

# **Immunregulatorische Mechanismen bei der hepatischen Amöbiasis**

## **Dissertation**

zur Erlangung der Würde des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Jill Noll**

Hamburg 2017

Tag der Disputation: 23.06.2017.

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. med. vet. Hannelore Lotter  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Abteilung Molekulare Parasitologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg
  
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Tim-Wolf Gilberger  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Abteilung Zelluläre Parasitologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	i
Zusammenfassung .....	iii
Abstract.....	iv
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das angeborene Immunsystem in der Leber .....	1
1.1.1 Monozyten.....	1
1.1.1.1 Humane Monozytenpopulationen .....	1
1.1.1.2 Murine Monozytenpopulationen .....	2
1.1.1.2.1 Ly6C <sup>hi</sup> -Monozyten.....	2
1.1.1.2.2 Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten.....	3
1.1.2 Das Th1-Zytokin IL-23 .....	5
1.1.3 Das Th2-Zytokin IL-13 .....	5
1.2 Lipidstoffwechsel.....	6
1.2.1 HDL.....	6
1.2.2 Apolipoprotein A1 .....	6
1.3 Koagulationsfaktor XII .....	6
1.4 Amöbiasis .....	7
1.4.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	7
1.4.1.1 Lebenszyklus.....	8
1.4.1.2 Pathogenitätsfaktoren.....	8
1.4.2 Krankheitsbild und Therapie der Amöbiasis.....	8
1.4.3 Der Amöbenleberabszess im Tiermodell.....	9
1.4.4 Immunpathologie im Amöbenleberabszess .....	9
1.5 Zielsetzung.....	10
<b>2. Ergebnisse .....</b>	<b>11</b>
2.1 IL-23 und CCR2 – Die Immunpathologie im Amöbenleberabszess .....	11
2.1.1 Einfluss von IL-23 auf den Abszessverlauf und das Überleben des Parasiten.....	11
2.1.2 Expression von CCL2 und CCR2 in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus.....	12
2.1.3 Rekrutierung von Monozyten in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus.....	13
2.1.4 Rekrutierung von Monozyten in der CCR2 <sup>-/-</sup> -Maus .....	14
2.1.5 Zytokin-Expression in der CCR2 <sup>-/-</sup> -Maus nach Infektion mit <i>E. histolytica</i> .....	16
2.2 Einfluss des <i>Knockouts</i> von IL-23 auf regulatorische Mechanismen und Zellen in der Leber.....	17
2.2.1 Einfluss von IL-23 auf die Rekrutierung regenerativer Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten .....	18

## Inhaltsverzeichnis

2.2.2	IL-13-Expression verschiedener übergeordneter Zellpopulationen im infizierten Lebergewebe der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus .....	19
2.2.3	Bestimmung der IL-13 exprimierenden Monozyten-Population in der infizierten IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus.....	20
2.2.4	Die Expression der Rezeptoren IL-13Rα1/IL-4Rα und IL-13Rα2 in der infizierten IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus.....	22
2.2.5	Auswirkung der Applikation und Überexpression von IL-13 auf den Abszessverlauf .....	23
2.2.6	Auswirkung der Depletion von IL-13 in IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Mäusen sowie der Applikation eines rIL-13/αIL-13 Komplexes in der WT-Maus auf den Abszessverlauf .....	24
2.2.7	Expression von Arg1 und iNOS in der infizierten IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus .....	25
2.2.8	Immunhistologische Lokalisation von Monozyten und Makrophagen in infizierten WT- und IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Mäusen sowie Arg1, iNOS und Ki-67 exprimierender Zellen .....	26
2.3	Abszessausbildung und immunregulatorische Mechanismen nach Infektion mit <i>E. histolytica</i> in Abhängigkeit des Geschlechts im murinen Modell.....	29
2.3.1	Abszessverlauf und CCL2-Serumlevel nach Infektion mit <i>E. histolytica</i> in Abhängigkeit des Geschlechts .....	30
2.3.2	Geschlechtsabhängigkeit der Rekrutierung und IL-13-Expression inflammatorischer Ly6C <sup>hi</sup> - und regenerativer Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten nach Infektion .....	31
2.3.3	Einfluss des Geschlechts auf ausgewählte immunregulatorische Zytokine in Abhängigkeit einer Infektion .....	32
2.3.4	Einfluss des hormonell regulierten Apolipoproteins A1 auf die Abszessausbildung.....	33
2.3.5	Einfluss des hormonabhängigen ApoA1 auf die Rekrutierung und IL-13-Expression von inflammatorischen Ly6C <sup>hi</sup> - und regenerativen Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten .....	34
2.4	Einfluss von Geschlecht und ApoA1 auf die Immunantwort stimulierter humaner Makrophagen <i>in vitro</i> .....	36
2.4.1	Untersuchung der Immunantwort humaner männlicher und weiblicher MDMs nach Stimulation mit <i>EhLPPG</i> sowie SAA-A1 und SAA-B2 <i>in vitro</i> .....	36
2.4.2	Untersuchung der differenziellen Immunantwort humaner männlicher und weiblicher MDMs nach Stimulation mit bakteriellen, parasitären und viralen Antigenen <i>in vitro</i> ....	38
2.4.3	Einfluss des hormonell regulierten ApoA1 auf die Zytokin-Expression aktivierter männlicher und weiblicher Makrophagen.....	40
2.4.4	Einfluss des hormonell regulierten ApoA1 auf die Expression des humanen Makrophagen-Markers CD206 .....	42
2.5	Einfluss von FXII auf den Amöbenleberabszess.....	43
2.5.1	Untersuchung der Polyphosphat-Aktivierung von <i>E. histolytica</i> .....	44
2.5.2	Immunhistologischer Nachweis von FXII im infizierten Lebergewebe .....	45
2.5.3	Einfluss von FXII auf den Abszessverlauf .....	46
2.5.4	Untersuchung der FXII-abhängigen Faktoren B2R und FXI nach Infektion mit <i>E. histolytica</i> .....	47

## Inhaltsverzeichnis

3. Diskussion .....	49
3.1 IL-23 und die Immunpathologie im Amöbenleberabszess .....	50
3.2 Regulatorische Mechanismen im Amöbenleberabszess in Abwesenheit von IL-23 .....	51
3.3 Geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Immunpathologie des Amöbenleberabszesses.....	53
3.4 Makrophagen-Aktivierung und -Differenzierung in Abhängigkeit von Geschlecht und ApoA1 .	55
3.5 Zur Rolle des Koagulationsfaktors XII bei der Entstehung des Amöbenleberabszesses .....	57
4. Material & Methoden .....	59
4.1 Material .....	59
4.1.1 Chemikalien .....	59
4.1.2 Kits und Reagenzien.....	59
4.1.3 Gebrauchsmaterial .....	60
4.1.4 Geräte .....	60
4.1.5 Software & Datenbanken .....	60
4.1.6 Antikörper & rekombinante Moleküle .....	61
4.1.7 Oligonukleotide .....	61
4.1.8 Medium & Zusätze.....	63
4.1.9 Puffer & Lösungen .....	63
4.1.10 <i>Entamoeba histolytica</i> & Gewinnung von <i>soluble amebic antigen</i> (SAA) .....	64
4.1.11 Mäuse .....	64
4.2 Molekularbiologische Methoden .....	65
4.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus murinem Lebergewebe .....	65
4.2.2 Reverse Transkription.....	66
4.2.3 Quantitative Realtime-PCR ( <i>qPCR</i> ) .....	66
4.3 Biochemische Methoden.....	67
4.3.1 CCL2-ELISA .....	67
4.3.2 <i>Bead</i> -basierter Immunoassay (LEGENDplex™).....	68
4.3.3 Histologie & Immunhistochemie .....	68
4.3.4 Elektronenmikroskopie.....	69
4.4 Zellbiologische Methoden .....	70
4.4.1 Kultivierung von <i>E. histolytica</i> .....	70
4.4.2 Isolierung von Leukozyten aus murinem Gewebe .....	70
4.4.2.1 Isolierung von Leukozyten aus murinem Blut .....	70
4.4.2.2 Isolierung von Leukozyten aus murinem Lebergewebe.....	70
4.4.3 Isolierung humaner Zellen aus peripherem Blut .....	71

## Inhaltsverzeichnis

4.4.3.1 Isolierung humaner PBMCs aus peripherem Vollblut .....	71
4.4.3.2 Isolierung der Gesamt-Monozyten aus humanen PBMCs .....	71
4.4.3.3 Isolierung von CD14 <sup>+</sup> -Monozyten aus humanen PBMCs.....	71
4.4.4 Generierung humaner MDMs aus CD14 <sup>+</sup> -Monozyten .....	72
4.4.5 Zellzählung.....	72
4.4.6 <i>In vitro</i> Stimulationsassays humaner Zellen .....	72
4.4.6.1 <i>In vitro</i> Makrophagen-Stimulationsassay.....	72
4.4.6.2 <i>In vitro</i> Monozyten & Makrophagen-Stimulationsassay.....	73
4.4.7 Antikörperfärbung für die Durchflusszytometrie .....	73
4.4.8 Durchflusszytometrie .....	73
4.5 Das murine Infektionsmodell des Amöbenleberabszesses.....	74
4.5.1 Induktion des Amöbenleberabszesses .....	74
4.5.2 Immundepletion und Neutralisation <i>in vivo</i> .....	74
4.5.3 Applikation von rIL-13 und rIL-13/ $\alpha$ -IL-13 <i>in vivo</i> .....	74
4.5.4 Bestimmung der Abszessvolumina mittels MRT .....	75
4.6 Statistische Analysen.....	76
Literaturverzeichnis.....	v
Abbildungsverzeichnis.....	xii
Tabellenverzeichnis.....	xiii
Publikation .....	xiv
Danksagung.....	xv
Eidesstattliche Erklärung .....	xvii

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abzgl.	abzüglich
ApoA1	Apolipoprotein A1
APC	<i>antigen presenting cell</i>
Arg1	Arginase1
B2R	Bradykinin 2 Rezeptor
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BK	Bradykinin
ca.	circa
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD11b	<i>cluster of differentiation molecule 11B</i>
CX <sub>3</sub> CL	Chemokin (C-X3-C Motiv) Ligand
CX <sub>3</sub> CR	Chemokin (C-X3-C Motiv) Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>EhLPPG</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> lipopeptidophosphoglycan
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
et al.	<i>et alia</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSC	<i>Fowardscatter</i>
FXI	Koagulationsfaktor XI
FXII	Koagulationsfaktor XII (Hageman Faktor)
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor</i>
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HBV	Hepatitis B Virus
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HepB	Hepatitis B
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen – antigen D related</i>
HK	<i>high molecular weight kininogen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>hepatic stellate cell</i>
ICAM	Interzelluläres Adhäsions Molekül
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
ILC2	<i>type 2 innate lymphoid cells</i>
iNKT	invariante natürliche Killer T-Zellen
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthetase</i>
i.p.	intraperitoneal
JAK	<i>Janus-activated kinase</i>
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure

## Abkürzungsverzeichnis

Ly6C	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i>
M	molar
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>
MDMs	<i>monocyte derived macrophages</i>
min	Minute/n
mind.	mindestens
mM	millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
MT1-MMP	<i>membrane type 1-matrix metalloproteinase 1</i>
n	Proben-/Tieranzahl des Versuchs
NaPBS	Natrium PBS
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid; <i>nitric oxide</i>
Nr4a1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PK	Plasmakallikrein
polyP	Polyphosphat/e
PPBD	<i>polyphosphate binding domain</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
r	rekombinant
ROS	<i>reactive oxigen species</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAA	<i>soluble amebic antigen</i>
sek	Sekunde/n
SSC	<i>Sidewardscatter</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tab.	Tabelle
Th	T-Helfer
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
WT	Wildtyp
$\alpha$ -	anti- (abweichend tlw. alpha)
$\gamma\delta$ -T-Zellen	gamma-delta-T-Zellen



## Zusammenfassung

Die Infektion mit *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) ist verantwortlich für die Entstehung des Amöbenleberabszesses (ALA), der häufigsten extraintestinalen Verlaufsform der invasiven Amöbiasis, welche vorwiegend in männlichen Individuen auftritt. Neben den Pathogenitätsfaktoren des Erregers konnte zusätzlich eine Beteiligung des Wirts-Immunsystems an der Ausbildung der schweren fokalen Leberschädigung nachgewiesen werden. Mithilfe eines Mausmodells für den ALA wurde gezeigt, dass der Erkrankung eine Immunpathologie zugrunde liegt, welche eine übermäßige CCR2-abhängige Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten sowie die erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Th1-Zytokine IL-23, IL-17 und TNF $\alpha$  sowie des Chemokins CCL2 beinhaltet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl der *Knockout* des Zytokins IL-23 als auch des CCL2-Rezeptors CCR2, eine geringere Leberschädigung nach Infektion mit *E. histolytica* zur Folge hatte. Trotz beobachteter reduzierter CCL2-Expression in Abwesenheit von IL-23 blieb jedoch die Population der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in der Leber unverändert. Sowohl in IL-23p19<sup>-/-</sup>- als auch in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte allerdings eine erhöhte Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Gewebe nachgewiesen werden. In Abwesenheit von IL-23 wiesen diese Zellen eine verstärkte Synthese des Th2-Zytokins IL-13 auf. Zudem konnte eine erhöhte Expression von F4/80 und Arg1 der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten nachgewiesen werden, was eine Polarisierung der Monozyten zu geweberegenerierenden M2-Makrophagen vermuten lässt. In weiblichen Tieren, die, wie Frauen, den Leberschaden besser kontrollieren können, konnte ein Anstieg der IL-13-Expression in Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten beobachtet werden, was vor allem im Zusammenhang mit dem gezeigten generellen Fehlen immunpathologischer Regulatoren auf eine frühe und verstärkte M2-Polarisierung hindeutet. Darüber hinaus konnte in IL-13tg-Tieren sowie nach Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit einem rIL-13/ $\alpha$ IL-13-Komplex eine reduzierte Abszessausbildung nachgewiesen werden.

Apolipoprotein A1 (ApoA1) ist für seine anti-inflammatorischen Eigenschaften bekannt und wird in der Leber unter Einfluss des weiblichen Geschlechtshormons Estradiol synthetisiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von ApoA1 in weiblichen Mäusen zu einer Verstärkung des Leberschadens führte, in männlichen Tieren hingegen die Ausheilung des ALA verzögerte. Der Phänotyp weiblicher Tiere ging dabei mit einer verminderten Anzahl von Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten Blut und einer reduzierten IL-13 Expression einher. Die Untersuchung aktivierter humaner Makrophagen *in vitro* zeigte zudem, dass ApoA1 die Produktion pro-inflammatorischer Moleküle wie TNF $\alpha$  und CCL2 reduzierte und die Synthese des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 induzierte.

Die Koagulationsfaktor XII (FXII)-abhängige Aktivierung des Kontaktphasesystems und die damit einhergehende Fibrinsynthese sind für die Demarkierung von abszediertem Gewebe essenziell. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die durch *E. histolytica* produzierten Polyphosphate die Aktivierung der FXII-abhängigen Fibrinsynthese induzieren und der Parasit so zur Abszessausbildung beiträgt. Die hier gezeigte reduzierte Abszessausbildung in Abwesenheit von FXII lässt daher eine für den Erreger protektive Abkapselung durch ein dichtes Fibrinnetzwerk vermuten.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Entstehung sowie die Ausheilung des ALA von der Balance der Monozyten-Populationen, deren Zytokinprofil sowie hormonell regulierten Apolipoproteinen abhängig ist und die Bildung eines Fibrinnetzwerkes die Eliminierung des Erregers erschwert.

## Abstract

The infection with *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) is responsible for the development of an amebic liver abscess (ALA), the most frequent extraintestinal manifestation of invasive amebiasis that occurs predominantly in male individuals. Beside pathogenicity factors of *E. histolytica*, it could be shown that the immune system of the host contributes to the severe focal liver damage. In a mouse model for the disease it was proven that the development of ALA underlies an immunopathology comprising an excessive CCR2-dependent recruitment of inflammatory Ly6C<sup>hi</sup>-monocytes as well as a high expression of the pro-inflammatory Th1-cytokines IL-23, IL-17 and TNF $\alpha$  and the chemokine CCL2.

In this study it could be shown that the knockout of IL-23 as well as the knockout of the CCL2-receptor CCR2 resulted in reduced liver tissue damage after infection with *E. histolytica*. But despite reduced CCL2 expression in the absence of IL-23 the population of Ly6C<sup>hi</sup>-monocytes in the liver was unaltered. However, in IL-23p19<sup>-/-</sup> as well as in CCR2<sup>-/-</sup>-mice a higher number of regenerative Ly6C<sup>lo</sup>-monocytes in the liver tissue was observed. In the absence of IL-23 these cells showed an increased expression of the Th2-cytokine IL-13. Additionally an elevated synthesis of F4/80 and Arg1 of Ly6C<sup>lo</sup>-monocytes could be shown, which is indicative for a polarization of the monocytes towards tissue regenerative M2-macrophages. In female mice, which are more able to control abscess development than male mice, an increased IL-13 expression of Ly6C<sup>hi</sup>-monocytes was observed. Together with an observed lack of pro-inflammatory regulators of pathology this indicates an early and increased M2-polarization in female mice. Furthermore in IL-13tg-mice as well as after treatment of wildtype mice with rIL-13/ $\alpha$ IL-13-complex a reduced abscess development was observed.

Apolipoprotein A1 (ApoA1) is known for its anti-inflammatory properties and its expression in the liver is influenced by the female sex hormone estradiol. In this work it was shown that the lack of ApoA1 increased abscess development in female mice, while in male mice the repair of liver tissue was delayed. The phenotype observed in female mice was accompanied by a reduced amount of Ly6C<sup>lo</sup>-monocytes in the blood as well as a reduced IL-13 expression. Additionally examination of activated human macrophages *in vitro* revealed that the presence of ApoA1 reduced the expression of pro-inflammatory TNF $\alpha$  and CCL2 and simultaneously increased the expression of anti-inflammatory IL-10.

The coagulation factor XII (FXII)-dependent activation of the contact phase system and the concomitant fibrin synthesis are essential for demarcation of abscessed tissue. In this work it was observed that polyphosphates produced by *E. histolytica* induced FXII-activated fibrin synthesis, which contributed to abscess development. The reduced abscess formation in the absence of FXII indicates a protective encapsulation of the parasite by dense fibrin structures during infection.

In summary it was shown, that the development and control of the amebic liver abscess depends on the balance of monocyte populations and their cytokine production in the liver as well as on hormone-regulated apolipoproteins and that fibrin synthesis hinders clearance of the parasite.

## 1. Einleitung

### 1.1 Das angeborene Immunsystem in der Leber

Die Leber ist das größte und wichtigste Stoffwechselorgan des Körpers. Es dient nicht nur der Verwertung von Nahrungsbestandteilen und der Produktion lebenswichtiger Proteine, es ist auch für den Abbau schädlicher Stoffe und die Synthese von in den Lipidstoffwechsel involvierten Lipoproteinen zuständig.

Nahezu sämtliche über den Darm aufgenommenen Nährstoffe gelangen über das Blut der Pfortader direkt in die Leber. Auf diesem Weg erreichen jedoch auch Krankheitserreger, die aus dem Darm in die Peripherie gelangen konnten, das lebenswichtige Organ. Daher entwickelte die Leber einerseits Mechanismen zum Schutz vor eindringenden Pathogenen, andererseits aber auch eine Toleranz gegenüber ungefährlichen Kommensalen des Darms [1].

Neben den Epithelien, die als mechanische Barriere dienen, und humoralen Bestandteilen (Komplementsystem und Zytokine) bilden Makrophagen, Monozyten, Neutrophile Granulozyten (Neutrophile), Mastzellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) das angeborene Immunsystem. Gelangt ein Erreger ins Gewebe, z.B. in die Leber, erkennen die Zellen des angeborenen Immunsystems das eindringende Pathogen anhand charakteristischer Strukturen und Oberflächenproteine, den sogenannten *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) mittels zelleigener *pattern recognition receptors* (PRRs). Auf diese Weise gelingt es den Immunzellen körpereigene von fremden Zellen zu unterscheiden [2].

Im Gegensatz zu Makrophagen und NK-Zellen, sind Neutrophile und Monozyten keine residenten Zellen der Leber, stellen aber bei einer Infektion die ersten rekrutierten Immunzellen dar.

#### 1.1.1 Monozyten

Monozyten entstehen im Knochenmark und machen ca. 5 – 10% der Leukozyten in der Peripherie aus. Im Blut bilden sie ein Reservoir myeloider Vorläuferzellen, welches dazu dient die residenten Makrophagen- und dendritischen Zell-Populationen im Gewebe bei Bedarf aufzufüllen [3-5]. Im Falle einer Gewebsschädigung können sie darüber hinaus direkt zum Infektionsherd rekrutiert werden und dort mittels Zytokin-Synthese zur Eliminierung des Erregers und zur Regeneration des Gewebes beitragen [6]. Monozyten unterteilen sich in verschiedene Subpopulationen mit differenziellen Aufgaben und unterscheiden sich sowohl in ihrem Oberflächenmarkerprofil als auch in der Zytokin-Expression in Mensch und Maus.

##### 1.1.1.1 Humane Monozytenpopulationen

Bereits im Jahre 1989 wurde die Heterogenität humaner Monozytenpopulationen nachgewiesen [7]. Entsprechend ihrer Expression von *cluster of differentiation 14* (CD14; TLR4-Rezeptor für bakterielles LPS) sowie CD16 wurden die humanen Monozyten in drei Subpopulationen unterteilt [8, 9].

CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>-Monozyten, auch klassische Monozyten genannt, zeichnen sich durch eine besonders hohe Expression von CD14 sowie die Synthese inflammatorischer Zytokine aus [10] und bilden 90% der Monozyten in der Peripherie. Weiterhin zeichnet sich diese Monozytenpopulation durch eine hohe Expression des Oberflächenrezeptors C-C-Motiv-Rezeptor 2 (CCR2) aus, welcher nach Bindung

seines Liganden C-C-Motiv-Ligand 2 (CCL2/MCP-1) die Rekrutierung der klassischen Monozyten zum Infektionsherd initiiert [11]. Im Gewebe differenzieren die rekrutierten CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>-Monozyten zu M1-Makrophagen, welche nach Aktivierung durch Lipopolysaccharide (LPS) reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) und IL-6 synthetisieren [12], und unter anderem an der Beseitigung von Pathogenen wie *M. tuberculosis* beteiligt sind [6, 13, 14].

Die restlichen 10% der peripheren Monozyten unterscheiden sich von den klassischen Monozyten durch eine erhöhte CD16-Expression und unterteilen sich in die sogenannten intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>- (ca. 3%) und die nicht-klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Monozyten (ca. 7%). Erstere exprimieren den CX<sub>3</sub>-C-Rezeptor 1 (CX<sub>3</sub>CR1; Fraktalkin) und im Vergleich zu anderen Monozytenpopulationen verstärkt CCR5, *toll like receptor 4* (TLR4), CD163 und *human leukocyte antigen - antigen D related* (HLA-DR; MHC-II) auf ihrer Oberfläche. Sie zeichnen sich ebenfalls durch die Expression von ROS und pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aus und können die Kollagen-Synthese in *hepatic stellate cells* (HSCs) induzieren [8, 10, 12, 15-18]. Die Rekrutierung der intermediären Monozyten erfolgt unter anderem durch die Bindung des CCR5-Liganden CCL3. Sowohl für klassische als auch für intermediäre Monozyten konnte aufgrund ihres pro-inflammatorischen Phänotyps bereits eine Beteiligung an verschiedenen immunpathologischen Erkrankungen, u.a. Arteriosklerose, nachgewiesen werden [19].

Die Population der nicht-klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Monozyten exprimiert im Vergleich zu den beiden anderen Subtypen weniger CCR2, zeichnet sich dafür durch eine besonders hohe CD16- und CX<sub>3</sub>CR1-Expression aus [8, 16, 18]. Für diese Population konnten bereits gewebsregenerierende Eigenschaften sowie ein patrouillierendes Verhalten entlang der Blutgefäße nachgewiesen werden [6, 8]. In Abhängigkeit der T-Helfer Typ 2 (Th2)-Zytokine IL-4 und IL-13 polarisiert dieser Subtyp im Gewebe zu M2-Makrophagen, welche einen vorwiegend anti-inflammatorischen und somit regulatorischen Phänotyp aufweisen [20, 21].

Neben den hier genannten Monozyten-Population werden stetig weitere intermediäre Formen beschrieben und auch die bereits genannte intermediäre CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>-Monozytenpopulation scheint eine Übergangsform von einer Monozytenpopulation in die andere darzustellen [17, 22]. Des Weiteren können M1-Makrophagen durch die Anwesenheit entsprechender Stimuli im Gewebe zu M2-Makrophagen differenzieren, was verdeutlicht, dass nicht nur Monozyten, sondern auch die aus ihnen resultierenden Makrophagen eine hohe Plastizität aufweisen [23, 24].

### 1.1.1.2 Murine Monozytenpopulationen

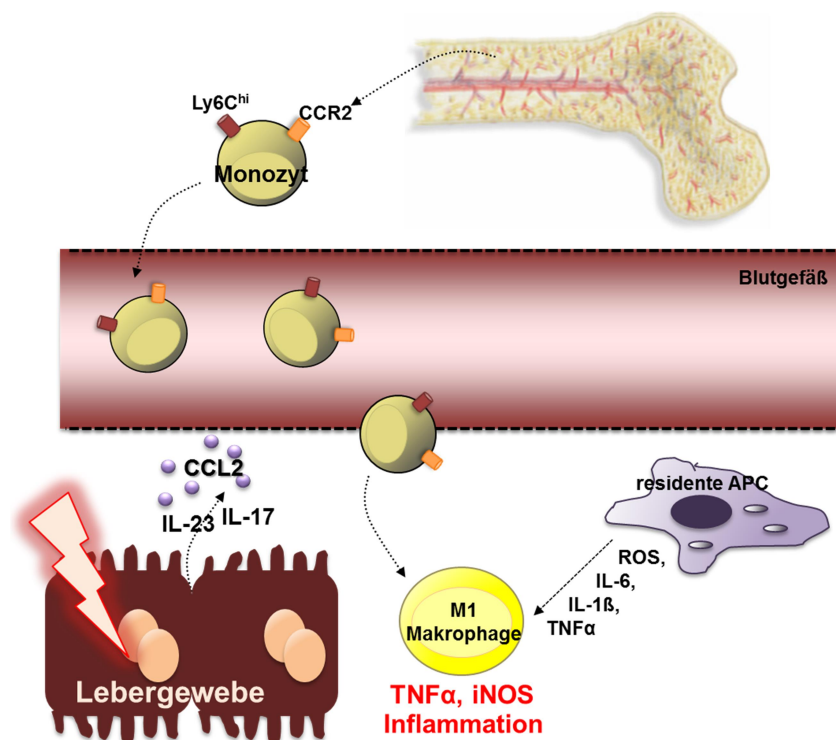
In der Maus finden sich verschiedene Monozytenpopulationen die sich, wie im Menschen, durch eine hohe Plastizität und Diversität auszeichnen und im Gewebe zu Makrophagen differenzieren. Dennoch werden vor allem zwei Monozyten-Populationen mit gegensätzlichem Phänotyp unterschieden, welche die beiden Extreme der Plastizität der Monozyten repräsentieren, namentlich inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und regenerative Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten.

#### 1.1.1.2.1 Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten

Inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten exprimieren CD11b sowie große Mengen *lymphocyte antigen 6 complex, locus C1* (Ly6C) auf ihrer Oberfläche. Durch Bindung der Chemokin-Liganden CCL2 oder CCL7 (MCP-3) an ihren zelleigenen Oberflächenrezeptor CCR2, werden die inflammatorischen Monozyten entlang eines Chemokin-Gradienten aus dem Knochenmark in infiziertes Gewebe

rekrutiert [4, 25], wo sie ihre Ly6C-Expression herunterregulieren [26, 27] und inflammatorische Th1-Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-6 sezernieren [28].

Im Gewebe differenzieren Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten zu M1-Makrophagen [29], welche induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthetase*; iNOS) exprimieren und somit die Synthese von Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*; NO) und Citrullin aus dem Substrat L-Arginin katalysieren [30]. Durch die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine tragen die Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten/M1-Makrophagen zur Eliminierung von Pathogenen bei [31, 32], können aber auch eine gewebsschädigende, chronische Immunpathologie hervorrufen [33, 34], wie es unter anderem in der durch den Parasiten *Schistosoma mansoni* ausgelösten Bilharziose und beim Amöbenleberabszess [35] nachgewiesen werden konnte [36] (Abb. 1.1.1.2.1).



**Abbildung 1.1.1.2.1: Rekrutierung und Differenzierung muriner Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten.** Im Falle einer Gewebsschädigung wird die IL-23/IL-17-Achse aktiviert, welche die Ausschüttung von CCL2 induziert. Die Bindung dieses Chemokins an dessen Rezeptor CCR2 auf der Oberfläche pro-inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten bedingt die Rekrutierung der Zellen aus dem Knochenmark durch das Blut in das infizierte Gewebe via Chemotaxis. Die durch die Infektion initiierte Aktivierung residenter *antigen presenting cells* (APCs) und deren Synthese pro-inflammatorischer Zytokine bedingen die Differenzierung infiltrierender Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im Gewebe zu M1-Makrophagen, welche durch die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und iNOS sowohl zur Eliminierung des Pathogens als auch zur Gewebsschädigung beitragen können.

Da Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten bezüglich ihrer Expression von Oberflächenmarkern und Zytokinen eine hohe Ähnlichkeit zu humanen klassischen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>-Monozyten aufweisen, gelten sie als das murine Pendant dieser Zell-Population [18].

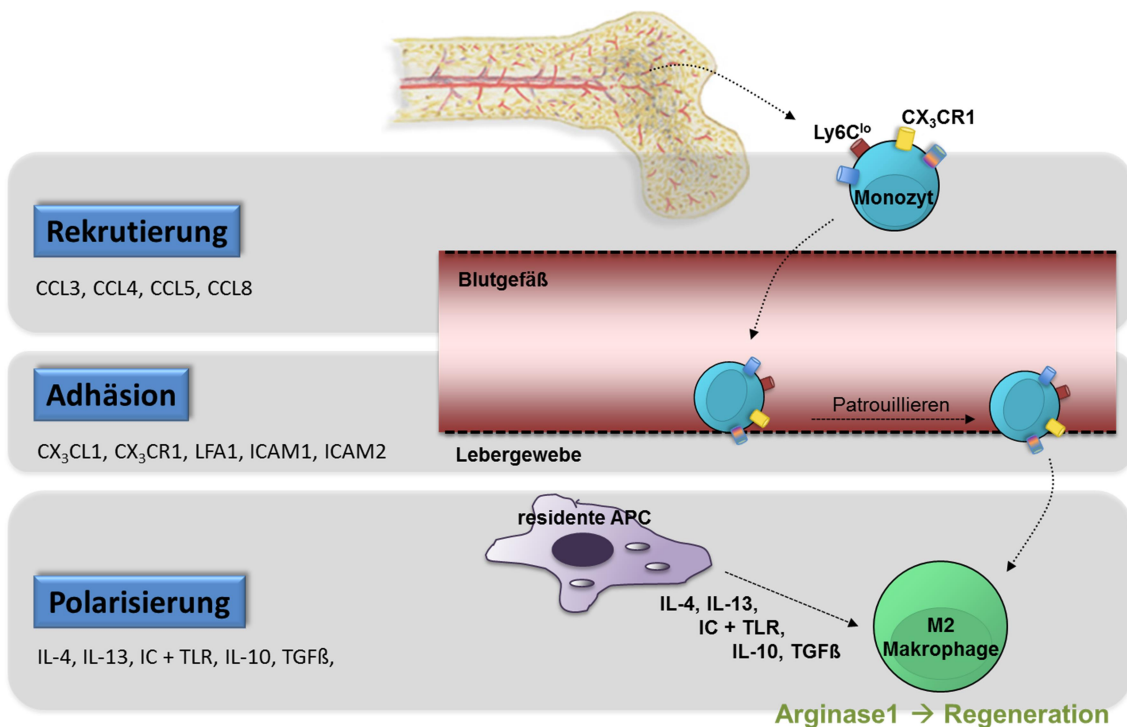
#### 1.1.1.2.2 Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten

Regenerative Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten exprimieren wie Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten CD11b auf ihrer Oberfläche, jedoch deutlich weniger Ly6C und haben eine längere Halbwertszeit. Ihre Differenzierung aus

## Einleitung

Vorläuferzellen im Knochenmark wird durch den Transkriptionsfaktor Nukleärer-Rezeptor-4-a1 (Nr4a1) reguliert [37]. Weiterhin exprimieren die regenerativen Monozyten kein CCR2, dafür aber CX<sub>3</sub>CR1 sowie das *Lymphocyte function associated antigen 1* (LFA1) [5]. Die Rekrutierung der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten erfolgt mittels Bindung der CCR5-Liganden CCL3, CCL4, CCL5 oder CCL8 entlang eines Chemokin-Gradienten [37, 38]. In den Blutgefäßen patrouillieren die Zellen entlang der Epithelien und dringen im Falle einer Infektion in das beschädigte Gewebe ein [11]. Hierbei kommt es zur Interaktion von CX<sub>3</sub>CR1 mit CX<sub>3</sub>CL1 und/oder LFA1 mit dem *Intracellular adhesion molecule 1* (ICAM1) oder ICAM2 auf den Gefäßepithelien [37, 39].

Im Gewebe können Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zu alternativ aktivierten M2-Makrophagen differenzieren [40], die sich insbesondere durch ihre Arginase 1 (Arg1)-Expression auszeichnen [30]. Entsprechend des im Gewebe vorherrschenden Th2-Zytokinmilieus können die infiltrierten Monozyten zu verschiedenen M2-Makrophagen-Subtypen differenzieren. Die Zytokine IL-4 und IL-13 induzieren eine M2a-Polarisierung der Zellen. Diese Makrophagenpopulation exprimiert ebenfalls IL-4 und IL-13 und unterstützt eine beginnende Th2-Immunantwort durch die Rekrutierung von Th2-Zellen. Eine M2b-Polarisierung erfolgt in Anwesenheit von Immunkomplexen (IC) wie LPS in Verbindung mit TLRs. Die Aktivierung dieses Subtyps bewirkt die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen (T<sub>regs</sub>) und eine damit verbundene Regulation der Immunantwort. Die Polarisierung zu M2c-Makrophagen setzt die Anwesenheit von IL-10 und/oder *transforming growth factor beta* (TGFβ) im Gewebe voraus und induziert die Rekrutierung naiver T-Zellen in das Gewebe [31] (Abb. 1.1.1.2.2).



**Abbildung 1.1.1.2.2: Rekrutierung, Adhäsion und Polarisation muriner Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten.** Durch die Bindung der Chemokin-Liganden CCL3, CCL4, CCL5 oder CCL8 an den zelleigenen Oberflächenrezeptor CCR5 der regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten werden diese aus dem Knochenmark in die Blutgefäße rekrutiert. Dort patrouillieren die Zellen entlang der Gefäßepithelien und dringen im Falle einer Infektion in beschädigtes Gewebe ein, was durch die Interaktion von CX<sub>3</sub>CR1 mit CX<sub>3</sub>CL1 und/oder LFA1 mit dem *Intracellular adhesion molecule 1* (ICAM1) oder ICAM2 auf den Epithelien ermöglicht wird. Im Gewebe differenzieren die Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zu regulatorischen M2-Makrophagen, welche unter anderem durch Produktion von Arginase 1 zur Gewebsregeneration beitragen. Dabei können die Makrophagen in Abhängigkeit der von residenten *antigen presenting cells* (APCs) sezernierten Zytokine zu verschiedenen M2-Subtypen polarisieren. IL-4 und IL-13 induzieren die M2a-Polarisierung, Immunkomplexe (ICs) in Verbindung mit *toll like receptors* (TLRs) die M2b-Polarisierung und IL-10 und TGFβ die M2c-Polarisierung.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten, bezüglich der Expression von Oberflächenmarkern und Zytokinen sowie ihres patrouillierenden Verhaltens und einer ähnlichen Funktionalität, gelten diese als das murine Gegenstück der humanen nicht-klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Monozyten [8, 18].

### 1.1.2 Das Th1-Zytokin IL-23

Interleukin-23 (IL-23) wurde im Jahre 2000 erstmalig beschrieben [41]. Es gehört zur Familie der IL-12-Zytokine und bildet ein Heterodimer aus seiner spezifischen Untereinheiten IL-23p19 sowie der Untereinheit IL-12p40, welche neben IL-12p35 die zweite Untereinheit des heterodimeren Zytokins IL-12 darstellt [42]. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-23 wird vorwiegend von *antigen presenting cells* (APCs), wie Dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen nach deren Kontakt mit PAMPs sezerniert [43, 44]. Es bindet an den gleichfalls heterodimeren IL-23-Rezeptor (IL-23R), welcher aus den Untereinheiten IL-12Rβ1 (ebenso eine der beiden Untereinheiten des IL-12R) und IL-23R besteht [45]. IL-23 ist vor allem dafür bekannt Th17-Zellen zu aktivieren und somit die Sezernierung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17 zu induzieren [46, 47]. IL-17 kann in einer Vielzahl von Zellen die Expression des Chemokins CCL2 induzieren [48-50]. Darunter finden sich je nach Stimulus Hepatozyten und Makrophagen [51], HSCs [52] sowie Endothelzellen [53]. Durch die Bindung des Chemokin-Liganden CCL2 an dessen Rezeptor CCR2 auf der Oberfläche pro-inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten wird wiederum die Rekrutierung dieser Zellen in das infizierte Gewebe initiiert [49]. Einmal ins Gewebe infiltriert, können Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten zur Produktion von TNFα beitragen [9, 54]. Das Th1-Zytokin stimuliert die Phagozytose in Makrophagen, was unter anderem in einem Infektionsmodell für *Mycobacterium tuberculosis* nachgewiesen werden konnte [55]. Andererseits konnte eine Beteiligung von TNFα an der Immunpathologie am Beispiel der autoimmunen Enzephalitis sowie in einem Infektionsmodell für *Mycobacterium bovis* gezeigt werden [56, 57]. Die IL-23/IL-17/CCL2-Achse dient somit der Abwehr und Eliminierung diverser Pathogene [58, 59], kann aber auch an der Ausbildung immunpathologischer Erkrankungen beteiligt sein [56].

