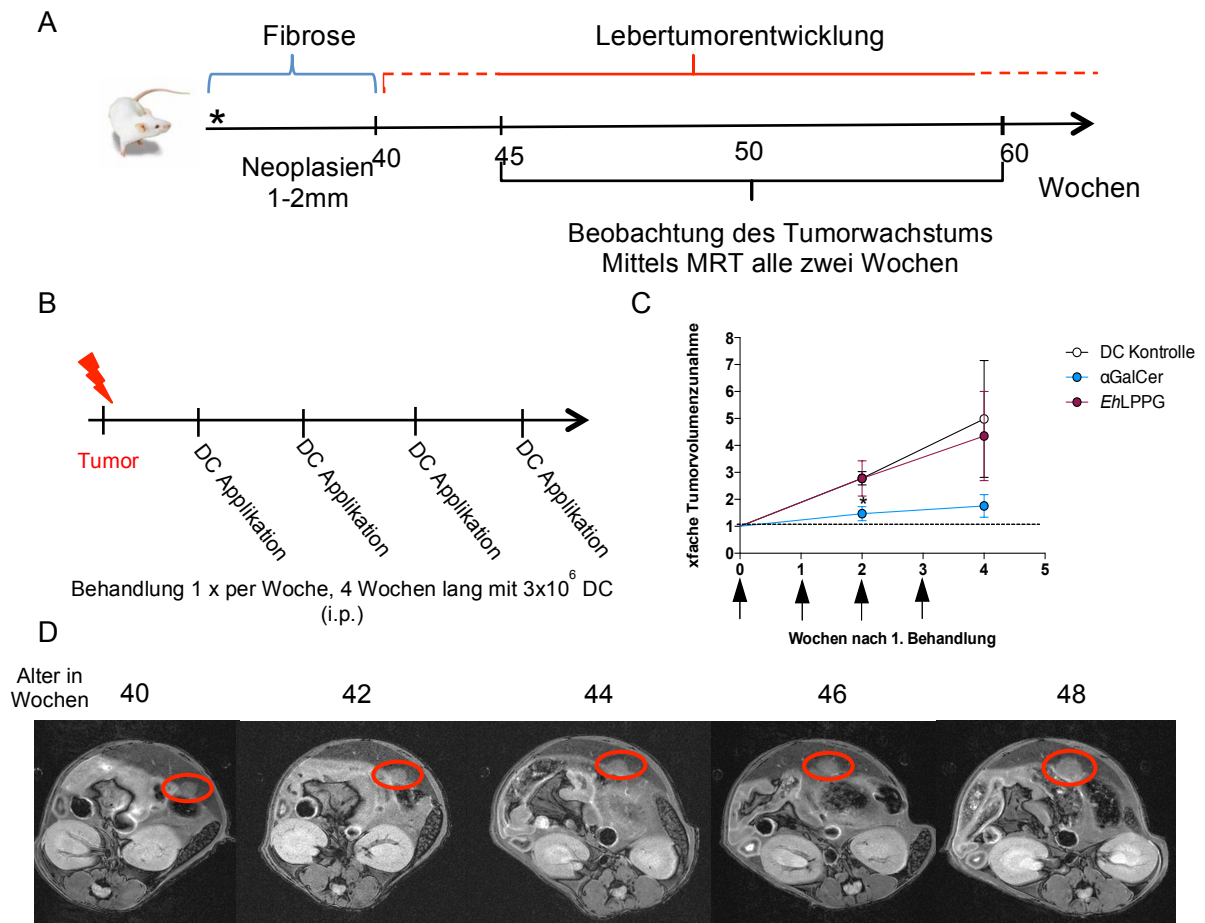


Abb. 25: Einfluss von α GalCer- und EhLPPG-stimulierten DCs in einem Tiermodell für das Hepatozelluläre Karzinoma (HCC) in Mdr2ko-Mäusen. (A) Schema der Lebertumorentstehung in Mdr2ko-Mäusen. (B) Verwendetes Behandlungsschema nach Nachweis einer tumorartigen Veränderung der Leber mittels MRT. (C) Verlauf der x-fachen Tumorumfangzunahme über den Behandlungszeitraum. (D) Repräsentative MRT-Bilder eines endogenen Lebertumors einer Mdr2ko-Maus über 8 Wochen (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, $n=3-4$) (*unpaired Student's t test*, $*p \leq 0,05$).

4. Diskussion

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen können geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet werden. Männer sind deutlich häufiger von bestimmten, insbesondere parasitären, Infektionskrankheiten betroffen als Frauen (Bernin and Lotter, 2014; Bouman et al., 2004; Klein, 2012). Die Gründe dafür sind vielfältig, neben genetischen Faktoren können gerade bei parasitären Erkrankungen soziokulturell bedingte Unterschiede in der Exposition für den Geschlechtsdimorphismus verantwortlich sein. Nur bei Gleichverteilung der Prävalenz des Erregers und deutlicher Abhängigkeit einer Infektion oder Erkrankung von dem Hormonstatus des Individuums, erscheint ein eindeutiger Geschlechtsdimorphismus bei einer Erkrankung vorzuliegen. Von entscheidender Bedeutung ist der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Immunantwort (Fish, 2008; Klein, 2012; van Lunzen and Altfeld, 2014). Im Gegensatz zu Männern neigen Frauen allgemein zu stärkeren Immunantworten gegenüber verschiedenen Infektionserregern aber auch Vakzinierungen, was sie im Gegenzug anfälliger gegenüber Autoimmunerkrankungen werden lässt. Ein Beispiel für einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus ist der Amöbenleberabszess (ALA) als Folge einer intestinalen Infektion mit dem Parasiten *E. histolytica*. Von dieser schweren Verlaufsform der invasiven Amöbiasis sind Männer deutlich häufiger betroffen als Frauen (Acuna-Soto et al., 2000; Blessmann et al., 2003b; Blessmann et al., 2002). Untersuchungen zu den immunologischen Hintergründen dieser Erkrankung in einem immunkompetenten Mausmodell zeigten, dass die erhöhte Suszeptibilität männlicher Tiere abhängig ist von Testosteron, Kupferzellen und der Rekrutierung inflammatorischer Monozyten (Bernin et al., 2013; Lotter et al., 2013). Die höhere Resistenz gegenüber einem ALA in weiblichen Tieren wird hingegen über IFN γ vermittelt, welches von iNKT Zellen gebildet wird. Die Substitution weiblicher Tiere mit Testosteron führte zu einer Reduktion dieser schützenden Zytokinproduktion und zur Aufhebung der Resistenz (Lotter et al., 2013) (Lotter et al., 2009).

iNKT Zellen sind eine einzigartige T-Zellpopulation, die durch ihre Eigenschaften, sowohl angeborene als auch adaptive Funktionen vereinen, immunmodulatorisch wirken und damit Immunantworten entscheidend mitgestalten können (Van Kaer 2011). Die Zytokinproduktion von iNKT Zellen wird auch durch Geschlechtshormone beeinflusst. Studien konnten zeigen, dass Estradiol die IFN γ -Produktion von iNKT Zellen verstärkt, wohingegen Testosteron diese inhibiert (Gourdy et al., 2005; Lotter et al., 2013).

Die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede von Immunzellen und Immunantworten ist ein bisher nicht hinreichend abgedecktes Forschungsgebiet. Daher beinhaltete ein Teil dieser Arbeit grundlegende Untersuchungen zu humanen und murinen Immunzellen. In dieser Arbeit sollten Frequenzen sowie das Zytokinprofil weiblicher und männlicher Probanden nach spezifischer Stimulation analysiert werden.

Immunstimulatorische Moleküle können die Initiierung einer protektiven Immunantwort und somit die Eliminierung von Erregern oder Tumorzellen unterstützen. Aus der Membran von *E. histolytica* konnte in früheren Untersuchungen das EhLPPG isoliert werden. Es zeigt hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu α GalCer und dessen Eigenschaft iNKT Zellen zu aktivieren (Lotter et al., 2009). α GalCer wird bereits als Immuntherapeutikum für diverse Erkrankungen eingesetzt, z.B. bei der Behandlung von malignen

Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und als Adjuvant für Impfungen (Cerundolo et al., 2009; Schneiders et al., 2011; Van Kaer et al., 2011). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass *EhLPPG* auch als Immuntherapeutikum verwendet werden könnte. Daher wurde in dem zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob *EhLPPG* einen Einfluss auf Infektionen mit intrazellulären Erregern oder Tumorerkrankungen hat.

4.1 Charakterisierung geschlechtsspezifischer Unterschiede in den Frequenzen humaner und muriner Immunzellen

4.1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen humaner und muriner iNKT Zellen

iNKT Zellen gehören zu den T-Zellen und sind aufgrund ihrer immunregulatorischen Eigenschaften für die frühe Kontrolle einer Vielzahl von Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen, Infektionserkrankungen und Tumorerkrankungen von besonderer Bedeutung (Godfrey et al., 2004). Zudem wird die Zytokinproduktion dieser Zellen unter anderem von Geschlechtshormonen, wie Östrogenen moduliert. So kann die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IFN γ -Produktion durch Östrogene verstärkt werden (Gourdy et al., 2005).

In dieser Arbeit sollten an einem Kollektiv von 25 gesunden Probanden die iNKT Zellfrequenzen von Männern und Frauen vergleichend untersucht werden. Die Frequenzen der iNKT Zellen des peripheren Blutes der Probanden variierten zwischen den Individuen von 0,01-1,18%. Eine tendenziell erhöhte Anzahl an iNKT Zellen konnte in weiblichen Probanden beobachtet werden. Die Analyse der drei iNKT-Subpopulationen des Menschen, iNKT⁺CD4⁺, iNKT⁺CD8⁺ und iNKT⁺DN Zellen, ergab, dass Frauen tendenziell mehr iNKT⁺DN Zellen (40%) und Männer tendenziell mehr iNKT⁺CD8⁺ Zellen (29,9%) in ihrer Peripherie aufwiesen. iNKT⁺CD4⁺ Zellen hingegen zeigten keinen geschlechtsspezifischen Unterschied (Männer: 32,2%; Frauen: 32,9%).

Geschlechtsspezifische Divergenzen in der Frequenz von iNKT Zellen legen die Vermutung nahe, dass iNKT Zellen durch ihre immunregulatorischen Fähigkeiten einen besonderen Einfluss auf Erkrankungen ausüben, bei denen ein Geschlechtsdimorphismus beobachtet wird. Neben geschlechtsspezifischen Unterschieden in den Frequenzen bestimmter Immunzellen können auch geschlechtsspezifische Unterschiede im Zytokinprofil für einen Geschlechtsdimorphismus verantwortlich sein. So produzieren humane DN iNKT Zellen hauptsächlich Th1-Zytokine (La Cava et al., 2006). Der erhöhte Anteil an iNKT⁺DN Zellen in Frauen könnte darauf hinweisen, dass unter einer Infektion mehr protektives IFN γ produziert werden würde als das bei Männern der Fall wäre. In Bezug auf den geschlechtsspezifischen Unterschied bei der Entstehung des Amöbenleberabszesses würde dies bedeuten, dass Frauen durch die verstärkte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen die *E. histolytica*-Infektion besser kontrollieren als Männer. Kongruent dazu, wurde im Mausmodell den ALA gezeigt, dass weibliche Tiere durch die vermehrte Produktion von protektiven IFN γ vor der Abszessentstehung geschützt sind (Lotter et al., 2009).