### 1.1.3 Das Th2-Zytokin IL-13

Das Th2-Zytokin IL-13 wird von diversen Zellen des Immunsystems synthetisiert, darunter T-Zellen, eosinophile Granulozyten (Eosinophile), *type 2 innate lymphoid cells* (ILC2) sowie Monozyten und Makrophagen [60-62]. Durch Bindung an den heterodimeren Rezeptor IL-13Rα1/IL-4Rα aktiviert IL-13 den *Janus-activated kinase* (JAK)/*signal transducers and activators of transcription 6* (STAT6)-Signalweg [63]. In Makrophagen induziert die Aktivierung von JAK/STAT6 die Arg1-Expression und somit die Polarisierung zu alternativ aktivierten geweberegenerierenden M2-Makrophagen. Ebenso kann IL-13 die Synthese von TGFβ initiieren, welches die Bildung extrazellulärer Matrix stimuliert und wie Arg1 zur Geweberegeneration beiträgt [64]. Eine pathologische Überexpression von IL-13 kann jedoch zur Bildung von Fibrosen oder allergischem Asthma führen [65, 66]. Ein weiterer Rezeptor, IL-13Rα2, inhibiert durch dessen Bindung die Aktivität von IL-13 [67] und wird unter anderem durch Interferon gamma (IFNγ) heraufreguliert [68]. Da auch IL-4 den heterodimeren Rezeptor IL-13Rα1/IL-4Rα JAK/STAT6 aktivieren kann, konnten den beiden Th2-Zytokinen IL-13 und IL-4 in vielerlei Hinsicht ähnliche Funktionen nachgewiesen werden. Allerdings sind IL-4<sup>-/-</sup>-Mäuse, nicht jedoch IL-13-defiziente Mäuse, beispielsweise in der Lage eine Helminthen-Infektion auszuheilen [69], was verdeutlicht, dass die Funktionen der Th2-Zytokine IL-13 und IL-4 keine vollständige Redundanz aufweisen.

## 1.2 Lipidstoffwechsel

Der Lipidstoffwechsel ist ein komplexes System enzymatisch katalysierter Reaktionen, welches in eine Vielzahl zellulärer Vorgänge in sämtlichen Organen des Körpers involviert ist und unter anderem dem Zellwachstum, der Zellproliferation sowie dem reversen Cholesteroltransport dient [70, 71]. Für einige Moleküle des Lipidstoffwechsels – hier im Speziellen HDL und ApoA1 – konnte gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  die Synthese dieser Moleküle herunterregulieren [72]. In Abwesenheit der hemmenden Signalstoffe konnte wiederum eine Beteiligung von ApoA1 und HDL an der Gewebsregeneration nachgewiesen werden [73].

### 1.2.1 HDL

Das *high density lipoprotein* (HDL) ist vor allem für seine protektive Funktion in der Arteriosklerose bekannt [74-76]. Das im HDL-Partikel vorkommende Apolipoprotein A1 (ApoA1) vermittelt den reversen Cholesteroltransport aus den in arteriosklerotischen Plaques residenten Makrophagen in die Leber, wo das Cholesterol abgebaut und schließlich über den Magen-Darm Trakt ausgeschieden wird [70]. Neben dem Abbau von arteriosklerotischen Plaques weist HDL anti-oxidative, anti-thrombotische und anti-inflammatorische Eigenschaften auf [70, 75, 77]. Den anti-inflammatorischen Eigenschaften liegt eine durch HDL vermittelte Inhibition der pro-inflammatorischen Sphingosin-Kinase-, *extracellular-signal regulated kinases* (ERK)- sowie der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B)-abhängigen Signalkaskaden zugrunde [78].

In der Menge des im Serum nachweisbaren HDL zeigt sich ein Geschlechtsunterschied dahingehend, dass Frauen signifikant mehr HDL synthetisieren (55 mg/dL), als Männer (45 mg/dL) [79, 80]. Dabei gehen erhöhte HDL-Serumlevel mit einem erhöhten Östrogen-Serumspiegel einher [80, 81].

### 1.2.2 Apolipoprotein A1

ApoA1 wird in der Leber und im Darm synthetisiert. Aufgrund einer Estradiol-Bindedomäne in der Promotorregion von ApoA1 weisen Frauen eine höhere Expression des Apolipoproteins auf, als Männer [79, 80]. ApoA1 macht mit 70% den Hauptbestandteil der Proteine eines HDL-Partikels aus und ist essentiell für dessen Bildung und Funktionen [82]. 5 – 10% des im Körper vorkommenden ApoA1 liegen ungebunden und somit in freier Form vor. ApoA1 wird in dieser Form auch pre- $\beta$ 1-HDL genannt [83]. Eine erhöhte Expression von ApoA1 hat erhöhte HDL-Level und ein reduziertes Arteriosklerose-Risiko zur Folge [84]. Die Bindung von ApoA1 an *ATP-binding cassette (ABC) transporter A1* (ABCA1) induziert den Efflux von Cholesterol aus den Zellen der arteriosklerotischen Plaques an ApoA1, wodurch die Bildung des HDL-Partikels initiiert wird [70, 85]. Zur Therapie der vaskulären Erkrankung sind daher bereits verschiedene ApoA1-*mimetic peptides* Gegenstand der Forschung, die, wie ApoA1, neben kardioprotektiven auch anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen [70, 86-89]. Den anti-inflammatorischen Eigenschaften von ApoA1 liegt eine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 zugrunde. Die STAT3-Signalkaskade hat dabei nicht nur eine reduzierte Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  in Makrophagen zur Folge, sondern auch eine induzierte Expression des Th2-Zytokins IL-10 [90, 91].

## 1.3 Koagulationsfaktor XII

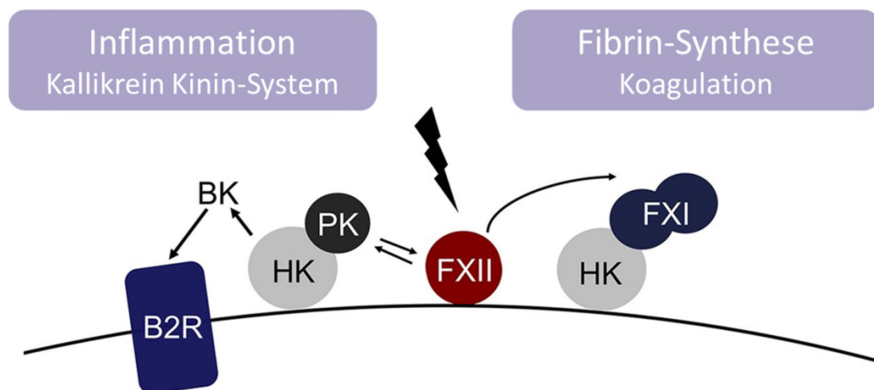
Der vorwiegend in Hepatozyten synthetisierte Koagulationsfaktor XII (FXII), auch Hagemann-Faktor genannt, ist eine Serinprotease die in ihrer aktiven Form (FXIIa) sowohl in die Blutgerinnung via Fibrinsynthese als auch in die Aktivierung inflammatorischer Mechanismen involviert sein kann [92,



93]. Die autokrine Aktivierung von FXII zu FXIIa wird dabei durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen wie Heparin, Kollagen oder Polyphosphaten (polyP) initiiert [94, 95].

Die durch FXII(a) induzierte Fibrinsynthese ist FXI-abhängig und dient dem Wundverschluss nach Gewebsschädigung. Weiterhin ist Fibrin neben Kollagen Bestandteil äußerer Abszessmembranen und kann zudem dazu dienen Kapseln um einen Erreger zu bilden, um diesen zu immobilisieren [96-98]. Einige Pathogene, wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, sind in der Lage, die Bildung von Fibrinkapseln zu nutzen, um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen [99].

Die Beteiligung von FXII an inflammatorischen Prozessen der angeborenen Immunantwort beruht auf der FXIIa-abhängigen Aktivierung des Kallikrein Kinin-Systems, welches mittels Spaltung von *high molecular weight kininogen* (HK) durch Plasmakallikrein (PK) die Freisetzung von Bradykinin (BK) induziert. Dieses Peptid- und Gewebshormon bindet an den Bradykinin 2 Rezeptor (B2R) und initiiert so unter anderem die Synthese von NO und die Rekrutierung von Monozyten durch residente Makrophagen [100, 101]. Dieser Mechanismus ist nachweislich sowohl an der Eliminierung bakterieller, viraler als auch parasitärer Erreger beteiligt [102-108] (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: FXII-abhängige Aktivierung der Inflammation sowie der Fibrin-Synthese.** Koagulationsfaktor XII (FXII) wird kontaktabhängig durch negativ geladene Oberflächen aktiviert. Aktivierter FXII kann zum einen die Fibrin-Synthese durch die Koagulationsfaktor XI (FXI)-vermittelte Koagulation initiieren. Zum anderen wird durch FXII Präkallikrein (PK) aktiviert, welches *high molecular weight kininogen* (HK) spaltet und so die Freisetzung von Bradykinin (BK) induziert. BK aktiviert schließlich durch Bindung an den Bradykinin 2 Rezeptor (B2R) pro-inflammatorische Signalkaskaden. (Verändert nach [108]).

## 1.4 Amöbiasis

Eine intestinale Infektion mit dem parasitären Protozoon *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) kann die Ausbildung einer Amöbiasis verursachen (Schaudinn, 1903). Weltweit infizieren sich Schätzungen zufolge jährlich bis zu 50 Millionen Menschen mit dem amöboiden Erreger, wodurch die Amöbiasis, nach Malaria und Schistosomiasis, zu einer der häufigsten humanen Parasitosen zählt (WHO/PAHA/UNESCO, 1997).

### 1.4.1 *Entamoeba histolytica*

*E. histolytica*, der Erreger der Amöbiasis, ist ein eukaryotischer Einzeller, dessen endemische Verbreitung sich aufgrund unzureichender hygienischer Standards und mangelnder Wasseraufbereitung auf tropische und subtropische Gebiete beschränkt [109]. Für gewöhnlich verbleibt der Parasit als Kommensale im Darm, kann aber auch durch bisher nicht vollständig aufgeklärte

Mechanismen das Darmepithel schädigen und in die Blutbahn gelangen [110]. Infiltriert der Parasit schließlich über die Peripherie in extraintestinale Gewebe, kann dies die Ausbildung von Abszessen induzieren, welche im Menschen unbehandelt zum Tod des Wirtes führen.

### **1.4.1.1 Lebenszyklus**

Menschen und einige Affenarten stellen die einzigen natürlichen Wirte von *E. histolytica* dar (van Lunzen et al., 1996). Zu einer Infektion mit dem Erreger der Amöbiasis kommt es durch fäkal-orale Aufnahme der vierkernigen Zysten, dem Dauerstadium des Parasiten, mit kontaminierter Nahrung oder Wasser. Nach der Aufnahme passieren die säureresistenten Zysten den Magen, gelangen in den Dünndarm und exzystieren dort aufgrund des vorliegenden, neutralen bis basischen pH-Wertes zu vierkernigen Trophozoiten. Diese besiedeln den oberen Dickdarm, in welchem sie durch Kern- und Plasmateilung jeweils acht einkernige Trophozoiten bilden [111]. In diesem Stadium ist der Parasit motil. Die Fortpflanzung der *E. histolytica*-Trophozoiten erfolgt mittels Zweiteilung, zur Nahrungsaufnahme werden Nahrungsmittelreste und Bakterien der Darmflora phagozytiert. Gelangen die Trophozoiten in den unteren Dickdarm, kommt es zur Enzystierung der Parasiten. Durch zwei aufeinanderfolgende Kernteilungen entstehen wiederum vierkernige Zysten, welche mit dem Stuhl ausgeschieden werden und einen neuen Wirt infizieren können.

### **1.4.1.2 Pathogenitätsfaktoren**

Der Parasit *E. histolytica* trägt seinen Namen aufgrund der Fähigkeit Gewebe hocheffizient zu lysieren [112]. Nach der durch das Lektin Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin (Gal/GalNAc) vermittelten Adhäsion der Trophozoiten an das Darmepithel [113, 114] sezerniert der Parasit kontaktabhängig sogenannte *Amoebapores*, welche durch Porenbildung zur Lyse der Epithelzellen beitragen [115]. Mittels Cysteinpeptidasen kann der Parasit zudem verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix degradieren und somit zusätzlich die Lyse des Gewebes induzieren [116-121].

## **1.4.2 Krankheitsbild und Therapie der Amöbiasis**

Die Infektion mit *E. histolytica* verläuft in ca. 90% der Fälle asymptomatisch, indem die Trophozoiten über Monate oder Jahre als apathogene Kommensalen im oberen Dickdarm verbleiben [122]. In 10% der Infektionen kann jedoch eine massive Schädigung des mukosalen Darmgewebes durch den Parasiten beobachtet werden [110]. Die daraus resultierende sogenannte „Amöbenruhr“ zeichnet sich unter anderem durch Fieber, Kolitis und blutige Diarrhöe aus und wird vermutlich durch Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* induziert. In ca. 1% der Fälle kommt es zur Einwanderung des Parasiten in die Blutbahn, was zu 95% eine extraintestinale Manifestation von *E. histolytica* Trophozoiten in der Leber zur Folge hat. Der daraus resultierende Amöbenleberabszess (ALA) stellt eine schwere fokale Schädigung des Lebergewebes dar. In der Häufigkeit der Ausbildung des Amöbenleberabszesses liegt ein Geschlechtsdimorphismus vor. So infizieren sich Frauen (und Kinder) zwar deutlich öfter mit dem Erreger, bilden dennoch seltener einen Abszess aus, als Männer. Eine Abszessausbildung ist bei Männern mittleren Alters am häufigsten zu beobachten [123]. Wird diese frühzeitig medikamentös behandelt, kann aufgrund der hohen Regenerationsfähigkeit der Leber eine vollständige Ausheilung des Gewebes erwirkt werden [124]. Unbehandelt jedoch, vergrößert sich der Abszess bis zur Ruptur in den Bauchraum oder benachbarte Organe, was schließlich den Tod des Wirtes herbeiführt [110].

Die intestinale Form der Amöbiasis wird mit Paromomycin behandelt, wobei das Antibiotikum die Ribosomen und somit die Proteinbiosynthese des Parasiten blockiert und zu dessen Absterben führt

[123]. Bei der invasiven Form, wie dem Amöbenleberabszess, wird zusätzlich zu Paromomycin ein zweites Antibiotikum, Metronidazol, verabreicht [125]. Unter anaeroben Bedingungen bildet Metronidazol Radikale, welche die DNA, Proteine und Lipide des Parasiten schädigen.

### 1.4.3 Der Amöbenleberabszess im Tiermodell

Obwohl der Mensch und einige Affenarten die einzigen natürlichen Wirte *E. histolytica* darstellen, kann auch in verschiedenen Kleintiermodellen durch direkte intrahepatische Infektion der parasitären Trophozoiten die Ausbildung des Amöbenleberabszesses induziert werden [126, 127]. 2006 gelang es Lotter et al. ein Mausmodell zu entwickeln, in welchem nicht nur Abszesse induziert werden können, sondern aufgrund des weitreichenden Wissens über immunregulatorische Mechanismen in der Maus auch eine Untersuchung der Immunantwort des Wirtes auf das Eindringen des Parasiten ermöglicht wird. Weiterhin zeigt das Mausmodell dieselbe geschlechtsabhängige differenzielle Ausbildung des Amöbenleberabszesses wie sie im Menschen beobachtet werden konnte [128, 129]. So entwickeln Männer und männliche Mäuse größere Abszesse als Frauen und weibliche Mäuse, was im Mausmodell zusätzlich die Analyse geschlechtsspezifischer Mechanismen nach Infektion mit *E. histolytica* ermöglicht. Im Gegensatz zum Menschen ist die Maus außerdem in der Lage, den induzierten Amöbenleberabszess selbstständig und vollständig nach nur ca. 14 Tagen auszuheilen. Somit könnte die Untersuchung des Amöbenleberabszesses im murinen Modell Mechanismen und immunregulatorische Faktoren enthüllen, die zur Behandlung des Menschen nach Infektion mit *E. histolytica* eingesetzt werden können.

### 1.4.4 Immunpathologie im Amöbenleberabszess

Neben den Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* ist eine pathologische Beteiligung des wirtseigenen Immunsystems an der Abszessausbildung aufgrund des beobachteten Geschlechtsdimorphismus anzunehmen.

Die Infektion immunkompetenter C57BL/6 (WT)- sowie diverser *Knockout*-Mäuse mit dem Parasiten ermöglicht die Untersuchung immunologischer und hormoneller Einflüsse bei der Entstehung und Regeneration des Amöbenleberabszesses im Tiermodell, auch in Abhängigkeit des Geschlechts. So konnte in infizierten WT-Mäusen bereits eine Beteiligung des pro-inflammatorischen Zytokins IFN $\gamma$  an der Kontrolle des Amöbenleberabszesses nachgewiesen werden [130-132]. IFN $\gamma$  induzierte dabei die Aktivierung von Makrophagen, welche durch NO-Synthese zur Eliminierung des Parasiten beitragen. Für die frühe und starke Produktion von IFN $\gamma$  kommen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie invariante Natürliche Killer T (iNKT) Zellen, in Betracht [131]. Durch Stimulation mit einem amöben-eigenen Glycolipid, dem *E. histolytica* Lipopeptidophosphoglykan (*EhLPPG*), waren diese Zellen durch Produktion von IFN $\gamma$  in die Kontrolle des Amöbenleberabszesses involviert [133]. Dabei zeigte sich, dass iNKT Zellen weiblicher Tiere mehr IFN $\gamma$  synthetisierten, als iNKT Zellen männlicher Tiere. Eine Behandlung weiblicher Mäuse mit Testosteron bewirkte jedoch den Verlust der Abszesskontrolle bei gleichzeitig verringerter iNKT-Zell-spezifischer IFN $\gamma$  Produktion [131].

Nach Infektion männlicher WT-Mäuse konnte zudem eine erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-23 und IL-17 im Lebergewebe nachgewiesen werden [134]. *In vitro* wurde gezeigt, dass sowohl  $\gamma\delta$ -T-Zellen als auch iNKT-Zellen IL-23-abhängig nach Stimulation mit *EhLPPG* IL-17 synthetisierten. Der *Knockout* und die Depletion von IL-17 führten wiederum zu tendenziell reduzierten Abszessvolumina in männlichen Mäusen, was eine Beteiligung der pro-inflammatorischen IL-23/IL-17-Achse an der Entstehung des Amöbenleberabszesses vermuten

lässt. Weiterhin konnten Helk et al. nach Infektion männlicher Mäuse mit dem Parasiten erhöhte Serum-Level des Chemokins CCL2 nachweisen [35], dessen Expression durch die IL-23/IL-17-Achse induziert wird und die Rekrutierung CCR2-abhängiger inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in das Gewebe induziert [4]. Es konnte ferner gezeigt werden, dass Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und die aus ihnen resultierenden M1-Makrophagen unter anderem TNF $\alpha$  sezernieren [28], ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches häufig mit der Pathologie chronischer Entzündungen in Zusammenhang gebracht wurde [112, 135, 136]. Auch konnte eine Beteiligung von TNF $\alpha$  an der Ausbildung eines Amöbenleberabszesses nachgewiesen werden, wobei die Depletion des Zytokins eine reduzierte Abszessausbildung zur Folge hatte [35].

### 1.5 Zielsetzung

Im Mausmodell konnte neben dem Einfluss der Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* eine Beteiligung der wirtseigenen Immunantwort im Sinne einer Immunpathologie an der Ausbildung eines Amöbenleberabszesses nachgewiesen werden [35]. In dieser Arbeit sollten daher die der Immunpathologie zugrunde liegenden Mechanismen weitergehend analysiert, sowie immunregulatorische Mechanismen identifiziert werden, die zur Regeneration des Amöbenleberabszesses beitragen.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Beteiligung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-23 sowie der inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und ihrem regenerativen Gegenpart, den Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten, an der Ausbildung eines Amöbenleberabszesses analysiert werden. In vorigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die IL-23/IL-17-Achse in die Immunpathologie des Amöbenleberabszesses involviert ist [134]. Zudem konnten erhöhte Serum-Level des Chemokins CCL2 sowie ein Anstieg der TNF $\alpha$ -Expression nach Infektion mit *E. histolytica* nachgewiesen werden [35]. Da die IL-23/IL-17-Achse über die Expression von CCL2 in die Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten involviert ist und TNF $\alpha$  von Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und den aus ihnen resultierenden M1-Makrophagen sezerniert werden kann, lag die Vermutung nahe, dass ebendiese Zellen an der Pathologie des Amöbenleberabszesses im männlichen Tier beteiligt sein könnten.

Im Mausmodell für den Amöbenleberabszess sowie in *in vitro* Experimenten mit humanen Makrophagen sollte weiterhin der Einfluss von Apolipoprotein A1 (ApoA1) auf die Abszesskontrolle analysiert werden. Für ApoA1 konnten dabei nicht nur anti-inflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden [90], das Molekül weist zudem eine Bindedomäne für das weibliche Hormon Estradiol in dessen Promotorregion auf [80]. Da sich sowohl im murinen Modell als auch im Menschen eine geschlechtsspezifische Ausbildung des Amöbenleberabszesses zeigte, stellt ApoA1 somit einen potentiellen Kandidaten dar, der in die Kontrolle des Amöbenleberabszesses in weiblichen Individuen involviert sein könnte.

Abschließend wurde die Beteiligung des Koagulationsfaktors XII (FXII) an der Abszessausbildung untersucht. FXII wird durch negativ geladene Oberflächen, wie beispielsweise Polyphosphate, aktiviert und kann sowohl in inflammatorische Prozesse als auch in die Fibrinbildung während der Abszessausbildung involviert sein [92, 95]. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob *E. histolytica* im Gewebe vermehrt Polyphosphate synthetisiert und so einen potentiellen Aktivator von FXII darstellt. Weiterhin wurde untersucht, ob FXII über die Aktivierung inflammatorischer Signalwege oder über die Fibrinsynthese, welche z.B. das Einkapseln des Parasiten bedingen könnte, in die Ausbildung eines Amöbenleberabszesses involviert ist.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 IL-23 und CCR2 – Die Immunpathologie im Amöbenleberabszess

Durch das Invadieren von *E. histolytica* in das Lebergewebe, werden wirtseigene Abwehrmechanismen aktiviert, die der Beseitigung des Parasiten dienen sollen. Im Falle des Amöbenleberabszesses (ALA) trägt diese pro-inflammatorische Immunantwort jedoch maßgeblich zur Abszessentstehung bei. In der Arbeitsgruppe konnte im Mausmodell des ALA bereits nachgewiesen werden, dass eine Infektion der Leber männlicher Tiere mit *E. histolytica* zu einer verstärkten Expression der Th1-Zytokine IL-23, IL-17 sowie TNF $\alpha$  führt und eine Depletion von letzterem geringere Abszessvolumina zur Folge hatte [35]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser Zytokine in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus nach Abszessinduktion reduziert war. Ebenso konnten nach Infektion erhöhte Serum-Level des Chemokins CCL2 nachgewiesen werden, welches an den CCR2-Rezeptors auf der Oberfläche inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten bindet und so die Rekrutierung dieser Zellen aus dem Knochenmark in das infizierte Gewebe induziert. Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten differenzieren im Gewebe zu inflammatorischen M1-Makrophagen, welche TNF $\alpha$  und iNOS exprimieren und so die Gewebsschädigung verstärken. Da IL-23 am Anfang dieser inflammatorischen Signalkaskade und CCR2 in direktem Zusammenhang mit der Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in das infizierte Gewebe steht, wurde im ersten Abschnitt dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss der *Knockout* von IL-23 und CCR2 auf die Abszessentwicklung und die Rekrutierung der Monozyten hat.

Hierfür wurden männliche C57BL/6-, IL-23p19<sup>-/-</sup>- sowie CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die Abszessentwicklung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) erfasst. Mit Hilfe von qPCR und *Bead*-basiertem Immunoassay erfolgte eine Analyse der mRNA-Akkumulation sowie der Serum-Level verschiedener mit der Abszessausbildung potentiell assoziierter pro-inflammatorischer und regulatorischer Moleküle nach Infektion. Weiterhin wurde die Rekrutierung der inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>- und regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten aus dem Knochenmark am Durchflusszytometer untersucht.

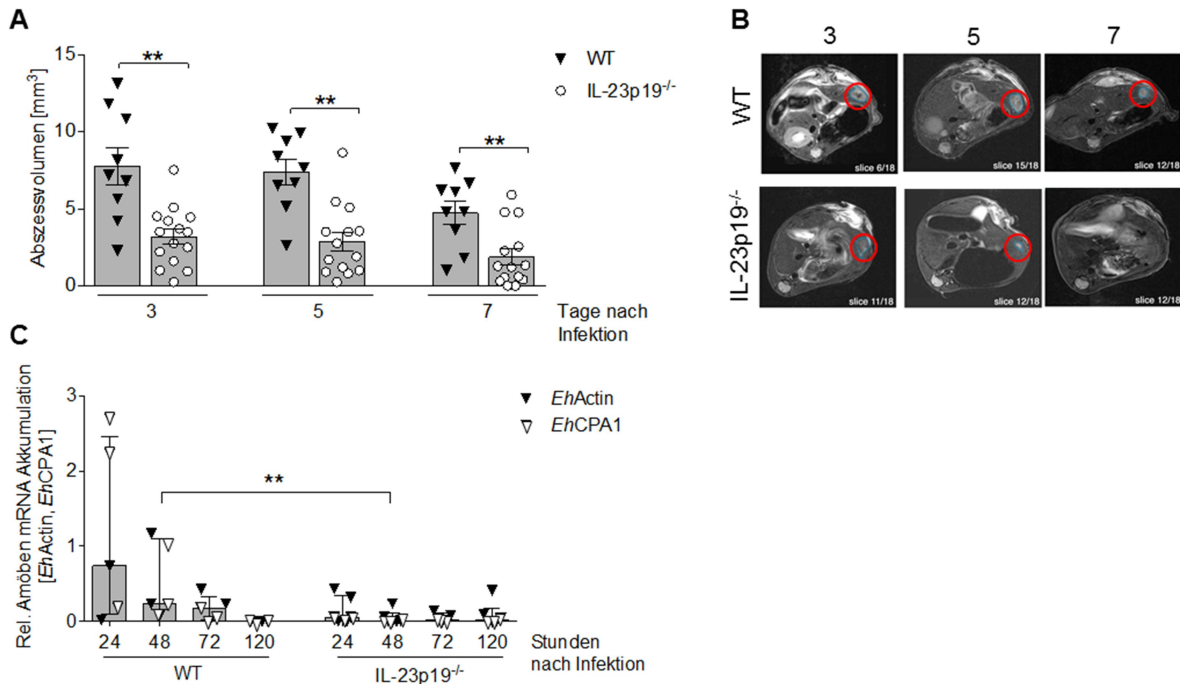
#### 2.1.1 Einfluss von IL-23 auf den Abszessverlauf und das Überleben des Parasiten

Da bereits eine Beteiligung der Th1-Zytokine IL-17 und TNF $\alpha$  an der Gewebsschädigung nach Infektion der Leber mit *E. histolytica* nachgewiesen werden konnte [35], und sich die Expression dieser Zytokine in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen verringerte, war anzunehmen, dass der *Knockout* von IL-23 einen Einfluss auf die Abszessausbildung hat. Diese Hypothese sollte zu Beginn dieser Arbeit überprüft werden.

Hierzu wurden männliche IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und der Abszessverlauf an den Tagen 3, 5 und 7 nach Infektion mittels MRT untersucht. Als Kontrollgruppe dienten infizierte, männliche C57BL/6 Wildtyp (WT)-Mäuse. Des Weiteren wurde die mRNA-Expression der Amöbenproteine *EhActin* (*E. histolytica* spezifisches Aktin) und *EhCPA1* (*E. histolytica* spezifische Cystein Peptidase A1) in WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen in der Leber mittels qPCR über einen Verlauf von 120 Stunden nach Infektion verglichen, um die Überlebensfähigkeit der Amöben und den Einfluss von IL-23 auf selbige beurteilen zu können.

## Ergebnisse

Bereits an Tag 3 nach Infektion zeigten sich signifikant kleinere Abszesse in IL-23p19<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT-Mäusen (ca. 8 mm<sup>3</sup> (WT) vs. ca. 4 mm<sup>3</sup> (IL-23p19<sup>-/-</sup>); p < 0,01). Dieser Phänotyp manifestierte sich an den Tagen 5 und 7 nach Infektion (Abb. 2.1.1 A und B). Weiterhin konnte in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant reduzierte mRNA-Akkumulation der Amöbenproteine *EhActin* und *EhCPA1* bereits 48 Stunden nach Infektion nachgewiesen werden (p < 0,01) (Abb. 2.1.1 C).



**Abbildung 2.1.1: Abszessausbildung und Überleben von *E. histolytica* in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus.** WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und (A) die Abszessvolumina an den Tagen 3, 5 und 7 nach Infektion am MRT ermittelt (drei unabhängige Experimente). (B) Repräsentative T2-gewichtete MRT Aufnahmen der Amöbenleberabszesse in WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen. (C) mRNA-Akkumulation von *E. histolytica* spezifischem Aktin und der *E. histolytica* spezifischen Cystein Peptidase A1 in der Leber infizierter WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse während des Abszessverlaufs. (Mittelwerte ± Standardfehler; Mann-Whitney U test; \*\*p < 0,01).

Zusammenfassend zeigten sich in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus sowohl die Abszessausbildung, als auch die Überlebensfähigkeit der Amöben im Vergleich zur WT-Maus signifikant reduziert.

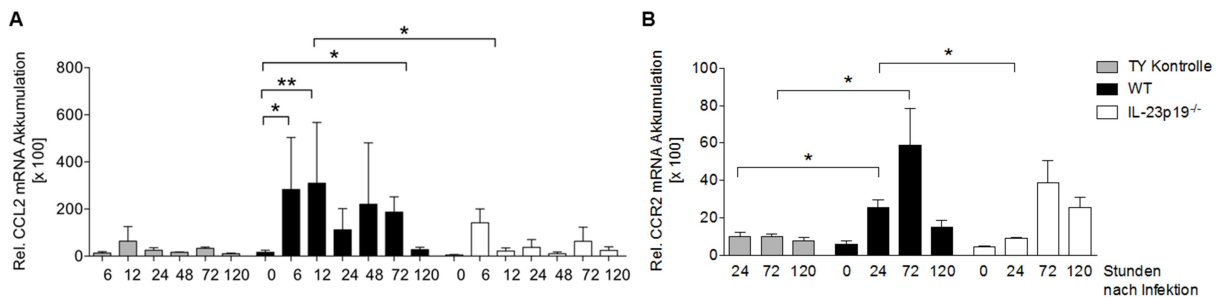
### 2.1.2 Expression von CCL2 und CCR2 in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus

Vorige Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Expression des Chemokins CCL2 in infizierten WT-Mäusen nach Infektion anstieg und ein *Knockout* dessen Rezeptors CCR2 zu einer reduzierten Abszessausbildung führte. Da die CCL2-Expression unter anderem von IL-23 abhängig ist, sollte im Folgenden die Auswirkung des IL-23p19-*Knockouts* auf die Expressionslevel von CCL2 und CCR2 in der Leber untersucht werden.

Hierzu wurden männliche IL-23p19<sup>-/-</sup>- und WT-Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Als Kontrolle wurde nicht infizierten WT-Mäusen Parasiten-freies TY-Medium appliziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion erfolgte die Entnahme des infizierten Leberlappens mit anschließender Aufreinigung der Gesamt-RNA. Anschließend wurde mittels qPCR die mRNA-Akkumulation von CCL2 und CCR2 im infizierten Leberlappen bestimmt.

## Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte einen signifikanten Anstieg der CCL2-mRNA-Akkumulation in WT-Mäusen sowohl 6 Stunden ( $p < 0,05$ ) als auch 12 Stunden ( $p < 0,01$ ) nach Infektion, verglichen mit nicht infizierten WT-Mäusen (Abb. 2.1.2 A). Auch zu den darauffolgenden untersuchten Zeitpunkten war die CCL2-mRNA-Expression sowohl im Vergleich zu naiven WT-Mäusen sowie zur TY-Kontrolle tendenziell erhöht, die Einzelwerte der Messungen schwankten jedoch stark. Lediglich zum Zeitpunkt 120 Stunden nach Infektion ließ sich erneut eine signifikant erhöhte CCL2-mRNA-Akkumulation in der infizierten WT-Maus im Vergleich zu naiven WT-Tieren feststellen ( $p < 0,05$ ). In der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus hingegen war keine erhöhte Expression von CCL2 auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Stattdessen konnte 12 Stunden nach Infektion eine signifikant reduzierte mRNA-Akkumulation im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen ermittelt werden ( $p < 0,05$ ). Ebenso zeigte sich die CCR2-mRNA-Akkumulation in der WT-Maus im Vergleich zur TY-Kontrolle sowohl 24 Stunden ( $p < 0,05$ ) als auch 72 Stunden ( $p < 0,05$ ) nach Infektion signifikant erhöht (Abb. 2.1.2 B). Wie bereits für CCL2 gezeigt, war auch die CCR2-mRNA-Akkumulation in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen 24 Stunden nach Infektion im Vergleich zu WT-Tieren signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 2.1.2: mRNA-Akkumulation von CCL2 und CCR2 in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus.** mRNA-Akkumulation von (A) CCL2 und (B) CCR2 in der Leber von mit *E. histolytica* Trophozoiten infizierten WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen im zeitlichen Verlauf; (n = 3 – 6). (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in der infizierten Leber männlicher IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant weniger CCL2- sowie CCR2-mRNA akkumulierte.

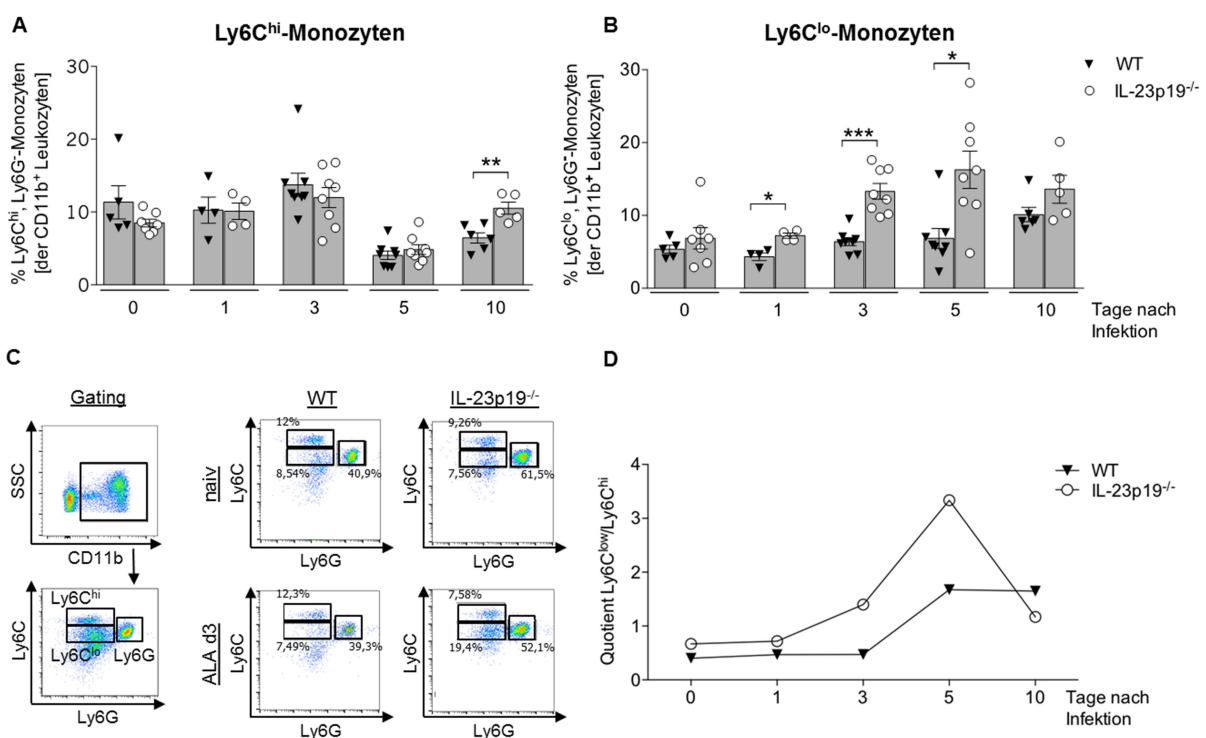
### 2.1.3 Rekrutierung von Monozyten in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus

Inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten werden durch Bindung des Liganden CCL2 an ihr Oberflächenmolekül CCR2 entlang eines Chemokin-Gradienten zum infizierten Gewebe rekrutiert. Wie bereits gezeigt werden konnte, reduziert der *Knockout* von IL-23p19 sowohl die Akkumulation der CCL2- als auch der CCR2-mRNA in der infizierten Leber. Daher sollte im Folgenden der Einfluss von IL-23 auf die Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>- und regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten untersucht werden.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach intrahepatischer Infektion von männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen mit *E. histolytica* Trophozoiten wurde der infizierte Leberlappen entnommen und die Leukozyten mittels Dichtegradienten von den übrigen Zellen getrennt. Durch eine Inkubation der Zellen mit gegen CD11b, Ly6C und Ly6G gerichteten Antikörpern konnten anschließend die Populationen der Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Durchflusszytometer mittels entsprechender *Gating*-Strategie (Abb. 2.1.3 C) sichtbar gemacht werden.

## Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigten, dass sich der prozentuale Anteil inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im Lebergewebe der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus weder im Vergleich zur naiven Kontrolle noch zu infizierten WT-Tieren änderte. Erst 10 Tage nach Infektion konnte im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen ein signifikanter Anstieg in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Tieren beobachtet werden ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.1.3 A). Im Gegensatz dazu stieg der prozentuale Anteil der regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus bereits 24 Stunden nach Infektion im Vergleich zu WT-Tieren signifikant an ( $p < 0,05$ ). An Tag 3 nach Infektion war dieser Unterschied am deutlichsten ( $p < 0,001$ ), an Tag 10 nach Infektion glich sich der prozentuale Anteil regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in IL-23p19<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen an. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Verhältnis zu inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Tieren höher ist, als in der WT-Maus (Abb. 2.1.3 D).