Einige Studien konnten zeigen, dass sich die iNKT Zellfrequenzen geschlechtsspezifisch unterscheiden und Frauen höhere iNKT Zellfrequenzen im peripheren Blut aufweisen als Männer. Sandberg et al., 2003 zeigte, dass Frauen im peripheren Blut signifikant höhere Anzahlen an iNKT

Zellen (0,07%) aufweisen als Männer (0,04%). Auch Kee et al., 2012 und auch Montoya et al., 2007 konnten feststellen, dass Frauen tendenziell über mehr iNKT Zellen verfügten als Männer (Kee et al. 2013: iNKT: Frauen 0,14%, Männer 0,09%; Montoya et al., 2007: iNKT: Frauen 0,21%, Männer 0,14%). Andere Studien zeigten dagegen keine Korrelation zwischen Geschlecht und iNKT Zellfrequenz (Fereidouni et al., 2010; Jing et al., 2007; Snyder-Cappione et al., 2010). Bezüglich der iNKT-Subpopulationen gibt es kontroverse Ergebnisse. Sandberg et al. 2003 und auch Kee et al. 2012 zeigten dass Männer tendenziell mehr iNKT⁺CD4⁺ Zellen aufwiesen als Frauen. Zusätzlich stellte auch Kee et al. 2012 fest, dass im Blut von Frauen tendenziell eine höhere Anzahl an iNKT⁺DN Zellen zirkuliert als im Blut von Männern. Snyder-Cappione et al. 2010 hingegen zeigten in ihrem untersuchten Kollektiv, dass in Frauen tendenziell mehr iNKT⁺CD4⁺ Zellen und in Männern tendenziell mehr iNKT⁺CD8⁺ und iNKT⁺DN Zellen im peripheren Blut zirkulieren. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind womöglich auf die Anzahl und das Alter der untersuchten Probanden zurückzuführen. Interessanterweise zeigten einige Untersuchungen, dass die iNKT Zellfrequenz mit dem Alter signifikant abnimmt (DelaRosa et al., 2002; Jing et al., 2007; Molling et al., 2005; Peralbo et al., 2006). In diesen Studien wurden die iNKT Zellfrequenzen von 21-94 Jahre alten, gesunden Probanden analysiert. Auch die iNKT Zellsubpopulationen erfahren mit dem Alter eine Reorganisation. Jing et al. 2007 zeigten, dass ältere Menschen mehr CD4⁺ iNKT Zellen und weniger DN iNKT Zellen aufweisen als junge Menschen, wohingegen DelaRosa et al. 2002 zeigten, dass es in diesen Subpopulationen keinen Unterschied gibt und nur CD8⁺ iNKT Zellen in älteren Menschen signifikant erhöht waren (Jing et al., 2007) (DelaRosa et al., 2002). Es ist bekannt, dass Unterschiede in der Anzahl bestimmter iNKT-Subpopulationen auch Auswirkungen auf das Zytokinprofil von iNKT Zellen haben können (La Cava et al., 2006). iNKT Zellen älterer Menschen zeigten *in vitro* eine tendenziell höhere Produktion von IL-4 und IL-10 und eine signifikant niedrigere Produktion von IFN γ als iNKT Zellen junger Menschen (Jing et al., 2007). Daher ist es wichtig bei der Untersuchung von geschlechtsspezifischen Unterschieden der iNKT Zellen ein möglichst großes Kollektiv zu wählen mit ausgeglichenen Anteilen an männlichen und weiblichen Probanden, sowie einer großen Altersspanne, um altersbedingte Effekte ausschließen zu können.

Bei murinen iNKT Zellen konnten keine geschlechtsspezifischen Frequenzunterschiede beobachtet werden. Jedoch wurde ein Anstieg an iNKT Zellen mit zunehmendem Alter der Tiere beobachtet (Lotter 2013 bereits publiziert). Diese Zunahme der iNKT Zellen mit dem Alter könnte auf normale Reifungsprozesse des Immunsystems der Maus zurück zu führen sein. Ob dies auch für den Menschen zutrifft ist, ist unklar. Eine Studie untersuchte Kinder mit Eosinophiler Ösophagitis und gesunde Kontrollen. Hier zeigten sich zwar krankheitsbedingt niedrigere iNKT-Frequenzen in Kindern mit Ösophagitis, jedoch keine abweichenden Frequenzen von gesunden Kindern im Vergleich zu Erwachsenen. Sie variierten von 0,01-3,6% (Jyonouchi et al., 2014).

Über die Frequenzunterschiede von humanen Leber-iNKT Zellen ist nicht viel bekannt, da es ethisch problematisch ist Proben in ausreichender Menge von gesunden oder erkrankten Probanden zu erhalten. Bekannt ist jedoch, dass in der Leber der Prozentsatz von iNKT Zellen bei ca. 0,5% liegt (Kenna et al., 2003). Neueren Studien nach kann der Anteil der iNKT Zellen an der

Gesamtlymphozytenzahl bis zu 12% iNKT Zellen betragen (Swain, 2010) (Swain, 2008). Der Prozentsatz der iNKT Zellen in der Leber der Maus kann sogar 30% betragen (Bendelac et al., 2007). Aufgrund der höheren Frequenzen an iNKT Zellen in der Leber und der damit potentiell verbesserten Datensicherheit wurden in dieser Arbeit zusätzlich iNKT Zellen aus dem Resektionsmaterial humaner Leberproben analysiert.

Die Untersuchung der iNKT Zellfrequenzen dieser Proben, die überwiegend von Tumorpatienten stammten, zeigte, dass die Frequenzen niedrig waren und sie zwischen 0 und 0,065% variierten. In einem Patienten konnten sogar keine iNKT Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Variabilität der iNKT Zell-Frequenzen im Menschen in der Leber sehr hoch ist. Allerdings scheint die Tumor-Vorerkrankung zu einer deutlichen Reduktion der Frequenz zu führen.

Molling et al. 2005 konnten zeigen, dass die Anzahl an iNKT Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten bis zu 50% niedriger ist als in gesunden Probanden. Dies lässt die Vermutung zu, dass unter einer Erkrankung die Anzahl an iNKT Zellen beeinflusst werden kann, inwiefern dies jedoch Auswirkungen auf die jeweilige Erkrankung haben könnte, ist unklar.

4.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Frequenz humaner Monozyten und der Monozytenrekrutierung durch das Chemokin CCL2

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Monozyten einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung des ALA haben. Über die Expression des Monozyten-rekrutierenden Chemokins CCL2 migrieren inflammatorische Monozyten aus dem Blutstrom in infiziertes Gewebe. Dort vermitteln sie über die Produktion von $\text{TNF}\alpha$ die Schädigung der Leber während der ALA-Entstehung (Bernin et al., 2013). In dieser Arbeit wurde analysiert, ob geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen der verschiedenen Monozytenpopulationen oder in der Konzentration des Chemokins CCL2 beim Menschen vorhanden sind.

Die hier untersuchten gesunden, männlichen und weiblichen Probanden wiesen jedoch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Monozytenfrequenzen auf. Klassische $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^-$ Monozyten machten prozentual den größten Anteil der Monozyten im Blut aus (58,8%). Intermediäre $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ Monozyten wiesen mit 4,1% und nicht-klassische $\text{CD14}^{(+)}\text{CD16}^+$ Monozyten mit 9,7% einen geringeren Prozentsatz auf. Auch variierte die Frequenz von klassischen Monozyten $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^-$ von 15,4 bis 84,3%. Die Frequenzen von intermediären $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ Monozyten und nicht-klassischen $\text{CD14}^{(+)}\text{CD16}^+$ Monozyten konnte bis zu ca. 16% der Blutmonozyten ausmachen. In der Literatur wurde gezeigt, dass klassische $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^-$ Monozyten bis zu 90%, intermediäre $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ Monozyten bis zu 5% und nicht-klassische $\text{CD14}^{(+)}\text{CD16}^+$ bis zu 10% der Blutmonozyten ausmachten. Auch hier sind klassische Monozyten die größte Subpopulation im peripheren Blut (Auffray et al., 2009; Hristov et al., 2012; Zawada et al., 2012; Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013). Unterschiede vor allem in der Frequenz von intermediären $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ und nicht-klassischen $\text{CD14}^{(+)}\text{CD16}^+$ Monozyten im Vergleich zur Literatur könnten Individuen-spezifisch oder darauf zurück zuführen sein, dass die untersuchten Probanden nicht vollständig gesund waren. Intermediäre und nicht-klassische Monozyten haben im Menschen pro-inflammatorische Eigenschaften, können $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β und IL-12 produzieren (Zawada et al., 2012; Ziegler-Heitbrock

and Hofer, 2013) und sind unter Erkrankungen wie z.B. Tuberkulose (Castano et al., 2011), Schistosomiasis (Fernandes et al., 2014) und Rheumatoider Arthritis erhöht (Kawanaka et al., 2002). Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen konnte Bouman et al. 2004 einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Monozytenfrequenz zeigen. Männer wiesen mit $36 \pm 4 \times 10^7$ Zellen/L signifikant höhere Mengen an Monozyten im Blut auf als Frauen mit $24 \pm 4 \times 10^7$ Zellen/L (Bouman et al., 2004). Um genauere Aussagen über einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der humanen Monozytenfrequenz treffen zu können, müssen noch weitere Studien durchgeführt werden.

Auch wenn bisher geschlechtsspezifische Unterschiede in der Monozytenfrequenz kontrovers diskutiert werden, gibt es jedoch Hinweise, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Aktivierung und Rekrutierung von Monozyten geben könnte. Es wurde gezeigt, dass LPS-stimulierte Monozyten von Männern größere Mengen an IL-12, IL-1 β und TNF α produzieren als Monozyten von Frauen (Bouman 2004). Auch in einem Mausmodell für den Amöbenleberabszess scheint die Rekrutierung inflammatorischer Monozyten über das Chemokin CCL2 Einfluss auf den Geschlechtsdimorphismus zu haben. Das Chemokin CCL2 ermöglicht Blutmonozyten, die den CCR2-Rezeptor exprimieren unter einer Infektion in infiziertes Gewebe einzuwandern und sich dort entsprechend dem Zytokinmilieu in inflammatorische Monozyten zu differenzieren (Dunay et al., 2008; Karlmark et al., 2009; Shi C, 2011). Männlichen CCR2^{-/-} Mäusen, denen der CCR2-Rezeptor fehlt, weisen keine inflammatorischen Monozyten in der Peripherie auf und entwickeln im Vergleich zu männlichen Wildtyp-Mäusen kleinere Abszesse (Bernin et al., 2013). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine verstärkte Monozytenrekrutierung über CCL2 in männlichen Tieren die Entstehung eines Abszesses begünstigt.

In einer klinischen Studie, die sich mit der Erforschung der Behandlung des Amöbenleberabszesses auseinandersetzte und einer longitudinalen Studie der intestinalen *E. histolytica*-Infektion, wurden in einem für *E. histolytica*-endemischen Gebiet in Vietnam humane Seren gesammelt (Blessmann et al., 2003a; Blessmann et al., 2003b). In einem weiteren Projekt im Rahmen dieser Arbeit wurden die Seren von Amöbenleberabszesspatienten (ALA), Asymptomatischen *E. histolytica* Carriern (ASC) und *E. dispar*-infizierten Individuen auf Serummarker untersucht, die assoziiert sind mit Resistenz oder Suszeptibilität gegenüber einer *E. histolytica*-Infektion (Bernin et al., 2014 im Druck). Da im Mausmodell für die Entstehung des ALA gezeigt wurde, dass pro-inflammatorische Monozyten über TNF α die Leberschädigung vermitteln (Bernin et al., 2013), sollten über die Analyse der CCL2-Konzentration im Serum der ALA-Patienten, ASC und *E. dispar*-infizierten Individuen indirekt Rückschlüsse auf die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten gezogen werden. Die Untersuchung der CCL2-Konzentration im Serum des Kollektivs zeigte, dass männliche ASC höhere Mengen an CCL2 im Serum aufwiesen als weibliche ASC. Somit könnte der allgemein höherer Anteil an Monozyten (Bouman et al., 2004) verbunden mit höheren Konzentrationen an CCL2 bei Männern zur Rekrutierung inflammatorischer Monozyten führen. In der Folge wären damit, wie auch im Mausmodell beschrieben, die Grundlagen für eine Immunpathologie gegeben, die zur Entstehung des ALA führt.

4.2 Geschlechtsspezifisches Zytokinprofil humaner und muriner iNKT Zellen

4.2.1 Geschlechtsspezifisches Zytokinprofil humaner iNKT Zellen

Einige Untersuchungen zeigten dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Zytokinausschüttung von Immunzellen auftreten können. Giron-Gonzalez et al. 2000 zeigten als erstes, dass im Überstand von Phytohemagglutinin-stimulierten Lymphozyten männlicher Probanden höhere Mengen an IFN γ und IL-2 und niedrigere Mengen an IL-4 und IL-10 nachgewiesen werden konnten als im Überstand von Lymphozyten weiblicher Probanden (Giron-Gonzalez et al., 2000). Auch Monozyten von Männern produzieren größere Mengen an TNF α , IL-1 β und IL-12 als Monozyten von Frauen (Bouman et al., 2004). Diese Unterschiede könnten Hinweise darauf geben, warum bestimmte Erkrankungen häufiger Frauen bzw. Männer betreffen. Daher wurde das Zytokinprofil von humanen iNKT Zellen in Abhängigkeit des Geschlechts untersucht. Im Tiermodell konnte man bereits zeigen, dass iNKT Zellen weiblicher Tiere mehr IFN γ produzieren als iNKT Zellen männlicher Tiere (Lotter et al., 2009).

Über das geschlechtsspezifische Zytokinprofil von humanen iNKT Zellen ist in der Literatur bisher nur wenig bekannt und die Resultate sind sehr kontrovers. Begründet sind diese Unterschiede zum einen in der nicht-normierten Aufarbeitung und zum anderen in der Stimulation der iNKT Zellen. Mit der Folge, dass erzielte Resultate schwierig zu vergleichen sind.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass frisch aus dem Blut isolierte iNKT Zellen weiblicher Probanden nach Glykolipid-Stimulation mehr IFN γ , TNF α , IL-17A und IL-4 produzieren als iNKT Zellen männlicher Probanden. Auch produzierten sowohl iNKT⁺DN als auch iNKT⁺CD4⁺ Zellen weiblicher Probanden signifikant mehr IL-17. Zudem schienen iNKT⁺CD4⁺ Zellen hauptverantwortlich für die Zytokinproduktion zu sein.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen untersuchten Snyder-Cappione et al. 2010 das Zytokinprofil von expandierten iNKT Zellen in Männern und Frauen nach Mitogen-Stimulation. Hier wurde gezeigt, dass Männer *ex vivo* höhere Mengen an IFN γ -, TNF α - und MIP-1 α -produzierenden iNKT Zellen aufwiesen als Frauen. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Produktion von IL-4 wurde nicht beobachtet (Snyder-Cappione et al., 2010).

Eine andere Studie, die Mitogen-expandierte humane iNKT Zellen verwendete, konnte feststellen, dass α GalCer-Stimulation in allen drei iNKT-Subpopulationen *in vitro* Th1- und Th2-Zytokine induzierte. Jedoch war dort die Zytokinproduktion von iNKT⁺CD8⁺ Zellen deutlich höher als von iNKT⁺CD4⁺ und iNKT⁺DN Zellen (O'Reilly et al., 2011). Dies stimmte nur teilweise mit den hier erzielten Ergebnissen überein, hier induzierte zwar α GalCer ebenso sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine in humanen iNKT Zellen, jedoch hauptsächlich nur in iNKT⁺CD4⁺ und iNKT⁺DN Zellen. Auch im teilweisen Widerspruch zu den hier in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen beobachtete Sandberg et al., 2003, dass CD4⁺ iNKT Zellen nach α GalCer-Stimulation weniger TNF α und IFN γ produzierten als CD4⁻ iNKT Zellen. In dieser Arbeit produzierten iNKT⁺CD4⁺ Zellen nach α GalCer-Stimulation ebenfalls geringe Mengen an TNF α , jedoch gleichzeitig deutlich größere Mengen an IFN γ als die anderen beiden iNKT-Subpopulationen.

Eine Übereinstimmung konnte lediglich in der von O'Reilly et al. 2011 durchgeführten Studie im Vergleich zu dieser Arbeit gefunden werden. Auch diese Studie zeigte, dass humane iNKT⁺DN Zellen IL-17 produzieren können, jedoch ohne Bezug auf das Geschlecht. (O'Reilly et al., 2011).

Die beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Studien sind womöglich hauptsächlich in der Stimulation begründet. Wohingegen die Stimulation mit α GalCer und *Eh*LPPG eine direkte Stimulation über Involvement des invarianten iNKT TcR beinhaltet, wird die Stimulation von iNKT Zellen mit Mitogen hingegen wahrscheinlich über TLRs vermittelt, welches für eine indirekte Stimulation spricht. Somit könnte eine direkte oder indirekte Aktivierung von iNKT Zellen möglicherweise durch Induktion verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden unterschiedliche Zytokinprofile induzieren und abweichende Aussagen generieren.

4.2.2 Geschlechtsspezifisches Zytokinprofil muriner iNKT Zellen

Auch murine iNKT Zellen weisen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Zytokinproduktion auf, insbesondere in der Produktion von IFN γ (Gourdy et al., 2005; Lotter et al., 2013).

Der geschlechtsspezifische Unterschied in der IFN γ -Produktion von murinen iNKT Zellen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Neben IFN γ produzierten iNKT Zellen weiblicher Tiere auch signifikant größere Mengen an IL-12p40, TNF α und IL-17. iNKT Zellen männlicher Tiere produzierten nach α GalCer-Stimulation tendenziell mehr IL-4 und iNKT Zellen weiblicher Tiere nach *Eh*LPPG-Stimulation mehr IL-4. Vergleicht man zunächst das Zytokinprofil muriner iNKT Zellen mit dem Zytokinprofil humaner iNKT, können Gemeinsamkeiten in der Zytokinproduktion von iNKT Zellen weiblicher Probanden und weiblicher Mäuse festgestellt werden. Sowohl in humanen als auch murinen iNKT Zellen weiblicher Herkunft wird mehr IFN γ , TNF α und IL-17 produziert. Dies deutet darauf hin, dass sich humane und murine iNKT Zellen in ihrer Immunantwort nach Glykolipid-Stimulation durchaus ähneln.

Wie kommen jedoch diese geschlechtsspezifischen Unterschiede im Zytokinprofil von weiblichen Tieren bzw. Frauen und männlichen Tieren bzw. Männern zustande, vor allem wenn nur geringe geschlechtsspezifische Unterschiede in den Frequenzen von Immunzellen zu beobachten sind?

Bezüglich iNKT Zellen konnte Gourdy et al. 2005 zeigen, dass α GalCer-Applikation in weiblichen Mäusen höhere Konzentrationen an IFN γ im Serum induziert als in männlichen Tieren. Bei genauerer Untersuchung zeigte sich, dass dieser Effekt durch Ovariectomie aufgehoben werden konnte (Gourdy et al., 2005), was für eine Beteiligung von Geschlechtshormonen bei diesem beobachteten Geschlechtsdimorphismus spricht. Tatsächlich konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Menge an α GalCer-induziertem IFN γ durch Estradiol verstärkt werden. Dass endogene Östrogene für den Geschlechtsunterschied im Zytokinprofil verantwortlich sind, wurde durch die Untersuchung von Östrogenrezeptor α -defizienten Mäusen weiter verstärkt, denn diese Tiere produzierten kein IFN γ nach α GalCer-Stimulation (Gourdy et al., 2005). iNKT Zellen männlicher Tiere produzieren aufgrund von Testosteron weniger IFN γ . Zudem inhibiert Testosteron die Sekretion von IFN γ in weiblichen Tieren (Lotter et al., 2013). Männliche und weibliche Geschlechtshormone scheinen somit wichtige Modulatoren bei der Induktion eines geschlechtsspezifischen Zytokinprofils zu sein und könnten möglicherweise mitverantwortlich für die Ausprägung eines Geschlechtsunterschieds in bestimmten Erkrankungen sein. Geschlechtshormone können über die Bindung an Rezeptoren die Zytokinausschüttung von Immunzellen beeinflussen. Geschlechtshormone sind meist lipophil und

können durch Membranen diffundieren. Daher findet man Geschlechtshormonrezeptoren sowohl in als auch auf Immunzellen. Es wird angenommen, dass Geschlechtshormone nach Bindung an ihren Rezeptor NF- κ B-vermittelte Signalwege aktivieren, die Einfluss auf die Regulierung der Expression von inflammatorischen Genen haben und somit die Zytokinproduktion beeinflussen (Bouman et al., 2005).

Östrogen-, Progesteron und Androgenrezeptoren können auf vielen Zellen gefunden werden, wie T-Zellen, B-Zellen, DC, Makrophagen, Monozyten und NK Zellen (Bouman et al., 2005; Fish, 2008). Aufgrund des scheinbar ubiquitären Vorhandenseins von Geschlechtshormonrezeptoren auf Immunzellen ist anzunehmen, dass Geschlechtshormone die Immunkompetenz ihres Wirtes entscheidend modulieren können. Östrogene wirken allgemein aktivierend auf das Immunsystem, wohingegen Testosteron hauptsächlich immunsuppressiv wirken und zur Herunterregulation der Zytokin- und Immunglobulinproduktion sowie T- und B-Zellproliferation führen soll (Fish, 2008).

Für einige Infektionserkrankungen ist ein Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Suszeptibilität von Männern und Frauen bekannt. Wie beim ALA (Lotter et al., 2006) sind von der Leishmaniose mehr Männer von dieser Erkrankung betroffen als Frauen (Karami et al., 2013; Marlow et al., 2013; Murback et al., 2011; Sarkari et al., 2012). In Tiermodellen der Erkrankung weisen männliche Tiere größere Läsionen und höhere Parasitenlasten auf als weibliche Tiere. Zudem zeigten männliche Tiere eine starke Polarisation zu einer Th2-Antwort, charakterisiert durch höhere Expression von IL-4, IL-10 und TGF β mRNA (Lezama-Davila et al., 2007; Travi et al., 2002). Hervorzuheben ist zudem, dass dieser Geschlechtsunterschied erst mit dem Eintritt in die Pubertät entsteht (Murback et al., 2011) und folglich stark mit steigenden Testosteronleveln korrelieren könnte. Infolgedessen scheint die Qualität der initiierten Immunantwort in Abhängigkeit von Geschlechtshormonen von Frauen und Männern einen viel größeren Effekt auf die Entscheidung über eine geschlechtsspezifische Ausprägung einer Erkrankung zu haben als die Quantität von Immunzellen (Bouman et al., 2004; Fish, 2008; Klein, 2012).

4.3 Charakterisierung der Aktivierung von humanen und murinen iNKT Zellen durch Stimulation mit synthetischen *Eh*PI Analoga des *Eh*LPPGs

Die Behandlung verschiedener Erkrankungen kann durch die Applikation von immunstimulatorischen Molekülen unterstützt werden. Derartige Moleküle helfen das Immunsystem so zu aktivieren, dass eine protektive Immunantwort ausgelöst wird und Krankheitserreger oder Tumorzellen besser eliminiert werden können. Der iNKT Zell-Ligand *Eh*LPPG aus der Membran des Protozoen *E. histolytica* könnte aufgrund seiner immunstimulatorischen Eigenschaften für therapeutische Zwecke angewendet werden. Die Verwendung von synthetischen Analoga kann viele Vorteile gegenüber der Verwendung von nativen Molekülen bieten. Die Aufreinigung kann verkürzt, die Reinheit erhöht und größere Mengen hergestellt werden. Außerdem ermöglicht die Herstellung synthetischer Analoga die Einführung von Modifikationen, die die immunmodulatorischen Eigenschaften des Moleküls verbessern können, um protektive Immunantworten auszulösen. Daher wurden synthetische *Eh*PI Analoga des *Eh*LPPGs hergestellt, die einerseits dem nativen Molekül sehr ähneln und andererseits schon Modifikationen beinhalten (s. Abschnitt 3.2).

Ob Unterschiede in der Aktivierung von humanen und murinen iNKT Zellen zwischen den synthetischen *EhPI* Analoga und dem natürlichen Molekül bestehen, wurde in dieser Arbeit analysiert, um zukünftig Analoga zu identifizieren, die immuntherapeutisch angewendet werden könnten.

Die Untersuchung der synthetischen Analoga zeigte, dass synthetische *EhPI* Analoga sowohl humane als auch murine iNKT Zellen aktivieren können. Alle vier *EhPI* Analoga (*EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 trans und *EhPIb* C28:0) induzierten in humanen PBMC hauptsächlich iNKT⁺IFN γ ⁺ und iNKT⁺IL-4⁺ Zellen und nur wenig iNKT⁺TNF α ⁺ und iNKT⁺IL-17A⁺ Zellen.

Murine iNKT Zellen produzierten nach Stimulation mit den *EhPI* Analoga weniger IFN γ als nach Stimulation mit α GalCer und *EhLPPG*. Im Vergleich dazu war in humanen PBMCs die Anzahl an Zytokin-produzierenden iNKT Zellen zwischen α GalCer-, *EhLPPG*- und *EhPI* Analoga-stimulierten PBMCs nahezu gleich. Auch induzierte *EhPIa* C30:1 cis, welches nur eine Fettsäurekette am Phosphatidylinositolring trägt, in murinen iNKT Zellen im Vergleich zu humanen iNKT Zellen nur geringe Mengen an IFN γ . Diese Beobachtung wurde auch schon für ein α GalCer-Analog das OCH gemacht. OCH zeichnet eine verkürzte Sphingosinkette aus und induziert höhere Mengen an IFN γ in humanen iNKT Zellen als in murinen iNKT Zellen (Veerapen et al., 2011). Modifikationen von iNKT Zell-Agonisten können zudem die iNKT Zellaktivierung modulieren. Z.B. Analoga von α GalCer mit Phytosphingosin- und Fettsäureketten variierender Länge und Saturierung können zur Induktion verschiedener Zytokinprofile in iNKT Zellen führen (Cerundolo et al., 2009). Diese Unterschiede sind abhängig von der Stabilität des Lipidliganden-CD1d-Komplexes, der Affinität der Bindung zum iNKT TcR sowie der Beladung im zellulären Kompartiment (Cerundolo et al., 2009). α GalCer induziert Th1- und Th2-Zytokine in murinen und humanen iNKT Zellen. α GalCer Analoga wie das OCH, C20:2 und C20:4 induzieren dagegen hauptsächlich ein Th2-Zytokinprofil (Anderson et al., 2013; Bricard et al., 2010). Bei der Polarisierung der Immunantwort durch ein Glykolipid spielt die Bindung des Glykolipids in der A' und F' *pocket* der Bindungsgrube des CD1ds und die Präsentation der polaren Kopfgruppe des Glykolipids zum TcR der iNKT Zellen eine wichtige Rolle (Anderson et al., 2013). Eine Verkürzung der Fettsäurekette erhöht die Dissoziation des Lipidantigens von CD1d und verringert die hydrophobe Bindungsaffinität. iNKT Zell-Agonisten mit ungesättigte Fettsäureketten, wie sie das α GalCer Analog C20:2 aufweist, sollen darüber hinaus eine stärkere Bindung zur A' *pocket* des CD1ds aufweisen und direkt auf CD1d auf Zelloberflächen geladen werden können (Yu et al., 2005). *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 trans weisen jeweils auch eine ungesättigte Bindung auf. Diese Doppelbindung könnte dazu führen, dass diese *EhPI* Analoga prinzipiell auch besser auf CD1d-Moleküle geladen werden könnten und nicht erst in späten Endosomen wie *EhLPPG* prozessiert werden müssen. Yu et al. zeigten auch, dass das C20:1 Analog von α GalCer mit einer ungesättigten Bindung *in vitro* IFN γ und IL-4 in murinen Milzzellen induzierte. Bisher zeigte das *EhPIb* C30:1 trans Analog in humanen iNKT Zellen die stärkste Stimulation, vielleicht aufgrund der trans-Doppelbindung, die eine affinere Bindung vermittelt und somit eine bessere iNKT TcR Stimulation.