**Abbildung 2.1.3: Rekrutierung von Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus.** WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Mittels Durchflusszytometer wurde der prozentuale Anteil (A) inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und (B) regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im infizierten Lebergewebe von WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen bestimmt. (C) Gating-Strategie zur Identifikation der Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten. (D) Verhältnis der Anzahl von Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zu Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im infizierten Lebergewebe von WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen (für n siehe (A) und (B)). (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dreier unabhängiger Experimente; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend zeigte sich in Abwesenheit von IL-23 eine verstärkte Akkumulation regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten.

### 2.1.4 Rekrutierung von Monozyten in der CCR2<sup>-/-</sup>-Maus

Die Bindung des CCL2-Liganden an den Chemokin-Rezeptor CCR2 auf der Oberfläche inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten bedingt dessen Rekrutierung in infiziertes Gewebe. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die CCL2-Expression nach Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten signifikant ansteigt. Im Folgenden sollte daher untersucht werden wie sich der *Knockout* von CCR2



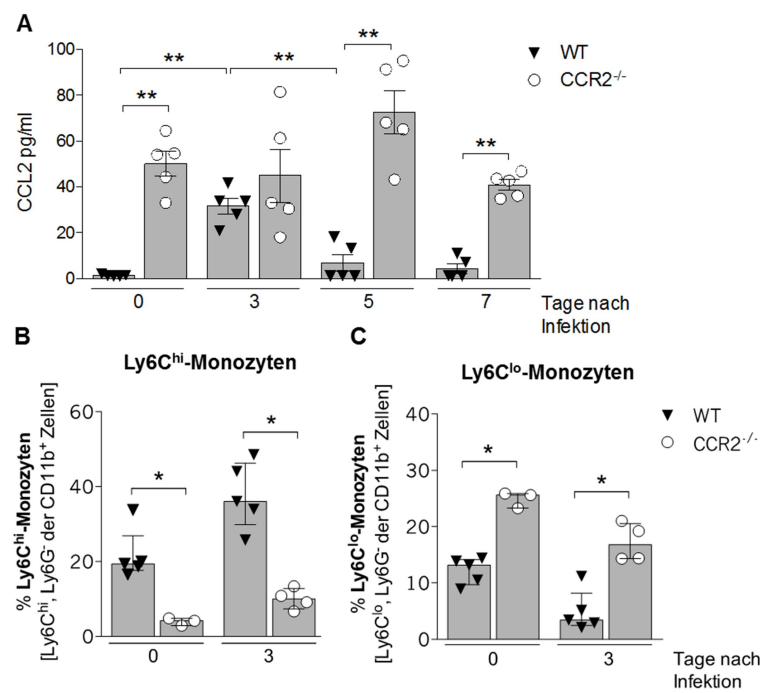
## Ergebnisse

auf die CCL2-Akkumulation und die Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>- und regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten auswirkt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach intrahepatischer Infektion männlicher WT- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten erfolgte die Entnahme peripheren Blutes. Mittels ELISA wurden die CCL2-Serumlevel der infizierten Tiere bestimmt. Weiterhin erfolgte eine Leukozyten-Isolation aus dem Gesamt-Blut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Nach Inkubation der aus dem Blut gewonnenen Zellen mit gegen CD11b, Ly6C und Ly6G gerichteten Antikörpern wurde die Rekrutierung der Monozyten-Populationen am Durchflusszytometer ermittelt.

Bereits in naiven CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten sich deutlich erhöhte CCL2-Serumlevel ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur naiven WT-Maus (Abb. 2.1.4 A). Selbiges war an Tag 5 und 7 nach Infektion mit *E. histolytica* zu beobachten. In WT-Mäusen konnten drei Tage nach Infektion eine signifikant erhöhte CCL2-Expression ( $p < 0,01$ ) sowie ähnliche Serumlevel wie in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ermittelt werden.

Sowohl in naiven als auch in infizierten CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen war der prozentuale Anteil inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten an Tag 3 nach Infektion im Vergleich zur WT-Maus signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ), der Anteil der regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten stattdessen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).



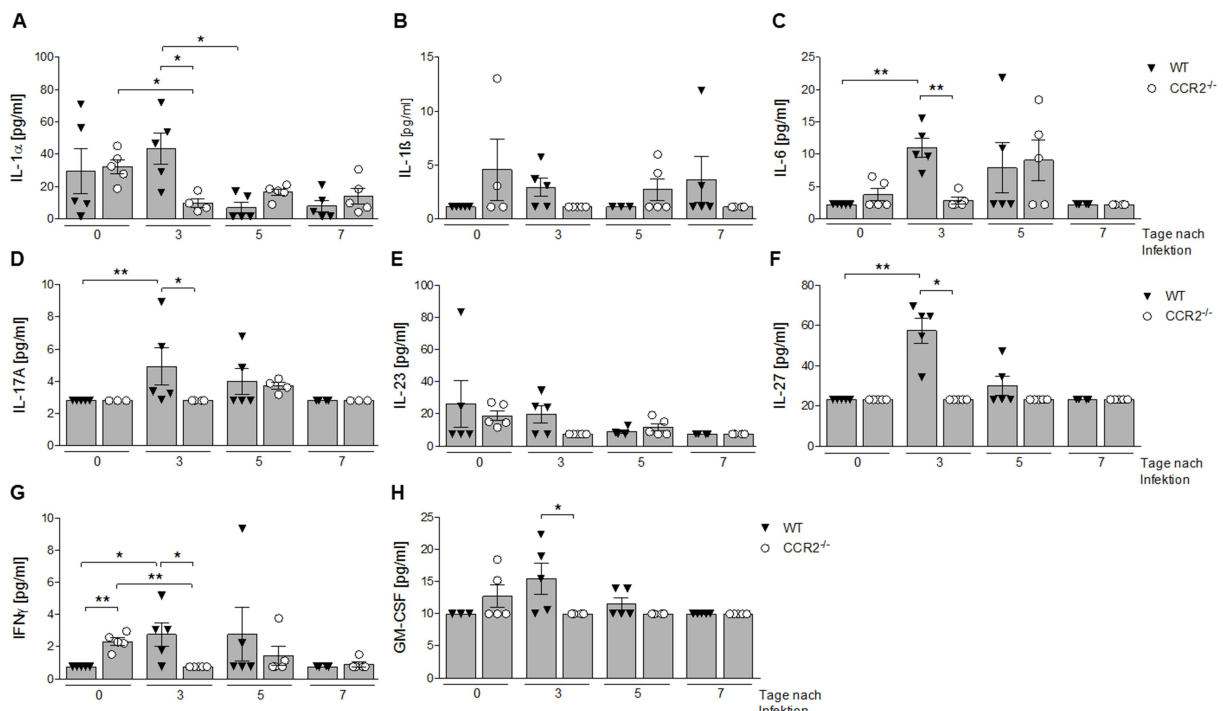
**Abbildung 2.1.4: Rekrutierung von Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in der CCR2<sup>-/-</sup>-Maus.** (A) Per ELISA ermittelte CCL2-Serumlevel in mit *E. histolytica* Trophozoiten infizierten WT- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie der am Durchflusszytometer bestimmte prozentuale Anteil (B) inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und (C) regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im infizierten Lebergewebe von WT- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Zusammenfassend zeigte sich im infizierten Lebergewebe von CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ein Rückgang der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten sowie eine Zunahme der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten und somit eine konträre Verschiebung des Monozyten-Gleichgewichts im Vergleich zur infizierten WT-Maus.

### 2.1.5 Zytokin-Expression in der CCR2<sup>-/-</sup>-Maus nach Infektion mit *E. histolytica*

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der *Knockout* von CCR2 einen Einfluss auf das Gleichgewicht der Monozytenpopulationen im infizierten Lebergewebe hat. Im Folgenden sollte des Weiteren der Einfluss des CCR2-*Knockouts* auf das Zytokinmilieu im infizierten Gewebe untersucht werden.

An Tag 3, 5 und 7 nach intrahepatischer Infektion männlicher WT- sowie CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten erfolgte jeweils eine Blutentnahme mit anschließender Gewinnung des Serums. Mittels *Bead*-basiertem Immunoassay (LEGENDplex™) wurde das Expressionsprofil verschiedener als pro-inflammatorisch geltender Zytokine im Blutserum ermittelt. Als Kontrolle diente Serum nicht infizierter WT- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse.



**Abbildung 2.1.5: Zytokin-Expressionsprofil in der CCR2<sup>-/-</sup>-Maus.** WT- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die mRNA-Akkumulation im Blutserum mittels *Bead*-basiertem Immunoassay zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. (A) IL-1 $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-6, (D) IL-17A, (E) IL-23, (F) IL-27, (G) IFN $\gamma$  und (H) GM-CSF Serumlevel in infizierten WT- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Drei Tage nach Infektion zeigte sich die IL-1 $\alpha$ -Expression in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen sowohl im Vergleich zur WT- als auch zur naiven CCR2<sup>-/-</sup>-Maus signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.1.5 A). An Tag 5 nach Infektion konnte zudem in WT-Mäusen ein signifikanter Rückgang ( $p < 0,05$ ) der IL-1 $\alpha$ -Expression nachgewiesen werden. Die Expression von IL-1 $\beta$  blieb im Blut weitestgehend unverändert (Abb. 2.1.5 B). Es zeigte sich lediglich eine tendenziell erhöhte IL-1 $\beta$ -Expression in der CCR2<sup>-/-</sup>-Maus, verglichen mit naiven sowie drei Tage infizierten WT-Mäusen. Die IL-6-Expression stieg in der WT-Maus an Tag 3 nach Infektion signifikant an ( $p < 0,01$ ) und war auch im Vergleich zur CCR2<sup>-/-</sup>-Maus signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.1.5 C). An Tag 5 nach Infektion blieb die IL-6-Expression in WT-Mäusen auf demselben Level, wohingegen die Expression in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen tendenziell anstieg. Auch die Expression von IL-17A stieg in WT-Mäusen drei Tage nach Infektion

signifikant an ( $p < 0,01$ ) und war auch verglichen zur CCR2<sup>-/-</sup>-Maus an Tag 3 nach Infektion signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.1.5 D). Die IL-23-Expression zeigte sich im Blut sowohl in WT- als auch in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infektion unverändert (Abb. 2.1.5 E). Die IL-27-Expression stieg hingegen in WT-Mäusen an Tag 3 nach Infektion signifikant an ( $p < 0,01$ ) und war zu diesem Zeitpunkt auch im Vergleich zur CCR2<sup>-/-</sup>-Maus signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.1.5 F). In naiven CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte, verglichen zu naiven WT-Mäusen, signifikant mehr IFN $\gamma$  nachgewiesen werden ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.1.5 G). An Tag 3 nach Infektion stieg jedoch die IFN $\gamma$ -Expression in WT-Tieren signifikant an, ( $p < 0,05$ ) wohingegen diese in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant abnahm ( $p < 0,01$ ). Dies führte dazu, dass an Tag 3 nach Infektion in der WT-Maus signifikant mehr IFN $\gamma$  nachgewiesen werden konnte, als in CCR2<sup>-/-</sup>-Tieren. Die Expression vom GM-CSF zeigte sich an Tag 3 nach Infektion in WT-Mäusen im Vergleich zur CCR2<sup>-/-</sup>-Maus signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.1.5 H). Zu anderen Zeitpunkten nach Infektion konnte keine differenzielle Expression von GM-CSF nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnten insbesondere an Tag 3 nach Infektion im Blut infizierter CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse geringere Mengen inflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden, als in WT-Mäusen.

## 2.2 Einfluss des *Knockouts* von IL-23 auf regulatorische Mechanismen und Zellen in der Leber

Im vorigen Abschnitt dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der *Knockout* des pro-inflammatorischen Zytokins IL-23 verringerte Abszessvolumina sowie eine erhöhte Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im infizierten Lebergewebe mit sich bringt. Dies lässt darauf schließen, dass in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus nicht nur inflammatorische Prozesse reduziert sind, sondern möglicherweise zusätzlich regulatorische Prozesse in Gang gesetzt werden, die zur Regeneration des Gewebes beitragen.

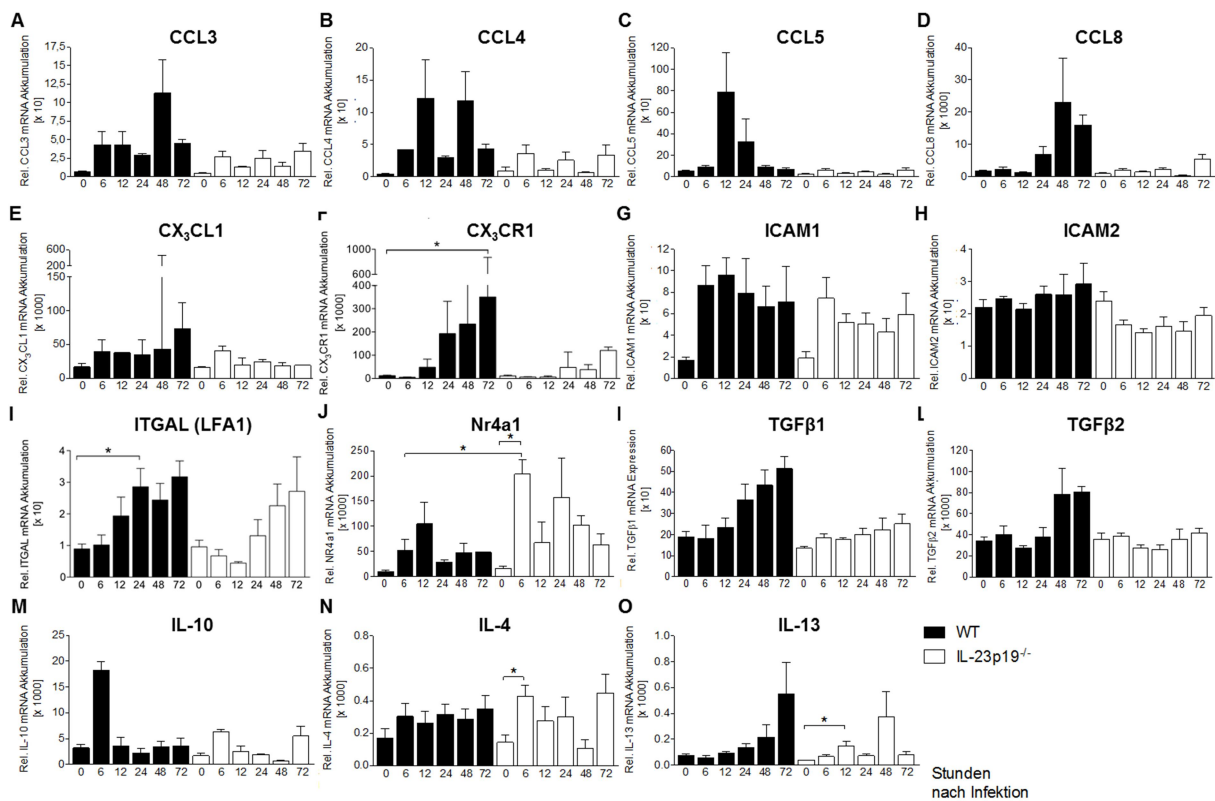
Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden männliche WT- sowie IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die mRNA-Akkumulation verschiedener assoziierter Moleküle mittels *qPCR* ermittelt. Hierzu zählen die Chemokine CCL3, CCL4, CCL5 und CCL8 die an CCR5 auf der Oberfläche der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten binden und so die Zellen entlang eines Gradienten zum infizierten Gewebe rekrutieren können. Des Weiteren wurde der Einfluss von IL-23 auf die Akkumulation von Adhärenzfaktoren der regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten untersucht. Hierzu zählen der Oberflächenrezeptor CX<sub>3</sub>CR1 auf den Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten, der dessen Liganden CX<sub>3</sub>CL1 auf den Epithelien bindet, sowie ICAM1 und ICAM2, epithelgebundene Proteine die mit dem zelleigenen Integrin LFA1 (ITGAL) der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in Wechselwirkung treten. Auch die Expression des Transkriptionsfaktors Nr4a1, welcher ein Überlebenssignal für Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten darstellt, wurde nach Infektion im Lebergewebe der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus untersucht. Schließlich wurden die Akkumulation der Zytokine TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, IL-4, IL-10 und IL-13 ermittelt, welche in die Polarisierung der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zu M2-Makrophagen involviert sind.

Darüber hinaus wurde der Anteil inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>- und regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im infizierten Lebergewebe, sowie die Expression des Th2-Zytokins IL-13 verschiedener Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen analysiert. Ebenso wurde der Abszessverlauf nach Depletions-Experimenten sowie in transgenen Mäusen im MRT untersucht. Immunhistologische Färbungen dienten zudem der räumlichen Lokalisation iNOS-positiver inflammatorischer und Arg1-positiver regenerativer Monozyten- und Makrophagen-Populationen im Lebergewebe nach Infektion.

### 2.2.1 Einfluss von IL-23 auf die Rekrutierung regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten

Im vorigen Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren, in welchen pro-inflammatorisches IL-23 nach Infektion verstärkt exprimiert wird, signifikant erhöht war. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Zytokin IL-23 einen negativ regulatorischen Effekt auf die Rekrutierung der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten hat.

Um dies zu untersuchen, erfolgte eine intrahepatische Infektion männlicher WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde der infizierte Leberlappen entnommen, die Gesamt-RNA isoliert und mittels qPCR die Akkumulation relevanter Faktoren ermittelt, die in die Rekrutierung (CCL3, CCL4, CCL5, CCL8), die Adhäsion (CX<sub>3</sub>CL1, CX<sub>3</sub>CR1, ICAM1, ICAM2, ITGAL (LFA1)) und das Überleben (Nr4a1) der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten sowie die Polarisierung dieser zu verschiedenen M2-Makrophagen-Subtypen (TGFβ1, TGFβ2, IL-4, IL-10, IL-13) involviert sind.



**Abbildung 2.2.1:** mRNA-Akkumulation von in die Rekrutierung und Polarisierung regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten involvierten Chemokinen, Zytokinen und Adhärenzfaktoren in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus. WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die mRNA-Akkumulation in der Leber mittels qPCR zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. (A) CCL3, (B) CCL4, (C) CCL5, (D) CCL8, (E) CX<sub>3</sub>CL1, (F) CX<sub>3</sub>CR1, (G) ICAM1, (H) ICAM2, (I) ITGAL (LFA1), (J) Nr4a1, (K) TGFβ1, (L) TGFβ2, (M) IL-10, (N) IL-4 und (O) IL-13-mRNA-Akkumulation in WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen; (n = 4 – 5). (Mittelwerte ± Standardfehler; Mann-Whitney U test; \*p < 0,05).

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation der in die Rekrutierung involvierten Chemokine CCL3, CCL4, CCL5 und CCL8 in WT-Mäusen tendenziell höher war, als in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus (Abb. 2.2.1 A – D). Dieselbe Beobachtung konnte für die Adhärenzfaktoren CX<sub>3</sub>CL1, CX<sub>3</sub>CR1, ICAM1, ICAM2 und ITGAL (LFA1) angestellt werden (Abb. 2.2.1 E – I). Die Expression des

Transkriptionsfaktors Nr4a1, der unter anderem für das Überleben der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten notwendig ist, war hingegen sechs Stunden nach Infektion in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus sowohl im Vergleich zu infizierten WT- als auch zu naiven IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.2.1 J). Die Akkumulation der in die M2c-Polarisierung involvierten Zytokine TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 und IL-10 zeigte sich in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus wiederum im Vergleich zum WT-Tier nicht erhöht (Abb. 2.2.1 K – M). Bezüglich der M2a-Polarisierung war jedoch eine erhöhte Akkumulation zweier involvierter Faktoren zu beobachten: Die IL-4 Akkumulation stieg in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen sechs Stunden nach Infektion signifikant an ( $p < 0,05$ ), was in der WT-Maus nicht zu beobachten war (Abb. 2.2.1 J). 12 Stunden nach Infektion konnte zudem in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus ein signifikanter Anstieg der IL-13 Akkumulation gezeigt werden ( $p < 0,05$ ), der ebenfalls nicht in WT-Mäusen nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.2.1 K).

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass IL-23 scheinbar weder die Rekrutierung noch die Adhäsion der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten beeinflusst, jedoch einen Einfluss auf die Polarisierung der Monozyten zu M2-Makrophagen hat.

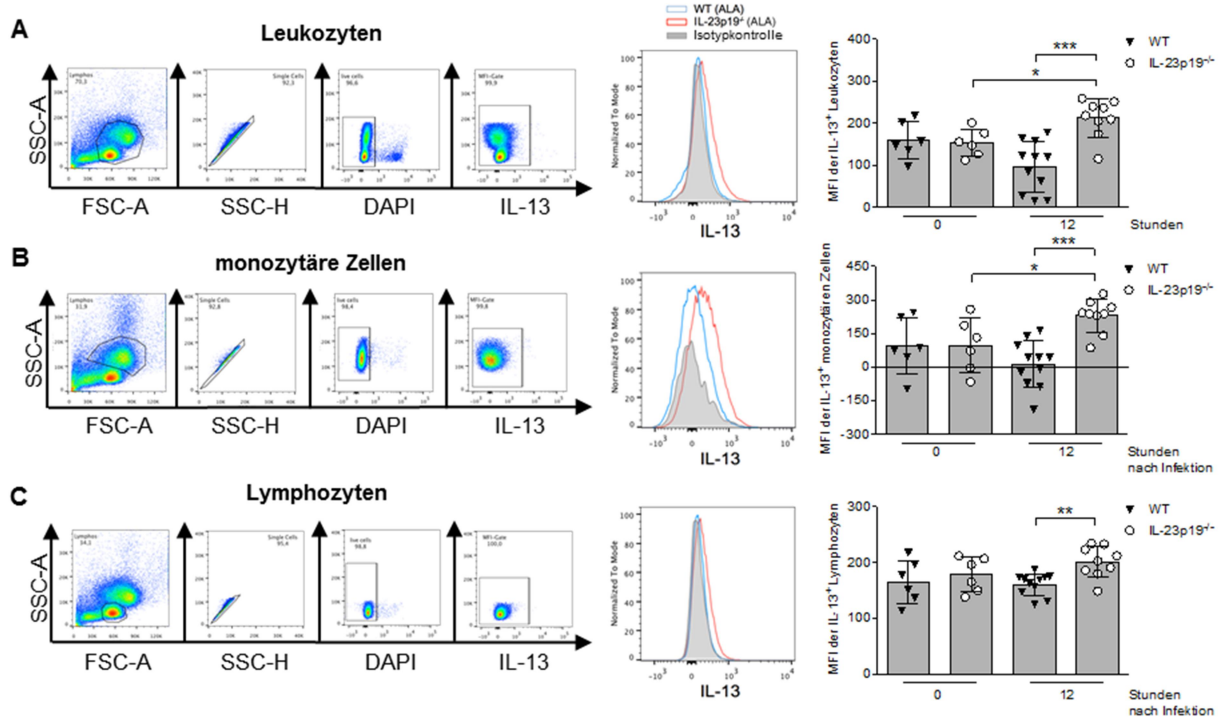
### 2.2.2 IL-13-Expression verschiedener übergeordneter Zellpopulationen im infizierten Lebergewebe der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus

Die Ergebnisse der *q*PCR zeigten, dass IL-23 einen Einfluss auf die Expression des Th2-Zytokins IL-13 auf mRNA-Ebene hat. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen auch auf Protein-Ebene ein solcher Unterschied ersichtlich wird, und ob eine differenzielle IL-13-Expression verschiedener übergeordneter Zellpopulationen zu ermitteln ist.

Um dies zu prüfen, erfolgte eine intrahepatische Infektion männlicher WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten. 12 Stunden nach Infektion wurde jeweils der infizierte Leberlappen entnommen, mittels Dichtegradienten die Gesamt-Leukozyten isoliert und eine intrazelluläre Färbung von IL-13 zur Analyse am Durchflusszytometer durchgeführt. Für die Auswertung wurde die durch die Software *FlowJo* ermittelte *Mean Fluorescent Intensity* (MFI) von IL-13 der jeweils untersuchten Zellpopulationen herangezogen. Dabei stellt die MFI die mittlere Fluoreszenzintensität einer ausgewählten Zellpopulation in Bezug auf einen spezifischen FACS-Antikörper dar. Zur Kontrolle wurden die Leukozyten nicht infizierter Tiere entsprechend des beschriebenen Verfahrens ebenfalls am FACS analysiert.

Für die Gesamt-Leukozyten-Population konnte in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus 12 Stunden nach Infektion eine signifikant erhöhte IL-13-MFI sowohl im Vergleich zur naiven IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus ( $p < 0,05$ ) als auch zum infizierten WT-Tier ( $p < 0,001$ ) gezeigt werden (Abb. 2.2.2 A). Die IL-13-MFI der gesamten Population monozytärer Zellen war in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus 12 Stunden nach Infektion ebenfalls signifikant erhöht, sowohl verglichen zur naiven IL-23p19<sup>-/-</sup>- ( $p < 0,05$ ) als auch zur infizierten WT-Maus ( $p < 0,001$ ) (Abb. 2.2.2 B). Die Lymphozyten-Population zeigte in infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen hingegen lediglich im Vergleich zur infizierten WT-Maus eine signifikant erhöhte IL-13-MFI, wobei der Anstieg verglichen mit der Population der monozytären Zellen weniger deutlich ausfiel ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.2.2 C).

## Ergebnisse



**Abbildung 2.2.2: Durchflusszytometrische Bestimmung der IL-13-Produktion von Leukozyten, monozytären Zellen und Lymphozyten in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus.** WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die Leberlymphozyten 12 Stunden nach Infektion am Durchflusszytometer analysiert. *Gating*-Strategie, Histogramme und quantitative Analyse der (A) IL-13<sup>+</sup> Leukozyten, (B) IL-13<sup>+</sup> monozytären Zellen und (C) IL-13<sup>+</sup> Lymphozyten. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler zweier unabhängiger Experimente; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Population monozytärer Zellen für eine erhöhte Expression von IL-13 in infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen verantwortlich ist.

### 2.2.3 Bestimmung der IL-13 exprimierenden Monozyten-Population in der infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus

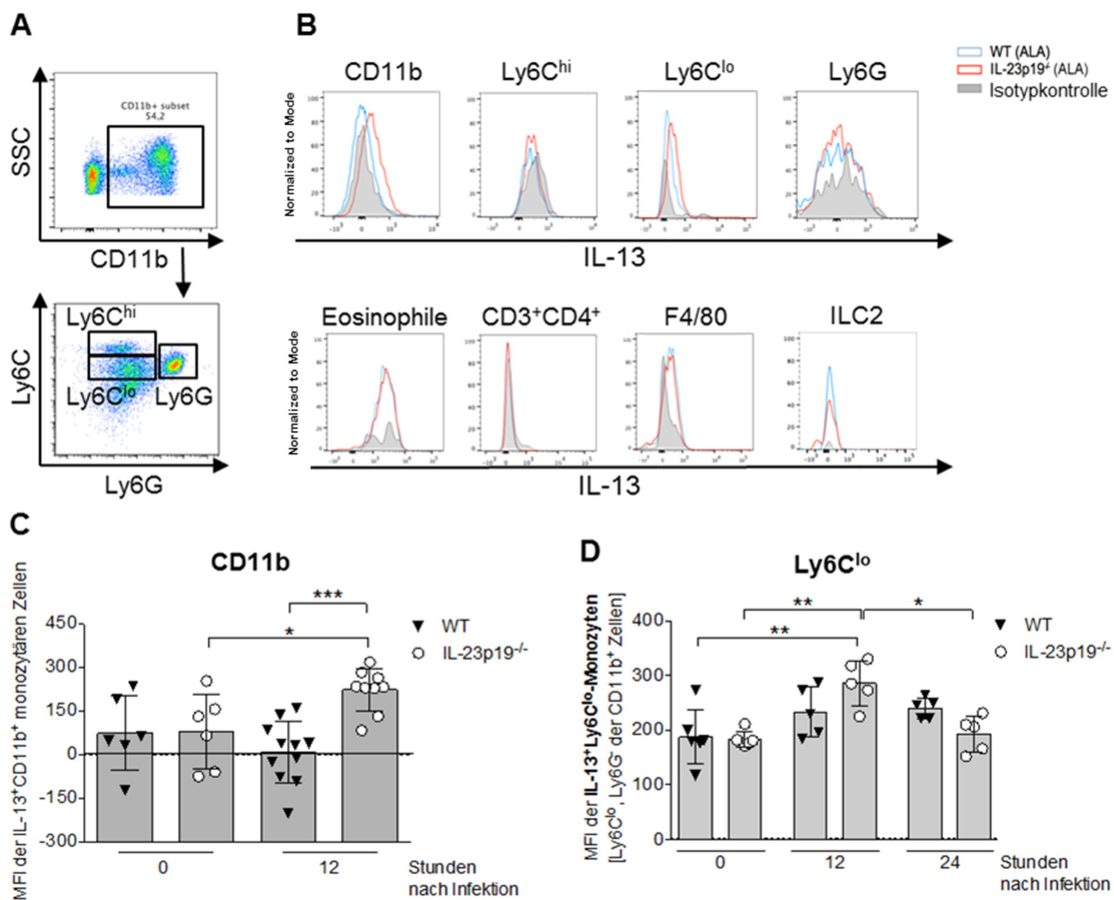
Im vorigen Abschnitt konnte nach Infektion von IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen insbesondere für die Population der monozytären Zellen eine erhöhte IL-13-Expression nachgewiesen werden. Im Weiteren sollte die IL-13 exprimierende Population in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus genauer bestimmt werden.

Hierzu wurde 12 Stunden nach intrahepatischer Infektion männlicher WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten jeweils der infizierte Leberlappen entnommen und mittels Dichtegradienten die Gesamt-Leukozyten isoliert. Die Zellen wurden mit entsprechenden FACS-Antikörpern markiert und die Fluoreszenz am Durchflusszytometer ermittelt. Hierbei wurden Antikörper gegen CD11b (Monozyten), Ly6C und Ly6G (inflammatorische und regenerative Monozyten sowie Neutrophile entsprechend der dargestellten *Gating*-Strategie (Abb. 2.2.3 A), Siglec-F (Eosinophile), CD3 und CD4 (T-Helferzellen), F4/80 (Gewebs-Makrophagen) sowie CD127, CD90.2 und lin<sup>-</sup>-AKs (ILC2) verwendet. Mit Hilfe der *FlowJo*-Software wurde anschließend die IL-13-MFI der entsprechenden Zellpopulationen ermittelt. Zur Kontrolle wurden die Gesamt-Leukozyten nicht infizierter Tiere wie zuvor beschrieben behandelt und ebenfalls mittels Durchflusszytometer untersucht.

In der infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus konnte im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen keine differenzielle IL-13-Expression in den Populationen der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen,

## Ergebnisse

T-Helferzellen, Lebergewebs-Makrophagen sowie der ILC2-Population ermittelt werden (Abb. 2.2.3 B). Die CD11b<sup>+</sup>-Zellen (Monozyten) sowie die Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zeigten hingegen jeweils eine positive Verschiebung der IL-13-MFI der Gesamtpopulation in infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die quantitative Auswertung der CD11b<sup>+</sup>-Zellen ergab eine signifikant erhöhte IL-13-MFI in der infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus sowohl im Vergleich zu naiven IL-23p19<sup>-/-</sup>- (p < 0,05) als auch zu infizierten WT-Tieren (p < 0,001) (Abb. 2.2.3 C). Die quantitative Auswertung der IL-13-MFI der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozytenpopulation zeigte in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant erhöhte IL-13-Expression 12 Stunden nach Infektion verglichen zur naiven IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus (p < 0,01) (Abb. 2.2.3 D), welche bereits 24 Stunden nach Infektion wieder signifikant abnahm (p < 0,05).



**Abbildung 2.2.3: Identifizierung der IL-13 produzierenden Zellpopulation in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus.** WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die Leberlymphozyten 12 Stunden nach Infektion am Durchflusszytometer analysiert. (A) Gating-Strategie zur Identifikation von Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten sowie Neutrophilen. (B) Histogramm-Darstellung der IL-13-MFI der CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>hi</sup>, Ly6C<sup>lo</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und F4/80<sup>+</sup>Zellpopulation sowie der Eosinophilen und ILC2s 12 Stunden nach Infektion in infizierten WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen. Quantitative Analyse der IL-13-MFI (C) CD11b<sup>+</sup>-Zellen sowie (D) Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten vor und nach Infektion. (Mittelwerte ± Standardfehler zweier unabhängiger Experimente; Mann-Whitney U test; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001).

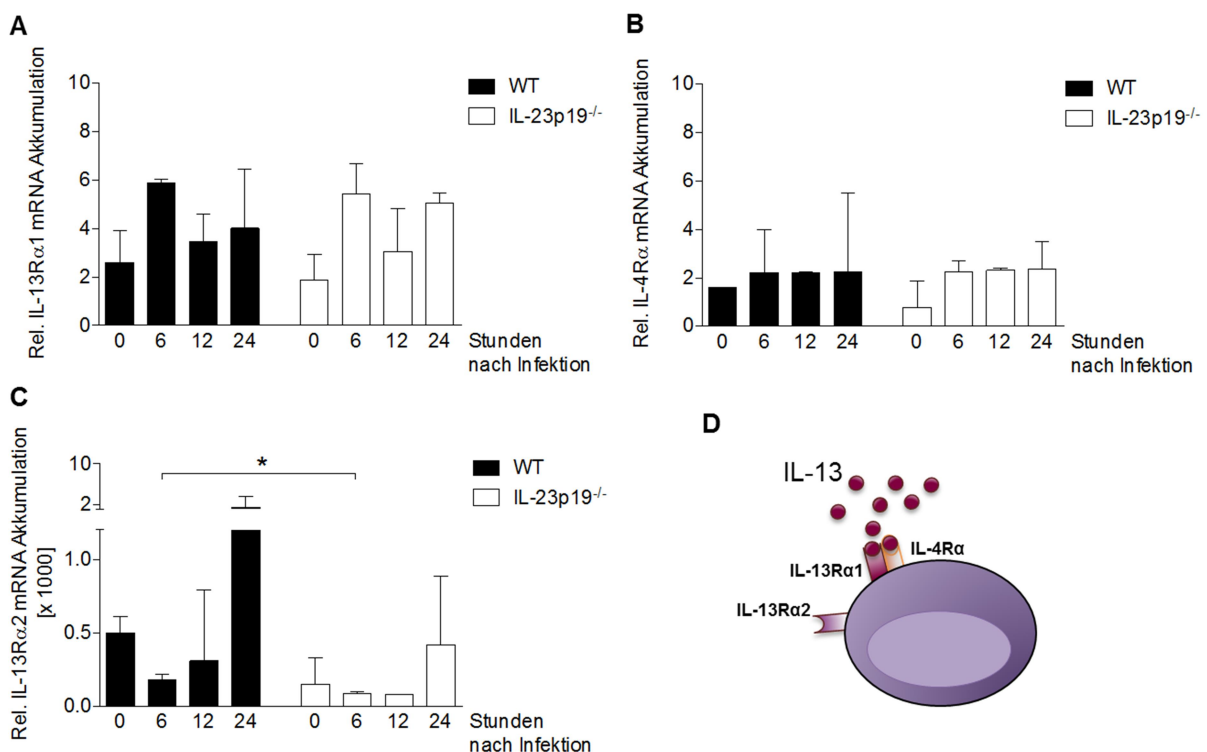
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass innerhalb der untersuchten Zellpopulationen überwiegend CD11b<sup>+</sup>-Zellen sowie CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus verstärkt IL-13 exprimierten.

### 2.2.4 Die Expression der Rezeptoren IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R $\alpha$ und IL-13R $\alpha$ 2 in der infizierten IL-23p19 $^{-/-}$ -Maus

In dieser Arbeit konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene eine erhöhte Expression des Th2-Zytokins IL-13 in infizierten IL-23p19 $^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesen werden, welches im ALA insbesondere von CD11b $^{+}$ -Zellen und Ly6C $^{lo}$ -Monozyten exprimiert wird. Weiterhin ist bekannt, dass zwei IL-13-Rezeptoren mit gegensätzlicher Wirkung existieren (Abb. 2.2.4 D). Die Bindung von IL-13 an seinen heterodimeren Rezeptor IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R $\alpha$  führt dabei zu einer Aktivierung IL-13-spezifischer Th2-Signalkaskaden, wohingegen IL-13R $\alpha$ 2, welcher IL-13 mit signifikant höherer Affinität bindet, die Aktivität des Zytokins inhibiert [137]. Im Folgenden wurde daher die Expression der verschiedenen IL-13-Rezeptoren in der infizierten IL-23p19 $^{-/-}$ -Maus untersucht.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach intrahepatischer Infektion männlicher WT- und IL-23p19 $^{-/-}$ -Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten erfolgte die Entnahme des infizierten Leberlappens. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde die mRNA-Akkumulation von IL-13R $\alpha$ 1, IL-4R $\alpha$  und IL-13R $\alpha$ 2 mittels qPCR bestimmt.

Sowohl die mRNA-Akkumulation von IL-13R $\alpha$ 1, als auch von IL-4R $\alpha$  zeigte weder nach Infektion noch im Vergleich zwischen WT- und IL-23p19 $^{-/-}$ -Mäusen einen Unterschied (Abb. 2.2.4 A und B). Die mRNA-Akkumulation des Rezeptors IL-13R $\alpha$ 2 war hingegen in der IL-23p19 $^{-/-}$ -Maus verglichen zu WT-Mäusen zu jedem Zeitpunkt tendenziell geringer und zeigte sich 6 Stunden nach Infektion signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.2.4 C).



**Abbildung 2.2.4: mRNA-Akkumulation von IL-13R $\alpha$ 1, IL-4R $\alpha$  und IL-13R $\alpha$ 2 in der IL-23p19 $^{-/-}$ -Maus.** WT- und IL-23p19 $^{-/-}$ -Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die mRNA-Akkumulation von (A) IL-13R $\alpha$ 1, (B) IL-4R $\alpha$ 2 und (C) IL-13R $\alpha$ 2 in der Leber mittels qPCR zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. (D) Grafische Darstellung der IL-13-Rezeptoren auf der Zelloberfläche; (n = 3 – 4). (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ ).



## Ergebnisse

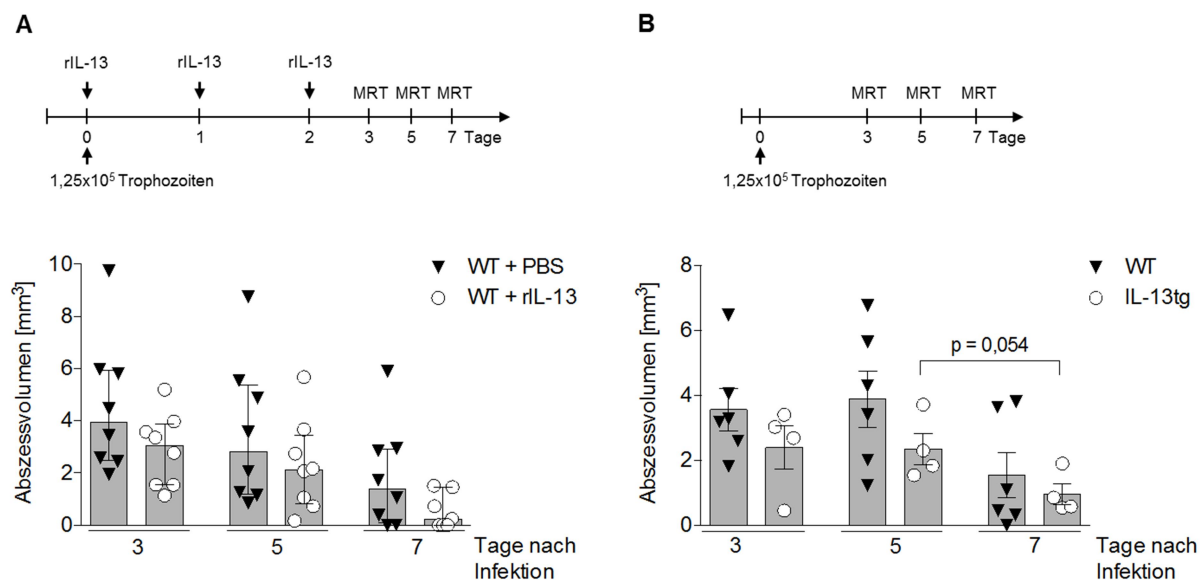
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IL-23 den heterodimeren IL-13 Rezeptor IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R $\alpha$  nicht affiziert, jedoch die Expression des IL-13 hemmenden Rezeptors IL-13R $\alpha$ 2 verstärkt.

### 2.2.5 Auswirkung der Applikation und Überexpression von IL-13 auf den Abszessverlauf

In den vorigen Experimenten dieser Arbeit konnte in den schneller regenerierenden IL-23p19 $^{-/-}$ -Mäusen eine verstärkte Expression des anti-inflammatorischen Th2-Zytokins IL-13 nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich im *Knockout* eine reduzierte Expression des Rezeptors IL-13R $\alpha$ 2, welcher die Aktivität von IL-13 nach dessen Bindung inhibiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine regenerative Wirkung von IL-13 im Verlauf des Amöbenleberabszesses hin, was im Folgenden durch verstärkte IL-13 Präsenz während der Infektion untersucht werden sollte.

Hierzu wurden männliche WT-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und zusätzlich am Tag der Infektion sowie an Tag 1 und 2 nach Infektion 1,2  $\mu$ g rIL-13 in 100  $\mu$ L PBS oder 100  $\mu$ L PBS i.p. appliziert. In einem weiteren Versuch wurden männliche WT- sowie IL-13tg-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert, wobei Letztere das Th2-Zytokin beständig exprimieren. Für beide Versuchsgruppen wurde anschließend der Abszessverlauf an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion mittels MRT bestimmt und die Abszessvolumina mit Hilfe der *OsiriX*-Software ermittelt.

Sowohl die rIL-13 applizierten WT-Mäuse, als auch die IL-13tg-Mäuse zeigten im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe zu jedem Zeitpunkt tendenziell reduzierte Abszessvolumina (Abb. 2.2.5 A und B).



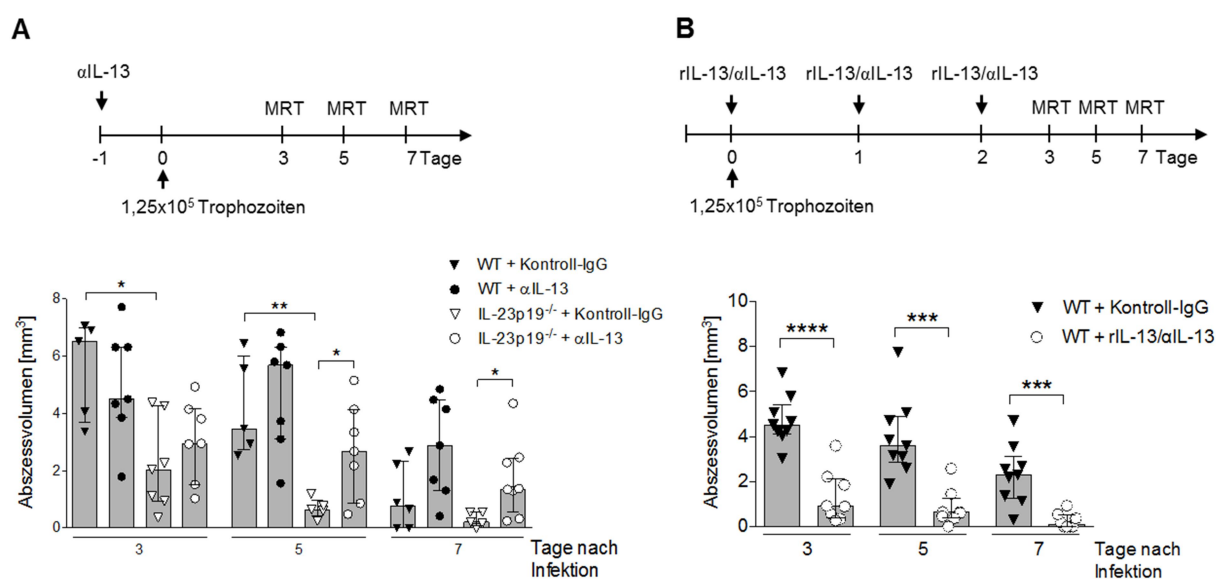
**Abbildung 2.2.5: Abszessausbildung in der WT-Maus nach rIL-13-Applikation sowie in IL-13-transgenen Mäusen.** (A) WT-Mäusen wurde vor der Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten, sowie an Tag 1 und 3 nach Infektion 1,2  $\mu$ g rIL-13 in 100  $\mu$ L PBS oder ausschließlich PBS i.p. appliziert und die Abszessvolumina an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion im MRT ermittelt. (B) WT- und IL-13tg-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die Abszessvolumina an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion mittels MRT bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler zweier jeweils unabhängiger Experimente; Mann-Whitney U test).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf einen geringen regulatorischen Einfluss von IL-13 auf den Amöbenleberabszess hin.

## 2.2.6 Auswirkung der Depletion von IL-13 in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie der Applikation eines rIL-13/αIL-13 Komplexes in der WT-Maus auf den Abszessverlauf

Im vorigen Abschnitt dieser Arbeit konnten tendenziell reduzierte Abszessvolumina durch eine erhöhte Präsenz von IL-13 durch Applikation oder Überexpression erreicht werden. Im Folgenden soll untersucht werden, ob auch die Depletion von IL-13 in der schneller regenerierenden IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus sowie die Applikation eines rIL-13/αIL-13-Komplexes in WT-Mäusen Einfluss auf den Abszessverlauf haben. Hierbei soll der Komplex die Stabilität und Bioverfügbarkeit von IL-13 erhöhen und somit möglichst eine längere Wirksamkeit gewährleisten.

Männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde hierzu einen Tag vor Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten αIL-13 appliziert (Abb. 2.2.6 A). Als Kontrolle dienten sowohl infizierte IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse denen ein Kontroll-IgG verabreicht wurde, als auch WT-Mäuse, die entsprechende Mengen αIL-13 oder Kontroll-IgG erhielten. In einem weiteren Versuch wurden männliche WT-Mäuse zunächst mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Anschließend erfolgte am Tag der Infektion sowie an Tag 1 und 2 nach Infektion die Applikation eines rIL-13/αIL-13-Komplexes. Der Abszessverlauf der Versuchsgruppen wurde an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion mittels MRT bestimmt und die Abszessvolumina mit Hilfe der *OsiriX*-Software ermittelt.



**Abbildung 2.2.6: Abszessausbildung in WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen nach IL-13-Depletion sowie in der WT-Maus nach Applikation eines rIL-13/αIL-13-Komplexes.** (A) WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden einen Tag vor der Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten 100 µg αIL-13 oder 100 µg Kontroll-IgG i.p. appliziert und die Abszessvolumina an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion im MRT ermittelt. (B) WT-Mäusen wurde direkt nach intrahepatischer Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten, sowie an Tag 1 und 2 nach Infektion ein rIL-13/αIL-13-Komplex (1,2 µg rIL-13 und 6,4 µg αIL-13 in 150 µL PBS) oder Kontroll-IgG (6,4 µg IgG in 150 µL PBS) i.p. appliziert und die Abszessvolumina mittels MRT bestimmt. (Mittelwerte ± Standardfehler zweier jeweils unabhängiger Experimente; Mann-Whitney U test; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001).

Die Depletion von IL-13 führte in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Tieren zu signifikant erhöhten Abszessvolumina an Tag 5 und 7 nach Infektion (p < 0,05) und in der WT-Maus zu tendenziell erhöhten Abszessvolumina zu denselben Zeitpunkten nach Infektion (Abb. 2.2.6 A). In den Kontrollgruppen der IgG-applizierten WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte ein für die jeweilige Mausgruppe bekannter Abszessverlauf beobachtet werden. Die Applikation des rIL-13/αIL-13-Komplexes führte in WT-Mäusen zu signifikant

reduzierten Abszessvolumina an Tag 3 ( $p < 0,0001$ ), 5 und 7 ( $p < 0,001$ ) nach Infektion, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 2.2.6 B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Depletion von IL-13 zu vergrößerten und die Applikation eines Zytokin-stabilisierenden rIL-13/ $\alpha$ IL-13-Komplexes zu verringerten Abszessvolumina führte.

### 2.2.7 Expression von Arg1 und iNOS in der infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus

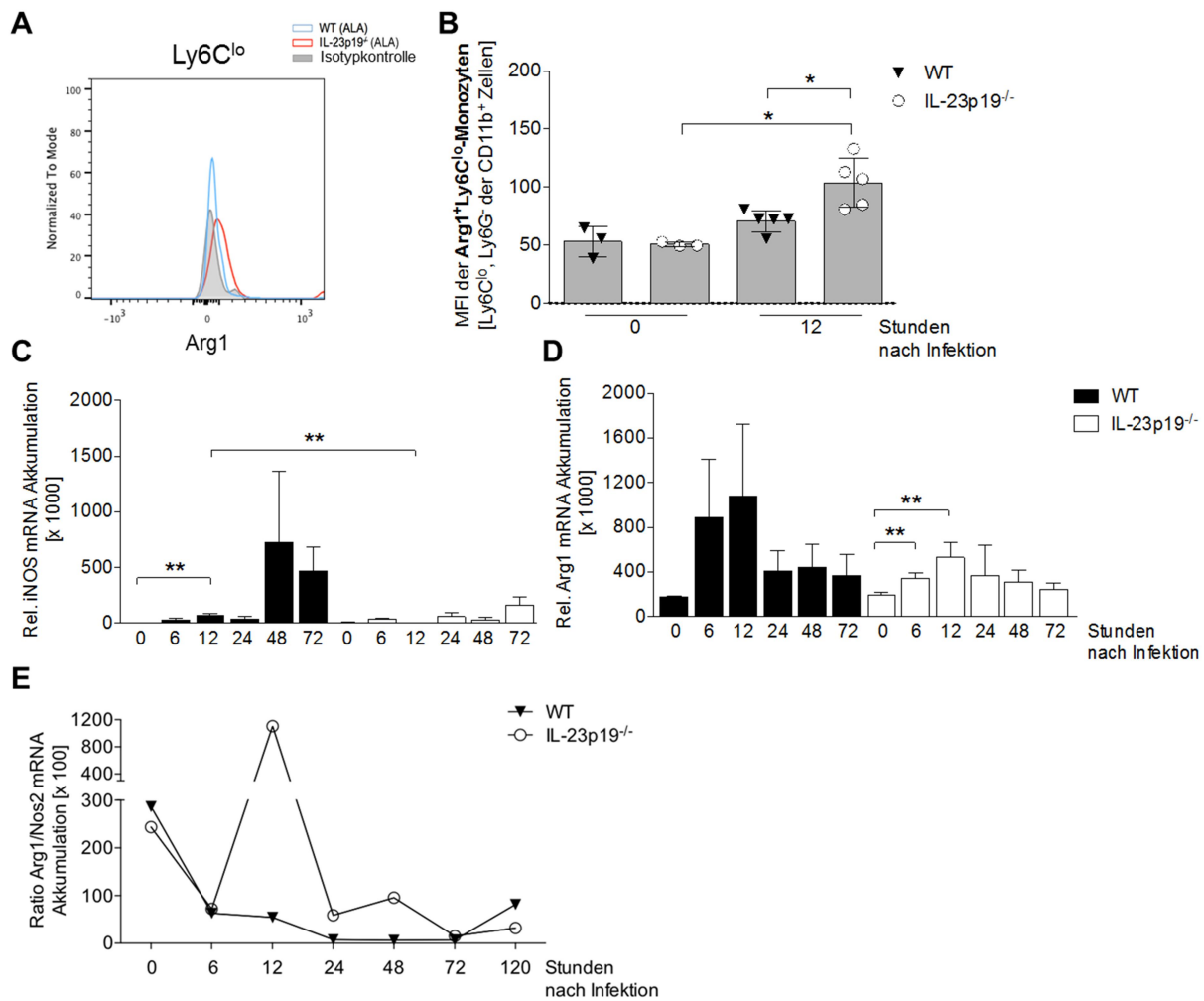
In vorigen Untersuchungen dieser Arbeit konnte in der schneller regenerierenden IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus nicht nur eine erhöhte Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Gewebe und eine verstärkte Expression des Th2-Zytokins IL-13 gezeigt werden, sondern auch, dass die Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten selbst zur erhöhten IL-13-Produktion beitragen. IL-13 kann eine Polarisierung der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zu regulatorischen M2-Makrophagen induzieren [31], welche zur Wundheilung und Regeneration des infizierten Gewebes via Arg1-Expression beitragen. Arg1 wiederum reduziert die Synthese schädlicher Stickstoffmonoxide (NO) im Gewebe [30]. Daher sollte im Folgenden die Arg1-Expression durch Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im infizierten Lebergewebe in Abhängigkeit von IL-23, sowie die generelle Expression von Arg1 und dessen Gegenspieler, die induzierbare Stickstoff-monoxidsynthase (iNOS), im beschädigten Gewebe untersucht werden.

Hierzu wurden männliche WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und der entsprechende Leberlappen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion entnommen. Für die Untersuchung der Arg1-MFI der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten-Population erfolgte eine Aufreinigung der Gesamt-Leukozyten mittels Dichtegradienten. Anschließend wurden die Zellen mit entsprechenden Fluoreszenzantikörpern inkubiert und am Durchflusszytometer vermessen. Für die Bestimmung der mRNA-Akkumulation von Arg1 und iNOS mittels qPCR wurde die Gesamt-RNA des infizierten Leberlappens isoliert und analysiert.

Bereits im Histogramm war eine positive Verschiebung der Arg1-MFI der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten-Population in infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen zu erkennen (Abb. 2.2.7 A). Die quantitative Auswertung diesbezüglich ergab eine signifikant höhere Arg1-Expression der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen 12 Stunden nach Infektion im Vergleich zu naiven IL-23p19<sup>-/-</sup>-Tieren ( $p < 0,05$ ) sowie zu infizierten WT-Mäusen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.2.7 B). Ebenfalls 12 Stunden nach Infektion konnte in WT-Mäusen im Vergleich zu naiven WT-Mäusen ( $p < 0,01$ ) als auch zu infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Tieren ( $p < 0,01$ ) eine signifikant erhöhte Akkumulation der iNOS-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 2.2.7 C). Eine signifikant erhöhte Akkumulation der Arg1-mRNA konnte wiederum in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits 6 Stunden sowie 12 Stunden nach Infektion beobachtet werden ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.2.7 D). Das Verhältnis der Arg1-mRNA-Akkumulation zur iNOS-mRNA-Akkumulation war zudem 12 Stunden nach Infektion in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren um das 24-Fache erhöht (Abb. 2.2.7 E).

Zusammenfassend konnte nicht nur deutlich mehr Arg1 als iNOS in infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden, es konnte ebenso gezeigt werden, dass die regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zur erhöhten Arg1-Akkumulation im Lebergewebe beitragen.

## Ergebnisse



**Abbildung 2.2.7: Expression von Arg1 und iNOS in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus nach Infektion.** (A) Darstellung der Arg1-Expression der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Histogramm sowie (B) quantitative Auswertung der Arg1-MFI der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten nach Analyse der Leberlymphozyten in mit *E. histolytica* infizierten WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen am Durchflusszytometer. mRNA-Akkumulation von (C) iNOS und (D) Arg1 im mit *E. histolytica* infizierten Lebergewebe zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion; (n = 4 – 5). (E) Verhältnis der Arg1-mRNA-Expression zur Expression von iNOS-mRNA in WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen während des Abszessverlaufs. (Mittelwerte ± Standardfehler; Mann-Whitney U test; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01).

### 2.2.8 Immunhistologische Lokalisation von Monozyten und Makrophagen in infizierten WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie Arg1, iNOS und Ki-67 exprimierender Zellen

Bisherige Ergebnisse machten eine Beteiligung von Monozyten und Makrophagen am Abszessverlauf deutlich. Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten, die im Gewebe zu M1-Makrophagen differenzieren, können durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Faktoren wie TNF $\alpha$  und NO zur Abszessausbildung in infizierten WT-Mäusen beitragen. Arg1 exprimierende regenerative Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten, die nach dem Eindringen in das Gewebe zu alternativ aktivierten M2-Makrophagen differenzieren, scheinen wiederum in der schneller regenerierenden IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus an der Abszesskontrolle beteiligt zu sein. Der Nachweis des Amöbenleberabszesses kann nicht nur mittels MRT, sondern auch durch immunhistologische Färbungen erfolgen, eine Methode, die sowohl die Identifikation von Zellpopulationen als auch die lokale Expression verschiedenster Faktoren innerhalb des Gewebes ermöglicht. Im Folgenden wurden daher immunhistologische Präparate verwendet, um verschiedene Immunzellen sowie die Faktoren Arg1, iNOS und den Proliferationsmarker Ki-67 im Gewebe infizierter WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse an Tag 3 nach Infektion sichtbar zu machen und ihre Lokalisation zu bestimmen.

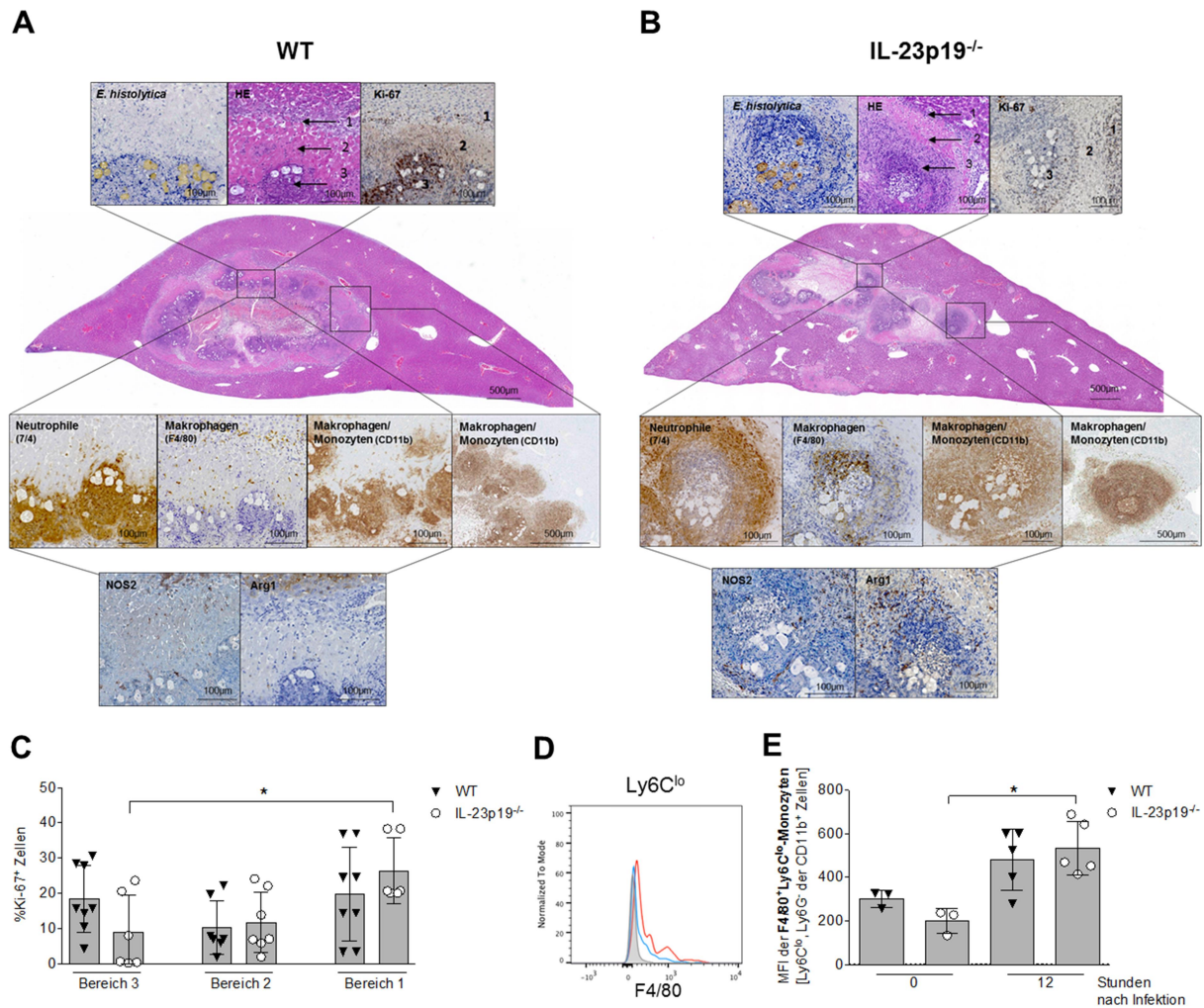
## Ergebnisse

Drei Tage nach intrahepatischer Infektion männlicher WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten wurde der infizierte Leberlappen entnommen und in Paraffin eingebettet. Ein gegen verschiedene zelluläre Moleküle und Oberflächenproteine von *E. histolytica* gerichteter Kaninchen-Serum-Pool wurde verwendet, um den Parasiten in Gewebsschnitten sichtbar zu machen. In allen weiteren Schnitten erscheinen die Trophozoiten im Gewebe farblos. Die Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung dient dem Nachweis von Immunzellen und bewirkt eine rötliche Darstellung der Leukozyten sowie eine bläuliche Färbung der Zellkerne im Gewebe. Die Verwendung des 7/4-Antikörpers dient weiterhin dem Nachweis von Neutrophilen. Da jedoch die Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und aktivierten Makrophagen bekannt ist, wurden weitere Gewebsschnitte mit einem CD11b-Antikörper behandelt, um Neutrophile räumlich von Monozyten und Makrophagen unterscheiden zu können. Zur Differenzierung von Monozyten und Makrophagen wurden zusätzliche Gewebeschnitte mit einem gegen F4/80 gerichteten Antikörper behandelt, welcher der Detektion von Gewebsmakrophagen dient. Mit Hilfe von gegen Arg1 und iNOS gerichteten Antikörpern sollte weiterhin die lokale Expression dieser Moleküle im Gewebe untersucht werden und die Zuordnung zu den untersuchten Zellpopulationen ermöglicht werden. Weiterhin wurden in Zusammenarbeit mit Penelope Pelczar Schnitte des infizierten Lebergewebes mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki-67 behandelt, um die Regeneration des Gewebes räumlich genauer bestimmen und quantifizieren zu können. Die Quantifizierung erfolgte dabei durch das Auszählen angefärbter Zellen unter dem Mikroskop.

Die immunhistologischen Färbungen der Schnitte infizierten Lebergewebes zeigten sowohl in WT- als auch in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen von dichten Immunzellinfiltraten umgebene *E. histolytica* Trophozoiten, wobei sich die Färbung der Parasiten-Proteine in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus stärker darstellte, als im Gewebe der WT-Maus (Abb. 2.2.8 A und B, oben links). Die H&E-Färbung offenbarte sowohl in WT- als auch in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Tieren eine organisierte Abszess-Struktur, die sich in 3 Bereiche unterteilen ließ: Ein Zentrum mit dichten Immunzellinfiltraten (3), einen Randbereich mit lysierten Hepatozyten, der weniger Immunzellinfiltrat aufweist (2) und ein äußerer Bereich, der das nicht infizierte Lebergewebe umfasst (1) (Abb. 2.2.8 A und B, oben mittig). Dieselbe strukturelle Unterteilung zeigte sich auch nach der Verwendung eines gegen den Proliferationsmarker Ki-67 gerichteten Antikörpers, wobei der Marker im Gewebe der WT-Mäuse vor allem im zentralen Abszessbereich, im Gewebe der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Tiere hingegen im äußeren Randbereich verstärkt exprimiert wurde (Abb. 2.2.8 A und B, oben rechts). Im zentralen Abszessbereich konnte in der WT-Maus weiterhin eine Akkumulation von Neutrophilen in direkter Nähe zu den *E. histolytica* Trophozoiten nachgewiesen werden (Abb. 2.2.8 A, 2. Reihe links). Da jedoch auch die CD11b-Färbung im WT-Tier dieselben Zellen sichtbar machte und für den 7/4-Antikörper eine Kreuzreaktivität zu CD11b besteht, könnte es sich bei diesen Zellen ebenso um inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten handeln. Im Gewebe der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus waren stattdessen F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in direkter Nähe zu den Trophozoiten zu erkennen, die sich im WT-Gewebe schwach im Randbereich und dem äußeren Abszessbereich verteilten (Abb. 2.2.8 A und B, 2. Reihe, 2. Bild). Der Einsatz des gegen CD11b gerichteten Antikörpers führte im Gewebe der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus unter anderem zu einer Färbung derselben Zellpopulation, die auch für den Makrophagen-Marker F4/80 positiv war, was verdeutlicht, dass es sich bei dieser Population um residente Makrophagen handelt (Abb. 2.2.8 B, 2. Reihe, 2. und 3. Bild). Da diese Population jedoch nicht in Kreuzreaktivität mit dem 7/4-Antikörper tritt, scheint es sich hierbei somit um eine nicht aktivierte, residente Makrophagen-Population zu handeln. Allerdings befand sich um die *E. histolytica* Trophozoiten im IL-23p19<sup>-/-</sup>-Gewebe eine weitere CD11b<sup>+</sup>-Zellpopulation im zentralen Abszessbereich, die weder positiv für F4/80 noch für den

## Ergebnisse

7/4-Antikörper zu sein schien. Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um frisch infiltrierte nicht-entzündliche und demnach regenerative Monozyten (Abb. 2.2.8 B, 2. Reihe, 1., 2. und 3. Bild). Die Färbung von iNOS und Arg1 ergab des Weiteren eine verstärkte Expression von iNOS in infizierten WT-Mäusen, die in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus nicht zu erkennen war, und der Lokalisation der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen entsprach (Abb. 2.2.8 A und B, 3. Reihe, 1. Bild). Die Arg1 Färbung fiel hingegen im IL-23p19<sup>-/-</sup>-Gewebe deutlich stärker aus, als im WT-Gewebe und zeigte sich in räumlicher Nähe zu den F4/80-negativen CD11b<sup>+</sup>-Monozyten (Abb. 2.2.8 A und B, 3. Reihe, 2. Bild).



**Abbildung 2.2.8: Immunhistologie des Amöbenleberabszesses in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus.** WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. (A) Aufeinanderfolgende Schnitte von in Paraffin eingebettetem Lebergewebe wurden an Tag 3 nach Infektion immunhistologisch mit einem gegen verschiedene zelluläre und Oberflächenproteine von *E. histolytica* gerichtetem Kaninchen Serum Pool, H&E und gegen Ki-67 (obere Reihe), 7/4 (Neutrophile), F4/80 (Makrophagen), CD11b (Monozyten) (mittlere Reihe), iNOS und Arg1 (untere Reihe) gerichteten Antikörpern angefärbt. (C) Quantifizierung der Anzahl Ki-67<sup>+</sup>-Zellen im zentralen Abszessbereich (3), im Randbereich (2) und im an den Abszess angrenzenden Bereich (1). (D) Darstellung der F4/80-Expression der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen 12 Stunden nach Infektion im Histogramm sowie (E) quantitative Auswertung der F4/80-MFI der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten. (Mittelwerte ± Standardfehler; Mann-Whitney U test; \*p < 0,05).

Die quantitative Auswertung der mit dem Proliferations-Marker Ki-67 gefärbten Zellen ergab eine tendenziell höhere Proliferation im zentralen Abszessbereich der infizierten WT-Maus im Vergleich zum IL-23p19<sup>-/-</sup>-Gewebe (Abb. 2.2.8 C). Im Randbereich um den zentralen Abszessbereich herum,

zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Zellproliferation. Im äußeren Abszessbereich war hingegen eine tendenziell erhöhte Proliferation im IL-23p19<sup>-/-</sup>-Gewebe, verglichen zum WT-Gewebe, zu ermitteln. Diese erhöhte Proliferation zeigte sich zudem im Vergleich zum zentralen Abszessbereich der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Zusätzlich wurden Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten aus mit *E. histolytica* infiziertem Lebergewebe von WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen 12 Stunden nach Infektion isoliert und mittels Durchflusszytometrie bezüglich der Expression des Makrophagen-Markers F4/80 auf der Oberfläche untersucht. Dabei konnte in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus 12 Stunden nach Infektion im Vergleich zur nicht infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus eine signifikant erhöhte F4/80-Expression auf den Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte hiermit immunhistologisch bestätigt werden, dass die *E. histolytica* Trophozoiten in WT-Mäusen aller Ansicht nach von inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten umgeben sind, in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus hingegen von Arg1 exprimierenden regenerativen Monozyten. Da zudem gezeigt werden konnte, dass die Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten bereits 12 Stunden nach Infektion F4/80 positiv wurden und somit zu Gewebsmakrophagen differenzierten, könnte es sich auch bei den F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>7/4<sup>-</sup>-Zellen im zentralen Abszessbereich der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus um Makrophagen handeln, die aus Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten differenzierten.

### 2.3 Abszessausbildung und immunregulatorische Mechanismen nach Infektion mit *E. histolytica* in Abhängigkeit des Geschlechts im murinen Modell

Neben den bereits untersuchten immunregulatorischen Mechanismen, spielt auch das Geschlecht eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des Amöbenleberabszesses. So ist bekannt, dass Frauen deutlich seltener einen Amöbenleberabszess entwickeln, als Männer [128]. Auch im murinen Modell konnte eine reduzierte Abszessausbildung an den Tagen 7, 14 und 21 nach Infektion nachgewiesen werden [129]. Ob dies auch schon zu früheren Zeitpunkten nach Infektion der Fall ist, und ob das Geschlecht einen Einfluss auf die bereits bekannten Mechanismen hat, welche in der männlichen Maus zur Abszessausbildung beitragen, oder ob andere, bisher unbekannte Mechanismen dem weiblichen Individuum nach einer Infektion mit dem Parasiten *E. histolytica* einen Vorteil verschaffen, sollte im folgenden Abschnitt dieser Arbeit untersucht werden.

Um diese Fragen zu klären, wurde zunächst der Abszessverlauf in mit *E. histolytica* infizierten männlichen und weiblichen WT-Mäusen an den Tagen 3, 5 und 7 nach Infektion mittels MRT untersucht. Da CCL2 via Rekrutierung inflammatorischer TNF $\alpha$ -exprimierender Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten ein Schlüsselchemokin in der Ausbildung des Amöbenleberabszesses darstellt, wurden anschließend die Serumlevel des Chemokins in infizierten männlichen und weiblichen Mäusen untersucht. Zudem wurden die Menge von Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Blut infizierter männlicher und weiblicher Mäuse sowie die IL-13-Expression dieser Populationen ermittelt. Die Bestimmung der Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine sollte weiterhin Aufschluss darüber geben, ob die Ausbildung einer Th1-Immunantwort geschlechtsspezifisch ist.

Des Weiteren sollte das Estradiol-abhängige Apolipoprotein A1 (ApoA1) hinsichtlich seines Einflusses auf die Ausbildung eines Amöbenleberabszesses und die Rekrutierung inflammatorischer und regenerativer Monozyten untersucht werden. Zwar ist ApoA1 vor allem als essentieller Bestandteil des Lipidstoffwechsels bekannt [70], doch konnte diesem Apolipoprotein zusätzlich eine wesentliche

## Ergebnisse

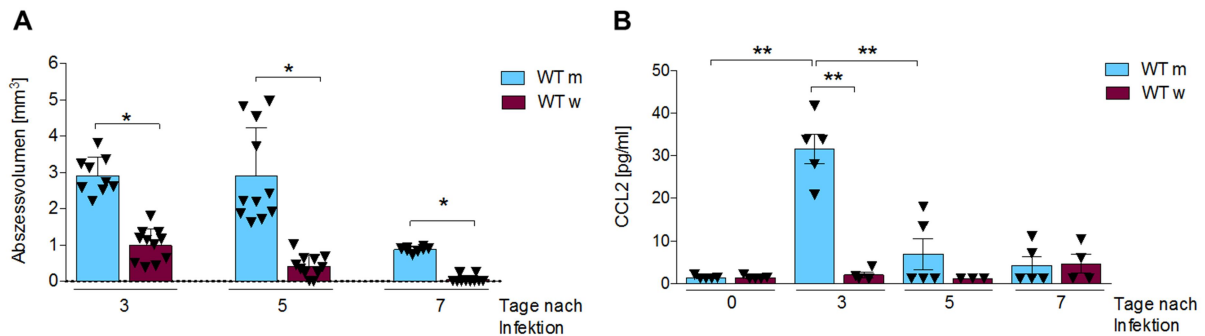
Funktion in anti-inflammatorischen Prozessen via STAT3-Aktivierung nachgewiesen werden [90]. Daher wurden der Abszessverlauf sowie die Menge pro-inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>- und regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Blut infizierter männlicher und weiblicher ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäuse untersucht.

### 2.3.1 Abszessverlauf und CCL2-Serumlevel nach Infektion mit *E. histolytica* in Abhängigkeit des Geschlechts

Es ist bekannt, dass Frauen in endemischen Gebieten deutlich seltener an einem Amöbenleberabszess erkranken als Männer [128]. Daher sollte zunächst mittels MRT-basierter Bildgebung gezeigt werden, ob das Geschlecht im murinen Modell zu einem frühen Zeitpunkt eine Auswirkung auf die Abszessausbildung hat und wie es sich auf die CCL2-Expression und somit die Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in das infizierte Gewebe auswirkt.

Hierzu wurden männliche und weibliche WT-Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und der Abszessverlauf mittels MRT analysiert. Zusätzlich erfolgten Blutentnahmen für die Gewinnung von Serum, welches mittels ELISA hinsichtlich der CCL2-Akkumulation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion untersucht wurde.

An Tag 3, 5 und 7 nach Infektion waren in weiblichen Mäusen im Vergleich zu männlichen Tieren signifikant kleinere Abszessvolumina zu beobachten ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.3.1 A). Im männlichen Tier wurde an Tag 3 nach Infektion zudem eine signifikant erhöhte CCL2-Expression ermittelt – sowohl im Vergleich zu naiven männlichen Tieren ( $p < 0,01$ ) als auch zu infizierten weiblichen Mäusen ( $p < 0,01$ ) – welche an Tag 5 nach Infektion bereits wieder abnahm ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.3.1 B).



**Abbildung 2.3.1: Abszessausbildung und CCL2-Expression in männlichen und weiblichen infizierten Mäusen.** Männliche und weibliche WT-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und (A) die Abszessvolumina an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion am MRT ermittelt (zwei unabhängige Experimente). (B) CCL2-Serumlevel in männlichen und weiblichen Mäusen vor und 3, 5 und 7 Tage nach Infektion. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

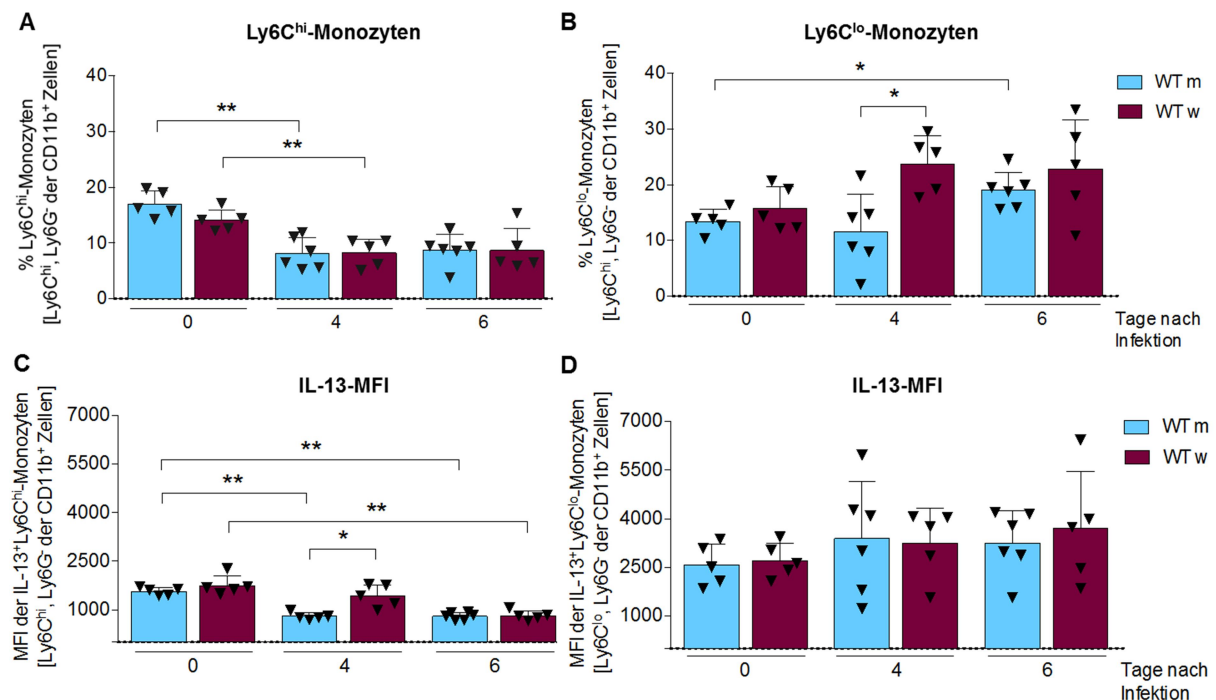
Zusammenfassend ließ sich bestätigen, dass im murinen Modell auch zu frühen Zeitpunkten ein Geschlechtsunterschied in der Ausbildung des Amöbenleberabszesses besteht. Die deutlich geringere CCL2-Expression ist zudem ein erster Hinweis darauf, dass es im Weibchen nach Infektion nicht zu einer gewebsschädigenden Inflammation kommt, wie es in männlichen Mäusen der Fall ist.