Die strukturelle Modifikation der *EhPI* und die Polarisierung zu einer bestimmten Immunantwort könnte Vorteile gegenüber Molekülen, die sowohl Th1- und Th2-Antworten induzieren, haben. Th1- und Th2-Zytokine können in der Modulation des Immunsystems gegeneinander wirken und zu einer Inhibition führen. *EhLPPG* scheint in murinen iNKT Zellen nur wenig IL-4 und mehr IFN γ zu produzieren (diese

Arbeit und Lotter et al., 2009), was für eine Polarisierung in Richtung einer Th1-Antwort sprechen könnte. In humanen iNKT Zellen wird jedoch sowohl IFN γ als auch IL-4 induziert. Dieses Ergebnis und auch das Ergebnis der Stimulation mit OCH (Veerapen et al., 2011) lässt die Vermutung zu, dass es Unterschiede in der Aktivierung humaner und muriner iNKT Zellen geben könnte. Welche Faktoren dafür verantwortlich sind, ist jedoch bisher unklar.

4.4 Immuntherapeutisches Potential von *EhLPPG*

4.4.1 Leberschädigung durch *EhLPPG*

Viele Medikamente können auf die Leber toxisch wirken, daher wurde auch das *EhLPPG* auf eine mögliche Lebertoxizität hin getestet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl in C57BL/6 Mäusen als auch FVB/N Mäusen die Serum-ALT-Konzentration in Abhängigkeit der verwendeten Konzentration von α GalCer zunahm, während *EhLPPG* hingegen nur eine geringe Erhöhung der ALT-Werte in beiden untersuchten Mausstämmen induzierte. Diese geringe Leberschädigung durch *EhLPPG* in Mäusen könnte ein Vorteil bei der Verwendung von *EhLPPG* gegenüber α GalCer als Immuntherapeutikum sein. Ursache dafür könnte sein, dass *EhLPPG* als Glykolipid aus einem Humanpathogen, der seit langer Zeit an den Menschen adaptiert ist, verträglicher sein könnte. Die leberschädigende Wirkung von α GalCer wurde auch schon in einer anderen Studie belegt. C57BL/6 Mäuse, denen α GalCer appliziert wurde, wiesen erhöhte Transaminaselevel (ALT und AST) auf. Auch die histologische Untersuchung der Leber dieser Tiere zeigte eine Schädigung der Hepatozyten, sowie ein verstärktes Immunzellinfiltrat (Osman et al., 2000). Eine Schädigung humaner Hepatozyten konnte bisher bei der Behandlung von Tumorpatienten mit α GalCer-stimulierten DCs nicht festgestellt werden (Kunii et al., 2009; Nieda et al., 2004). Lediglich bei einem Lungentumorpatienten konnten erhöhte Bilirubinwerte nach der Behandlung mit α GalCer-stimulierten DCs nachgewiesen werden, was für eine Leberschädigung sprechen kann (Motohashi et al., 2009).

4.4.2 Antileishmanienaktivität von *EhLPPG*

Während einer Infektion mit Leishmanien spielen APCs, wie Makrophagen und DCs, eine wichtige Rolle. Sie sind zum einen die Zielzellen der Leishmanien für die Proliferation im infizierten Wirt und zum anderen sind sie die Haupteffektorzellen, die für die Eliminierung des Parasiten zuständig sind (Liu and Uzonu, 2012). Die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Makrophagen ist ein essentieller Faktor im Infektionsverlauf. Klassisch-aktivierte Makrophagen, die über IFN γ von z.B. Th1- und NK Zellen aktiviert werden, produzieren iNOS, ein Enzym, das für die Katalyse von L-Arginin zu NO zuständig ist. NO ist ein Haupteffektormolekül bei der Abtötung von intrazellulären Erregern. Leishmanien können die Differenzierung zu klassisch-aktivierten Makrophagen inhibieren und stattdessen die Differenzierung zu alternativ-aktivierten Makrophagen durch Induktion von IL-10 und TGF β fördern, welches zur Persistenz und Vermehrung des Parasiten führt. Alternativ-aktivierte Makrophagen zeichnen sich durch eine erhöhte Polyaminbiosynthese aus, die zu erhöhter Arginin-Produktion und zur Herunterregulation der NO-Produktion und der Th1-Zytokinexpression führt.

Darüber hinaus können DCs durch die Produktion von IL-12 T-Zellen aktivieren, die über IFN γ die Differenzierung zu klassisch-aktivierten Makrophagen vermitteln (Liu and Uzonna, 2012).

APCs, wie DC und Makrophagen können durch *EhLPPG* aktiviert werden. Daher sollte untersucht werden, ob *EhLPPG* auch zur Abtötung von intrazellulären Erregern, wie *L. major*, beitragen kann. Hier wurde erstmals die Antileishmanienaktivität von *EhLPPG* in einem *in vitro* Modell für die Leishmanien-Infektion untersucht. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von *L. major*-infizierten Makrophagen mit *EhLPPG* bzw. α GalCer und Milzzellen sowohl den Prozentsatz an infizierten Makrophagen als auch die Parasitenlast senken konnte.

Die *EhLPPG*- bzw. α GalCer-Behandlung könnte Makrophagen und DCs zur IL-12-Produktion angeregt haben, welche zur Aktivierung von Makrophagen und zur Differenzierung zu klassisch-aktivierten Makrophagen geführt haben könnte. Klassisch-aktivierte Makrophagen können durch erhöhte iNOS-Synthese und NO-Produktion, sowie durch die Produktion von TNF α und anderen Th1-Zytokinen eine Leishmanien-Infektion besser kontrollieren als alternativ-aktivierte Makrophagen. Die Zugabe von Milzzellen führte wahrscheinlich zusätzlich über Aktivierung von DC und iNKT Zellen zu einer Leishmanien-spezifischen T-Zellantwort, die charakterisiert ist durch die vermehrte Produktion von IFN γ durch CD4 $^{+}$ T-Zellen (Liu and Uzonna, 2012). Folglich könnte die Glykolipid-Applikation *in vitro* somit eine Differenzierung von Makrophagen zu klassisch-aktivierten Makrophagen begünstigt haben, welche zu einer besseren Kontrolle der Infektion und Eliminierung des Parasiten beigetragen haben könnte.

Ein weiterer Schritt in der Aufklärung des Einflusses von *EhLPPG* auf intrazelluläre Erreger, war die Untersuchung der Antileishmanienaktivität in einem *in vivo* Mausmodell für die kutane Leishmaniose. Hier sollte untersucht werden, ob die in Kultur beobachteten Effekte auch in einem immunologisch intakten System beobachtet werden können.

In vivo konnten wir zeigen, dass nach subkutaner Applikation von *EhLPPG* (4 μ g/ml und 8 μ g/ml) eine Verzögerung in der Zunahme der Fußschwellung in behandelten Mäusen festgestellt werden konnte. Die langsamere Zunahme der Fußschwellung korrelierte zudem mit einer verlängerten Ulzerationsfreien Zeit. Denn Fußläsionen *EhLPPG*-behandelter Tiere ulzerierten zu späteren Zeitpunkten als Fußläsionen PBS-behandelter Tiere.

In einem Leishmanien-Infektions-Modell, das physiologische Infektionsdosen von 10 3 *L. major*-Promastigoten verwendete, konnte durch die Applikation des α GalCer-Analog PBS57 der Infektionsverlauf in BALB/c Mäusen auch beeinflusst werden (Griewank et al., 2014). Anders als in unserem Modell erfolgte hier die Injektion der Parasiten in die Haut des Ohres der Tiere und die Größe der Ohrläsionen wurde gemessen. BALB/c Mäuse entwickeln normalerweise während einer Leishmanien-Infektion eine Th2/Th17-Immunantwort, welche dazu führt, dass sie die Infektion schlechter kontrollieren können und höhere Parasitenlasten aufweisen. Die Applikation von einer niedrigen Dosis von PBS57 führte dazu, dass korrespondierend zu den hier gezeigten Ergebnissen, eine Verzögerung in der Volumenzunahme der Ohrläsionen eintrat. Darüber hinaus korrelierten die kleineren Läsionen mit niedrigeren Parasitenlasten in Ohr und Milz im Vergleich zur Kontrolle. Diese Beobachtung scheint Mausstamm-spezifisch zu sein, denn die Applikation von PBS57 in Leishmanien-resistenten C57BL/6 Mäusen führte zu einer verstärkten Zunahme der Ohrläsionsvolumina und zur einer verzögerten Ausheilung der Läsionen (Griewank et al., 2014).

Auch in einem Mausmodell für die viszerale Leishmaniose in C57BL/6 Mäusen führte die Aktivierung von iNKT Zellen durch α GalCer zu einer Exazerbation der Symptomatik der Erkrankung, die mit einer vermehrten Produktion von nicht-protektiven IL-4 sowie einer Abnahme protektiver IFN γ ⁺CD8⁺ T Zellen einherging (Stanley et al., 2008).

Weltweit sind über 12 Millionen Menschen von Leishmaniose betroffen (Griewank et al., 2014; Wertheim et al., 2012). Das wirksamste Medikament für die Behandlung der kutanen und viszeralen Leishmaniose ist bisher das Amphotericin B. Jedoch ist das Amphotericin B hochtoxisch und hat zahlreiche Nebenwirkungen. Intravenös verabreicht löst es viele Infusionsbedingte Reaktionen aus, wie Fieber, Schüttelfrost, Hypoxie und Blutdruckschwankungen (Daftarian et al., 2013). Aufgrund dieser Komplikationen ist es nötig Nebenwirkungs-ärmere Medikamente zur Behandlung der Leishmaniose zu entwickeln.

Klassische Anti-Leishmanien-Medikamente wie das Amphotericin B und Paromomycin wirken direkt gegen den Parasiten. Mit einer Applikation von *EhLPPG* sowie α GalCer soll vorrangig das Immunsystem des Wirtes aktiviert werden, so dass eine gegen den Parasiten gerichtete Immunantwort initiiert wird. Eine Kombinationstherapie, z.B. bestehend aus immunmodulierenden Molekülen, wie *EhLPPG* und anti-parasitären Mitteln, könnte möglicherweise die zu verabreichende Dosis von anti-parasitären Medikamenten, die teilweise starke Nebenwirkungen aufweisen, senken und bei der Elimination des Erregers helfen. Die Verwendung von Nanocarriern könnte zudem die Bioverfügbarkeit von *EhLPPG* über eine verbesserte Inkorporation in Makrophagen erheblich steigern. Liposomen könnten hierbei einen passenden Nanocarrier darstellen. Liposomale Formulierungen für Medikamente, die gegen den Parasiten selbst gerichtet sind, werden bereits für die Behandlung der kutanen und viszeralen Leishmaniose getestet. Die liposomale Darreichungsform von z.B. Amphotericin B konnte die normalerweise benötigte Dosis für die intravenöse Behandlung senken und Liposomen, die Oleylphosphocholin enthielten, die man durch Tätowieren in die Hautläsionen von Mäusen infiziert mit *L. major* und *L. mexicana* applizierte, führten zu einer kompletten Ausheilung der Läsionen (Shio et al., 2014).

4.4.3 Antitumoraktivität von *EhLPPG*

Für das Studium von Tumoren gibt es eine Vielzahl an Tiermodellen. Gegenüber karzinogen-induzierten Tumormodellen, die chemische oder radioaktive Substanzen für die Induktion von Tumoren nutzen (Liu et al., 2014), haben transgene Tumormodelle, charakterisiert durch eine erhöhte Onkogenexpression und/oder den Verlust der Tumorsuppression oder Mutationen des Stoffwechsels, entscheidende Vorteile. Transgene Tumormodelle ermöglichen das Studium vieler verschiedener Krebsarten, sind reproduzierbar und weisen ein rasches und zuverlässiges Tumorstadium auf, welches die Ermittlung der Behandlungseffizienz und des Tumorstadiums erleichtert. Darüber hinaus nutzt man auch zahlreiche Tumorzelllinien zur Induktion von Tumoren in verschiedenen Mausstämmen ein, wie B16-Melanomazellen zur Induktion von Leber- und Lungenmetastasen (Fujii et al., 2002; Toura et al., 1999), MV3-Melanomazellen zur Induktion von soliden Tumoren und Lungenmetastasen (Thies et al., 2008) sowie EL-4-T-Zelllymphomazellen zur Induktion von Lebermetastasen (Inafuku et al., 2012).