### 2.3.2 Geschlechtsabhängigkeit der Rekrutierung und IL-13-Expression inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>- und regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten nach Infektion

Da gezeigt werden konnte, dass es in weiblichen, im Gegensatz zu männlichen Tieren, nach Infektion mit *E. histolytica* nicht zu einer erhöhten CCL2-Expression kam, lag die Vermutung nahe, dass sich ein gleichwohl differenzielles Bild bezüglich der Rekrutierung inflammatorischer und regenerativer Monozyten ergibt. Dies, sowie die IL-13-Expression der genannten Monozyten-Populationen, wurde daher im Folgenden genauer untersucht.

Hierzu wurden männliche und weibliche WT-Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Vor Infektion, sowie an Tag 4 und 6 nach Infektion, erfolgte eine Blutentnahme mit anschließender Aufarbeitung der gewonnenen Zellen. Zur Detektion der inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>- und regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten am Durchflusszytometer wurden die Marker CD11b, Ly6C und Ly6G verwendet.



**Abbildung 2.3.2: Rekrutierung und IL-13-Expression von Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in Abhängigkeit des Geschlechts.** Männliche und weibliche WT-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und der prozentuale Anteil von (A) inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und (B) regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Blut mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (C) IL-13-MFI der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozytenpopulation und (B) IL-13-MFI der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozytenpopulation im Blut infizierter männlicher und weiblicher Mäuse. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01).

Sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren sank der prozentuale Anteil inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im Blut 4 Tage nach Infektion in gleichem Maße ( $p < 0,01$ ) und blieb auch an Tag 6 nach Infektion auf diesem Niveau (Abb. 2.3.2 A). Der Anteil regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zeigte sich im weiblichen Tier 4 Tage nach Infektion im Vergleich zum männlichen Tier hingegen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.3.2 B). Der prozentuale Anteil regenerativer Monozyten stieg im männlichen Tier erst an Tag 6 nach Infektion verglichen zum naiven Tier signifikant an ( $p < 0,05$ ). Außerdem zeigte sich, dass das Verhältnis von Ly6C<sup>lo</sup>- zu Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im Weibchen höher war (3-fach), als im Männchen (1,5-fach) (Vergleich Abb. 2.3.2 A und B). Die IL-13-Expression der

Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten sank sowohl im männlichen als auch im weiblichen Tier nach Infektion ( $p < 0,01$ ), außer im Weibchen an Tag 4 nach Infektion (Abb. 2.3.2 C). Zu diesem Zeitpunkt konnte eine signifikant erhöhte IL-13-Expression der inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im Weibchen im Vergleich zum Männchen gezeigt werden ( $p < 0,05$ ). Anders als erwartet, ergab der Vergleich der IL-13-Expression regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Blut männlicher und weiblicher Tiere keinerlei Unterschiede (Abb. 2.3.2 D).

Zusammenfassend konnten somit im Blut infizierter weiblicher Tiere mehr regenerative Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten und eine erhöhte IL-13-Expression der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten nachgewiesen werden, als in männlichen Mäusen.

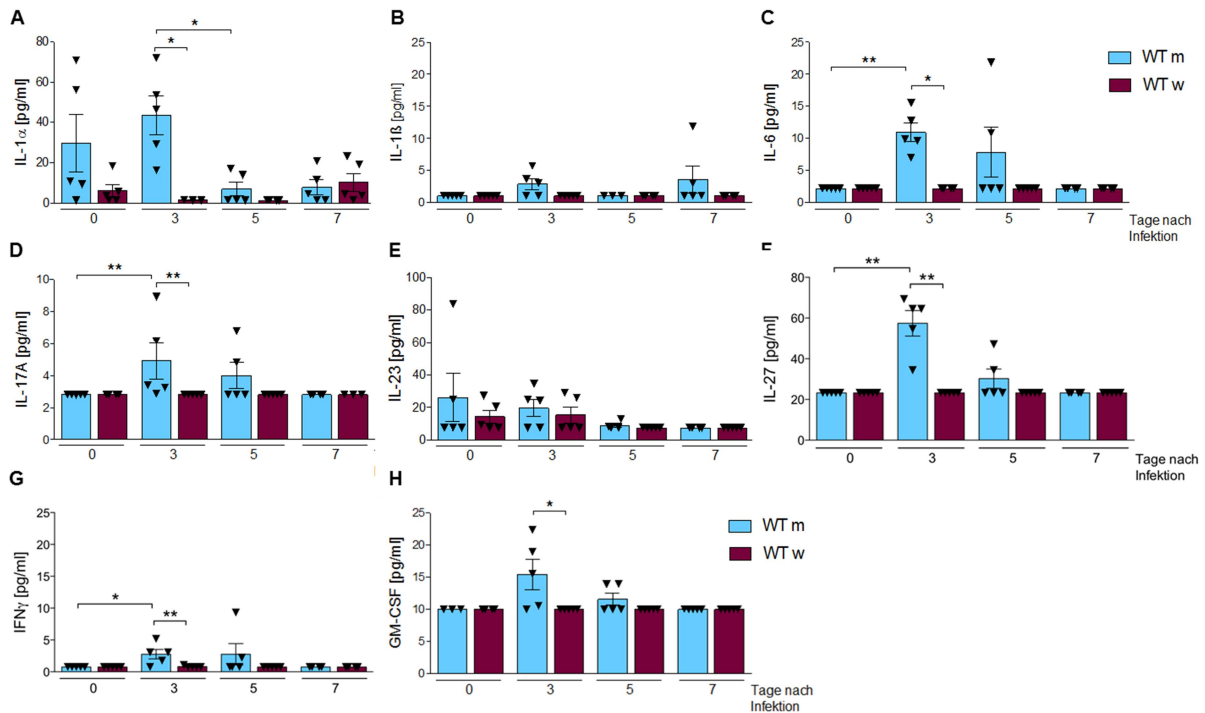
### 2.3.3 Einfluss des Geschlechts auf ausgewählte immunregulatorische Zytokine in Abhängigkeit einer Infektion

Wie bereits gezeigt wurde, hat das Geschlecht sowohl einen Einfluss auf die Synthese des pro-inflammatorischen Chemokins CCL2, als auch auf die Rekrutierung und Aktivierung immunregulatorischer Monozyten-Populationen. Daher sollte im Weiteren ein Set verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine auf geschlechtsabhängige Expression während der Infektion mit *E. histolytica* untersucht werden.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach intrahepatischer Infektion männlicher und weiblicher WT-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten erfolgte hierzu eine Blutentnahme zum anschließenden Gewinn von Blutserum, welches in einem *Bead*-basiertem Assay zur Detektion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, IL-23, IL-27, IFN $\gamma$  und GM-CSF eingesetzt wurde.

Die Expression von IL-1 $\alpha$  war bereits im naiven männlichen Tier tendenziell höher, als im Weibchen (Abb. 2.3.3 A). An Tag 3 nach Infektion zeigte sich diese schließlich im Vergleich im Männchen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) und fiel an Tag 5 nach Infektion wieder ab ( $p < 0,05$ ). Die IL-1 $\beta$ -Expression zeigte sich im Männchen an Tag 3 und 7 nach Infektion im Vergleich zum Weibchen tendenziell erhöht (Abb. 2.3.3 B). Die Expression von IL-6 stieg im männlichen Tier drei Tage nach Infektion signifikant an ( $p < 0,01$ ), war zu diesem Zeitpunkt auch verglichen mit infizierten Weibchen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ), und sank in den darauffolgenden Tagen wieder ab (Abb. 2.3.3 C). Auch die Expression von IL-17A stieg im Männchen drei Tage nach Infektion signifikant an ( $p < 0,01$ ) und war zu diese Zeitpunkt ebenfalls im Vergleich zum infizierten weiblichen Tier signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.3.3 D). An Tag 3 nach Infektion zeigte die IL-23-Expression weder im Männchen noch im Weibchen einen Unterschied zu nicht-infizierten Tieren, an Tag 5 und 7 nach Infektion war die Expression von IL-23 tendenziell reduziert (Abb. 2.3.3 E). Die Expression von IL-27 hingegen stieg drei Tage nach Infektion im männlichen Tier signifikant an ( $p < 0,01$ ), auch verglichen zum Weibchen zum gleichen Zeitpunkt ( $p < 0,01$ ), und war an Tag 5 nach Infektion bereits wieder herunterreguliert (Abb. 2.3.3 F). Auch die Expression von IFN $\gamma$  war im männlichen Tier drei Tage nach Infektion signifikant erhöht, sowohl im Vergleich zum naiven Männchen ( $p < 0,05$ ), als auch zum infizierten Weibchen an Tag 3 nach Infektion ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.3.3 G). Ebenfalls die GM-CSF-Expression stieg ausschließlich im männlichen Tier nach Infektion tendenziell an, im Vergleich zum Weibchen war die Expression an Tag 3 im Männchen sogar signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.3.3 H).

## Ergebnisse



**Abbildung 2.3.3: Zytokin-Expressionsprofil in männlichen und weiblichen infizierten Mäusen.** Männliche und weibliche WT-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die mRNA-Akkumulation im Blutserum mittels *Bead*-basiertem Immunoassay zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. (A) IL-1 $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-6, (D) IL-17A, (E) IL-23, (F) IL-27, (G) IFN $\gamma$  und (H) GM-CSF Serumlevel in männlichen und weiblichen Mäusen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Zusammenfassend zeigte sich deutlich, dass eine Infektion mit *E. histolytica* im männlichen Tier, nicht jedoch im Weibchen, eine Vielzahl pro-inflammatorischer Vorgänge aktiviert.

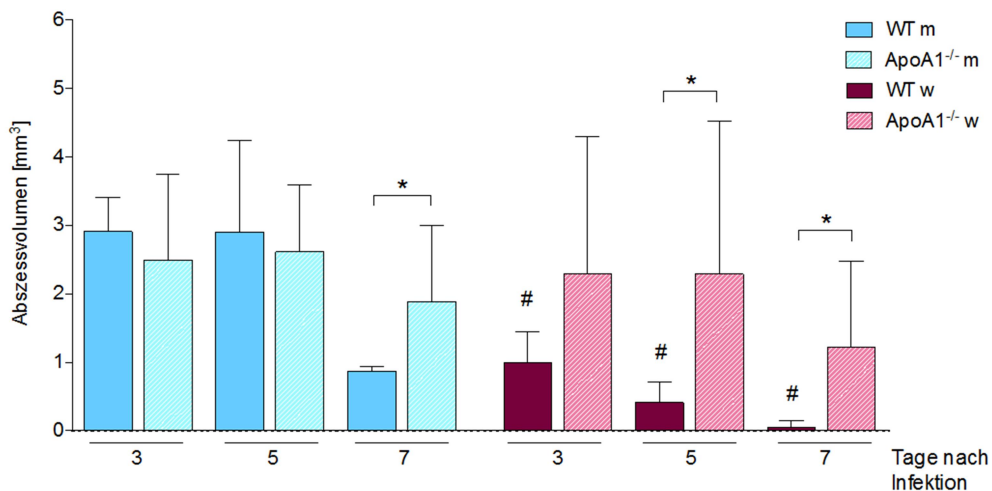
### 2.3.4 Einfluss des hormonell regulierten Apolipoproteins A1 auf die Abszessausbildung

Apolipoprotein A1 (ApoA1) wird unter anderem durch das weibliche Hormon Estradiol reguliert und weist durch die Aktivierung der STAT3-Signalkaskade eine Beteiligung an anti-inflammatorischen Th2-assoziierten Vorgängen auf [90]. Da im infizierten weiblichen Tier im Gegensatz zur männlichen Maus bisher kaum pro-inflammatorische Marker nachgewiesen werden konnten, und Estradiol die Expression des anti-inflammatorischen ApoA1 erhöht, lag die Vermutung nahe, dass das Apolipoprotein für die reduzierte Inflammation im weiblichen Organismus nach Infektion mit *E. histolytica* verantwortlich sein könnten.

Um den Einfluss von ApoA1 auf die Abszessentwicklung zu untersuchen, wurden männliche und weibliche WT- und ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und der Abszessverlauf mittels MRT analysiert.

Zunächst schien der *Knockout* von ApoA1 keinen Einfluss auf die Abszessentwicklung im männlichen Tier zu haben (Abb. 2.3.4). Erst an Tag 7 nach Infektion zeigte sich in Männchen ein Unterschied dahingehend, dass die Abszessvolumina in WT-Mäusen rückläufig waren, in ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen jedoch auf vorigem Niveau verblieben, wodurch sich ein signifikanter Unterschied der Abszessvolumina ergab ( $p < 0,05$ ). In den weiblichen Tieren waren die Abszessvolumina in den ApoA1<sup>-/-</sup>-Tieren bereits an Tag 3 nach Infektion tendenziell größer, als in WT-Mäusen. An Tag 5 und 7 nach Infektion zeigte sich dieser Unterschied schließlich signifikant ( $p < 0,05$ ).

## Ergebnisse



**Abbildung 2.3.4: Geschlechtsspezifische Abszessausbildung in Abhängigkeit von ApoA1.** Im MRT ermittelte Abszessvolumina in männlichen und weiblichen WT- und ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 3, 5 und 7 nach intrahepatischer Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten. (Mittelwerte ± Standardfehler; Mann-Whitney U test; \* im Vergleich zu den jeweiligen WT-Kontrollmäusen, # im Vergleich zum jeweils anderen Geschlecht; \*/#p < 0,05).

Somit zeigte sich, dass der *Knockout* von ApoA1 in weiblichen Tieren die Abszessausbildung verstärkt und in männlichen Tieren einen negativen Einfluss auf die Abszessausheilung hat.

### 2.3.5 Einfluss des hormonabhängigen ApoA1 auf die Rekrutierung und IL-13-Expression von inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>- und regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten

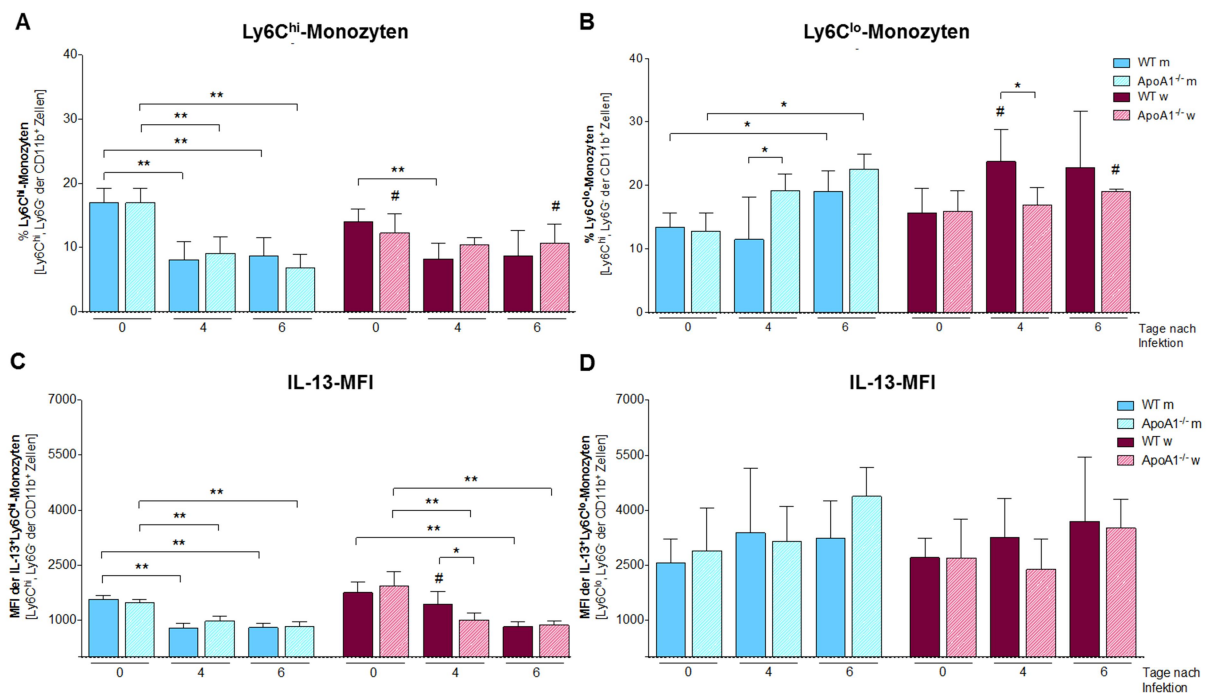
In 2.3.4 konnte ein deutlicher Einfluss von ApoA1 auf die Regulation des Amöbenleberabszesses nachgewiesen werden. Aus weiteren Experimenten dieser Arbeit wurde deutlich, dass Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten einen starken Einfluss auf die Abszessentwicklung haben. Nun sollte geklärt werden, ob ApoA1 diese Zellen und ihre IL-13-Expression beeinflusst.

Hierzu wurden männliche und weibliche WT- und ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Einen Tag vor Infektion und an Tag 4 und 6 nach Infektion wurde den Tieren Blut entnommen und die daraus gewonnenen Zellen für eine Messung am Durchflusszytometer aufgereinigt. Gegen CD11b, Ly6C und Ly6G gerichtete Antikörper dienten dabei der Visualisierung der Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten. Zusätzlich wurde ein intrazellulärer IL-13 Antikörper verwendet, um die Bestimmung der IL-13-MFI dieser Zellpopulationen zu ermöglichen.

Vier und sechs Tage nach Infektion war der prozentuale Anteil inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im Blut der männlichen WT- und ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen gleichermaßen signifikant reduziert ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.3.5 A). Auch in weiblichen WT-Mäusen sank der Anteil inflammatorischer Monozyten vier Tage nach Infektion signifikant ( $p < 0,01$ ), nicht jedoch in weiblichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen, bei denen bereits vor Infektion tendenziell weniger Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im Blut nachweisbar waren. Verglichen mit männlichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten weibliche ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäuse vor Infektion sogar signifikant weniger inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten. Da sich jedoch der prozentuale Anteil dieser Zellen in weiblichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen über den Verlauf der Infektion kaum änderte, dieser in infizierten männlichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Tieren jedoch sank, waren an Tag 6 nach Infektion im ApoA1<sup>-/-</sup>-Weibchen signifikant mehr Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten nachweisbar. Der prozentuale Anteil regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten war im Blut männlicher ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäuse an Tag 4

## Ergebnisse

nach Infektion signifikant höher, als in WT-Männchen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.3.5 B). An Tag 6 nach Infektion stieg die Menge regenerativer  $Ly6C^{lo}$ -Monozyten sowohl in männlichen WT- als auch  $ApoA1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zur jeweiligen naiven Kontrolle signifikant an ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz zum weiblichen WT-Tier stieg der prozentuale Anteil der  $Ly6C^{lo}$ -Monozyten in weiblichen  $ApoA1^{-/-}$ -Mäusen vier Tage nach Infektion nicht signifikant an, blieb dabei auf dem Niveau der naiven Kontrolltiere und war somit signifikant geringer, als in der weiblichen WT-Maus ( $p < 0,05$ ). An Tag 6 nach Infektion konnte im Blut weiblicher  $ApoA1^{-/-}$ -Tiere zusätzlich eine signifikant geringere Menge regenerativer  $Ly6C^{lo}$ -Monozyten im Vergleich zu männlichen  $ApoA1^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). Ebenso wie die Menge der  $Ly6C^{hi}$ -Monozyten, sank auch die IL-13-Expression dieser Zellpopulation sowohl in männlichen WT- als auch im männlichen  $ApoA1^{-/-}$ -Mäusen an Tag 4 und 6 nach Infektion signifikant, im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.3.5 C). Wohingegen weibliche WT-Mäuse, verglichen mit dem männlichen Pendant, an Tag 4 nach Infektion noch signifikant mehr IL-13 exprimierten ( $p < 0,05$ ), ist dies bei weiblichen  $ApoA1^{-/-}$ -Mäusen nicht zu beobachten. Stattdessen zeigte sich im  $ApoA1^{-/-}$ -Weibchen eine signifikant verringerte IL-13-Expression der  $Ly6C^{hi}$ -Monozytenpopulation, im Vergleich zu weiblichen WT-Mäusen ( $p < 0,05$ ) sowie zum naiven  $ApoA1^{-/-}$ -Weibchen ( $p < 0,01$ ). An Tag 6 nach Infektion zeigte sich die IL-13-Expression der  $Ly6C^{hi}$ -Monozyten sowohl in der weiblichen WT-Maus als auch in  $ApoA1^{-/-}$ -Weibchen, verglichen zur jeweiligen naiven Kontrolle, signifikant verringert ( $p < 0,01$ ). Ausgenommen der Tatsache, dass die IL-13-Expression der  $Ly6C^{lo}$ -Monozyten in allen Versuchsgruppen deutlich über der IL-13-Expression der  $Ly6C^{hi}$ -Monozyten lag, konnte kein Unterschied bezüglich der IL-13-MFI zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 2.3.5\_D).



**Abbildung 2.3.5: Geschlechtsspezifische Rekrutierung und IL-13-Expression von  $Ly6C^{hi}$ - und  $Ly6C^{lo}$ -Monozyten in Abhängigkeit von ApoA1.** Männliche und weibliche WT- und  $ApoA1^{-/-}$ -Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoitien infiziert und der prozentuale Anteil von (A) inflammatorischen  $Ly6C^{hi}$ -Monozyten und (B) regenerativen  $Ly6C^{lo}$ -Monozyten im Blut mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (C) IL-13-MFI der  $Ly6C^{hi}$ -Monozytenpopulation und (D) IL-13-MFI der  $Ly6C^{lo}$ -Monozytenpopulation im Blut infizierter männlicher und weiblicher WT- und  $ApoA1^{-/-}$ -Mäuse. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; # im Vergleich zum jeweils anderen Geschlecht; \*/# $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich männliche ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäuse bezüglich des prozentualen Anteils inflammatorischer und regenerativer Monozyten und deren IL-13-Expression im Blut kaum von männlichen WT-Mäusen unterscheiden. Lediglich die Rekrutierung regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten schien etwas zügiger abzulaufen. In weiblichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich im Vergleich zum ApoA1<sup>-/-</sup>-Männchen eine erhöhte Menge inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten. Verglichen zum WT-Weibchen war eine reduzierte Menge regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zu beobachten. Zusätzlich war die IL-13-Expression der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in weiblichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum WT-Weibchen reduziert. Dies lässt darauf schließen, dass ApoA1 durchaus einen Einfluss auf die Monozytenpopulationen hat, die für den Abszessverlauf relevant sind.

### 2.4 Einfluss von Geschlecht und ApoA1 auf die Immunantwort stimulierter humaner Makrophagen *in vitro*

Männliche Individuen erkrankten nach Infektion mit dem Parasiten *E. histolytica* deutlich häufiger an einem Amöbenleberabszess, als weibliche Individuen [128, 129]. Helk et al. zeigten, dass überschießende pro-inflammatorische Immunmechanismen im männlichen Tier zur Abszessentstehung beitragen [35]. Wie sich herausstellte, sind in das Gewebe rekrutierte, inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten durch die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und iNOS maßgeblich an der Entstehung des Amöbenleberabszesses beteiligt. Diese Zellen werden nach ihrer Infiltration in das Gewebe durch die von parasitär-aktivierten *antigen presenting cells* (APCs) ausgeschütteten inflammatorischen Zytokine stimuliert und zur Zytokinausschüttung angeregt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine solche inflammatorische Immunantwort auf das Eindringen des Parasiten in das Lebergewebe in weiblichen Tieren nicht nachzuweisen ist. Daher wird vermutet, dass bereits die Aktivierung der APCs durch den Parasiten im Weibchen eine zum Männchen differenzielle Immunantwort bewirkt, was im Folgenden an humanen APCs *in vitro* untersucht wurde. Da hier im murinen Modell weiterhin ein Einfluss des hormonell regulierten anti-inflammatorischen Apolipoproteins A1 (ApoA1) auf die Abszessausbildung sowie immunregulatorische Mechanismen nachgewiesen werden konnte, sollte zusätzlich die Wirkung von ApoA1 auf die Aktivierung humaner APCs analysiert werden.

Hierzu wurde männlichen und weiblichen Probanden peripheres Blut entnommen. Aus dem Blut isolierte CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden *in vitro* zu *monocyte derived macrophages* (MDMs) (APCs) maturiert. Die Hälfte der gewonnenen Makrophagen eines Spenders wurde im Anschluss für 16 Stunden mit ApoA1 vorstimuliert. Es folgte eine Stimulation der Zellen mit Antigenen verschiedener Erreger (LPS (gramnegative Bakterien), LTA (grampositive Bakterien), LPPG (lipopeptidophosphoglycan aus *E. histolytica*), SAA (*E. histolytica* Proteinpool), HepB+ (inaktiviertes Serum eines Hepatitis-B-positiven Patienten)). 48 Stunden später wurde der Zellkulturüberstand entnommen und mit Hilfe eines *Bead*-basierten Immunoassays die Zytokin- und Chemokin-Expression der stimulierten Makrophagen untersucht.

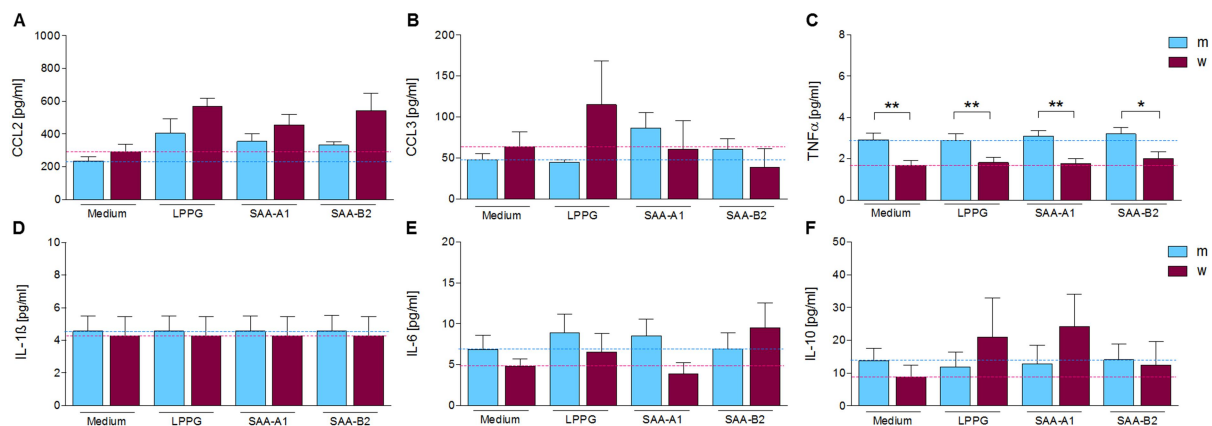
#### 2.4.1 Untersuchung der Immunantwort humaner männlicher und weiblicher MDMs nach Stimulation mit *EhLPPG* sowie *SAA-A1* und *SAA-B2 in vitro*

Um im murinen Modell einen Amöbenleberabszess zu induzieren, erfolgt eine intrahepatische Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten des pathogenen Klons B2. Ein weiterer Klon, der sogenannte apathogene Klon A1, ist nicht in der Lage nach intrahepatischer Infektion Abszesse in dem Ausmaß zu

## Ergebnisse

induzieren, wie sie nach einer Infektion mit dem Klon B2 zu beobachten sind. Was der Grund für die unterschiedliche Reaktion des Wirts auf die Klone B2 und A1 ist, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die unterschiedlichen Klone eine differenzielle Immunantwort der aktivierten Makrophagen im Gewebe bewirken, was im Folgenden mit Hilfe eines humanen *in vitro* Assay überprüft werden sollte.

Hierzu wurden PBMCs aus dem peripheren Blut humaner männlicher und weiblicher Probanden isoliert. Es erfolgte eine Selektion von CD14<sup>+</sup>-Monozyten, die im Anschluss zu MDMs differenziert wurden. Die Makrophagen wurden geerntet und für 48 Stunden mit verschiedenen aus *E. histolytica* gewonnenen Antigenen stimuliert: 1. *Eh*LPPG (LPPG), ein lipopeptidophosphoglycan welches aus der Membran des Parasiten isoliert werden konnte, 2. *soluble amebic antigen* (SAA)-A1, ein Proteinpool des Klons A1, 3. SAA-B2, ein Proteinpool des Klons B2. Nach erfolgter Stimulation wurde der Zellüberstand in einem *Bead*-basierten Immunoassay eingesetzt, um die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine der aktivierten Makrophagen zu ermitteln. Die Expression des Chemokins CCL2 wurde hierbei mit Hilfe eines entsprechenden ELISAs erfasst.



**Abbildung 2.4.1: Geschlechtsspezifische Chemokin- und Zytokin-Expression von mit *E. histolytica* spezifischen Antigenen stimulierten MDMs.** CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden aus dem peripheren Blut männlicher und weiblicher Spender gewonnen und zu *monocyte derived macrophages* (MDMs) maturiert. In Kultur wurden die Zellen mit *Eh*LPPG (LPPG), *soluble amebic antigen* (SAA) des apathogenen *E. histolytica* Klons A1 oder des pathogenen Klons B2 stimuliert. 48 Stunden nach Stimulation wurde die Expression der MDMs von (A) CCL2, (B) CCL3, (C) TNFα, (D) IL-1β, (E) IL-6 und (F) IL-10 mittels ELISA oder *Bead*-basiertem Immunoassay bestimmt. (Mittelwerte ± Standardfehler; Mann-Whitney U test; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01).

Nach Stimulation mit den verschiedenen Amöbenantigenen stieg die CCL2-Expression der MDMs tendenziell im Vergleich zur Mediumkontrolle an, wobei die Makrophagen weiblicher Blutspender eine tendenziell stärkere CCL2-Expression aufwiesen, als die MDMs männlicher Spender (Abb. 2.4.1 A). Ebenfalls reagierten die Makrophagen weiblicher Blutspender mit einer tendenziell stärkeren CCL3-Expression nach Stimulation mit *Eh*LPPG, sowohl verglichen zur Mediumkontrolle als auch im Vergleich zu mit *Eh*LPPG stimulierten Zellen männlicher Spender (Abb. 2.4.1 B). Die Stimulation der Zellen mit SAA-A1 und SAA-B2 bewirkte vor allem in den MDMs männlicher Spender einen tendenziellen Anstieg der CCL3-Expression. Die Stimulation der Makrophagen mit den verschiedenen Amöbenantigenen hatte wiederum keinerlei Auswirkung auf die Ausschüttung von TNFα, interessanterweise exprimierten jedoch die MDMs männlicher Spender signifikant mehr TNFα, als die Makrophagen weiblicher Probanden (p < 0,01) (Abb. 2.4.1 C). Auch auf die Expression von IL-1β hatte die Stimulation der Zellen mit den verschiedenen Amöbenantigenen keinen Einfluss

(Abb. 2.4.1 D). Die Stimulation der MDMs mit *EhLPPG* oder SAA-A1 bewirkte einen tendenziellen Anstieg der IL-6-Expression in den Makrophagen männlicher Spender, wohingegen die Stimulation mit SAA-B2 die IL-6-Expression der MDMs weiblicher Spender tendenziell erhöhte (Abb. 2.4.1 E). Die IL-10-Expression wiederum zeigte sich vor allem in den MDMs weiblicher Spender nach Stimulation mit *EhLPPG* oder SAA-A1 tendenziell erhöht (Abb. 2.4.1 F).

Zusammenfassend konnte keine differenzielle Expression der untersuchten Zytokine und Chemokine aufgrund unterschiedlicher *E. histolytica*-Antigene beobachtet werden.

### **2.4.2 Untersuchung der differenziellen Immunantwort humaner männlicher und weiblicher MDMs nach Stimulation mit bakteriellen, parasitären und viralen Antigenen *in vitro***

Für den Amöbenleberabszess konnte eine Gender-abhängige Entwicklung des Krankheitsbildes festgestellt werden. Grund hierfür ist eine überschießende inflammatorische Th1-Immunantwort im männlichen Tier, wohingegen in weiblichen Tieren eine Th2-Antwort die Ausheilung des Abszesses begünstigt [134]. Unter anderem durch die Ausschüttung von Zytokinen tragen APCs, zu denen auch Makrophagen zählen, zur Polarisierung immunregulatorischer Zellen wie Monozyten in einen Th1- oder Th2-Phänotyp bei. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Zytokin-Expression von aus Männern und Frauen gewonnen Makrophagen nach Aktivierung durch bakterielle, parasitäre und virale Antigene voneinander unterscheidet.

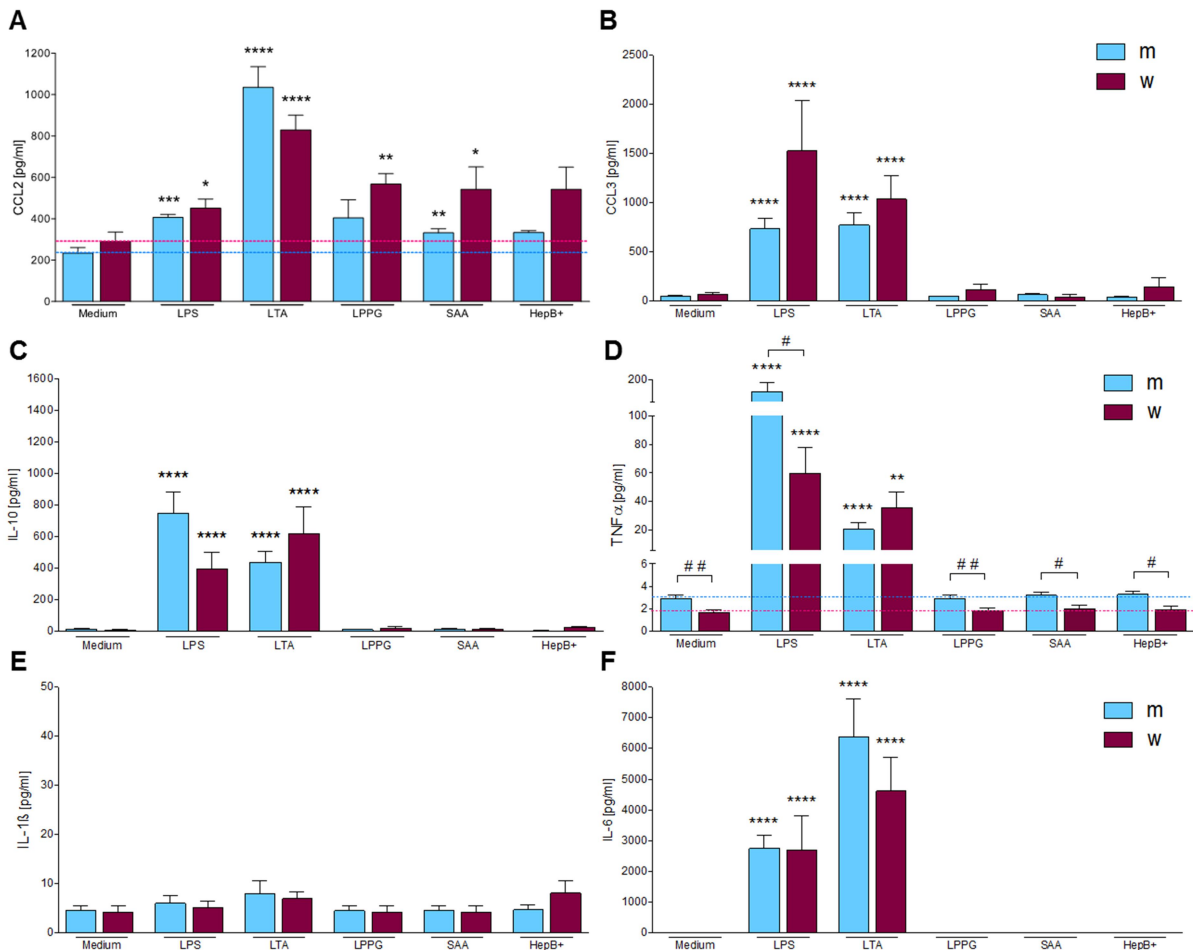
Aus dem peripheren Blut männlicher und weiblicher Probanden wurden dazu humane CD14<sup>+</sup>-Monozyten isoliert und zu MDMs maturiert. Es folgte eine Stimulation der MDMs mit Antigenen verschiedener Erreger (LPS, LTA, LPPG, SAA, HepB) für 48 Stunden. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand in einem *Bead*-basiertem Immunoassay eingesetzt, um die Zytokin-Expression der MDMs nach Aktivierung zu ermitteln. Die CCL2-Expression wurde mittels ELISA bestimmt.