Die Aktivierung von iNKT Zellen beeinflusst die Funktion vieler Immunzellen, insbesondere von DC, NK Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, welche wichtig sind für die Initiierung einer Antitumorantwort (Seino et al., 2006). Daher liegt die Vermutung nahe, dass durch die spezifische Stimulation von iNKT Zellen protektive Antitumorantworten ausgelöst werden könnten.

In dieser Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob *EhLPPG*-stimulierte DC eine Antitumoraktivität auslösen können. In einem induzierbaren transgenen Mammakarzinom-Mausmodell, in dem die Tiere eine Mutation des Tumorsuppressors p53 aufweisen (Schulze-Garg et al., 2000), können über Transplantation von H8N8-Zellen Tumore im Mammagewebe ausgelöst werden. Eine Woche nach Transplantation wurden die Tiere mit 2×10^6 α GalCer-, *EhLPPG*-stimulierten DCs, 2×10^6 DCs oder PBS einmal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen behandelt. Die Behandlung von Tieren mit *EhLPPG*-stimulierten DCs führte zu einer signifikant verlängerten Tumor-freien Überlebenszeit sowie zu einem verringerten Tumorstadium. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, die mit α GalCer-stimulierten DCs behandelt worden waren nur bis Tag 33 signifikant kleinere Tumorstadien im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Überraschenderweise konnte auch die Behandlung mit DC allein das Tumorstadium beeinflussen, indem es ein verringertes Tumorstadium wie *EhLPPG*-stimulierte DC induzierte.

Zusätzlich wurde ebenso der Einfluss von *EhLPPG*- und α GalCer-stimulierten DC in einem Mausmodell für die Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms in Mdr2ko-Mäusen untersucht (Ella et al., 2014; Potikha et al., 2013). In diesem Modell entwickeln Mdr2ko-Mäuse mit zunehmendem Alter endogene Lebertumore. Tumormodelle mit endogen-entstehenden Tumoren sind aufgrund ihrer heterogenen Tumorentwicklung näher an der humanen Situation. Jedoch erhöht die Tumorerheterogenität auch die Komplexität der Behandlung und kann die Ergebnisinterpretation erschweren. Im Gegensatz zum Mammakarzinom-Modell konnte das Tumorstadium durch die Gabe von α GalCer-stimulierten DC verlangsamt werden. Durch Applikation von *EhLPPG*-stimulierten DCs konnte das Tumorstadium hier jedoch nicht beeinflusst werden. Aufgrund der geringen Fallzahl an Lebertumoren (nur 11 von 24 Tieren) ist zukünftig die Untersuchung eines größeren Kollektivs notwendig, um differenzierte Aussagen über den Einfluss einer Behandlung mit *EhLPPG*-stimulierten DCs auf die Lebertumorentstehung in diesem Modell treffen zu können.

In anderen Tumormodellen konnte auch ein positiver Effekt der Behandlung mit α GalCer-stimulierten DCs festgestellt werden. In einem Mausmodell für Lungenmetastasen ausgelöst durch B16-Melanoma konnte die i.v.-Applikation von α GalCer-stimulierten DC die Anzahl an Lungenmetastasen reduzieren. Außerdem zeigte diese Studie, dass α GalCer-stimulierte DCs eine langanhaltendere Aktivierung von IFN γ -produzierenden iNKT Zellen induzierten als lösliches α GalCer (Fujii et al., 2002). Ebenso in einem Modell für die Lebermetastasierung von B16-Melanomazellen konnten Metastasen durch α GalCer-DC-Applikation inhibiert werden (Toura et al., 1999). Dieser Effekt zeigte sich nicht nur bei Gabe einen Tag nach Injektion der B16-Zellen in die Milz, sondern auch nachdem bereits Lebermetastasen entstanden waren und die Behandlung erst an Tag 7 nach Injektion begann und einmal täglich über den Zeitraum von 6 Tagen fortgeführt wurde (Toura et al., 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *EhLPPG*-stimulierte DC auch Einfluss auf solide Tumore haben können. Inwiefern auch eine Metastasierung beeinflusst werden kann wurde nicht untersucht. Der positive Effekt, der durch die Behandlung von *EhLPPG*-stimulierten DC beobachtet werden

konnte, könnte auf die Induktion einer Antitumorantwort in den behandelten Mäusen zurückzuführen sein.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Applikation von α GalCer-DC und auch α GalCer allein, sowie Analoga von α GalCer die IFN γ -Produktion und die Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen erhöhen kann (Fujii et al., 2002; Inafuku et al., 2012). Die Aktivierung von iNKT Zellen durch Glykolipid-stimulierte DCs führte womöglich zur Hochregulation der zytotoxischen Molekülexpression wie Perforin, FasL oder TRAIL, in diesen Zellen, welches zu direkter zytotoxischer Aktivität von iNKT Zellen gegen Tumorzellen geführt haben könnte. Außerdem führt eine erhöhte Expression von CD40L auf der Oberfläche von aktivierten iNKT Zellen zur verstärkten Aktivierung von DCs über CD40 (Seino et al., 2006), welche wiederum durch IL-12-Produktion iNKT Zellen zur IFN γ -Sekretion anregen. iNKT Zellen-produziertes IFN γ kann NK Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen aktivieren, welches zur Vermittlung von Antitumorzytotoxizität führt. Zudem können aktivierte iNKT Zellen die DC-Reifung induzieren und damit eine verstärkte Th1-Antwort, welche dabei helfen könnte eine Antitumorantwort zu initiieren (Seino et al., 2006).

Ebenso scheint eine vermehrte Einwanderung von DC in den Primärtumor das Tumorwachstum beeinflussen zu können. Für eine humane Tumorzelllinie MV3, die in immundefiziente Mäuse implantiert wurde, wurde gezeigt, dass die Applikation von Mistletoe-Lectin (ML)-I zu einer Anreicherung von DC im Primärtumor und zur Reduktion des Melanomwachstums und Anzahl der Metastasen führte (Thies et al., 2008). Somit könnte eine Anreicherung von DC ausgelöst durch ein Molekül oder durch Applikation von DC auf das Tumormilieu immunmodulatorisch wirken und helfen eine gegen den Tumor-gerichtete Immunantwort zu induzieren. Dies könnte möglicherweise erklären warum die Applikation von DC im hier verwendeten Mammakarzinommodell auch das Tumorwachstum beeinflussen konnte. Die DC könnten durch die Aufbereitung aktiviert worden sein und könnten womöglich dadurch auf das Tumormilieu gewirkt haben.

Aufgrund der Vorteile von α GalCer-stimulierten DC werden diese auch vorzugsweise bei der Behandlung von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen, wie Nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (Ishikawa et al. (2005)), Kopf- und Nackenkarzinom (Kunii et al., 2009; Kurosaki et al., 2011) und anderen Tumorarten verwendet (Motohashi et al., 2011; Nagato et al., 2012; Nieda et al., 2004). In diesen Studien zeigte sich, dass Patienten sehr individuell auf diese Art der Behandlung reagierten und nicht in jedem Fall iNKT Zell-vermittelte Antitumoreffekte ausgelöst werden konnten (Kunii et al., 2009), jedoch überwogen positive Effekte, wie erhöhte Produktion von IFN γ , Expansion von iNKT Zellen und eine vermehrte Anzahl an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Motohashi et al., 2011). Diese Ergebnisse legen nahe, dass trotz individueller Unterschiede im Therapieerfolg, der Einsatz von Glykolipiden in der Antitumorthherapie für einige Patienten eine neue Behandlungsform darstellen und einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnte.

4.5 Ausblick

Weniger die Quantität von Immunzellen als vielmehr Unterschiede in der Qualität und Vielfalt der Zytokinproduktion sowie der Rekrutierung von Immunzellen scheinen eine wichtige Rolle bei der Ausprägung eines Geschlechtsdimorphismus bei bestimmten Erkrankungen zu spielen. Die Untersuchung von Regulationsmechanismen, die über Geschlechtshormone, wie Östrogen und

Testosteron, vermittelt werden, könnten Aufschluss darüber geben, warum die Suszeptibilität von Männern und Frauen gegenüber bestimmten Erkrankungen unterschiedlich ist und darüber zu Ansatzpunkten für neue Therapiemethoden führen.

Moleküle, die eine Immunantwort induzieren, die die Eliminierung eines Pathogens oder Tumors begünstigen, werden vermehrt als Immuntherapeutikum bei der Behandlung von verschiedenen Erkrankungen eingesetzt. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein natives Molekül wie das Lipopeptidphosphoglykan aus *E. histolytica* eine Infektion mit einem intrazellulären Parasiten sowie das Wachstum von Tumoren beeinflussen konnte. Ein wichtiger Schritt hin zu einem Immuntherapeutikum ist die Verwendung eines synthetischen Wirkstoffes. Ob und inwieweit synthetische Analoga des *Eh*LPPGs dessen Wirksamkeit ersetzen oder nach Optimierung verbessern können, ist Ziel zukünftiger Untersuchungen. Diese beinhalten zum einen die gezielte Einführung von Modifikationen, die zu einer Optimierung in der Aktivierung von iNKT Zellen führen, die Verwendung zusätzlicher Modelle für intrazelluläre Erreger sowie anderer Tumore und die Verwendung von Nanocarriern zur Steigerung der Bioverfügbarkeit für therapeutische Anwendungen.

5. Literatur

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and S., P. (2010). Cellular and molecular immunology, 6th edn. Saunders, Philadelphia, PA.

Acuna-Soto, R., Maguire, J.H., and Wirth, D.F. (2000). Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. *The American journal of gastroenterology* 95, 1277-1283.

Amprey, J.L., Im, J.S., Turco, S.J., Murray, H.W., Illarionov, P.A., Besra, G.S., Porcelli, S.A., and Spath, G.F. (2004). A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *The Journal of experimental medicine* 200, 895-904.

Anderson, B.L., Teyton, L., Bendelac, A., and Savage, P.B. (2013). Stimulation of natural killer T cells by glycolipids. *Molecules* 18, 15662-15688.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* 27, 669-692.

Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annual review of immunology* 25, 297-336.

Bernin, H., Helk, E., Ernst, T., Ittrich, H., Jacobs, T., Heeren, J., Tacke, F., Tannich, E., and Lotter, H. (2013). TNFalpha-mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection. *PLoS pathogens* 9, e1003096.

Bernin, H., and Lotter, H. (2014). Sex bias in the outcome of human tropical infectious diseases: influence of steroid hormones. *The Journal of infectious diseases* 209 Suppl 3, S107-113.

Bernin, H., Marggraff, C., Jacobs, T., Brattig, N., An, L.V., Blessmann, J., and Lotter, H. (2014 im Druck). Immune markers characteristic for asymptomatically infected and diseased *Entamoeba histolytica* individuals and their relation to sex. *BMC Infectious Diseases*.

Biller, L., Schmidt, H., Krause, E., Gelhaus, C., Matthiesen, J., Handal, G., Lotter, H., Janssen, O., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2009). Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *Proteomics* 9, 4107-4120.

Blessmann, J., Ali, I.K., Nu, P.A., Dinh, B.T., Viet, T.Q., Van, A.L., Clark, C.G., and Tannich, E. (2003a). Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *Journal of clinical microbiology* 41, 4745-4750.

Blessmann, J., Le Van, A., and Tannich, E. (2003b). Hepatic ultrasound in a population with high incidence of invasive amoebiasis: evidence for subclinical, self-limited amoebic liver abscesses. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 8, 231-233.

Blessmann, J., Van Linh, P., Nu, P.A., Thi, H.D., Muller-Myhsok, B., Buss, H., and Tannich, E. (2002). Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66, 578-583.

Bos, H.J., and van de Griend, R.J. (1977). Virulence and toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Nature* 265, 341-343.

Bouman, A., Heineman, M.J., and Faas, M.M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Human reproduction update* 11, 411-423.

Bouman, A., Schipper, M., Heineman, M.J., and Faas, M.M. (2004). Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. *Am J Reprod Immunol* 52, 19-26.

Brennan, P.J., Brigl, M., and Brenner, M.B. (2013). Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature reviews Immunology* 13, 101-117.

- Bricard, G., Venkataswamy, M.M., Yu, K.O., Im, J.S., Ndonye, R.M., Howell, A.R., Veerapen, N., Illarionov, P.A., Besra, G.S., Li, Q., *et al.* (2010). Alpha-galactosylceramide analogs with weak agonist activity for human iNKT cells define new candidate anti-inflammatory agents. *PloS one* 5, e14374.
- Brigl, M., Bry, L., Kent, S.C., Gumperz, J.E., and Brenner, M.B. (2003). Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 4, 1230-1237.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N., and Tannich, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic cell* 2, 501-509.
- Burchard, G., and Tannich, E. (2004). Epidemiologie, Diagnostik und Therapie des Amöbiasis. *Deutsches Ärzteblatt* 101.
- Campbell, K.S., and Hasegawa, J. (2013). Natural killer cell biology: an update and future directions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132, 536-544.
- Castano, D., Garcia, L.F., and Rojas, M. (2011). Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis* 91, 348-360.
- Cerundolo, V., Silk, J.D., Masri, S.H., and Salio, M. (2009). Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nature reviews Immunology* 9, 28-38.
- Chadee, K., and Meerovitch, E. (1984). The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for *Entamoeba histolytica*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 33, 47-54.
- Christiansen, D., Milland, J., Mouhtouris, E., Vaughan, H., Pellicci, D.G., McConville, M.J., Godfrey, D.I., and Sandrin, M.S. (2008). Humans lack iGb3 due to the absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation. *PLoS biology* 6, e172.
- Chung, B., Aoukaty, A., Dutz, J., Terhorst, C., and Tan, R. (2005). Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *J Immunol* 174, 3153-3157.
- Crough, T., Purdie, D.M., Okai, M., Maksoud, A., Nieda, M., and Nicol, A.J. (2004). Modulation of human Valpha24(+)Vbeta11(+) NKT cells by age, malignancy and conventional anticancer therapies. *British journal of cancer* 91, 1880-1886.
- Daftarian, P.M., Stone, G.W., Kovalski, L., Kumar, M., Vosoughi, A., Urbiet, M., Blackwelder, P., Dikici, E., Serafini, P., Duffort, S., *et al.* (2013). A targeted and adjuvanted nanocarrier lowers the effective dose of liposomal amphotericin B and enhances adaptive immunity in murine cutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases* 208, 1914-1922.
- DelaRosa, O., Tarazona, R., Casado, J.G., Alonso, C., Ostos, B., Pena, J., and Solana, R. (2002). Valpha24+ NKT cells are decreased in elderly humans. *Experimental gerontology* 37, 213-217.
- Denis, M., and Chadee, K. (1989a). Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infection and immunity* 57, 1750-1756.
- Denis, M., and Chadee, K. (1989b). Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *Journal of leukocyte biology* 46, 270-274.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 431-432.
- Dobbeck, H. (2011). Untersuchung der geschlechtsspezifischen Zytokinsekretion humaner iNKT-Zellen in Bezug auf die Amöbiasis des Menschen. Diplomarbeit Universität Hamburg.

Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306-317.

Ella, E., Heim, D., Stoyanov, E., Harari-Steinfeld, R., Steinfeld, I., Pappo, O., Perlman, T.S., Nachmansson, N., Rivkin, L., Olam, D., *et al.* (2014). Specific genomic and transcriptomic aberrations in tumors induced by partial hepatectomy of a chronically inflamed murine liver. *Oncotarget*.

Enomoto, N., Nagata, T., Suda, T., Uchijima, M., Nakamura, Y., Chida, K., Nakamura, H., and Koide, Y. (2007). Immunization with dendritic cells loaded with alpha-galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T lymphocyte activity against infection by intracellular bacteria. *FEMS immunology and medical microbiology* 51, 350-362.

Fastag de Shor, A., Ramirez-Espinosa, M.E., Gil-Barbosa, M., and Villegas-Gonzalez, J. (1972). [Enzymatic activity of *Entamoeba histolytica* in experimental lesions in rabbits]. *Archivos de investigacion medica* 2, Suppl 2:287-294.

Fereidouni, M., Farid Hosseini, R., Jabbari Azad, F., Schenkel, J., Varasteh, A., and Mahmoudi, M. (2010). Frequency of circulating iNKT cells among Iranian healthy adults. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 78, 65-69.

Fernandes, J.S., Araujo, M.I., Lopes, D.M., de Souza Rda, P., Carvalho, E.M., and Cardoso, L.S. (2014). Monocyte subsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. *Mediators of inflammation* 2014, 703653.

Fish, E.N. (2008). The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nature reviews Immunology* 8, 737-744.

Fox, L.M., Cox, D.G., Lockridge, J.L., Wang, X., Chen, X., Scharf, L., Trott, D.L., Ndongue, R.M., Veerapen, N., Besra, G.S., *et al.* (2009). Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS biology* 7, e1000228.

Freud, A.G., Yu, J., and Caligiuri, M.A. (2014). Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Seminars in immunology* 26, 132-137.

Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M., and Steinman, R.M. (2002). Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 3, 867-874.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.

Girardi, E., and Zajonc, D.M. (2012). Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunological reviews* 250, 167-179.

Giron-Gonzalez, J.A., Moral, F.J., Elvira, J., Garcia-Gil, D., Guerrero, F., Gavilan, I., and Escobar, L. (2000). Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 143, 31-36.

Godfrey, D.I., and Berzins, S.P. (2007). Control points in NKT-cell development. *Nature reviews Immunology* 7, 505-518.

Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., and Van Kaer, L. (2004). NKT cells: what's in a name? *Nature reviews Immunology* 4, 231-237.

Godfrey, D.I., Stankovic, S., and Baxter, A.G. (2010). Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* 11, 197-206.

Gonzalez-Aseguinolaza, G., de Oliveira, C., Tomaska, M., Hong, S., Bruna-Romero, O., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bendelac, A., Van Kaer, L., Koezuka, Y., *et al.* (2000). alpha -galactosylceramide-

activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8461-8466.

Gonzalez-Aseguinolaza, G., Van Kaer, L., Bergmann, C.C., Wilson, J.M., Schmieg, J., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koezuka, Y., and Tsuji, M. (2002). Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *The Journal of experimental medicine* 195, 617-624.

Gourdy, P., Araujo, L.M., Zhu, R., Garmy-Susini, B., Diem, S., Laurell, H., Leite-de-Moraes, M., Dy, M., Arnal, J.F., Bayard, F., *et al.* (2005). Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. *Blood* 105, 2415-2420.

Griewank, K.G., Lorenz, B., Fischer, M.R., Boon, L., Lopez Kostka, S., and von Stebut, E. (2014). Immune modulating effects of NKT cells in a physiologically low dose *Leishmania major* infection model after alphaGalCer analog PBS57 stimulation. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e2917.

Gumperz, J.E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S.A., Cardell, S., Brenner, M.B., *et al.* (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12, 211-221.

Haque, R., Mondal, D., Kirkpatrick, B.D., Akther, S., Farr, B.M., Sack, R.B., and Petri, W.A., Jr. (2003). Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 69, 398-405.

Hristov, M., Schmitz, S., Nauwelaers, F., and Weber, C. (2012). A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *Journal of immunological methods* 381, 9-13.

Inafuku, M., Li, C., Kanda, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Oku, H., and Watanabe, H. (2012). Beta-glucosylceramide administration (i.p.) activates natural killer T cells in vivo and prevents tumor metastasis in mice. *Lipids* 47, 581-591.

Ishikawa, A., Motohashi, S., Ishikawa, E., Fuchida, H., Higashino, K., Otsuji, M., Iizasa, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Fujisawa, T. (2005). A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 1910-1917.

Jing, Y., Gravenstein, S., Chaganty, N.R., Chen, N., Lyerly, K.H., Joyce, S., and Deng, Y. (2007). Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. *Experimental gerontology* 42, 719-732.

Johnson, T.R., Hong, S., Van Kaer, L., Koezuka, Y., and Graham, B.S. (2002). NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *Journal of virology* 76, 4294-4303.

Jyonouchi, S., Smith, C.L., Saretta, F., Abraham, V., Ruymann, K.R., Modayur-Chandramouleeswaran, P., Wang, M.L., Spergel, J.M., and Cianferoni, A. (2014). Invariant natural killer T cells in children with eosinophilic esophagitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44, 58-68.

Karami, M., Doudi, M., and Setorki, M. (2013). Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. *Journal of vector borne diseases* 50, 30-37.

Karlmark, K.R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H.W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2009). Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 50, 261-274.

- Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y., and Makino, H. (2002). CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 46, 2578-2586.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., *et al.* (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.
- Kee, S.J., Park, Y.W., Cho, Y.N., Jin, H.M., Kim, M.J., Lee, S.J., Kim, T.J., Lee, S.S., Kwon, Y.S., Jang, H.C., *et al.* (2012). Age- and gender-related differences in circulating natural killer T cells and their subset levels in healthy Korean adults. *Human immunology* 73, 1011-1016.
- Kenna, T., Golden-Mason, L., Porcelli, S.A., Koezuka, Y., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., and Doherty, D.G. (2003). NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol* 171, 1775-1779.
- Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro, R., Benhnia, M.R., Zajonc, D.M., Ben-Menachem, G., Ainge, G.D., Painter, G.F., *et al.* (2006). Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 7, 978-986.
- Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G.W., Poles, M.A., Ho, D.D., Tsuji, M., Kawahara, K., Wong, C.H., and Kronenberg, M. (2005). Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434, 520-525.
- Klein, S.L. (2012). Sex influences immune responses to viruses, and efficacy of prophylaxis and treatments for viral diseases. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 34, 1050-1059.
- Ko, S.Y., Ko, H.J., Chang, W.S., Park, S.H., Kweon, M.N., and Kang, C.Y. (2005). alpha-Galactosylceramide can act as a nasal vaccine adjuvant inducing protective immune responses against viral infection and tumor. *J Immunol* 175, 3309-3317.
- Kovalovsky, D., Uche, O.U., Eladad, S., Hobbs, R.M., Yi, W., Alonzo, E., Chua, K., Eidson, M., Kim, H.J., Im, J.S., *et al.* (2008). The BTB-sinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nature Immunology* 9, 1055-1064.
- Kunii, N., Horiguchi, S., Motohashi, S., Yamamoto, H., Ueno, N., Yamamoto, S., Sakurai, D., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Okamoto, Y. (2009). Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer science* 100, 1092-1098.
- Kurosaki, M., Horiguchi, S., Yamasaki, K., Uchida, Y., Motohashi, S., Nakayama, T., Sugimoto, A., and Okamoto, Y. (2011). Migration and immunological reaction after the administration of alphaGalCer-pulsed antigen-presenting cells into the submucosa of patients with head and neck cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60, 207-215.
- La Cava, A., Van Kaer, L., and Fu Dong, S. (2006). CD4⁺CD25⁺ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends in immunology* 27, 322-327.
- Laskin, D.L., Sunil, V.R., Gardner, C.R., and Laskin, J.D. (2011). Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annual review of pharmacology and toxicology* 51, 267-288.
- Leippe, M., and Muller-Eberhard, H.J. (1994). The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology* 87, 5-18.
- Lezama-Davila, C.M., Isaac-Marquez, A.P., Barbi, J., Oghumu, S., and Satoskar, A.R. (2007). 17Beta-estradiol increases *Leishmania mexicana* killing in macrophages from DBA/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 76, 1125-1127.

- Liu, D., and Uzonna, J.E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 83.
- Liu, J., Blake, J., Smyth, M.J., and Teng, W.L. (2014). Improved mouse models to assess tumor immunity and irAEs after combination cancer immunotherapies. *Clinical & Translational Immunology* 3.
- Lotter, H., Gonzalez-Roldan, N., Lindner, B., Winau, F., Isibasi, A., Moreno-Lafont, M., Ulmer, A.J., Holst, O., Tannich, E., and Jacobs, T. (2009). Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. *PLoS pathogens* 5, e1000434.
- Lotter, H., Helk, E., Bernin, H., Jacobs, T., Prehn, C., Adamski, J., Gonzalez-Roldan, N., Holst, O., and Tannich, E. (2013). Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFN γ secretion in natural killer T cells. *PloS one* 8, e55694.
- Lotter, H., Jacobs, T., Gaworski, I., and Tannich, E. (2006). Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infection and immunity* 74, 118-124.
- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Loadholt, C.B., and Pittman, F.E. (1978). Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 27, 248-254.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, 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.
- Ly, D., and Moody, D.B. (2014). The CD1 size problem: lipid antigens, ligands, and scaffolds. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 3069-3079.
- Ma, C.S., Nichols, K.E., and Tangye, S.G. (2007). Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annual review of immunology* 25, 337-379.
- Mallewaey, T., and Selvanantham, T. (2012). Strategy of lipid recognition by invariant natural killer T cells: 'one for all and all for one'. *Immunology* 136, 273-282.
- Marinets, A., Zhang, T., Guillen, N., Gounon, P., Bohle, B., Vollmann, U., Scheiner, O., Wiedermann, G., Stanley, S.L., and Duchene, M. (1997). Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of experimental medicine* 186, 1557-1565.
- Marlow, M.A., da Silva Mattos, M., Makowiecky, M.E., Eger, I., Rossetto, A.L., Grisard, E.C., and Steindel, M. (2013). Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. *PloS one* 8, e56177.
- Marshall, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y., and Sterling, C.R. (1997). Waterborne protozoan pathogens. *Clinical microbiology reviews* 10, 67-85.
- Matsuda, J.L., Gapin, L., Baron, J.L., Sidobre, S., Stetson, D.B., Mohrs, M., Locksley, R.M., and Kronenberg, M. (2003). Mouse V α 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8395-8400.
- Matsuda, J.L., Gapin, L., Sidobre, S., Kieper, W.C., Tan, J.T., Ceredig, R., Surh, C.D., and Kronenberg, M. (2002). Homeostasis of V α 14i NKT cells. *Nat Immunol* 3, 966-974.
- Matsuda, J.L., Mallewaey, T., Scott-Browne, J., and Gapin, L. (2008). CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Current opinion in immunology* 20, 358-368.