Die CCL2-Expression stieg sowohl in MDMs aus Männern als auch aus Frauen nach Stimulation der Zellen mit den bakteriellen Antigenen LPS und LTA signifikant an (Abb. 2.4.2 A). Die Stimulation mit den Amöben-Antigenen *EhLPPG* und SAA bewirkte einen signifikanten Anstieg der CCL2-Expression in den Makrophagen weiblicher Blutspender, wohingegen nur die Stimulation mit SAA in Zellen aus männlichen Probanden einen signifikanten Anstieg induzierte. Weiterhin zeigte sich nach Stimulation mit *EhLPPG*, SAA und HepB<sup>+</sup>-Serum eine tendenziell stärkere CCL2-Expression in den Zellen weiblicher Blutspender, als in denen männlicher Spender. Eine erhöhte Expression des Chemokins CCL3 konnte ausschließlich durch die Stimulation mit LPS und LTA bewirkt werden (Abb. 2.4.2 B). Sowohl in den MDMs männlicher als auch in denen weiblicher Probanden stieg die CCL3-Expression signifikant an ( $p < 0,0001$ ), wobei die Zellen aus weiblichen Spendern tendenziell eine noch stärkere Expression aufwiesen. Ebenso zeigte sich nur nach Stimulation mit LPS und LTA eine signifikant erhöhte IL-10-Expression in den Zellen männlicher und weiblicher Spender ( $p < 0,001$ ) (Abb. 2.4.2 C). Interessanterweise exprimierten die Zellen männlicher Probanden nach LPS-Stimulation mehr IL-10, wohingegen die aus Frauen isolierten Zellen nach LTA-Stimulation mehr IL-10 exprimierten. Wie es schon für CCL3 und IL-10 zu beobachten war, bewirkte auch im Falle von TNF $\alpha$  lediglich die Stimulation mit LPS und LTA einen Anstieg der Expression in MDMs männlicher und weiblicher Blutspender (Abb. 2.4.2 D). Es zeigte sich zudem, dass die Makrophagen männlicher Probanden bereits im nicht stimulierten Zustand signifikant mehr TNF $\alpha$  exprimierten, als die MDMs weiblicher



## Ergebnisse

Spender. Dies war auch nach der Stimulation mit LPS, *Eh*LPPG, SAA und HepB<sup>+</sup>-Serum zu beobachten. Lediglich nach Stimulation mit LTA hob sich dieses Verhältnis auf und die Zellen weiblicher Spender exprimierten sogar tendenziell mehr TNF $\alpha$ . Keine der Stimulanzen bewirkte eine erhöhte IL-1 $\beta$ -Expression in den MDMs männlicher oder weiblicher Probanden (Abb. 2.4.2 E), wohingegen die Stimulation mit LPS und LTA die Expression von IL-6 sowohl in MDMs männlicher als auch weiblicher Spender signifikant erhöhte ( $p < 0,0001$ ), wobei die Makrophagen männlicher Spender tendenziell stärker auf die Stimulation mit LTA reagierte, als die Zellen weiblicher Probanden.



**Abbildung 2.4.2: Geschlechtsspezifische Chemokin- und Zytokin-Expression stimulierter MDMs.** CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden aus dem peripheren Blut männlicher und weiblicher Probanden gewonnen und zu *monocyte derived macrophages* (MDMs) differenziert. In Kultur wurden die Zellen mit den bakteriellen Antigenen LPS oder LTA, den *E. histolytica* spezifischen Antigenen *Eh*LPPG (LPPG) oder *soluble amebic antigen* (SAA) des pathogenen Klons B2 oder einem inaktivierten Serum eines mit Hepatitis-B-infizierten Patienten (HepB<sup>+</sup>) stimuliert. 48 Stunden nach Stimulation wurde die Expression der MDMs von (A) CCL2, (B) CCL3, (C) TNF $\alpha$ , (D) IL-1 $\beta$ , (E) IL-6 und (F) IL-10 mittels ELISA oder *Bead*-basiertem Immunoassay bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; \* signifikant zur entsprechenden Medium-Kontrolle, # signifikant zum jeweils anderen Geschlecht; Mann-Whitney U test; \*/# $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Zusammenfassend zeigte sich insbesondere nach Stimulation mit den bakteriellen Antigenen LPS und LTA eine erhöhte Immunantwort der Makrophagen männlicher und weiblicher Probanden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MDMs männlicher Blutspender grundlegend mehr TNF $\alpha$  exprimierten, als die aus Frauen generierten Makrophagen. Zudem zeigten die Zellen weiblicher Probanden eine tendenziell stärkere Expression der Chemokine CCL2 und CCL3.

### 2.4.3 Einfluss des hormonell regulierten ApoA1 auf die Zytokin-Expression aktivierter männlicher und weiblicher Makrophagen

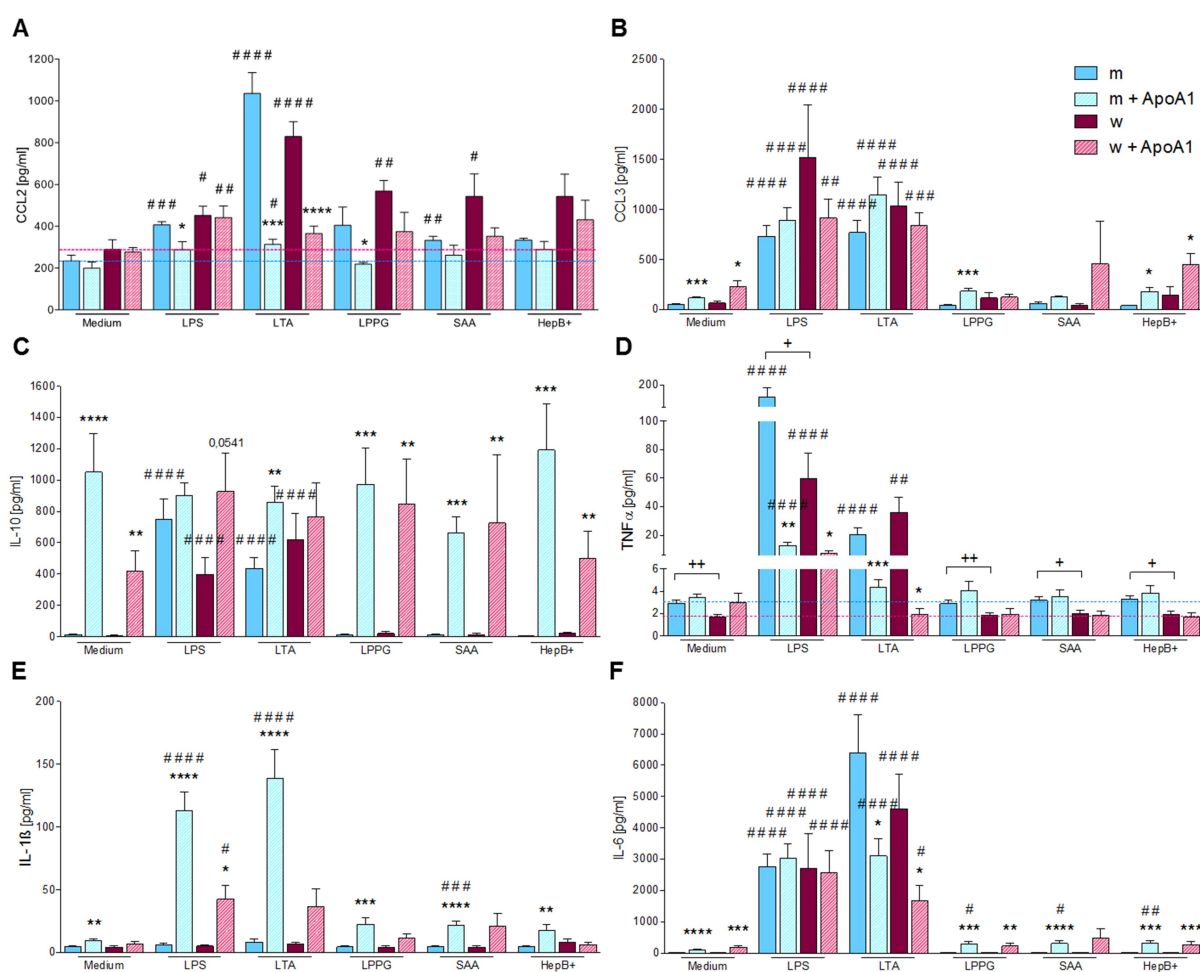
Die differenzielle Aktivierung der MDMs männlicher Probanden ergab unter anderem eine verstärkte Expression des pro-inflammatorischen Th1-Zytokins TNF $\alpha$  im Vergleich zu aktivierten MDMs aus weiblichen Spendern. Im Folgenden Abschnitt sollte geprüft werden, ob das Estradiol-abhängige anti-inflammatorische ApoA1 einen direkten Effekt auf die Zytokin-Expression aktivierter humaner Makrophagen männlicher und weiblicher Blutspender hat, was für die Polarisierung infiltrierender Monozyten von entscheidender Bedeutung sein könnte.

Um dies zu untersuchen wurden humane CD14<sup>+</sup>-Monozyten aus dem Blut männlicher und weiblicher Probanden isoliert und zu MDMs differenziert. Die Hälfte der Makrophagen wurde daraufhin für 16 Stunden mit ApoA1 vorstimuliert. Zur Kontrolle wurde die andere Hälfte der Zellen mit Medium inkubiert. Es folgte eine 48-stündige Stimulation der Zellen mit verschiedenen Erreger-Antigenen (LPS, LTA, LPPG, SAA, HepB). Im Zellkulturüberstand wurde schließlich die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine mittels *Bead*-basiertem Immunoassay bestimmt. Die CCL2-Expression wurde mittels ELISA ermittelt.

Die Vorstimulation der MDMs mit ApoA1 reduzierte die CCL2-Expression der Zellen weiblicher und männlicher Probanden entweder tendenziell oder signifikant im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen (Abb. 2.4.3 A). Besonders deutlich zeigte sich der Effekt nach Stimulation der Zellen mit LTA ( $p < 0,001$  (m);  $p < 0,0001$  (w)). Signifikant reduzierte eine Vorstimulation mit ApoA1 die CCL2-Expression sowohl nach LPS- als auch nach *EhLPPG*-Stimulation lediglich in MDMs männlicher Spender ( $p < 0,05$ ) nicht jedoch in den Zellen weiblicher Probanden. Nach Vorstimulation mit ApoA1 exprimierten die MDMs männlicher und weiblicher Blutspender bereits in der Mediumkontrolle mehr CCL3 ( $p < 0,001$  (m);  $p < 0,05$  (w)) (Abb. 2.4.3 B). Auf die CCL3-Expression nach Stimulation mit LPS oder LTA hatte die Vorstimulation mit ApoA1 keinen signifikanten Einfluss. Tendenzuell war in MDMs männlicher Spender jedoch ein Anstieg der CCL3-Expression zu erkennen, wohingegen in den Zellen weiblicher Probanden ein tendenzieller Rückgang beobachtet werden konnte. Nach Vorstimulation der MDMs männlicher Spender, stieg die CCL3-Expression in mit *EhLPPG* stimulierten Zellen signifikant an ( $p < 0,001$ ), nicht jedoch in den Zellen weiblicher Spender. Die Stimulation von MDMs männlicher und weiblicher Blutspender mit aus inaktiviertem Hepatitis-B-positivem Serum gewonnenen Antigenen führte nach Vorstimulation mit ApoA1 zu einem signifikanten Anstieg der CCL3-Expression ( $p < 0,05$ ). In den Makrophagen männlicher und weiblicher Blutspender war nach Vorstimulation mit ApoA1 bereits in der Mediumkontrolle ein signifikanter Anstieg der Expression des Th2 Zytokins IL-10 zu beobachten ( $p < 0,0001$  (m);  $p < 0,01$  (w)) (Abb. 2.4.3 C). Ein ähnliches Expressionsprofil zeigte sich auch nach Aktivierung der vorstimulierten Zellen mit *EhLPPG*, SAA und HepB+. Nach Stimulation der mit ApoA1 vorstimulierten Zellen mit LPS und LTA zeigte sich lediglich eine tendenziell erhöhte IL-10-Expression, da bereits die nicht vorstimulierten MDMs nach Aktivierung mit LPS und LTA mehr IL-10 exprimierten. In den vorstimulierten Zellen aus männlichen Spendern konnte jedoch nach LTA-Stimulation ein signifikanter Anstieg der IL-10-Expression ermittelt werden ( $p < 0,01$ ). Durch die Vorstimulation der MDMs mit ApoA1 konnte die TNF $\alpha$ -Expression signifikant reduziert werden, sowohl nach Aktivierung mit LPS ( $p < 0,01$  (m);  $p < 0,05$  (w)) als auch mit LTA ( $p < 0,001$  (m);  $p < 0,05$  (w)) (Abb. 2.4.3 D). Eine Vorstimulation mit ApoA1 bewirkte in MDMs männlicher Probanden bereits in der Mediumkontrolle einen signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Expression ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.4.3 E), was auch nach Aktivierung mit den verschiedenen eingesetzten Antigenen zu beobachten war. Hierbei induzierten die bakteriellen Antigene LPS und LTA die stärkste IL-1 $\beta$ -Expression in den vorstimulierten MDMs männlicher Probanden ( $p < 0,0001$ ).

## Ergebnisse

In den vorstimulierten Makrophagen weiblicher Spender konnte nach Aktivierung mit LTA, *Eh*LPPG und SAA ein tendenzieller Anstieg der IL-1 $\beta$ -Expression beobachtet werden. Lediglich die Stimulation mit LPS bewirkte in den mit ApoA1 vorstimulierten Zellen weiblicher Probanden einen signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Expression ( $p < 0,05$ ). Sowohl in den MDMs männlicher Spender, als auch in den MDMs weiblicher Spender konnte nach Vorstimulation mit ApoA1 in der Mediumkontrolle bereits eine signifikant erhöhte Expression von IL-6 beobachtet werden ( $p < 0,0001$  (m);  $p < 0,001$  (w)) (Abb. 2.4.3 F). Auch nach Aktivierung mit *Eh*LPPG, SAA und HepB+ konnte ein signifikanter Anstieg der IL-6-Expression in mit ApoA1 vorstimulierten MDMs männlicher und weiblicher Probanden ermittelt werden. Nur in den vorstimulierten Zellen weiblicher Spender zeigte sich lediglich ein tendenzieller Anstieg der IL-6-Expression. Im Vergleich zu den nicht vorstimulierten MDMs zeigte sich in den mit ApoA1 vorstimulierten Zellen nach LPS Aktivierung kein Unterschied in der Expression von IL-6. Die Vorstimulation der Zellen mit ApoA1 bewirkte nach Stimulation mit LTA jedoch eine signifikant reduzierte Expression des Zytokins ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 2.4.3: Chemokin- und Zytokin-Expression stimulierter MDMs in Abhängigkeit von ApoA1 und des Geschlechts.**

Aus dem peripheren Blut männlicher und weiblicher Probanden gewonnene CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden zu *monocyte derived macrophages* (MDMs) differenziert. In Kultur wurde die Hälfte der Zellen für 16 Stunden mit ApoA1 vorstimuliert, die andere Hälfte mit Medium inkubiert. Anschließend wurden sowohl die vorstimulierten als auch die nicht-vorstimulierten MDMs mit den bakteriellen Antigenen LPS oder LTA, den *E. histolytica* spezifischen Antigenen *Eh*LPPG (LPPG) oder *soluble amebic antigen* (SAA) des pathogenen Klon B2 oder einem inaktivierten Serum eines mit Hepatitis-B infizierten Patienten (HepB+) aktiviert. 48 Stunden nach Stimulation wurde die Expression der MDMs von (A) CCL2, (B) CCL3, (C) TNF $\alpha$ , (D) IL-1 $\beta$ , (E) IL-6 und (F) IL-10 mittels ELISA oder *Bead*-basiertem Immunoassay bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; \* signifikant zur jeweiligen nicht-vorstimulierten Kontrolle, # signifikant zur jeweiligen Mediumkontrolle, + signifikant zum jeweils anderen Geschlecht; Mann-Whitney U test; \*/#  $p < 0,05$ , \*\*/##  $p < 0,01$ , \*\*\*/###  $p < 0,001$ , \*\*\*\*/####  $p < 0,0001$ ).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ApoA1 die Expression von CCL2 und TNF $\alpha$  herunterreguliert, die beiden Faktoren, die im murinen Modell nachgewiesen eine Abszessausbildung in männlichen Mäusen begünstigen. Zusätzlich bedingt ApoA1 die Expression von IL-10, IL-1 $\beta$  und IL-6, wobei das Th2-Zytokin IL-10 in die Polarisierung alternativ aktivierter M2-Makrophagen involviert ist und IL-1 $\beta$  und IL-6 sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen können. Somit konnte gezeigt werden, dass ApoA1 z.T. tatsächlich den Phänotyp aktivierter Makrophagen in eine Th2-Richtung beeinflusst und die Expression derjenigen Chemokine und Zytokine herunterregulieren, die nachgewiesen die Abszessausbildung im männlichen Tier begünstigen.

### **2.4.4 Einfluss des hormonell regulierten ApoA1 auf die Expression des humanen Makrophagen-Markers CD206**

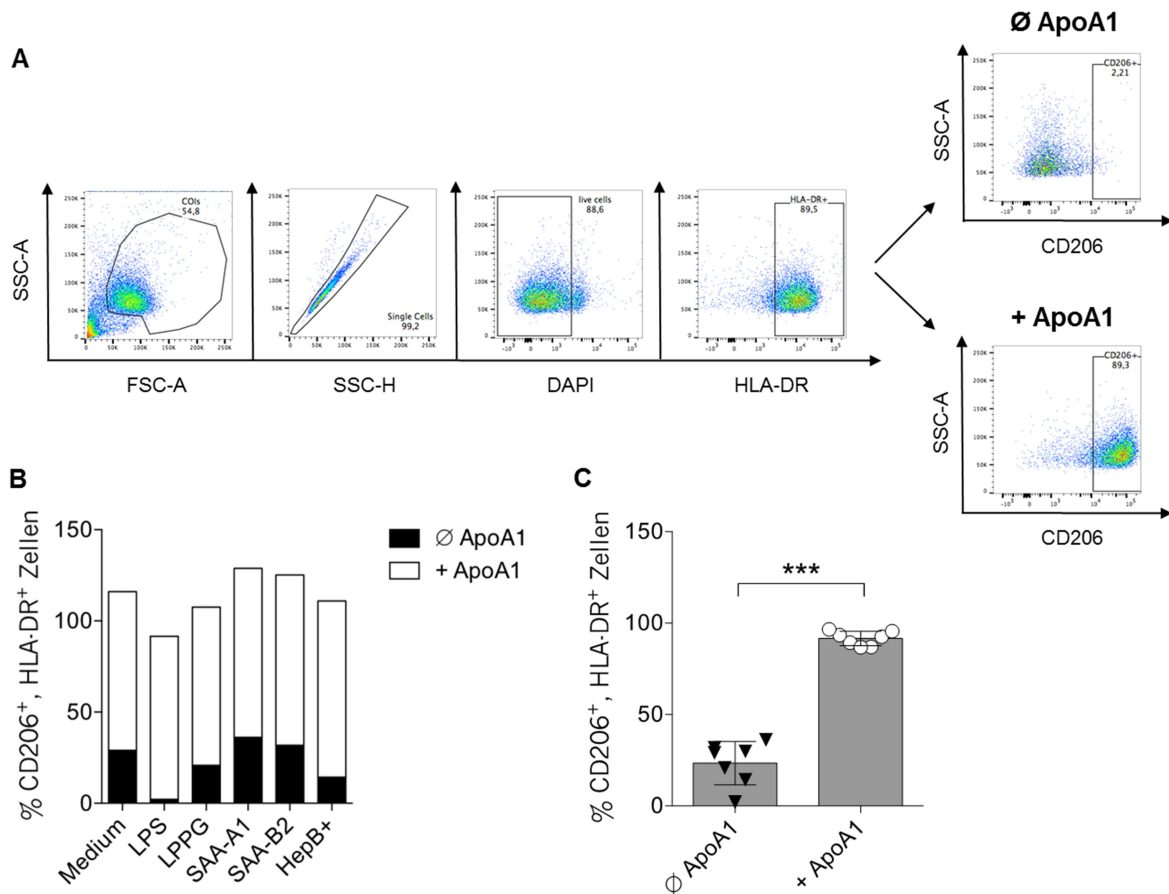
In das infizierte Gewebe infiltrierende Monozyten differenzieren vor Ort zu Makrophagen. Im vorigen Abschnitt konnte bereits gezeigt werden, dass ApoA1 die Zytokin-Expression von ausdifferenzierten Makrophagen beeinflussen kann. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob ApoA1 auch einen Einfluss auf die Differenzierung stimulierter Monozyten zu Makrophagen ausübt.

Hierzu wurden CD14<sup>+</sup>-Monozyten aus dem Blut eines männlichen Probanden isoliert, zu MDMs maturiert und die Hälfte der Zellen mit ApoA1 vorstimuliert. Es folgte eine Aktivierung der MDMs mit LPS, LPPG, SAA-A1, SAA-B2 oder HepB+. Vier Stunden nach Zugabe der Antigene wurden frisch aufgereinigte Gesamt-Monozyten aus der Peripherie desselben Probanden zu den aktivierten Makrophagen gegeben. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen für die Detektion am Durchflusszytometer mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle HLA-DR (MHCII-Molekül auf Monozyten und APCs wie z.B. Makrophagen [18]) und CD206 (Marker für humane M2-Makrophagen und dendritische Zellen [138, 139]) behandelt und die Expression des M2-Makrophagenmarkers CD206 vor und nach Stimulation quantifiziert.

Schon beim *Gating* der CD206<sup>+</sup> Zellen war ein deutlicher Unterschied zwischen den mit ApoA1 vorstimulierten und den nicht-vorstimulierten Zellen zu erkennen (Abb. 2.4.4 A). Ob und mit welchem Antigen die Zellen nach ApoA1-Vorstimulation aktiviert wurden, schien dabei keinen Einfluss auf die Expression von CD206 auf der Oberfläche der Zellen zu haben (Abb. 2.4.4 B). Eine Quantifizierung der Daten zeigte schließlich, dass die Vorstimulation der Monozyten mit ApoA1 zu einem signifikanten Anstieg der CD206-Expression führte ( $p < 0,001$ ) und etwa 90% aller mit ApoA1 vorstimulierten Zellen den Marker auf ihrer Oberfläche exprimierten.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass ApoA1 die Expression des M2-Makrophagenmarkers CD206 auf Monozyten hochreguliert, was dafür spricht, dass das Apolipoprotein die Differenzierung von Monozyten zu regulatorischen M2-Makrophagen fördert.

## Ergebnisse



**Abbildung 2.4.4: CD206-Expression stimulierter Monozyten in Abhängigkeit von ApoA1.** CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden aus dem peripheren Blut eines männlichen Spenders gewonnen und zu MDMs maturiert. In Kultur wurde die Hälfte der MDMs für 16 Stunden mit ApoA1 vorstimuliert, die andere Hälfte mit Medium inkubiert. Anschließend wurden sowohl die vorstimulierten als auch die nicht-vorstimulierten Makrophagen mit LPS, den *E. histolytica* spezifischen Antigenen *Eh*LPPG (LPPG) oder *soluble amebic antigen* (SAA) des apathogenen Klons A1 oder des pathogenen Klons B2 oder mit einem inaktivierten Serum eines Hepatitis-B-positiven Patienten (HepB+) aktiviert. 4 Stunden nach Zugabe der Antigene wurden frisch aufgereinigte Gesamt-Monozyten aus der Peripherie desselben Spenders zu den aktivierten Makrophagen gegeben. 48 Stunden später wurde die Expression des Makrophagen-Markers CD206 auf der Oberfläche der Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Gating-Strategie zur Bestimmung der CD206<sup>+</sup>-Zellen. (B) Vergleich der CD206-Expression in Abhängigkeit von ApoA1 sowie des Stimulus. (C) Quantitative Auswertung der CD206-Expression in Abhängigkeit von ApoA1. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \*\*\*p < 0,001).

## 2.5 Einfluss von FXII auf den Amöbenleberabszess

In den folgenden Abschnitten wurde die Rolle des Koagulationsfaktors XII (FXII) bei der Entstehung des Amöbenleberabszesses untersucht. Die Serinprotease FXII, auch Hageman-Faktor genannt, wird durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen (z.B. Polyphosphaten) aktiviert und kann sowohl Bradykinin 2 Rezeptor (B2R)-abhängige pro-inflammatorische Mechanismen aktivieren, als auch die FXI-abhängige Fibrinsynthese induzieren [92, 95].

In Kooperation mit Dr. Andy Long (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Thomas Renné; UKE) wurde zunächst untersucht, ob *E. histolytica* eine verstärkte Polyphosphat-Synthese aufweist und welchen Einfluss FXII auf die Ausbildung des Amöbenleberabszesses hat. In Zusammenarbeit mit Katharina Höhn, Leitung der Elektronenmikroskopie (BNITM) wurden hierfür elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen von mit Kollagen aktivierten und nicht aktivierten *E. histolytica* Trophozoiten generiert. Weiterhin wurde mit Hilfe immunhistologischer Färbungen die FXII-Expression im Lebergewebe infizierter WT-Mäuse analysiert sowie die Abszessausbildung in FXII<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die genaue

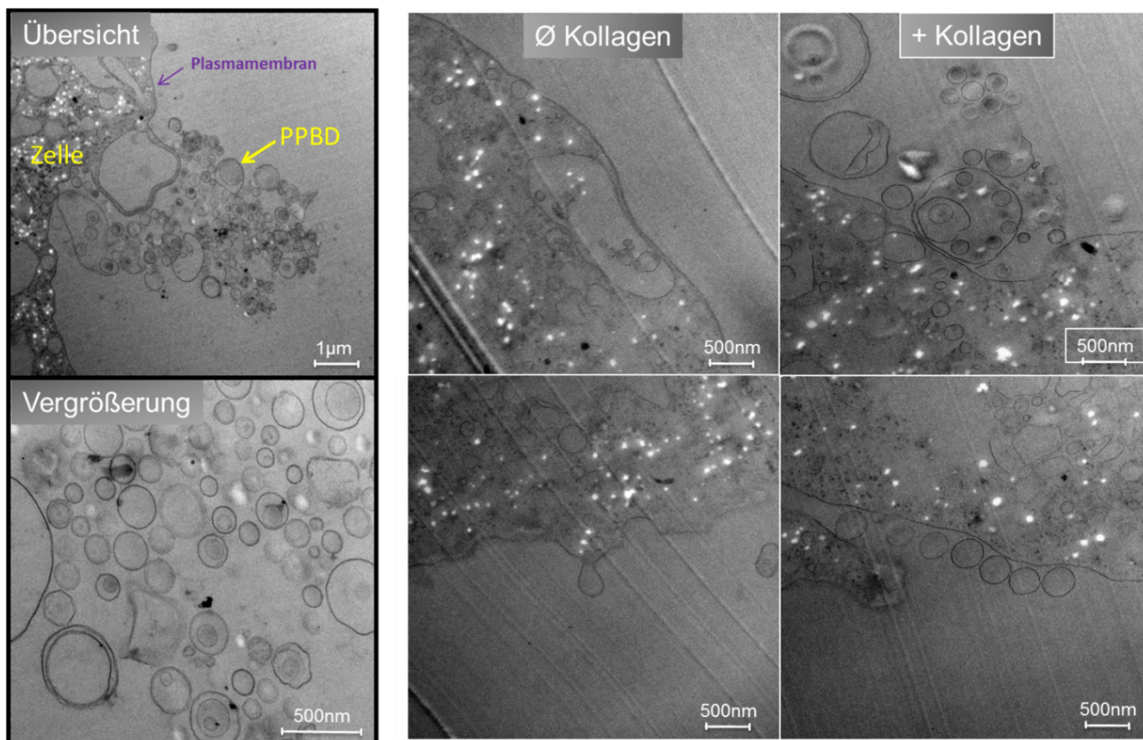
Bestimmung und Quantifizierung der Abszessvolumina in FXII<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden durch Messungen am MRT ermittelt. Um herauszufinden, ob FXII im Amöbenleberabszess in inflammatorische Prozesse oder die Bildung von Fibrin involviert ist, wurden weiterhin die Abszessvolumina infizierter B2R<sup>-/-</sup>- und FXI<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Hilfe des MRTs bestimmt.

### 2.5.1 Untersuchung der Polyphosphat-Aktivierung von *E. histolytica*

Zunächst sollte geklärt werden, ob *E. histolytica* im Gewebe eine verstärkte Synthese von Polyphosphaten aufweist und somit einen potentiellen Aktivator von FXII darstellt.

Um die Polyphosphat-Aktivierung der kultivierten *E. histolytica* Trophozoiten im Gewebe *in vitro* nachzustellen und untersuchen zu können, wurde der Parasit mit Kollagen stimuliert. Die im Anschluss fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit *polyphosphate binding domain* (PPBD) inkubiert. Diese Deletionsmutante einer rekombinanten Exopolyphosphatase hat ihre Fähigkeit zur Katalyse der Polyphosphat-Hydrolyse verloren, exprimiert jedoch weiterhin ihre Polyphosphat-Bindedomäne. Dieser Umstand ermöglicht die Bindung von Polyphosphaten durch PPBD, welches hier unter Zuhilfenahme eines an PPBD gekoppelten His-Tags und Immunogold-Labeling in der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht wurde.

	PPBD an der Oberfläche	kein PPBD an der Oberfläche
+ Kollagen	7	20
∅ Kollagen	1	25



**Abbildung 2.5.1: Polyphosphat-Synthese Kollagen-aktivierter *E. histolytica* Trophozoiten im EM.** *E. histolytica* Trophozoiten des pathogenen Klon B2 wurden mit oder ohne Kollagen kultiviert und die exprimierten Polyphosphate mittels PPBD in der Elektronenmikroskopie (EM) sichtbar gemacht. (Oben) Anzahl der PPBD<sup>+</sup>-Trophozoiten in Abhängigkeit von Kollagen. (Übersicht) Darstellung eines Trophozoiten aus der mit Kollagen behandelten Kultur sowie eine (Vergrößerung) nähere Ansicht im 500 nm-Maßstab in denen PPBD<sup>+</sup>-Strukturen anhand der dunkler gefärbten Oberfläche zu erkennen sind. Und repräsentative EM-Aufnahmen von je zwei Trophozoiten aus der Kultur ohne Kollagen (∅ Kollagen) und mit Kollagen (+ Kollagen).

In den EM-Aufnahmen der mit Kollagen stimulierten *E. histolytica* Trophozoiten waren vermehrt Vesikel erkennbar, die in den Trophozoiten der Kontrollkultur ohne Kollagen nicht in diesem Ausmaß nachgewiesen werden konnten (Abb. 2.5.1). Sowohl die Vesikel außerhalb als auch innerhalb der Trophozoiten, sowie die Plasmamembran der Zelle an sich, wiesen PPBD an der Oberfläche auf. In der mit Kollagen stimulierten Kultur waren 35% der Parasiten PPBD-positiv, wohingegen in der Kontrollkultur nur auf 4% der Zellen PPBD nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass *E. histolytica* in Anwesenheit von Kollagen verstärkt Polyphosphate synthetisiert und diese durch Abschnürung von Vesikeln in den extrazellulären Raum desorbiert.

### 2.5.2 Immunhistologischer Nachweis von FXII im infizierten Lebergewebe

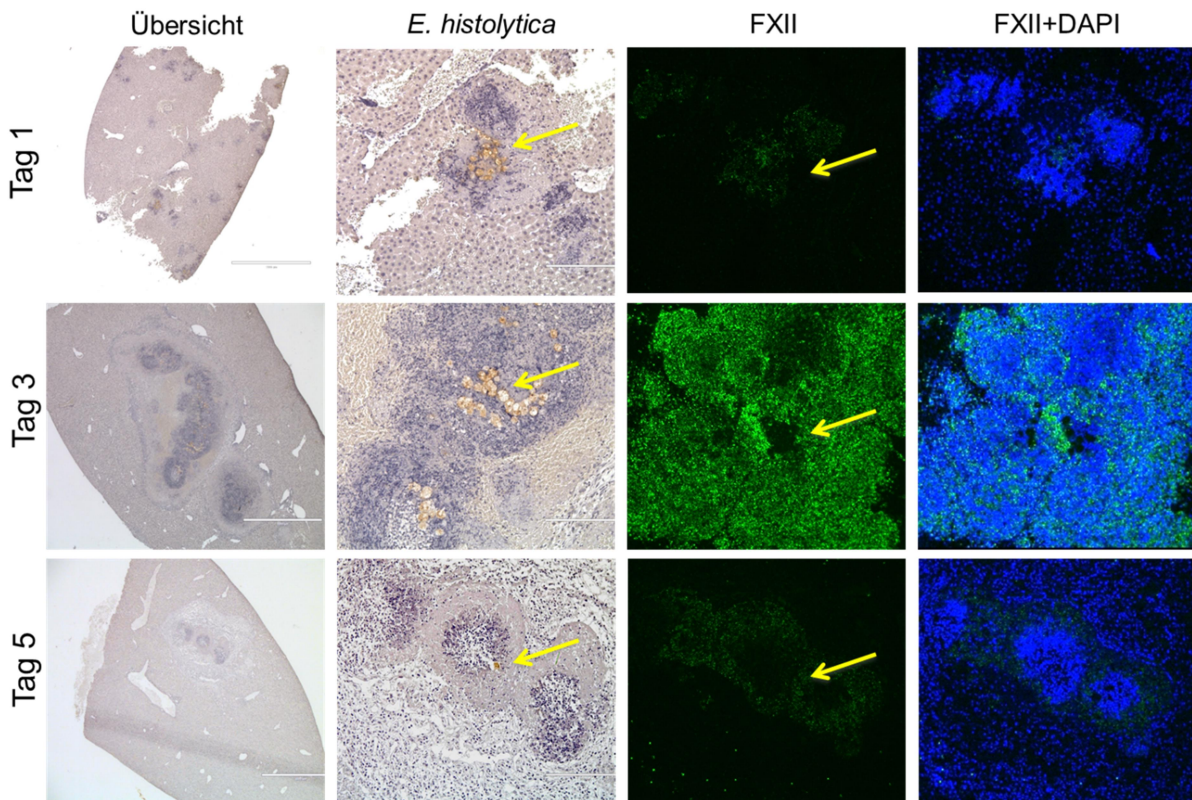
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *E. histolytica* in Anwesenheit von Kollagen, wie es auch im Gewebe der Fall ist, verstärkt Polyphosphate synthetisiert. Da Polyphosphate wiederum nachgewiesene Aktivatoren von FXII darstellen [94, 95], einem Zymogen welches in seiner autokrin aktivierten Form FXIIa an der Inflammation beteiligt ist und somit auch in die Abszessentwicklung involviert sein könnte, wurde im Folgenden die FXII-Expression im Gewebe nach Infektion untersucht.

Hierzu erfolgte eine intrahepatische Infektion männlicher WT-Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten. An den Tagen 1, 3 und 5 nach Infektion wurde jeweils der infizierte Leberlappen entnommen und in Paraffin eingebettet, um Gewebsschnitte anzufertigen, die im Anschluss immunhistologisch untersucht werden konnten. Mit einem gegen verschiedene zelluläre Moleküle und Oberflächenproteine von *E. histolytica* gerichtetem Kaninchen-Serum-Pool wurden die Trophozoiten in den Lebergewebs-Schnitten sichtbar gemacht. Die Visualisierung von FXII wurde mit Hilfe des Antikörpers anti-FXII erreicht und die Verwendung von DAPI bewirkte eine Blaufärbung der im Gewebe befindlichen DNA.

Die Färbung von *E. histolytica* gab zu erkennen, dass die Menge der Trophozoiten im Lebergewebe bereits fünf Tage nach Infektion deutlich reduziert war (Abb. 2.5.2 *E. histolytica*). Der Einsatz des gegen FXII gerichteten Antikörpers offenbarte eine Akkumulation des Koagulationsfaktors vor allem um die Trophozoiten (gelber Pfeil) herum (Abb. 2.5.2 FXII). Eine besonders starke Expression von FXII konnte dabei an Tag 3 nach Infektion nachgewiesen werden. Die DAPI-Färbung machte wiederum eine verstärkte Infiltration von Immunzellen in den Abszessbereich deutlich, welche ebenfalls drei Tage nach Infektion ihren Höhepunkt zu haben schien.

Somit konnte in der Immunhistologie gezeigt werden, dass die Infektion mit *E. histolytica* eine Aktivierung von FXII im Lebergewebe induziert.

## Ergebnisse



**Abbildung 2.5.2: Immunhistologischer Nachweis der FXII-Expression im Amöbenleberabszess.** WT-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Aufeinanderfolgende Schnitte von in Paraffin eingebettetem Lebergewebe an Tag 1, 3 und 5 nach Infektion wurden immunhistologisch mit einem gegen verschiedene zelluläre und Oberflächenproteine von *E. histolytica* gerichteten Kaninchen Serum Pool, mit anti-FXII sowie mit DAPI (DNA) angefärbt. Die Färbung mit anti-FXII sowie DAPI wurde von Dr. Andy Long (UKE) durchgeführt.

### 2.5.3 Einfluss von FXII auf den Abszessverlauf

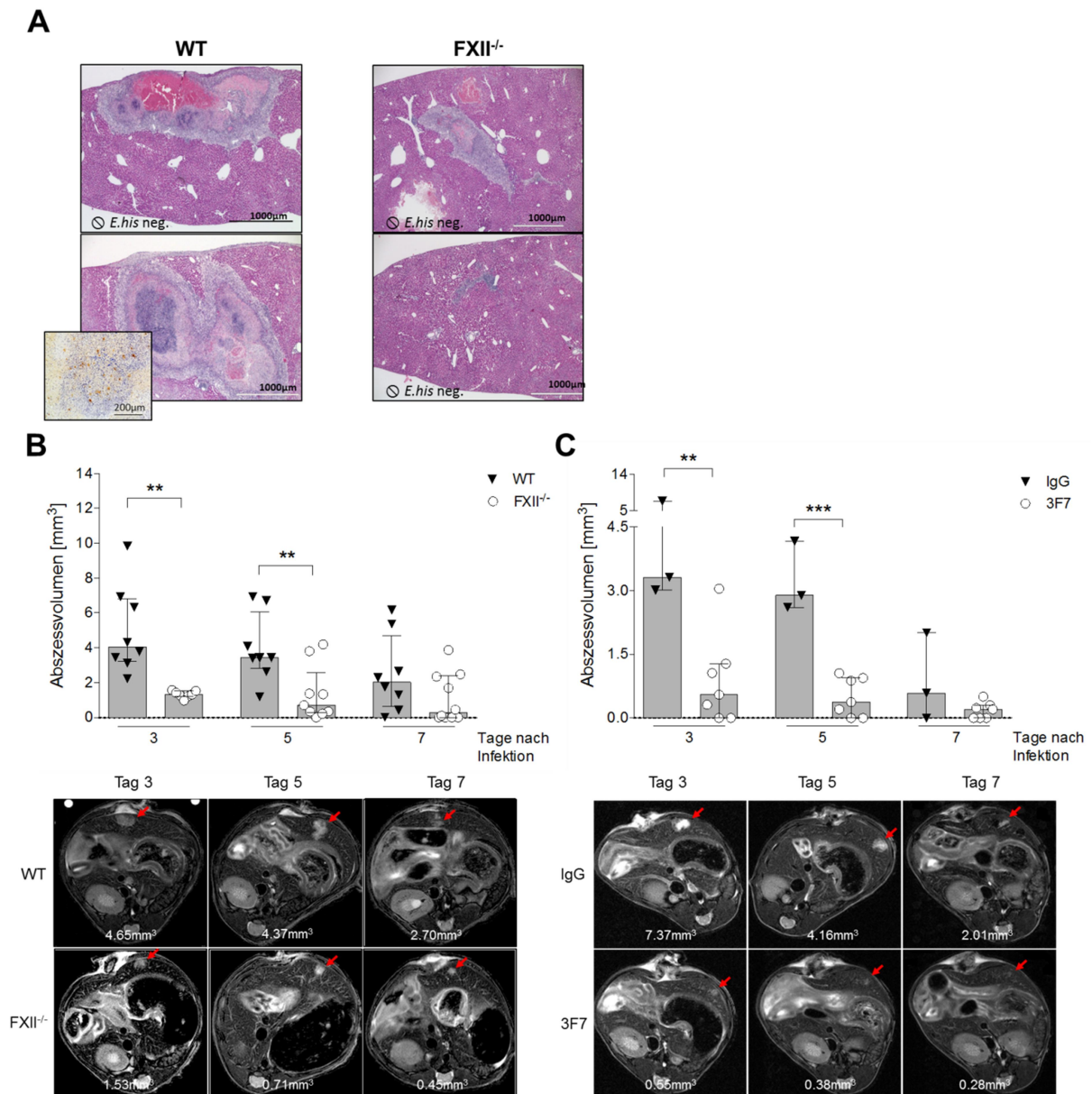
Bisher konnten sowohl eine vermehrte Polyphosphat-Synthese der *E. histolytica* Trophozoiten in Anwesenheit von Kollagen, als auch eine starke Akkumulation von FXII im Amöbenleberabszess in räumlicher Nähe zu den Trophozoiten nachgewiesen werden. Im Folgenden sollte geklärt werden, welchen Einfluss der *Knockout* von FXII auf den Abszessverlauf hat.

Hierzu wurde der Abszessverlauf in männlichen mit *E. histolytica* Trophozoiten infizierten WT- und FXII<sup>-/-</sup>-Mäusen an den Tagen 3, 5 und 7 nach Infektion mittels MRT erfasst. An Tag 7 nach Infektion wurde jeweils der infizierte Leberlappen entnommen, das Gewebe mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. In Gewebsschnitten wurden anschließend die in der Leber befindlichen Zellen mittels H&E-Färbung sichtbar gemacht. Zusätzlich wurde männlichen WT-Mäusen der Antikörper 3F7 appliziert – welcher FXII bindet und depletiert – und der Abszessverlauf nach Infektion mittels MRT dokumentiert.

Die Färbung der immunhistologischen Präparate offenbarte deutlich größere Abszesse im Gewebe der WT-Maus an Tag 7 nach Infektion im Vergleich zum infizierten FXII<sup>-/-</sup>-Gewebe (Abb. 2.5.3 A). Zusätzlich waren ausschließlich in der WT-Maus in einigen Schnitten *E. histolytica* Trophozoiten zu diesem Zeitpunkt nachweisbar. Im MRT zeigten sich sowohl an Tag 3 und 7 nach Infektion signifikant kleinere Abszesse in der FXII<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zu infizierten WT-Tieren ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2.5.3 B), was ebenso nach Depletion von FXII durch den Antikörper 3F7 zu beobachten war (Abb. 2.5.3 C).



## Ergebnisse



**Abbildung 2.5.3: Die Entwicklung des Amöbenleberabszesses in Abhängigkeit von FXII.** WT- und FXII<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. (A) Immunhistologische Schnitte von in Paraffin eingebettetem Lebergewebe an Tag 7 nach Infektion wurden mit H&E angefärbt und die Trophozoiten mit einem gegen verschiedene zelluläre und Oberflächenproteine von *E. histolytica* gerichteter Kaninchen Serum Pool sichtbar gemacht. Im MRT ermittelte Abszessvolumina in (B) infizierten FXII<sup>-/-</sup> und (C) FXII-depletierten (3F7) Mäusen an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion sowie T2-gewichtete repräsentative MRT-Bilder der Abszesse im zeitlichen Verlauf. (Mittelwerte ± Standardfehler; Mann-Whitney U test; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von FXII deutlich kleinere Abszesse nach Infektion mit *E. histolytica* ausgebildet werden.

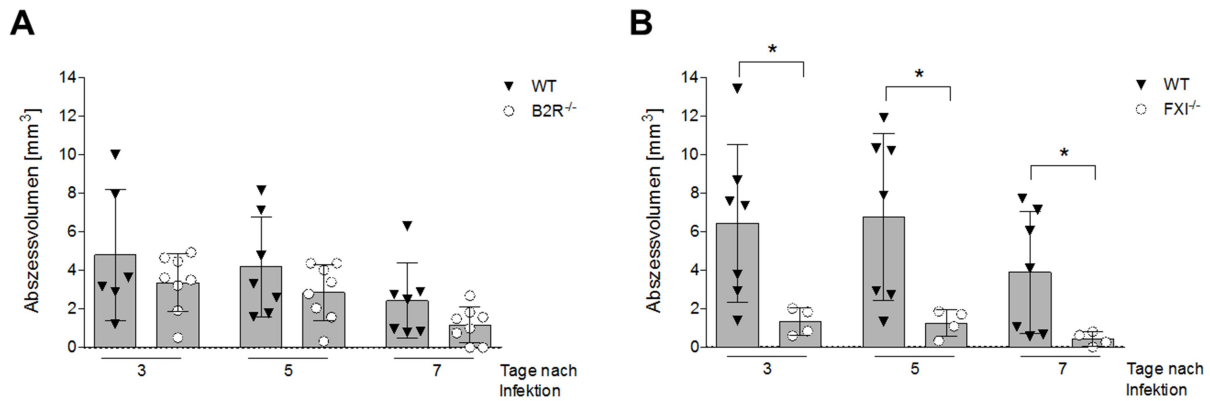
### 2.5.4 Untersuchung der FXII-abhängigen Faktoren B2R und FXI nach Infektion mit *E. histolytica*

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass FXII in die Abszessentwicklung involviert ist. Da der aktivierte FXII entweder über B2R inflammatorische Prozesse oder aber via FXI die Fibrinbildung aktiviert, sollte abschließend geklärt werden, welcher der beiden Mechanismen nach Infektion mit *E. histolytica* induziert wird.

## Ergebnisse

Hierzu wurden WT-, B2R<sup>-/-</sup>- und FXI<sup>-/-</sup>-Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und der Abszessverlauf an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion mittels MRT erfasst.

Der *Knockout* von B2R zeigte zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf den Abszessverlauf (Abb. 2.5.4 A), wohingegen in FXI<sup>-/-</sup>-Mäusen zu jedem Zeitpunkt signifikant kleinere Abszesse ausgebildet wurden ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2.5.4 B).



**Abbildung 2.5.4: Abszessausbildung in B2R<sup>-/-</sup>- und FXI<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Nach intrahepatischer Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten wurde die Abszessausbildung in (A) B2R<sup>-/-</sup>- und (B) FXI<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen mittels MRT analysiert und quantifiziert. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Mann-Whitney U test; \* $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass FXI, nicht jedoch B2R, einen Einfluss auf den Abszessverlauf hat und somit wider Erwarten nicht ein durch FXII aktivierter inflammatorischer Mechanismus, sondern die Fibrinbildung für die Abszessentwicklung von Bedeutung ist.

### 3. Diskussion

Der Amöbenleberabszess (ALA) ist eine durch den Parasiten *E. histolytica* ausgelöste Infektionskrankheit des Menschen, dessen Pathologie nicht nur den Pathogenitätsfaktoren des Erregers sondern ebenso dem Einfluss des wirtseigenen Immunsystems geschuldet ist. Der beobachtete Geschlechtsdimorphismus in der Ausbildung der Erkrankung gab erste Hinweise auf eine pathologische Beteiligung des Immunsystems in männlichen Individuen. Mithilfe des Mausmodells für den Amöbenleberabszess, welches den im Menschen beobachteten Geschlechtsdimorphismus widerspiegelt, konnte gezeigt werden, dass der Schädigung des Lebergewebes nach Infektion mit *E. histolytica* eine Immunpathologie zugrunde liegt. Basierend auf einer übermäßigen CCL2-abhängigen Rekrutierung inflammatorischer Monozyten und unter Beteiligung einer erhöhten Expression der inflammatorischen Th1-Zytokine IL-23, IL-17 und TNF $\alpha$  kommt es hier, anders als in weiblichen Individuen, zu einem schweren fokalen Leberschaden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die immunpathologischen Mechanismen der ALA-Entstehung in männlichen Individuen weiterführend geklärt und potentiell protektive Mechanismen in Frauen und weiblichen Mäusen eruiert. Hierzu wurde zunächst der Einfluss von IL-23 auf die Abszessentwicklung, die Rekrutierung von Monozyten und die Expression verschiedener relevanter Zytokine nach Infektion mit *E. histolytica* im männlichen Tier untersucht. Mit Hilfe des IL-23p19-*Knockouts*, in welchem die Abszessausbildung deutlich verringert ist, konnten weitere regulatorische Mechanismen identifiziert und untersucht werden, die der Entwicklung des Amöbenleberabszesses entgegenwirken. Dabei wurde das Th2-Zytokin IL-13 als möglicher Aktivator der M2-Polarisierung von Makrophagen identifiziert, welche vermutlich durch die Synthese von Arginase 1 (Arg1) zur Abszesskontrolle und Gewebsregeneration beitragen.

Die in der männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus identifizierten regulatorischen Mechanismen wurden im Anschluss in weiblichen Mäusen hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Abszesskontrolle untersucht. Wie in der männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus zeigten sich dabei auch in weiblichen Tieren eine reduzierte inflammatorische Immunantwort, ein Anstieg von Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten sowie eine erhöhte Expression von IL-13, was vermuten lässt, dass im weiblichen Tier ganz ähnliche Mechanismen für die verbesserte Abszesskontrolle verantwortlich sein könnten, wie in der männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus. Ferner sollte geklärt werden, weshalb weibliche Tiere auch ohne den *Knockout* von IL-23 nach Infektion mit *E. histolytica* reduzierte Abszessvolumina aufweisen. Diesbezüglich wurde der Effekt des anti-inflammatorischen und durch Estradiol hochregulierten Apolipoproteins A1 (ApoA1) auf die Abszessausbildung in Mäusen und die Aktivierung humaner Makrophagen untersucht. Dabei ließen erste Ergebnisse vermuten, dass ApoA1 die Aktivierung der im ALA als regenerativ identifizierten M2-Polarisierung verstärkt.

Neben den identifizierten immunpathologischen Mechanismen, konnte im männlichen Tier zudem eine Aktivierung der Koagulationsfaktor XII (FXII)-abhängigen Fibrinsynthese durch von *E. histolytica* sezernierten Polyphosphaten im Gewebe nachgewiesen werden. Der *Knockout* von FXII bewirkte dabei eine verringerte Abszessausbildung was vermuten lässt, dass der Parasit die Bildung von Fibrinkapseln nutzen könnte, um der Eliminierung durch Komponenten des Wirts-Immunsystems zu entgehen.

### 3.1 IL-23 und die Immunpathologie im Amöbenleberabszess

Die pro-inflammatorische IL-23/IL-17-Achse ist ein bekannter Aktivator der Synthese von CCL2 [50], einem Chemokin das die Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in infiziertes Gewebe bewirkt [49]. Diese Zellen differenzieren im Gewebe aufgrund eines im Falle einer Infektion vorherrschenden Th1-Zytokinmilieus zu inflammatorischen M1-Makrophagen [29], welche durch die Expression von TNF $\alpha$  und iNOS zur Eliminierung von Pathogenen beitragen [28]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Th1-Zytokine IL-23, IL-17 und TNF $\alpha$  sowie des Chemokins CCL2 in männlichen Mäusen nach Infektion mit *E. histolytica* erhöht ist [35]. Der *Knockout* von IL-23 reduzierte wiederum die Expression von IL-17 und TNF $\alpha$ . Da die IL-23/IL-17-Achse in die CCR2-abhängige Rekrutierung inflammatorischer TNF $\alpha$ -produzierender Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten involviert ist, wurde in dieser Arbeit der Abszessverlauf sowie die Monozyten-Rekrutierung in IL-23p19<sup>-/-</sup>- sowie in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen genauer untersucht.

Während bakterieller Infektionen mit beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis* oder *Toxoplasma gondii* konnte für die IL-23/IL-17-Achse eine protektive Funktion durch die Eliminierung der Erreger nachgewiesen werden [59, 140]. Nach Infektion männlicher IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäuse mit *E. histolytica* zeigten sich jedoch bereits sehr früh signifikant reduzierte Abszessvolumina sowie ein zügigeres Absterben des Parasiten. Dies lässt auf eine pathologische Beteiligung von IL-23 an der Ausbildung des Amöbenleberabszesses schließen, wie es auch für die experimentelle autoimmune Enzephalitis gezeigt werden konnte [57, 141]. In jedem Fall induziert die IL-23/IL-17-Achse die Synthese des Chemokins CCL2/MCP-1 [47-50]. Die Bindung von CCL2 an dessen Rezeptor CCR2 auf der Oberfläche pro-inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten bewirkt eine Rekrutierung der Zellen aus dem Knochenmark entlang eines Chemokin-Gradienten in das infizierte Gewebe [49], wo diese TNF $\alpha$  und iNOS exprimieren [9, 54, 58]. Wie in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus zeigten sich auch in der CCR2<sup>-/-</sup>-Maus signifikant kleinere Abszesse sowie eine reduzierte Expression inflammatorischer Zytokine nach Infektion mit *E. histolytica*. Zusätzlich konnte in der CCR2<sup>-/-</sup>-Maus neben der erhöhten Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten eine deutlich verringerte Menge inflammatorischer Monozyten nachgewiesen werden. Anders als erwartet zeigte sich jedoch keine verminderte Rekrutierung der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen. Stattdessen konnte auch hier ein Anstieg der regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im infizierten Lebergewebe ermittelt werden. In der Arbeitsgruppe konnte in *in vitro* Versuchen bereits gezeigt werden, dass die IL-17-Synthese, welche für die CCL2-Expression und somit für die Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten von entscheidender Bedeutung ist [48-50], in  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch durch das *E. histolytica* Oberflächenprotein EhLPPG stimuliert werden kann [35]. Dies könnte erklären, wieso es selbst in Abwesenheit von IL-23 nach Infektion mit *E. histolytica* zur Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten kommt. Zudem ist neben CCL2 ebenso CCL7, dessen Expression durch TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IFN $\gamma$  induziert wird [142], ein CCR2-Ligand und kann somit die Rekrutierung von Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in infiziertes Gewebe initiieren [4, 25]. Die Beteiligung von CCL7 an der Rekrutierung inflammatorischer Monozyten nach Infektion mit *E. histolytica* sollte daher in kommenden Arbeiten geprüft werden.

Zusammengefasst kann die reduzierte Abszessausbildung nach Infektion mit *E. histolytica* in IL-23p19<sup>-/-</sup>- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht durch eine verringerte Anzahl pro-inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten, jedoch durch den Anstieg regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Lebergewebe erklärt werden.

### 3.2 Regulatorische Mechanismen im Amöbenleberabszess in Abwesenheit von IL-23

Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten gelten als regenerative Zellpopulation. Unter Einfluss eines Th2-Zytokinmilieus (IL-4, IL-10, IL-13) differenzieren diese Leukozyten im Gewebe zu M2-Makrophagen [31], die insbesondere durch die Expression von Arg1 zur Regeneration beschädigten Gewebes beitragen können [30]. Da im vorigen Abschnitt dieser Arbeit ersichtlich wurde, dass nicht eine reduzierte Rekrutierung pro-inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten sondern die erhöhte Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten für eine verminderte Abszessausbildung in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus verantwortlich zu sein scheint, wurde im Weiteren analysiert, welchen Einfluss IL-23 speziell auf die Population der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten hat.

Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten werden durch die Bindung der Liganden CCL3, CCL4, CCL5 oder CCL8 an ihren zelleigenen Rezeptor CCR5 aus dem Knochenmark ins Blut rekrutiert [37, 38]. Dort patrouillieren die Zellen entlang der Blutgefäßepithelien und dringen im Falle einer Infektion in das beschädigte Gewebe ein. Dies geschieht durch Interaktion von CX<sub>3</sub>CR1 mit CX<sub>3</sub>CL1 und/oder LFA1 mit ICAM1 oder ICAM2 [37, 39]. Unter dem Einfluss von Th2-Zytokinen differenzieren die regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Gewebe zu alternativ aktivierten M2-Makrophagen [40], die an der Gewebsregeneration beteiligt sind [13] und sich weiterhin in verschiedene Subtypen unterteilen. Die Polarisierung zu M2a-Makrophagen wird durch IL-4 und IL-13 vermittelt, die Polarisierung zu M2c-Makrophagen durch IL-10 und TGF-β [31]. In infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde die mRNA-Expression der genannten in die Rekrutierung, die Adhäsion sowie die M2-Polarisierung involvierten Faktoren im Lebergewebe analysiert. Dabei konnte keine erhöhte Expression von CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CX<sub>3</sub>CR1, CX<sub>3</sub>CL1, LFA1, ICAM1, ICAM2, IL-10 und TGF-β beobachtet werden. Somit zeigte sich weder ein Einfluss von IL-23 auf die Rekrutierung, noch bezüglich der Adhäsion der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten. Allerdings konnte eine signifikant erhöhte Expression von IL-4 sechs Stunden und von IL-13 zwölf Stunden nach Infektion in der Leber von IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass IL-23 einen Einfluss auf die Polarisierung der Monozyten im Gewebe hat. Wie bereits im vorherigen Abschnitt und auch in vorigen Arbeiten gezeigt wurde, ist die inflammatorische Immunantwort in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus nach Infektion mit *E. histolytica* reduziert [35], wodurch es zu einer Verschiebung des Zytokinmilieus von Th1 zu Th2 und somit zu einem vorteilhaften Milieu für die Differenzierung alternativ aktivierter M2-Makrophagen kommen könnte. Andersherum würde dies bedeuten, dass die durch IL-23 hervorgerufene überschießende Inflammation in WT-Mäusen die Differenzierung von Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten durch ein vorherrschendes Th1-Milieu unterbindet, bis die Inflammation abklingt. Die in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus beobachteten reduzierten Abszessvolumina könnten demnach vermutlich nicht nur einer potentiell erhöhten Regeneration durch M2-Makrophagen, sondern bereits von Beginn an einer reduzierten Inflammation zuzuschreiben sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Synthese von IL-13 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nach Infektion in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus anstieg. Eine Depletion von IL-13 in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus hob demnach erwartungsgemäß die erhöhte Regenerationsfähigkeit des *Knockouts* auf und führte zur Ausbildung größerer Abszesse. IL-13 scheint dabei ein entscheidender Faktor für die Regeneration des Leberschadens zu sein, welcher, wie zuvor erwähnt, über die Polarisierung regulatorischer M2-Makrophagen zu einer reduzierten Abszessausbildung beitragen kann. Aus der Literatur sind diverse Zellpopulationen bekannt die für eine Produktion von IL-13 in Frage kommen können [60, 61]. Dazu zählen z.B. CD11b<sup>+</sup> Monozyten, Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten, Neutrophile,

Eosinophile, T-Helferzellen, Gewebs-Makrophagen sowie ILC2s (*type 2 innate lymphoid cells*), welche in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer IL-13-Expression nach Infektion mit *E. histolytica* in WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht wurden. Von den genannten Populationen zeigten dabei ausschließlich die CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten eine verstärkte IL-13-Expression in der infizierten IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus. Zusätzlich konnte eine signifikant erhöhte Arg1-Expression der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten nachgewiesen werden. Da Arg1 ein wichtiges Effektormolekül und einen Marker alternativ aktivierter M2-Makrophagen darstellt [30], deutet dies darauf hin, dass es sich bei den IL-13<sup>+</sup>/Arg1<sup>+</sup>Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im infizierten Gewebe um eine Zellpopulation handelt, die einen Übergangszustand zwischen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten und M2-Makrophagen repräsentieren könnte. Ein weiterer Hinweis darauf ist die erhöhte F4/80-Expression, die ebenfalls auf den Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten nachgewiesen werden konnte, wobei F4/80 ein typischer Marker gewebsresidenter Makrophagen ist. Eine Arg1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-Zellpopulation konnte zudem in der Immunhistologie im zentralen Abszessbereich an Tag 3 nach Infektion im Gewebe der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Immunhistologie im Lebergewebe von WT-Mäusen eine iNOS-exprimierende und somit pro-inflammatorische Zellpopulation im zentralen Abszessbereich. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus eine Polarisierung von Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zu M2-Makrophagen im infizierten Gewebe durch IL-13 stattfinden könnte.

Neben der erhöhten IL-13-Synthese konnte in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus zudem eine reduzierte IL-13Rα2-Expression im infizierten Lebergewebe nachgewiesen werden. Dieser Rezeptor inhibiert die IL-13 Aktivität nach dessen Bindung und wird durch die pro-inflammatorischen Zytokine TNFα, IL-17 und IFNγ heraufreguliert [68, 137], welche in Anwesenheit von IL-23 verstärkt exprimiert werden. Durch die verringerte Expression von IL-13Rα2 würde der Mangel an IL-23 eine erhöhte Menge an freiem IL-13 bewirken, welches an den funktionalen heterodimeren IL-13-Rezeptor IL-13Rα1/IL-4Rα binden kann. Diese Interaktion induziert im Weiteren über die Aktivierung von STAT6 die Arg1-Synthese [30]. Tatsächlich konnte in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen im Verhältnis mehr Arg1 als iNOS nachgewiesen werden. Beide Moleküle konkurrieren um L-Arginin als Substrat, wobei iNOS die Synthese von zellschädigendem Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin induziert, Arg1 wiederum die Synthese von unschädlichem L-Ornithin und Urea [30]. Da das von M2-Makrophagen ausgeschüttete Arg1 mit einer höheren Affinität an L-Arginin bindet als iNOS, und in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus eine erhöhte Arg1-Expression zu beobachten war, unterbindet demnach Arg1 in Abwesenheit von IL-23 sehr wahrscheinlich die gewebsschädigende Wirkung von iNOS. Die reduzierte Expression des IL-13-blockierenden IL-13Rα2 stellt somit einen weiteren IL-23-abhängigen Mechanismus dar, der die M2-Polarisierung, die Arg1-Synthese und die Abszesskontrolle begünstigen könnte.

In diesem Abschnitt konnte somit gezeigt werden, dass IL-23 die Differenzierung von Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten zu alternativ aktivierten M2-Makrophagen durch eine negative Regulation der IL-13-Expression unterbindet. Da jedoch weder die Rekrutierung der Zellen, noch ihre Adhäsion an die Gefäßepithelien heraufreguliert war, bleibt die Frage, woher die erhöhte Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten und M2-Makrophagen im infizierten Lebergewebe der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus stammt, wobei mögliche zugrundeliegende Mechanismen auch in der Literatur noch nicht abschließend geklärt werden konnten. Eine mögliche Erklärung stellt die Differenzierung der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten aus im Gewebe anwesenden Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten dar, wie es beispielsweise bei IgE-induzierten allergisch entzündlichen Hautreaktionen in Mäusen und auch im murinen Modell der sterilen Leberschädigung nachgewiesen werden konnte [26, 143]. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Repolarisierung von Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten/M1-Makrophagen zu Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten/M2-Makrophagen

erfolgen kann und auch intermediäre Formen dieser Zellpopulationen existieren [26, 30, 143, 144]. In dieser Arbeit konnte in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Nr4a1 im infizierten Lebergewebe nachgewiesen werden, welcher die Transkription von Arg1 induziert [144] und somit ebenfalls zur M2-Polarisierung der Monozyten und Makrophagen im Gewebe beitragen könnte. Weiterhin konnten Jenkins und Kollegen zeigen, dass IL-4, dessen Expression in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits 6 Stunden nach Infektion signifikant anstieg, die M2-Polarisierung residenter Makrophagen induziert [145]. Da IL-13 wie IL-4 über den heterodimeren Rezeptor IL-13Rα1/IL-4Rα agiert ist ebenso eine Beteiligung des hochregulierten Zytokins IL-13 an der M2-Polarisierung residenter Makrophagen in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus anzunehmen. Nach Infektion mit *E. histolytica* war in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen kein Rückgang der Rekrutierung von Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten, jedoch eine reduzierte Inflammation und ein zeitgleicher Anstieg der Expression von Nr4a1, Arg1, IL-4 und IL-13 nachzuweisen. Somit scheint die Umpolarisierung von infiltrierenden Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten/M1-Makrophagen sowie residenten Makrophagen die erhöhte Zahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten und M2-Makrophagen in der Leber nach Infektion mit *E. histolytica* zu begründen.

### 3.3 Geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Immunpathologie des Amöbenleberabszesses

Weibliche Individuen bilden nach Infektion mit *E. histolytica* deutlich kleinere Abszesse aus, als männliche. In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass IL-23 in männlichen Mäusen zu einer verstärkten Abszessentstehung beiträgt. Die Abwesenheit von IL-23 bewirkte dabei neben einer reduzierten inflammatorischen Immunantwort auch eine verstärkte IL-13-abhängige Polarisierung regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten und M2-Makrophagen, welche durch die Expression von Arg1 zur Regeneration beschädigten Gewebes und zur Abszesskontrolle beitragen können. In dieser Arbeit sollte daher zusätzlich untersucht werden, ob die in männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infektion mit *E. histolytica* beobachteten regulatorischen Mechanismen auch für die reduzierte Abszessausbildung in weiblichen Mäusen verantwortlich sein könnten.

Wie in männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte auch in weiblichen WT-Mäusen nach Infektion mit *E. histolytica* kein Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine oder des Chemokins CCL2 beobachtet werden. Ebenfalls zeigte sich nach Infektion keine veränderte Rekrutierung der CCR2-abhängigen pro-inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten, jedoch konnte ein Anstieg der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Blut weiblicher Tiere beobachtet werden. Im Gegensatz zur männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus exprimierten in weiblichen WT-Mäusen nach Infektion nicht die Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten, sondern ihr inflammatorischer Gegenpart, die Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten, im Blut mehr IL-13 als die männliche WT-Maus. Da IL-13 einen Aktivator der M2-Polarisierung darstellt [31], könnte die verstärkte Expression des Th2-Zytokins durch Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten auf eine beginnende Polarisierung der Zellen zu ihrem regenerativen Gegenpart hinweisen. Eine solche Umpolarisierung der als pro-inflammatorisch geltenden Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten zu regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten konnte unter anderem bereits im murinen Modell der sterilen Leberschädigung gezeigt werden [26]. Im Blutserum konnte nachgewiesen werden, dass es in weiblichen Tieren, im Gegensatz zu männlichen Mäusen, nach Infektion nicht zu einer verstärkten Induktion inflammatorischer Prozesse kommt. So war neben IL-23 und IL-17 beispielsweise auch die IFN $\gamma$ -Expression in der weiblichen WT-Maus nach Infektion mit *E. histolytica* nicht erhöht. Dabei initiiert die IL-23/IL-17-Achse durch Aktivierung von CCL2 die Rekrutierung inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten [4, 49], wobei das pro-inflammatorische Zytokin IFN $\gamma$  die Synthese des Rezeptors IL-13Rα2 induziert, welcher die Aktivität von IL-13 durch dessen Bindung

hemmt [68]. Die Abwesenheit der pro-inflammatorischen Aktivatoren der M1-Polarisierung nach Infektion mit *E. histolytica* im Weibchen könnte somit ausreichend sein, um eine Polarisierung der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten zu einem M2-Phänotyp zu induzieren, wie es auch nach IL-23-Depletion in einem murinen Tumormodell gezeigt werden konnte [30]. Diese ersten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in weiblichen Mäusen ähnliche Mechanismen in die Kontrolle des Amöbenleberabszesses involviert sind, wie sie in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus aufgezeigt werden konnten. Dennoch zeigten sich Unterschiede: 1. Im infizierten weiblichen Tier wurden die Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten vermehrt im Blut nachgewiesen und somit aufgrund der Infektion ins Gewebe rekrutiert, wohingegen die Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten in der IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus scheinbar direkt im Gewebe aus residenten Zellen differenzierten. 2. Im Vergleich zur infizierten männlichen WT-Maus produzierten im Weibchen nicht die Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten, sondern die Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten differenziell mehr IL-13, wohingegen in IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen eine differenzielle IL-13-Expression der Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten nachgewiesen werden konnte. Dennoch bedingte scheinbar sowohl in der männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup>-Maus als auch in weiblichen WT-Mäusen das Ausbleiben der Inflammation bei gleichzeitig erhöhter IL-13-Expression die regulatorische M2-Polarisierung von Monozyten und Makrophagen und somit eine erhöhte Gewebsschädigung bei zeitgleich reduzierter Gewebsschädigung.

Es blieb jedoch die Frage zu klären, wieso Weibchen nicht wie Männchen mit einer verstärkten Inflammation sondern mit einer Th2-Immunantwort auf das Eindringen von *E. histolytica* in das Lebergewebe reagieren. Die Tatsache, dass weibliche Mäuse auch ohne einen *Knockout* von IL-23 kleinere Abszesse ausbilden, als männliche Tiere, deutete darauf hin, dass hormonell regulierte Mechanismen an der Abszesskontrolle im Weibchen beteiligt sein könnten. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Apolipoproteins A1 (ApoA1) auf die Abszessausbildung untersucht, welches anti-inflammatorische Eigenschaften und in seiner Promotorregion unter anderem eine Bindungsdomäne für das weibliche Hormon Estradiol aufweist [79, 80]. Den anti-inflammatorischen Eigenschaften von ApoA1 liegt eine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 zugrunde. Die STAT3-Signalkaskade hat dabei nicht nur eine reduzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  zur Folge, sondern auch einen Anstieg der IL-10-Expression [90, 91], welches, wie oben erwähnt, ebenfalls die Polarisierung von Monozyten zu gewebsschädigenden, regulatorischen M2-Makrophagen unterstützt [30]. Da alle Ergebnisse dieser Arbeit darauf hinweisen, dass ebendiese Zellen an der Abszesskontrolle in männlichen IL-23p19<sup>-/-</sup> sowie in weiblichen WT-Mäusen beteiligt sind, und das Estradiol-abhängige ApoA1 entsprechend der Literatur somit auch im Amöbenleberabszess einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnte, wurde der Abszessverlauf in männlichen und weiblichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. In männlichen Tieren zeigte sich dabei an Tag 3 und 5 nach Infektion kein Unterschied in der Abszessausbildung. An Tag 7 nach Infektion blieben die Abszessvolumina in der ApoA1<sup>-/-</sup>-Maus jedoch auf demselben hohen Niveau, wohingegen in WT-Mäusen ein Rückgang der Gewebsschädigung zu beobachten war. Es ist anzunehmen, dass die Menge an ApoA1 in der männlichen WT-Maus zu gering ist, als dass sie bei der anfänglich starken pro-inflammatorischen Immunantwort einen Einfluss auf die Abszessausbildung haben könnte und dass die Abszessvolumina in männlichen WT-Mäusen zu diesen Zeitpunkten bereits ein maximales Niveau erreicht haben. Die an Tag 7 nach Infektion in männlichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen unverändert hohen Abszessvolumina, bei gleichzeitigem Rückgang der Gewebsschädigung in männlichen WT-Mäusen, deuten darauf hin, dass ApoA1 im männlichen Tier an der Ausheilung des Amöbenleberabszesses zu diesem Zeitpunkt beteiligt sein könnte. In weiblichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich stattdessen zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine deutlich verstärkte Abszessausbildung im Vergleich zu weiblichen WT-Mäusen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass



ApoA1 im weiblichen Tier an der Abszesskontrolle beteiligt ist. Wie zuvor erwähnt hemmt die durch ApoA1 aktivierte STAT3-Signalkaskade die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  [30]. Die höheren ApoA1-Level in der Leber weiblicher WT-Tiere könnten somit nach Infektion mit *E. histolytica* eine schnellere und effektivere Hemmung der Inflammation ermöglichen und eine verbesserte Ausheilung begünstigen. Zusätzlich konnte in weiblichen ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen ein Rückgang der regenerativen Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten sowie eine reduzierte IL-13-Expression der Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten nachgewiesen werden. Dies könnte sich durch die reduzierte STAT3-Aktivierung in Abwesenheit von ApoA1 erklären lassen, welche für die M2-Polarisierung von großer Bedeutung ist.

Somit konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass weibliche Mäuse kleinere Abszesse ausbilden und eine höhere Anzahl regenerativer Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten sowie eine verstärkte Expression von IL-13 durch Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten aufweisen, was auf eine verstärkte M2-Polarisierung im Vergleich zum männlichen Tier hindeutet. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass ApoA1, vermutlich durch eine STAT3-abhängige Inhibition der Inflammation bei zeitgleicher Aktivierung der M2-Polarisierung, an der Abszesskontrolle im weiblichen Tier beteiligt ist.

### 3.4 Makrophagen-Aktivierung und -Differenzierung in Abhängigkeit von Geschlecht und ApoA1

Die bereits diskutierten Ergebnisse zeigten, dass die Polarisierung von Monozyten und Makrophagen entscheidend für die Ausbildung eines Amöbenleberabszesses ist. Die durch TNF $\alpha$  und andere pro-inflammatorische Zytokine induzierte M1-Polarisierung führte dabei zu einer verstärkten Abszessausbildung in männlichen Mäusen, wohingegen ein Th2-Zytokinmilieu in IL-23p19<sup>-/-</sup>- und weiblichen Mäusen die regulatorische M2-Polarisierung bewirkte. Das für die Polarisierung der Zellen entscheidende Zytokinmilieu wird unter anderem durch die Aktivierung residenter Makrophagen wie Kupffer Zellen im Gewebe nach Infektion bestimmt, was somit auch den residenten Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Abszessentstehung zukommen lässt. Die Tatsache, dass Frauen und weibliche Mäuse nach Infektion mit *E. histolytica* kleinere Abszesse ausbilden, als Männer und männliche Mäuse, ließ darauf schließen, dass geschlechtsspezifische Hormone einen Einfluss auf die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen während einer Infektion haben könnten. In dieser Arbeit konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Estradiol-regulierte ApoA1 die Polarisierung eines M2-Phänotyps begünstigt. Aus diesem Grund war zu vermuten, dass die Stimulation von Makrophagen männlicher und weiblicher Individuen mit verschiedenen Antigenen eine differenzielle Zytokin-Expression induziert und dass ApoA1 einen Einfluss auf diese Vorgänge hat.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden CD14<sup>+</sup>-Monozyten aus dem Blut männlicher und weiblicher Probanden isoliert und durch Zugabe von M-CSF zu *monocyte derived macrophages* (MDMs) differenziert, welche *in vitro* die Population residenter Gewebemakrophagen darstellen sollten. Nach differenzieller Aktivierung der MDMs wurde deutlich, dass die Makrophagen männlicher Blutspender unabhängig vom Stimulus signifikant mehr TNF $\alpha$  exprimierten, wohingegen Makrophagen weiblicher Spender eine tendenziell verstärkte IL-10-Expression aufwiesen. Während TNF $\alpha$  eine Polarisierung von inflammatorischen M1-Makrophagen induziert [29], wurde für IL-10 eine Beteiligung an der regenerativen M2-Polarisierung und demzufolge der Hemmung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  nachgewiesen [31, 146]. Somit schienen die Makrophagen männlicher Probanden nach *in vitro* Stimulation mit *E. histolytica*-Antigenen durch die Ausschüttung von TNF $\alpha$  tatsächlich eine M1-Polarisierung zu fördern, wohingegen die MDMs weiblicher Spender

durch die reduzierte TNF $\alpha$ -Expression bei gleichzeitig erhöhter IL-10 Synthese zu einem Th2-Milieu beitragen und demzufolge eine M2-Polarisierung begünstigen. Der unter anderem durch IL-10 induzierbare M2-Phänotyp inhibiert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und bewahrt so das Gewebe vor weiterer Schädigung [146]. Weiterhin zeigte sich nach Aktivierung der MDMs weiblicher Blutspender eine tendenziell erhöhte Expression der Chemokine CCL2 und CCL3, welche vor allem in die Rekrutierung der inflammatorischen klassischen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> und intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>-Monozyten im Menschen involviert sind [10-12]. Zunächst scheint eine verstärkte Rekrutierung inflammatorischer Monozyten in Frauen nicht in das Bild einer reduzierten Abszessausbildung zu passen. Allerdings zeigte sich nach Infektion weiblicher Mäuse mit *E. histolytica* eine erhöhte IL-13-Expression inflammatorischer Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten im Blut, und auch die Makrophagen humaner weiblicher Blutspender synthetisierten nach Stimulation *in vitro* weniger pro-inflammatorisches TNF $\alpha$  und verstärkt anti-inflammatorisches IL-10. Wie es in der Maus für die Umpolarisierung von inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten zu Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten gezeigt werden konnte, könnten auch die durch CCL2 und CCL3 in das Gewebe rekrutierten, inflammatorischen humanen Monozyten aufgrund des scheinbar eher anti-inflammatorischen Zytokin-Milieus eine Polarisierung zum regulatorischen M2-Phänotyp durchlaufen und somit der Abszessausbildung in der Frau entgegenwirken. Demnach wäre, wie in der weiblichen Maus, auch in Frauen nicht der ursprüngliche Phänotyp sondern die Polarisierung der Monozyten aufgrund eines Th2-Zytokinmilieus für die Abszesskontrolle von entscheidender Bedeutung. In vorigen Arbeiten konnte allerdings gezeigt werden, dass NKT-Zellen nach ihrer Aktivierung in weiblichen Mäusen verstärkt pro-inflammatorisches IFN $\gamma$  synthetisierten, wodurch die NO-Synthese in Makrophagen und somit die Eliminierung von *E. histolytica* sowie eine schnellere Abszessausheilung induziert werden – ein Effekt, der zudem durch Behandlung mit Testosteron vermindert wird [131]. Möglicherweise bewirkt die verstärkte und frühe pro-inflammatorische NO-Synthese in weiblichen Tieren ein schnelles Absterben des Parasiten. Bedingt durch die zudem beobachtete Tendenz zur M2-Polarisierung in weiblichen Individuen könnte im Anschluss zügig die Aktivierung regulatorischer Prozesse und somit eine Gewebsregeneration induziert werden. In Mäusen konnte diesbezüglich bereits eine Beteiligung des durch Estradiol regulierten ApoA1 an der Abszesskontrolle in weiblichen Tieren nachgewiesen werden. Eine Stimulation humaner MDMs männlicher und weiblicher Spender mit ApoA1 16 Stunden vor Aktivierung der Zellen mit verschiedenen Erreger-Antigenen bestätigte die Vermutung, dass das Apolipoprotein die Abszesskontrolle auch in Frauen begünstigt. Die Vorstimulation mit ApoA1 bewirkte sowohl in den MDMs weiblicher als auch männlicher Blutspender eine reduzierte Expression von TNF $\alpha$  sowie eine verstärkte Ausschüttung von IL-10 im Vergleich zu Makrophagen, die nicht mit ApoA1 vorstimuliert wurden. IL-10 induziert dabei im Menschen eine verstärkte Expression von CD16 auf Monozyten [146], was auf eine Polarisierung der Zellen weg von ihrem inflammatorischen Phänotyp (CD14<sup>+</sup>) hin zu einer regulatorischen Funktion deutet. Zusätzlich konnte in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, dass ApoA1 die Expression von CD206 auf humanen Monozyten induziert. CD206 wird vor allem auf alternativ aktivierten Makrophagen exprimiert und ist somit ein weiterer Marker für die M2-Polarisierung [138, 139].