Mattner, J., Debord, K.L., Ismail, N., Goff, R.D., Cantu, C., 3rd, Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., *et al.* (2005). Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434, 525-529.

McGarr, P.L., Madiba, T.E., Thomson, S.R., and Corr, P. (2003). Amoebic liver abscess--results of a conservative management policy. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 93, 132-136.

Mifsud, N.A., Purcell, A.W., Chen, W., Holdsworth, R., Tait, B.D., and McCluskey, J. (2008). Immunodominance hierarchies and gender bias in direct T(CD8)-cell alloreactivity. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, 121-132.

Mo, R., Chen, J., Grolleau-Julius, A., Murphy, H.S., Richardson, B.C., and Yung, R.L. (2005). Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes. *Journal of Immunology* 15, 6023-6029.

Molling, J.W., Kolgen, W., van der Vliet, H.J., Boomsma, M.F., Kruizenga, H., Smorenburg, C.H., Molenkamp, B.G., Langendijk, J.A., Leemans, C.R., von Blomberg, B.M., *et al.* (2005). Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *International journal of cancer Journal international du cancer* 116, 87-93.

Montoya, C.J., Pollard, D., Martinson, J., Kumari, K., Wasserfall, C., Mulder, C.B., Rugeles, M.T., Atkinson, M.A., Landay, A.L., and Wilson, S.B. (2007). Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* 122, 1-14.

Moody, D.B., Zajonc, D.M., and Wilson, I.A. (2005). Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nature reviews Immunology* 5, 387-399.

Moody-Haupt, S., Patterson, J.H., Mirelman, D., and McConville, M.J. (2000). The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. *Journal of molecular biology* 297, 409-420.

Motohashi, S., Nagato, K., Kunii, N., Yamamoto, H., Yamasaki, K., Okita, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Suzuki, M., Yoshino, I., *et al.* (2009). A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol* 182, 2492-2501.

Motohashi, S., Okamoto, Y., Yoshino, I., and Nakayama, T. (2011). Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clinical immunology* 140, 167-176.

Muindi, K., Cernadas, M., Watts, G.F., Royle, L., Neville, D.C., Dwek, R.A., Besra, G.S., Rudd, P.M., Butters, T.D., and Brenner, M.B. (2010). Activation state and intracellular trafficking contribute to the repertoire of endogenous glycosphingolipids presented by CD1d [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3052-3057.

Murback, N.D., Hans Filho, G., Nascimento, R.A., Nakazato, K.R., and Dorval, M.E. (2011). American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Anais brasileiros de dermatologia* 86, 55-63.

Nagarajan, N.A., and Kronenberg, M. (2007). Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 178, 2706-2713.

Nagato, K., Motohashi, S., Ishibashi, F., Okita, K., Yamasaki, K., Moriya, Y., Hoshino, H., Yoshida, S., Hanaoka, H., Fujii, S., *et al.* (2012). Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. *Journal of clinical immunology* 32, 1071-1081.

Nichols, K.E., Hom, J., Gong, S.Y., Ganguly, A., Ma, C.S., Cannons, J.L., Tangye, S.G., Schwartzberg, P.L., Koretzky, G.A., and Stein, P.L. (2005). Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nature medicine* 11, 340-345.

Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Yamaura, A., Ide, K., Abraham, R., Juji, T., Macfarlane, D.J., and Nicol, A.J. (2004). Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 103, 383-389.

Nowak, M., and Stein-Streilein, J. (2007). Invariant NKT cells and tolerance. *International reviews of immunology* 26, 95-119.

O'Reilly, V., Zeng, S.G., Bricard, G., Atzberger, A., Hogan, A.E., Jackson, J., Feighery, C., Porcelli, S.A., and Doherty, D.G. (2011). Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha+ and CD4-CD8alpha- invariant natural killer T cells. *PloS one* 6, e28648.

Osman, Y., Kawamura, T., Naito, T., Takeda, K., Van Kaer, L., Okumura, K., and Abo, T. (2000). Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide. *European journal of immunology* 30, 1919-1928.

Pasquier, B., Yin, L., Fondaneche, M.C., Relouzat, F., Bloch-Queyrat, C., Lambert, N., Fischer, A., de Saint-Basile, G., and Latour, S. (2005). Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *The Journal of experimental medicine* 201, 695-701.

Peralbo, E., DelaRosa, O., Gayoso, I., Pita, M.L., Tarazona, R., and Solana, R. (2006). Decreased frequency and proliferative response of invariant Valpha24Vbeta11 natural killer T (iNKT) cells in healthy elderly. *Biogerontology* 7, 483-492.

Petri, W., Jr. (1996). Amebiasis and the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 44, 24-36.

Pillai, A.B., George, T.I., Dutt, S., Teo, P., and Strober, S. (2007). Host NKT cells can prevent graft-versus-host disease and permit graft antitumor activity after bone marrow transplantation. *J Immunol* 178, 6242-6251.

Pilones, K.A., Aryankalayil, J., and Demaria, S. (2012). Invariant NKT cells as novel targets for immunotherapy in solid tumors. *Clinical & developmental immunology* 2012, 720803.

Pilones, K.A., Kawashima, N., Yang, A.M., Babb, J.S., Formenti, S.C., and Demaria, S. (2009). Invariant natural killer T cells regulate breast cancer response to radiation and CTLA-4 blockade. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 597-606.

Pollitzer, E. (2013). Biology: Cell sex matters. *Nature* 500, 23-24.

Porubsky, S., Speak, A.O., Luckow, B., Cerundolo, V., Platt, F.M., and Grone, H.J. (2007). Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5977-5982.

Potikha, T., Stoyanov, E., Pappo, O., Frolov, A., Mizrahi, L., Olam, D., Shnitzer-Perlman, T., Weiss, I., Barashi, N., Peled, A., et al. (2013). Interstrain differences in chronic hepatitis and tumor development in a murine model of inflammation-mediated hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 58, 192-204.

Powell, S.J. (1969). Drug therapy of amoebiasis. *Bulletin of the World Health Organization* 40, 953-956.

Raghuraman, G., Geng, Y., and Wang, C.R. (2006). IFN-beta-mediated up-regulation of CD1d in bacteria-infected APCs. *J Immunol* 177, 7841-7848.

Reilly, E.C., Wands, J.R., and Brossay, L. (2010). Cytokine dependent and independent iNKT cell activation. *Cytokine* 51, 227-231.

Robert Koch Institut, R. (2009/2010). Krebs in Deutschland 2009/2010. Zentrum für Krebsregisterdaten.

Rodgers, J.R., and Cook, R.G. (2005). MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nature reviews Immunology* 5, 459-471.

Sada-Ovalle, I., Skold, M., Tian, T., Besra, G.S., and Behar, S.M. (2010). Alpha-galactosylceramide as a therapeutic agent for pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182, 841-847.

Salio, M., Speak, A.O., Shepherd, D., Polzella, P., Illarionov, P.A., Veerapen, N., Besra, G.S., Platt, F.M., and Cerundolo, V. (2007). Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20490-20495.

Sandberg, J.K., Bhardwaj, N., and Nixon, D.F. (2003). Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *European journal of immunology* 33, 588-596.

Sarkari, B., Hatam, G., and Ghatee, M. (2012). Epidemiological features of visceral leishmaniasis in fars province, southern iran. *Iranian journal of public health* 41, 94-99.

Schmieg, J., Gonzalez-Aseguinolaza, G., and Tsuji, M. (2003). The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 499-506.

Schneiders, F.L., Scheper, R.J., von Blomberg, B.M., Woltman, A.M., Janssen, H.L., van den Eertwegh, A.J., Verheul, H.M., de Gruijl, T.D., and van der Vliet, H.J. (2011). Clinical experience with alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection. *Clinical immunology* 140, 130-141.

Schulze-Garg, C., Löhler, J., Gocht, A., and Deppert, W. (2000). A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. *Oncogene* 19, 1028-1037.

Seino, K., Motohashi, S., Fujisawa, T., Nakayama, T., and Taniguchi, M. (2006). Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer science* 97, 807-812.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology* 26, 421-452.

Seydel, K.B., Smith, S.J., and Stanley, S.L., Jr. (2000). Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infection and immunity* 68, 400-402.

Shandera, W.X., Bollam, P., Hashmey, R.H., Athey, P.A., Greenberg, S.B., and White, A.C., Jr. (1998). Hepatic amebiasis among patients in a public teaching hospital. *Southern medical journal* 91, 829-837.

Shi C, P.E. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation *Nature Review Immunology* 11, 762-774.

Shimizu, K., Goto, A., Fukui, M., Taniguchi, M., and Fujii, S. (2007). Tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide induce innate NKT and NK cell-dependent resistance to tumor implantation in mice. *J Immunol* 178, 2853-2861.

Shio, M.T., Paquet, M., Martel, C., Bosschaerts, T., Stienstra, S., Olivier, M., and Fortin, A. (2014). Drug delivery by tattooing to treat cutaneous leishmaniasis. *Scientific reports* 4, 4156.

- Snyder-Cappione, J.E., Tincati, C., Eccles-James, I.G., Cappione, A.J., Ndhlovu, L.C., Koth, L.L., and Nixon, D.F. (2010). A comprehensive ex vivo functional analysis of human NKT cells reveals production of MIP1-alpha and MIP1-beta, a lack of IL-17, and a Th1-bias in males. *PloS one* 5, e15412.
- Stanley, A.C., Zhou, Y., Amante, F.H., Randall, L.M., Haque, A., Pellicci, D.G., Hill, G.R., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Engwerda, C.R. (2008). Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis. *PLoS pathogens* 4, e1000028.
- Stanley, S.L., Jr. (2003). Amoebiasis. *Lancet* 361, 1025-1034.
- Swain, M.G. (2008). Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clinical science* 114, 457-466.
- Swain, M.G. (2010). Natural killer T cells within the liver: conductors of the hepatic immune orchestra. *Digestive diseases* 28, 7-13.
- Taketo, M., Schroeder, A.C., Mobraaten, L.E., Gunning, K.B., Hanten, G., Fox, R.R., Roderick, T.H., Stewart, C.L., Lilly, F., Hansen, C.T., *et al.* (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 2065-2069.
- Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., and Wakao, H. (2003). The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annual review of immunology* 21, 483-513.
- Tatsumi, T., Takehara, T., Miyagi, T., Sugiyama, T., Aketa, H., Sasakawa, A., Kanto, T., Hiramatsu, N., and Hayashi, N. (2011). alpha-Galactosylceramide activates antitumor immunity against liver tumor. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 41, 160-169.
- Thies, A., Dautel, P., Meyer, A., Pfuller, U., and Schumacher, U. (2008). Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. *British journal of cancer* 98, 106-112.
- Toura, I., Kawano, T., Akutsu, Y., Nakayama, T., Ochiai, T., and Taniguchi, M. (1999). Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 163, 2387-2391.
- Tracy, R.P., Doyle, M.F., Olson, N.C., Huber, S.A., Jenny, N.S., Sallam, R., Psaty, B.M., and Kronmal, R.A. (2013). T-helper type 1 bias in healthy people is associated with cytomegalovirus serology and atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association* 2, e000117.
- Travi, B.L., Osorio, Y., Melby, P.C., Chandrasekar, B., Arteaga, L., and Saravia, N.G. (2002). Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infection and immunity* 70, 2288-2296.
- Travison, T.G., Araujo, A.B., O'Donnell, A.B., Kupelian, V., and McKinlay, J.B. (2007). A population-level decline in serum testosterone levels in American men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 196-202.
- Tupin, E., Kinjo, Y., and Kronenberg, M. (2007). The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nature reviews Microbiology* 5, 405-417.
- Van Kaer, L., Parekh, V.V., and Wu, L. (2011). Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell and tissue research* 343, 43-55.
- van Lunzen, J., and Altfeld, M. (2014). Sex Differences in Infectious Diseases - Common but Neglected. *The Journal of infectious diseases* 209, S79-80.
- van Lunzen, J., Tannich, E., and Burchard, G.D. (1996). Amöbenruhr und Amöbenleberabszess. *Deutsches Ärzteblatt* 93, 3410-3416.

Veerapen, N., Reddington, F., Bricard, G., Porcelli, S.A., and Besra, G.S. (2010). Synthesis and biological activity of alpha-L-fucosyl ceramides, analogues of the potent agonist, alpha-D-galactosyl ceramide KRN7000. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20, 3223-3226.

Veerapen, N., Reddington, F., Salio, M., Cerundolo, V., and Besra, G.S. (2011). Synthesis of truncated analogues of the iNKT cell agonist, alpha-galactosyl ceramide (KRN7000), and their biological evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry* 19, 221-228.

Ventura-Juarez, J., Jarillo-Luna, R.A., Fuentes-Aguilar, E., Pineda-Vazquez, A., Munoz-Fernandez, L., Madrid-Reyes, J.I., and Campos-Rodriguez, R. (2003). Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite immunology* 25, 503-511.

Walderich, B., Weber, A., and Knobloch, J. (1997). Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and residents of endemic areas. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 57, 70-74.

Webb, T.J., Giuntoli, R.L., 2nd, Rogers, O., Schneck, J., and Oelke, M. (2008). Ascites specific inhibition of CD1d-mediated activation of natural killer T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 7652-7658.

Wegwitz, F., Kluth, M.A., Manz, C., Otto, B., Gruner, K., Heinlein, C., Kuhl, M., Warnecke, G., Schumacher, U., Deppert, W., *et al.* (2010). Tumorigenic WAP-T mouse mammary carcinoma cells: a model for a self-reproducing homeostatic cancer cell system. *PloS one* 5, e12103.

Wertheim, H.F.L., Horby, P., and Woodall, J.P. (2012). *Atlas of Human Infectious Diseases*. Wiley-Blackwell, 126-127.

WHO/PAHA/UNESCO (1997). Report: A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol Bull* 18, 13-14.

Wu, D.Y., Segal, N.H., Sidobre, S., Kronenberg, M., and Chapman, P.B. (2003). Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 173-181.

Yona, S., and Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current opinion in hematology* 17, 53-59.

Yu, K.O., Im, J.S., Molano, A., Dutronc, Y., Illarionov, P.A., Forestier, C., Fujiwara, N., Arias, I., Miyake, S., Yamamura, T., *et al.* (2005). Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3383-3388.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Schirmer, S.H., Sester, M., Bohm, M., Fliser, D., and Heine, G.H. (2012). Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 217, 1273-1284.

Ziegler-Heitbrock, L., and Hofer, T.P. (2013). Toward a refined definition of monocyte subsets. *Frontiers in immunology* 4, 23.

6. Zusammenfassung & Abstract

6.1 Zusammenfassung

Die Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Infektionserregern unterscheidet sich zwischen Männern und Frauen. Begründet sind solch geschlechtsabhängige Divergenzen unter anderem in unterschiedlichen Expositionsraten, aber auch genetische sowie hormonelle Faktoren können die Regulation protektiver Immunreaktionen beeinflussen. Ein Beispiel für einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus ist der Amöbenleberabszess ausgelöst durch *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). Männer sind häufiger von dieser Erkrankung betroffen als Frauen. Frauen können durch die IFN γ -Produktion invarianter Natürlichen Killer T (iNKT) Zellen die *E. histolytica*-Infektion besser kontrollieren. Auch in anderen Infektionserkrankungen sowie Autoimmun- und Tumorerkrankungen spielen iNKT Zellen eine wichtige Rolle. Zudem kann die Zytokinsekretion von iNKT Zellen durch Geschlechtshormone moduliert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob geschlechtsspezifische Unterschiede auch in Immunzellen von gesunden Probanden auftreten. Insbesondere in der Frequenz von iNKT Zellen und in ihrem Zytokinprofil nach Stimulation mit dem iNKT Zell-spezifischen Liganden *E. histolytica* Lipopeptidphosphoglykan (*EhLPPG*) aus der Membran von *E. histolytica*. Frauen wiesen in der Tendenz einen höheren Anteil an iNKT Zellen in ihrer Peripherie auf als Männer. Darüberhinaus produzierten iNKT Zellen weiblicher Probanden nach Stimulation größere Mengen an IFN γ , TNF α , IL-17A und IL-4 als iNKT Zellen männlicher Probanden. Auch iNKT Zellen weiblicher Tiere produzierten nach Stimulation größere Mengen an IFN γ und IL-17. Dies deutet darauf hin, dass sich Männer und Frauen in der Qualität ihrer Immunantwort unterscheiden und dies Auswirkungen auf Erkrankungen haben könnte.

Bei einigen Erkrankungen kommt es aufgrund immunmodulatorischer Vorgänge zu einer Immunantwort, die nicht in der Lage ist, eine Infektion oder Tumorerkrankung zu kontrollieren. Um eine adäquate Immunantwort zu induzieren bzw. eine vorhandene Immunantwort zu unterstützen, können immunstimulatorische Moleküle eingesetzt werden.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde das immuntherapeutische Potential von *EhLPPG* untersucht. In einem *in vitro* Modell für die Leishmanien-Infektion von Makrophagen konnte gezeigt werden, dass eine *EhLPPG*-Behandlung allein, aber auch unter Zugabe von Milzzellen der prozentuale Anteil an infizierten Makrophagen sowie die Parasitenlast pro Makrophage gesenkt werden konnte. In einem *in vivo* Mausmodell für die kutane Leishmaniose führte die Injektion von *EhLPPG* zu einer verzögerten Zunahme der Fußschwellung und verlängerte die Zeit bis zum Auftreten einer Ulzeration und zeigte damit einen deutlichen therapeutischen Effekt.

In dieser Arbeit wurde zudem der Einfluss von *EhLPPG* auf Tumore überprüft. Die Applikation von autologen DC, aktiviert durch *EhLPPG*, führte in einem Mausmodell für das Mammakarzinom zu einer verlängerten Tumor-freien Überlebenszeit und geringerem Tumorwachstum. *EhLPPG* weist somit ein Potential als Immuntherapeutikum auf, indem es nicht nur zur Behandlung von intrazellulären Krankheitserregern sondern auch zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden könnte. Dieses Potential wird im Rahmen der Patentierung in Zukunft weiter analysiert werden. Hierbei ist insbesondere die Herstellung und Charakterisierung von synthetischen Analoga des *EhLPPGs*

bedeutsam. Synthetische Moleküle können die Reproduzierbarkeit von Untersuchungsergebnissen zusätzlich noch durch erhöhte Reinheit der Präparation gegenüber nativen Molekülen verbessern. In dieser Arbeit konnten vier synthetische Analoga des *EhLPPGs* (*EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 trans und *EhPIb* C28:0) auf ihre iNKT Zell-stimulierenden Eigenschaften hin getestet werden. Alle vier Analoga induzierten IFN γ sowohl in murinen als auch humanen iNKT Zellen. Bisher zeigte das *EhPIb* C30:1 trans Analog in humanen iNKT Zellen die stärkste Stimulation. *EhPIa* C30:1 cis wies Unterschiede in der Stimulation von humanen und murinen iNKT Zellen auf. *EhPIa* C30:1 cis induziert in murinen iNKT Zellen im Vergleich zu humanen iNKT Zellen nur geringe Mengen an IFN γ . Zukünftig sollen strukturelle Modifikationen der *EhPI* Analoga die Aktivierung von iNKT Zellen optimieren. Inwiefern die Optimierung synthetischer Analoga die Wirksamkeit des nativen Moleküls ersetzen oder verbessern kann, ist Ziel weiterführender Untersuchungen.

6.2 Abstract

Men and women differ in their susceptibility and response to different infectious diseases. Sex-specific divergences manifest in varying exposure rates, genetic and hormonal factors and may alter the regulation of protective immune reactions. The amebic liver abscess caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) exhibits a distinct sex dimorphism. Men are more prone to develop abscesses than women. In women, resistance against *E. histolytica* infection is mediated by IFN γ secreted by iNKT cells. iNKT cells are important for the control of other infectious diseases, autoimmune diseases and tumor diseases. Moreover, their cytokine secretion can be modulated by sex hormones.

In the first part of this thesis, we analyzed if healthy individuals exhibit sex-specific differences in their immune cell frequencies or cytokine profiles. Especially, the frequency of iNKT cells and their cytokine profile after stimulation with the iNKT cell-specific ligand *E. histolytica* lipopeptidphosphoglycan (*EhLPPG*), isolated from the membrane of *E. histolytica*, were examined. Women exhibited a trend towards higher iNKT cell counts in peripheral blood than men. In addition, iNKT cells of female individuals produce greater amounts of IFN γ , TNF α , IL-17A and IL-4 after stimulation in comparison to male individuals. Furthermore, also iNKT cells of female mice exhibit higher IFN γ and IL-17A concentrations than iNKT cells of male mice. This suggests that the quality of the mounted immune response during an infection can influence disease outcome and differs between men and women.

Occasionally immune responses are not able to control an infection due to inappropriate immune modulatory processes. Immune stimulatory molecules can help to initiate an appropriate immune reaction or enhance existing immune responses.

In the second part of this thesis, we examined the immune therapeutic potential of *EhLPPG*. In an *in vitro* model for Leishmania infection of macrophages we found that treatment with *EhLPPG* alone but also with additional spleen cells decreased the percentage of infected macrophages and parasite load per macrophage. In an *in vivo* model for cutaneous leishmaniasis *EhLPPG* injection led to delayed growth of foot pad lesions and elongated ulceration-free time, hence exhibiting obvious therapeutic effects.

Moreover, the influence of *EhLPPG* on tumor development was evaluated. Application of autologous DC activated with *EhLPPG* in an animal model for mammary carcinoma showed a prolonged tumor-free survival time and reduced tumor growth. These results indicate a potential for *EhLPPG* as an immune therapeutic drug for the treatment of tumors and will be further studied as part of a patent application. In particular, synthesis and characterization of synthetic analogs of *EhLPPG* will be analyzed. Synthetic molecules can increase reproducibility of study results and exhibit increased purity in comparison to native molecules.

Additionally, four synthetic analogs of *EhLPPG* (*EhPla* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 trans und *EhPIb* C28:0) were analyzed for their iNKT cell-stimulating properties. All four analogs induced IFN γ in murine and human iNKT cells. So far the *EhPIb* C30:1 trans analog induced the strongest stimulation in human iNKT cells. *EhPla* C30:1 cis stimulated murine and human iNKT cells differently. *EhPla* C30:1 cis induced higher IFN γ amounts in human iNKT cells than in murine iNKT cells. Optimization of the synthetic analogs via introduction of modifications could enhance the potency of the native molecule and thus will be addressed in future analyses.

7. Eigene Publikationen und Patenteinreichung

Patenteinreichung P 95317 an das Europäische Patentamt am 28. September 2014 mit dem Titel „New immunostimulatory molecules“

Lotter H, Tannich E, **Bernin H**, Gonzalez-Roldan N, Fujimoto Y, Fukase K

Host immunity and tissue destruction during amebic liver abscess formation.

Helk E, **Bernin H** and Lotter H. (2015).

Nozaki, Tomoyoshi, Bhattacharya, Alok (Eds.), Springer, ISBN 978-4-431-55199-7.

Immune markers characteristic for asymptotically infected and diseased *Entamoeba histolytica* individuals and their relation to sex.

Bernin H, Marggraff C, Jacobs T, Brattig N, An LV, Blessmann J, Lotter H

BMC Infectious Diseases akzeptiert Manuskript ID 1992030071346497

Sex bias in the outcome of human tropical infectious diseases: influence of steroid hormones.

Bernin H, Lotter H.

J Infect Dis. 2014 Jul 15;209 Suppl 3:S107-13. doi: 10.1093/infdis/jit610. Review.

PMID: 24966190

Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFN γ secretion in natural killer T cells.

Lotter H, Helk E, **Bernin H**, Jacobs T, Prehn C, Adamski J, González-Roldán N, Holst O, Tannich E.

PLoS One. 2013;8(2):e55694. doi: 10.1371/journal.pone.0055694. Epub 2013 Feb 12.

PMID: 23424637

TNF α -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection.

Bernin H, Helk E, Ernst T, Ittrich H, Jacobs T, Heeren J, Tacke F, Tannich E, Lotter H.

PLoS Pathog. 2013 Jan;9(1):e1003096. doi: 10.1371/journal.ppat.1003096. Epub 2013 Jan 3.

Danksagung

Die Anfertigung dieser Arbeit wurde maßgeblich ermöglicht durch die konstruktive Kritik und den fachlichen Diskurs mit PD Dr. Hanna Lotter, die mir in der Ausarbeitung und Darstellung dieser komplexen Themenwelt geholfen hat, meinen Blick auf das Wesentliche zu schärfen. Für diese Unterstützung möchte ich mich hiermit herzlich bei Dir bedanken.

Ich möchte mich auch bei PD Dr. Sabine Lühje bedanken, die sich bereit erklärt hat, die Zweitkorrektur dieser Arbeit zu übernehmen.

Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei

- Prof. Dr. Egbert Tannich, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe „Molekulare Parasitologie“ durchführen durfte.
- Claudia Marggraff, Heidrun von Thien und Jill Noll für die schöne gemeinsame Zeit in Labor 6. Eure Gesellschaft hat mir den Laboralltag persönlich und fachlich sehr bereichert. Die vielen Gespräche und gemeinsamen Mittagspausen haben mir auch in stressigen Zeiten immer sehr viel Freude bereitet.
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Molekulare Parasitologie“ für die gemeinsame Zeit, Kaffee trinken und den Zusammenhalt.
- meinen zahlreichen Kollaborationspartnern im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Forschungszentrum Borstel und an der Osaka und Keio University in Japan.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund, die mich immer unterstützen und mir die Kraft geben, auch die stressigsten aller Situationen zu meistern.

Eidesstattliche Versicherung

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

Hamburg, den 26.11.2014

Hannah Bernin