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass Makrophagen aus Frauen nach Aktivierung weniger TNF $\alpha$  und mehr IL-10 exprimierten, als die Makrophagen männlicher Probanden. ApoA1, dessen Expression unter anderem durch das weibliche Hormon Estradiol reguliert wird, verstärkte ein Th2-Expressionsprofil in Makrophagen und induzierte die Differenzierung von Monozyten zu CD206-positiven M2-Makrophagen. Somit lassen die Ergebnisse dieser Arbeit ähnliche

Mechanismen vermuten, die in Frauen und weiblichen Mäusen zur Abszesskontrolle nach Infektion mit *E. histolytica* beitragen.

### 3.5 Zur Rolle des Koagulationsfaktors XII bei der Entstehung des Amöbenleberabszesses

Der durch negativ geladene Oberflächen aktivierte Koagulationsfaktor XII (FXII) ist ein potenter Aktivator der Fibrinsynthese und ist darüber hinaus an pro-inflammatorischen Mechanismen beteiligt [93]. Über die FXII-abhängige Aktivierung von FXI induziert der Koagulationsfaktor die Bildung eines Fibrinnetzwerkes [96-98]. Fibrin ist dabei neben Kollagen ein wichtiger Bestandteil der Strukturen äußerer Abszessmembranen, die sich nach Infektion um einen Erreger bilden können [99]. Die Beteiligung von FXII an pro-inflammatorischen Prozessen beruht auf dessen Aktivierung des Gewebshormons Bradykinin, welches über die Bindung an den Bradykinin 2 Rezeptor (B2R) die Synthese von NO und die Rekrutierung von Monozyten durch residente Makrophagen induziert [101]. Zu den FXII-aktivierenden Molekülen zählen unter anderem Polyphosphate (polyP), langkettige Polymere aus Phosphat-Untereinheiten, die eine negativ geladene Oberfläche aufweisen [94, 95] und in allen pro- und eukaryotischen Zellen zu finden sind. Für die apathogene Amöbenspezies *Dictyostelium discoideum* konnte ein deutlicher Anstieg der Polyphosphatsynthese während der Entwicklungsphasen des Einzellers nachgewiesen werden [147]. Da es sich auch bei *E. histolytica*, dem Erreger des Amöbenleberabszesses, um einen amöboiden Organismus handelt, war anzunehmen, dass auch dieser Parasit in der Lage sein könnte vermehrt polyP zu synthetisieren und FXII zu aktivieren.

Durch Kultivierung von *E. histolytica* Trophozoiten in Anwesenheit von Kollagen wurde die Fähigkeit zur polyP-Synthese des amöboiden Parasiten in Zusammenarbeit mit Dr. Andy Long (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Thomas Renné, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)) untersucht. Es stellte sich heraus, dass in Anwesenheit von Kollagen, wie es auch im Gewebe der Fall wäre, die polyP-Synthese von *E. histolytica* bereits *in vitro* um das 7-Fache erhöht war. Darüber hinaus konnte mittels immunhistologischer Untersuchungen um die Trophozoiten herum ab Tag 3 nach Infektion vermehrt FXII im Lebergewebe nachgewiesen werden, was vermutlich durch die verstärkte polyP-Synthese *E. histolyticas* zu begründen ist. Um zu klären, ob FXII einen Einfluss auf die Abszessausbildung hat, wurde diese in männlichen FXII<sup>-/-</sup> sowie in WT-Mäusen, in denen FXII mittels des gegen den Koagulationsfaktor gerichteten Antikörpers 3F7 depletiert wurde [92], im MRT analysiert. Da sowohl der *Knockout* von FXII als auch dessen Depletion zu reduzierten Abszessvolumina führte, konnte mit FXII ein weiterer wirtseigener Faktor identifiziert werden, welcher zur Abszessentstehung beiträgt. Durch die Unterstützung der Synthese von Bradykinin und durch dessen Bindung an den zellulären Oberflächenrezeptor B2R kann FXII pro-inflammatorische Signalkaskaden induzieren [100, 101]. Da bereits gezeigt werden konnte, dass inflammatorische Faktoren wie TNF $\alpha$  und NO nach Infektion mit *E. histolytica* im männlichen Tier zur Abszessausbildung beitragen [35], bestünde die Möglichkeit, dass die zusätzliche Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden durch FXII diesen Prozess weiter verstärken. Alternativ dazu kann FXII über die Aktivierung von FXI die Synthese von Fibrin forcieren. Da Fibrin einen wichtigen Bestandteil äußerer Abszessmembranen darstellt und an der Einkapselung der Trophozoiten auch tatsächlich beteiligt ist, schien auch dieser durch FXII induzierbare Mechanismus für die Abszessausbildung relevant. Im MRT konnte schließlich gezeigt werden, dass der *Knockout* von FXI, nicht jedoch der des Rezeptors B2R, die Abszessvolumina

reduzierte. Entgegen der Erwartung verstärkte der durch *E. histolytica* Polyphosphate aktivierte FXII somit nicht die inflammatorischen Prozesse via FXI, sondern trug überwiegend zur Synthese des zur Abkapselung des Erregers benötigten Fibrins via B2R bei. Eine ähnliche Beteiligung von FXII an der Pathologie konnte in einem Thrombose Modell nachgewiesen werden. Hier wurde gezeigt, dass FXII konzentrationsabhängig, wie auch im Modell für den Amöbenleberabszess, über die Bildung kompakter und dichter Fibrinstrukturen zur Pathologie der Erkrankung beitragen kann [93]. Romer et al. zeigten zudem, dass eine erhöhte Fibrinsynthese, bzw. ein reduzierterer Plasmin-vermittelter Abbau von Fibrinstrukturen, eine verringerte Wundheilung zur Folge hat [148]. Im Amöbenleberabszess könnte die erhöhte Polyphosphatsynthese der *E. histolytica* Trophozoiten solch pathologische Level der FXII-Aktivierung und somit eine dichtere Abszessstruktur bewirken, was eine reduzierte Rekrutierung von Immunzellen in das abszessierte Gewebe bedingen und so die Abszessausheilung behindern könnte. Ebenso könnte die verstärkte Fibrinsynthese eine Einkapselung der Trophozoiten bewirken, was die Eliminierung des Parasiten durch Zellen des angeborenen Immunsystems erschweren würde.

Der Abbau von Fibrinnetzwerken, die Fibrinolyse, wird unter anderem durch das Enzym Plasmin katalysiert [149]. Weibliche, Plasmin-defiziente Mäuse die einer Ovariectomie unterzogen wurden, zeigten eine reduzierte Regenerationsfähigkeit im Vergleich zu nicht-kastrierten, Plasmin-defizienten weiblichen Mäusen [150]. Grandas et al. konnten zeigen, dass Östrogene die Expression fibrinolytischer Proteine, wie das der Matrix Metalloproteinase MT1 (MT1-MMP) unterstützen [151, 152]. Dies könnte mit ein Grund dafür sein, weshalb weibliche Individuen die Abszessausbildung besser kontrollieren können, als männliche: Östrogene würden somit die Fibrinolyse unterstützen, eine Abkapselung des Parasiten verhindern und damit die zelluläre Resolution des Krankheitsprozesses begünstigen. Dies zu untersuchen wäre ein wichtiger Bestandteil zukünftiger Forschungen.

## 4. Material & Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Tabelle 4.1.1: Verwendete Chemikalien

Antisedan®	Orion Pharma
Brefeldin-A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cepetor®	CP-Pharma
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
HPLC-Wasser	Pierce
Isofluran Forene® 100% (v/v)	Abbott GmbH & Co. KG
Ketamin Inresa	Inresa Arzneimittel GmbH
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
MgCl <sub>2</sub>	Promega
Penicillin	Grünenthal GmbH
RPMI-1640 w/o L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Streptomycin	Riemser Arzneimittel

Nicht gelistete Chemikalien wurden von Carl Roth, Merck oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

#### 4.1.2 Kits und Reagenzien

Tabelle 4.1.2: Verwendete Kits & Reagenzien

ApoA1, human	Academy Bio-medical Co.
Biocoll	Biochrom
CD14 Magnetic Particles, anti-human	BD Biosciences
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium, steril	PAN Biotech
DCS SuperVision 2 Single Species HRP-Polymer Ratte	DSC-diagnostics
ELISA-Kit CCL2	Biologend
LEGENDplex™ bead-based immunoassay, customised	Biologend
Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Scientific™
Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific™
M-CSF, human (recombinant)	Biologend
Pan Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec (MACS)
Percoll	GE Healthcare
Perm/Wash-Puffer (10x)	Biologend
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
RNAlater	Ambion
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
TRIzol®	Invitrogen
Vector® M.O.M.™ Immunodetection Kit	Vector Laboratories
Ventana diagnostic systems	Roche
Zombie UV™ Fixable Viability Kit	Biologend

### 4.1.3 Gebrauchsmaterial

Tabelle 4.1.3: Verwendete Gebrauchsmaterialien

96-Well Platte, Polypropylen, V-bottom	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EDTA Probenröhren	KABE Labortechnik GmbH
FACS-Röhrchen	Sarstedt
High-Binding 96-Well ELISA-Mikrotiterplatte	Greiner bio-one
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec
Multivette® 600 Z-Gel	Sarstedt
Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slides™	Thermo Scientific™
Reaktionsgefäße, DNA-, DNase-, RNase-frei	Biozym Scientific
S-Monovette	Sarstedt
Tissue Culture Plates 6-Well Flat bottom	Sarstedt

Gebrauchsmaterialien des normalen Laborbedarfs wurden nicht separat aufgeführt.

### 4.1.4 Geräte

Tabelle 4.1.4: Verwendete Geräte

ClinScan 7 T MRT	Bruker Biospin GmbH
ELISA-Reader MRXII	Dynex Technologies
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf
FACS LSR II	BD Biosciences
NanoZoomer 2.0-HT Digital slide scanner	Hamamatsu
Nikon ECLIPSE TS100 Mikroskop	Nikon
Nikon INTENSILIGHT C-HGFI	Nikon
Rotor-Gene RG-3000	Corbett Research
Tecnai Spirit transmission electron microscope	FEI

Geräte des normalen Laborbedarfs wurden nicht separat aufgeführt.

### 4.1.5 Software & Datenbanken

Für das Erstellen dieser Arbeit wurden folgende Softwares und Internetdatenbanken verwendet:

Tabelle 4.1.5: Verwendete Software und Internetdatenbanken

EndNote X4	Thomson Reuters
FACSDiva™	Becton Dickinson Biosciences
FlowJo 10.1	Treestar
MacVector 12.6	International Biotechnologies
Microsoft® Office 2010	Microsoft Corporation
Mouse Genome Informatics	<a href="http://www.informatics.jax.org">http://www.informatics.jax.org</a>
LEGENDplex™ Version 7.0 (Free analysis Software)	Biolegend
OsiriX Imaging Software DICOM Viewer (Open Source Version 32-bit 5.6)	<a href="http://www.osirix-viewer.com">http://www.osirix-viewer.com</a>
Primer 3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu">http://frodo.wi.mit.edu</a>
Primer-BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
PRISM® 6 for OSX	GraphPad
Rotor-Gene real time Analysis 6.0	Corbett Life Sciences

#### 4.1.6 Antikörper & rekombinante Moleküle

Tabelle 4.1.6: Verwendete Antikörper

Name	Klon	Konjugat	Hersteller
<b>Durchflusszytometrie</b>			
anti-human CD206	15-2	APC	Biolegend
anti-human HLA-DR	L243	AF700	Biolegend
anti-mouse Arg1	658922	APC	R&D Systems
anti-mouse CD11b	M1/70	PerCP	Biolegend
anti-mouse CD11c	HL3	FITC	BD Biosciences
anti-mouse CD127	A7R34	APC	eBiosciences
anti-mouse CD3	17A2	FITC	Biolegend
anti-mouse CD4	GK1	APC/Cy7	Biolegend
anti-mouse CD90.2	30-H12	Alexa Fluor® 700	Biolegend
anti-mouse F4/80	BM8	PE	Biolegend
anti-mouse IL-13	eBio13A	PE-Cy7	eBiosciences
anti-mouse Ly6C	HK1.4	FITC	Biolegend
anti-mouse Ly6G	1A8	APC	Biolegend
anti-mouse Siglec-F	E50-2440	PE-CF594	BD Biosciences
Isotyp IgG <sub>2b</sub> (Arg1)	658922	APC	R&D Systems
Isotyp IgG1 κ (IL-13)	eBRG1	PE-Cy7	eBiosciences
<b>MACS</b>			
anti-human CD14	MφP9	-	BD Biosciences
<b>Immunhistochemie</b>			
anti-mouse 7/4 (1:800)	7/4	-	Cedarline
anti-mouse Arg1 (1:1000)	19/Arginase I	-	BD Biosciences
anti-mouse CD11b (1:4000)	ab133357	-	Abcam
anti-mouse F4/80 (1:3000)	Cl:A3-1	-	Serotec
anti-mouse FXII	polyklonal	-	Sigma Aldrich
anti-mouse iNOS (1:50)	ab15323	-	Abcam
anti-mouse Ki-67 (1:50)	clB56	-	BD Biosciences
<b>Immundepletion/Applikation</b>			
anti-IL-13-mAb	413-ML	-	R&D Systems
mouse rIL-13	P600	-	Biolegend
goat IgG (IL-13)	polyklonal	-	R&D Systems

#### 4.1.7 Oligonukleotide

Wenn nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit Hilfe der Internetdatenbank *Primer 3* und der Software *Mac Vector* entworfen. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch MWG. Die Oligonukleotide wurden bei -20 °C gelagert. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotidpaare wurde mittels Schmelzpunkt-Analyse in der *qPCR* unter Verwendung des Maxima® SYBR Green *qPCR* Master Mix (2x) von Thermo Scientific ermittelt und kann in individuellen *qPCR*-Läufen um bis zu 0,5 °C abweichen. Der *Threshold* der Primerpaare wurde jeweils im ersten *qPCR*-Lauf festgelegt und in allen folgenden Läufen beibehalten.

Tabelle 4.1.7: Sequenz, Schmelztemperatur ( $T_m$ ), *Threshold* und anzunehmende Produktgröße der in der qPCR eingesetzten Oligonukleotide

Name	Sequenz [5'-3']	$T_m$ [°C]	<i>Threshold</i>	Produktgröße [bp]
Arg1_for Arg1_rev	GGAGACCACAGTCTGGCAGTTGGAA GAGCTGGTTGTCTAGGGGAGTGTGA	82,5	0,02212	116
CCL2_for CCL2_rev	TCTCTCTTCTCCACCACCA CGTAACTGCATCTGGCTGA	83,5	0,1126	107
CCL3_for CCL3_rev	ACACCCTGTTTCGCTGTAGG GATTCCTGGAAGGTGGTCAA	78,5	0,03119	133
CCL4-1_for CCL4-1_rev	CCCCTTCTGCTGTTTCTC GTCTGCCTCTTTGGTCAGG	80,5	0,01553	124
CCL5-4_for CCL5-4_rev	CTGCTGCTTTCCTACCTCT CCTTCGAGTGACAAACACGA	82	0,01208	109
CCL8-1_for CCL8-1_rev	ACGCTAGCCTTCACTCCAAA TATCTGGCCAGTCAGCTTC	81	0,00866	144
CCR2-3_for CCR2-3_rev	ACACCCTGTTTCGCTGTAGG GATTCCTGGAAGGTGGTCAA	78,5	0,03119	133
CX <sub>3</sub> CL1_for CX <sub>3</sub> CL1_rev	TGGGATTCGTGAGGTCATCT CGCGTTCTCCATTTGTGTA	81	0,01487	94
CX <sub>3</sub> CR1_for CX <sub>3</sub> CR1_rev	ATCCAGTTCAGGGAAGGAGG AGACTGGGTGAGTGACTGGC	81	0,02163	90
<i>EhActin</i> _for <i>EhActin</i> _rev	TAACTGAAAGAGGATATGCT TTCCTGCTTGATGCAGCTTTTG	79,5	0,02731	106
<i>EhCPA1</i> _for <i>EhCPA1</i> _rev	TGCATCATCTGTTCAATTCC CAACACCATATCCACCAGCA	73,6	0,03014	98
Gapdh_for Gapdh_rev	GGGTGTGAACCACGAGAAAT CCTTCCACAATGCCAAAGTT	80,5	0,03879	128
ICAM1-1_for ICAM1-1_rev	CTCCAGCTACCATCCAAA CTTCAGAGGCAGGAAACAGG	82,5	0,03092	103
ICAM2-1_for ICAM2-1_rev	ACTCCACAGACCCACAGAC CTCAAAGGCCTTCTCACCAG	80,5	0,04613	108
IL-4_for IL-4_rev	CCAAGGTGCTTCGCATATTT ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT	76,7	0,0285	153
IL-4R $\alpha$ _for IL-4R $\alpha$ _rev	TTAGTGTCAGTGTGGTGCCTGTA TCTCAGCCTCCAACAAGTCGAAA	84,2	0,02624	198
IL-10_for IL-10_rev	CCAAGCCTTATCGGAAATGA TCTCACCCAGGGAATTCAA	79,5	0,01615	153
IL-13-5_for <sup>1</sup> IL-13-5_rev <sup>1</sup>	CCTGGCTCTGCTTGCCTT GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA	83,5	0,03055	116
IL-13R $\alpha$ 1_for IL-13R $\alpha$ 1_rev	CCTTGCTTCTGTGGTAGTAGAG AAAGGGCCAGGAGGAAATAC	79,7	0,02217	98
IL-13R $\alpha$ 2_for IL-13R $\alpha$ 2_rev	GGAAAGGAGGACAAAGAGGTC GATTTAGTGTGCTGAAAGCTTACTC	74,7	0,04834	103
iNOS_for iNOS_rev	TGGTGGTGACAAGCACATTT AAGGCCAAACACAGCATACC	80	0,1392	119



Name	Sequenz [5'-3']	Tm [°C]	Threshold	Produktgröße [bp]
ITGAL-1_for	CTATCACTGCCGAACAAGCA	83,7	0,04359	179
ITGAL-1_rev	AGCAGAGGCCACTGAGGTAA			
Nr4a1-1_for	ACACCGGAGAGTTTGACACC	83,5	0,05801	104
Nr4a1-1_rev	CGAGGATGAGGAAGAAGACG			
RPS9_for	CCGCCTTGTCTCTCTTTGTC	86	0,03058	177
RPS9_rev	CCGGAGTCCATACTCTCCAA			
TGFβ1-3_for	TGGAGCAACATGTGGAAGCTC	80,5	0,01208	108
TGFβ1-3_rev	CGTCAAAAGACAGCCACTCA			
TGFβ2-2_for	ACACACACACACCCAGCAGT	82,5	0,01201	159
TGFβ2-2_rev	CTTCGGGTGAGACCACAAAT			

<sup>1</sup>[153]

#### 4.1.8 Medium & Zusätze

##### TY-I-SS-Medium (TY-Medium) [154]

80 g Trypticase Pepton  
 40 g Hefeextrakt  
 40 g Glucose  
 8 g NaCl  
 4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 4 g L-Cystein  
 0,8 g Ascorbinsäure  
 91,2 mg Fe-Ammoniumcitrat

##### RPMI-Medium (komplett human)

500 mL RPMI-1640  
 50 mL FCS  
 5 mL L-Glutamin  
 5 mL Pen/Strep

Die Bestandteile des *E. histolytica*-Kulturmediums TY-I-SS wurden in 4350 mL Aqua bidest gelöst und der pH-Wert mit 5 M NaOH auf 6,8 eingestellt. Das Medium wurde anschließend für 30 min im Dampfdruckkochtopf autoklaviert.

#### 4.1.9 Puffer & Lösungen

##### Citratpuffer (Histologie)

4,2 g Citrat  
 add. 2 L Aqua tridest, pH 6,0

##### ELISA-Substratpuffer

0,1 M Phosphat (pH 5,5)  
 15,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O  
 in 500 mL lösen  
 add. 1 L Aqua bidest, pH 5,5

##### Erythrozyten-Lyse-Puffer

10% 0,1 M Tris HCl (pH 7,5)  
 90% 0,16 M NH<sub>4</sub>Cl

##### ELISA-Substratlösung

200 µL TMB-Stammlösung  
 1,2 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 12 mL ELISA-Substratpuffer

##### ELISA-TMB-Stammlösung

30 mg Tetramethylbenzidin (TMB)  
 5 mL DMSO

##### FACS-Puffer

1 L 1x PBS  
 1% FCS  
 0,1% Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)

**MACS-Separations-Puffer**

200 mL 1x PBS, pH 7,2 (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> frei)  
1 g BSA (0,5%)  
800 µL 0,5 M EDTA (2mM)

**20x PBS (Ca<sub>2+</sub> und Mg<sub>2+</sub> frei)**

8 g KCl  
8 g KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
46 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
320 g NaCl  
add. 2 L Aqua bidest

**10x NaPBS**

23,86 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O (67mM)  
10,28 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O (33mM)  
163,6 g NaCl (1,4 M)  
add. 2 L Aqua bidest, pH 6,8

**TE-Puffer (Histologie)**

7,88 g Tris-HCL  
1,86 g EDTA  
pH 8,0  
add. 50 mL Aqua bidest

**4.1.10 *Entamoeba histolytica* & Gewinnung von *soluble amebic antigen* (SAA)**

Die Systematik von *E. histolytica* lautet wie folgt: Domäne Eukaryota, Stamm Amoebozoa, Klasse Entamoebidea, Gattung *Entamoeba*, Art *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903).

In dieser Arbeit wurde mit dem pathogenen *E. histolytica*-Stamm HM-1:IMSS gearbeitet, welcher 1964 aus einem an Amöbenkolitis erkrankten Patienten isoliert wurde. Mittlerweile existieren verschiedene Zelllinien dieses Stammes [155], welche dauerhaft in axenischer, mikroaerophiler Kultur ohne Wirtspassage gehalten werden. In dieser Arbeit wurde sowohl mit dem apathogenen Klon A1 aus der Zelllinie HM-1:ISS-A, als auch mit dem pathogenen Klon B2 aus der Zelllinie HM-1:ISS-B gearbeitet. Letzterer zeichnet sich durch eine besonders stabile Induktion des Amöbenleberabszesses im Mausmodell der Erkrankung aus, weshalb in dieser Arbeit ausschließlich Klon B2 für die Infektion der Tiere verwendet wurde.

Zur Herstellung von *soluble amebic antigens* (SAA) aus *E. histolytica* Trophozoiten der Klone A1 oder B2 für die Stimulation in der Zellkultur wurden  $1 \times 10^6$  Trophozoiten über 24 Stunden in einer 75 mL Kulturflasche kultiviert. Durch Inkubation auf Eis für 5 min wurden die adhärennten Trophozoiten in steriler Atmosphäre gelöst. Nach anschließender Sedimentation bei 430 x g und 4 °C für 5 min wurden die Zellen dreimalig mit Natrium-PBS (NaPBS) gewaschen, der Überstand verworfen und das Amöbenpellet abschließend im Residualvolumen gelöst. Die Lyse der Trophozoiten wurde durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in CO<sub>2</sub>/Ethanol forciert. Es folgte eine finale Zentrifugation bei 9000 x g und 4 °C für 10 min. Der das SAA-enthaltende Überstand wurde abgenommen und in ein steriles 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Schockgefrieren des Amöben-Extrakts mittels flüssigen Stickstoffs wurde dieses bei -80 °C gelagert.

**4.1.11 Mäuse**

Die Systematik der Hausmaus lautet wie folgt: Domäne Eukaryota, Stamm Chordata, Klasse Mammalia, Ordnung Rodentia, Überfamilie Muroidea, Familie Muridae, Unterfamilie Murinae, Gattung *Mus* (Mäuse), Art *Mus Musculus* (LINNAEUS, 1758).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden im Rahmen des Sonderforschungsprojektes 841 („Leberentzündung: Infektion, Immunregulation und Konsequenzen“) durchgeführt und unter den Voraussetzungen nach § 8 des Tierschutzgesetzes Deutschland durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg genehmigt (23/09; 46/13). Folgende Mausstämme, basierend auf dem Hintergrund der C57BL/6-Mäuse, wurden verwendet:

Tabelle 4.1.11: Verwendete Mausstämme

Mausstamm	Bezogen von	Phänotyp
C57BL/6J (WT)	Hauszucht BNITM	Wildtyp
ApoA1-Knockout	Hauszucht BNITM	Fehlen des Gens des Apolipoproteins A1
B2R-Knockout	Thomas Renné, UKE	Fehlen des Gens für den Bradykinin B2 Rezeptor
CCR2-Knockout	Daniel Engels, Universität Bonn	Fehlen des Gens des Chemokinrezeptors CCR2, Ly6C <sup>hi</sup> -Monozyten verbleiben im Knochenmark
FXI-Knockout	Thomas Renné, UKE	Fehlen des Gens für Koagulationsfaktor XI
FXII-Knockout	Thomas Renné, UKE	Fehlen des Gens für Koagulationsfaktor XII
IL-13tg	Universität Kiel	Kontinuierliche Überexpression von IL-13
IL-23p19-Knockout	Christoph Hölscher, FZ Borstel	Fehlen des Gens der IL-23p19-Untereinheit und somit des Zytokins IL-23

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus murinem Lebergewebe

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus murinem Lebergewebe wurde der große Leberlappen (*lobus lateralis sinister*) einer Maus entnommen, in sechs Teile geteilt und jeweils zwei Leberstücke in 1 mL RNA*later* in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß auf Eis gegeben. Nach Inkubation des Gewebes bei 4 °C über Nacht in RNA*later* wurden die Leberstücke mit Hilfe einer sterilen Pinzette aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in 500 µL Trizol<sup>®</sup> in einem 1,5 mL-Safe-Lock-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Homogenisierung des Gewebes durch händisches Mörsern. Nach Zugabe von weiteren 500 µL Trizol<sup>®</sup> wurde das homogenisierte Lebergewebe durch Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Safe-Lock-Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µL kaltem (4 °C) Chloroform versetzt und für 30 sek kräftig geschüttelt. Nach 3-minütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch erneut zentrifugiert (15 min, 4 °C, 16.000 x g), der Überstand in ein neues 1,5 mL-Safe-Lock-Reaktionsgefäß überführt, anschließend mit 500 µL Isopropanol versetzt und das Gemisch kräftig geschüttelt. Nach 10-minütiger Inkubation bei -80 °C wurde die RNA bei 16.000 x g und 4 °C für 15 min pelletiert und zwei Mal mit jeweils 1 mL 75% Ethanol gewaschen (je 5 min, 4 °C, 13.000 x g). Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen und das Pellet für 10 min bei RT an der Luft getrocknet. Zum Lösen des Pellets wurde dieses mit 200 µL RNase-freien Wassers versetzt und bei 56 °C unter ständigem Schütteln resuspendiert. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte durch Zuhilfenahme des *RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits* (QIAGEN), welches zeitgleich für die Durchführung eines DNase-Verdau auf der Säule verwendet wurde. Dabei wurden je 100 µL der mittels Trizol<sup>®</sup>/Chloroform-Aufreinigung isolierten RNA pro Säule eingesetzt und entsprechend der Angaben des Herstellers verfahren. Das Eluieren der RNA von der Säule erfolgte durch zweimalige Zugabe von 50 µL RNase-freien Wassers. Der Erfolg des auf der Säule durchgeführten DNase-Verdau wurde mittels *qPCR* geprüft. Gegebenenfalls wurde ein weiterer DNase-Verdau im Reaktionsgefäß nach Protokoll des Herstellers (QIAGEN) durchgeführt. Die Ausbeute und Reinheit der RNA wurde bei 260 und 280 nm am Photometer ermittelt, die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 4.2.2 Reverse Transkription

Zur cDNA-Synthese wurde das Kit *Maxima<sup>®</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific) verwendet. Nach Angaben des Herstellers wurde 1 µg RNA für die Reaktion eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte bei 50 °C für 30 min und wurde durch Inaktivierung des Enzyms bei 85 °C (5 min) gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde für maximal zwei Wochen bei -20 °C gelagert.

### 4.2.3 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Die quantitative Realtime-PCR (qPCR) ermöglicht sowohl die Vervielfältigung als auch die Quantifizierung eines Amplifikats. In dieser Arbeit wurde hierfür der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR<sup>®</sup>Green I* verwendet, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert und dadurch eine Quantifizierung des Produkts bereits während der Amplifikation ermöglicht. Dabei steigt die Lichtemission des Farbstoffs proportional zur Menge der amplifizierten cDNA an.

Die qPCR wurde mittels *RotorGene 3000* (Corbett Life Science) in einem 10 µL-Ansatz mit *Maxima<sup>®</sup> SYBR Green qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) und einer Primer-Endkonzentration von 0,3 µM sowie 1 µL cDNA (50 ng) durchgeführt. Um mögliche Ungenauigkeiten beim Überführen der cDNA auszuschließen und zu relativieren, wurde mit Doppelansätzen gearbeitet.

In den ersten sechs von insgesamt 45 Amplifikations-Zyklen erfolgte eine schrittweise Verringerung der *Annealing*-Temperatur von 64 °C auf finale 58 °C um jeweils 1 °C (*touch-down*), was eine erhöhte Spezifität der Amplifikation bedingt. Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen erfolgte mit Hilfe der Software *Rotor-Gene real time Analysis 6.0* und ausschließlich mit den Werten, die in der exponentiellen Phase der qPCR gewonnen wurden, da nur in dieser Phase der sogenannte *Threshold* der Fluoreszenzstärke überschritten wird und optimale Reaktionsbedingungen gegeben sind. Durch die während der Reaktion durchgeführte Schmelzpunktanalyse ergibt sich für jedes Oligonukleotidpaar ein spezifischer Schmelzpunkt. Nur Produkte, die den für das Amplifikat spezifischen Schmelzpunkt aufwiesen (s. Tab. 4.1.6), wurden für die weitere Analyse der Ergebnisse verwendet.

Tabelle 4.2.3: Reaktionsschritte der qPCR

Phase	Temperatur	Dauer
Aktivierung der Polymerase	95 °C	10 min
<b>45 Zyklen</b>		
Schmelzen	94 °C	30 sek
<i>Annealing</i> (in den ersten 6 Zyklen jeweils abzgl. 1 °C pro Zyklus)	64 – 58 °C	40 sek
Schmelzen	95 °C	30 sek
Schmelzen	95 °C	1 min
<b>Schmelzkurvenbestimmung</b>		
Schmelzen	67 °C	1 min
	67 – 95 °C	8 sek/Schritt
Abkühlen	40 °C	20 sek

Für die Auswertung der *qPCR* wurde der *Cycle of threshold* (Ct) herangezogen. Dieser wird in der exponentiellen Phase der Amplifikation bestimmt und entspricht dem Zyklus, bei welchem die Emission einer Probe die des Hintergrunds übersteigt. Wurde der Ct für ein Oligonukleotidpaar einmal bestimmt, so wurde dieser Wert in allen folgenden *qPCR*-Läufen beibehalten (Tab. 2.1.6). Die Normalisierung der jeweiligen cDNA-Konzentration eines Zielgens erfolgte mit Hilfe der in der Maus konstitutiv exprimierten Haushaltsgene *rps9* und *gapdh* und wurde wie folgt berechnet:

$$Ct_{\text{Referenzgen}} - Ct_{\text{Zielgen}} = \Delta Ct$$

Die relative Expression des Zielgens im Bezug zu den Referenzgenen wurde zunächst für jedes Referenzgen einzeln wie folgt ermittelt [156]:

$$\text{Rel. Expression}_{\text{Zielgen}} = 2^{\Delta Ct}$$

Die Ergebnisse wurden schließlich ohne Angabe eines Fehlers gemittelt. Für die Berechnung wurde eine Amplifikationseffizienz von 2 (100%) angenommen, da kein Vergleich zwischen den Produkten verschiedener Oligonukleotidpaare, sondern immer nur ein Vergleich zwischen den Produkten derselben Oligonukleotidpaare vorgenommen wurde und für jeden Lauf mit denselben Reagenzien die gleiche Effizienz angenommen werden kann.

### 4.3 Biochemische Methoden

#### 4.3.1 CCL2-ELISA

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) diente der Quantifizierung von Proteinkonzentrationen mit Hilfe spezifischer Antikörper z.B. in Zellkulturüberständen oder im Blutserum. In dieser Arbeit wurde hierzu zunächst ein gegen CCL2 gerichteter Antikörper (*capture* Antikörper) 1:200 mit *1x Coating Buffer A* verdünnt und auf der Polystyrol-Oberfläche einer Maxi-Sorb Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden anschließend durch viermaliges Waschen mit 0.05 % Tween in PBS entfernt. Das Blockieren unspezifischer Bindestellen erfolgte durch eine einstündige Inkubation mit PBS/BSA bei RT. Nach viermaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween wurden die Zellüberstände/das Blutserum in einer 1:20 Verdünnung mit *1x Assay Diluent A* auf die vorbehandelte Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss an viermaliges Waschen mit PBS/0,05 % Tween erfolgte eine Inkubation mit einem für das Zielprotein CCL2 spezifischen Biotin-konjugierten Antikörper (Detektions-Antikörper; 1:200 in *1x Assay Diluent A*) für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler. Es wurde erneut 4 Mal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen, danach erfolgte eine Inkubation mit Meerrettich-Peroxidasegekoppeltem (HRP, *horseradish peroxidase*) Streptavidin (1:1000 in *1x Assay Diluent A*) welches während einer 30-minütigen Inkubation bei RT auf dem Schüttler an das Biotin des Detektions-Antikörpers bindet. Nach fünf weiteren Waschschritten mit PBS/0,05 % Tween wurde TMB-haltige Substratlösung hinzugegeben. Der Umsatz des Substrates mittels HRP führte zu einem Farbumschlag in Abhängigkeit der Menge des gebundenen Sekundärantikörpers. Durch Zugabe von 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Reaktion gestoppt und die photometrischer Messung am ELISA-Reader MRXII, Dynex Technologies bei einer optischen Dichte von 450 und 570 gemessen und quantifiziert. Das Chemokin CCL2 wurde in dieser Arbeit mittels ELISA Kits von R&D Systems entsprechend der Angaben des Herstellers nachgewiesen und die Zellüberstände in Triplikaten analysiert.

#### 4.3.2 *Bead*-basierter Immunoassay (LEGENDplex™)

Der in dieser Arbeit verwendete *Bead*-basierte Immunoassay der Firma Biolegend beruht auf den grundlegenden Prinzipien eines Sandwich-ELISAs, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, jedoch können mit dieser Methode die Konzentrationen mehrerer Analyte in nur einer Probe zur selben Zeit quantifiziert werden. Dies gelingt durch den Einsatz von *Beads* unterschiedlicher Größe, welche eine APC-Eigenfluoreszenz aufweisen und jeweils mit einem spezifischen Antikörper gegen das Protein von Interesse gekoppelt werden können (*Capture Beads*). So wird gewährleistet, dass in einem Gemisch gleich mehrere verschiedene Analyte von spezifischen *Beads* gebunden werden können. Mit Hilfe fluoreszierender PE-gekoppelter *Detection-Antibodies* wird anschließend die Messung der Analyte am Durchflusszytometer ermöglicht. Die abschließende Quantifizierung erfolgt mittels der Software LEGENDplex™ Version 7.0 unter Verwendung einer Standardkurve. Dabei wurde für jede Analyt-spezifische *Bead*-Population mit Hilfe des vom Hersteller mitgelieferten Standard-Cocktails eine eigene Standardkurve bis 10.000 pg/mL erstellt.

Zur Durchführung des LEGENDplex™ wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Polypropylen-Mikrotiterplatte 6,25 µL Assay-Puffer vorgelegt und anschließend die Probe (Zellkulturüberstand oder Blutserum) hinzugegeben. Nach Zugabe der Analyt-spezifischen *Capture-Beads* sowie der biotinylierten *Detection-Antibodies* erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation des Gemischs über Nacht bei 4 °C unter ständigem starkem Schütteln. Am Folgetag wurde PE gekoppeltes Streptavidin (SA-PE) beigefügt, welches während einer 30-minütigen lichtgeschützten Inkubation bei RT unter ständigem Schütteln an die *Detection-Antibodies* im Gemisch bindet. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der verwendeten Mikrotiterplatte für 5 min bei 1000 x g und RT. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und die *Beads* in 150 µL Wasch-Puffer gelöst. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die *Beads* sowie die gebundenen Analyte nach Angaben des Herstellers am Durchflusszytometer LSRII vermessen.

In dieser Arbeit wurde im Falle von Zellkulturüberständen mit ¼-Volumen (je 6,25 µL) der Herstellervorgaben gearbeitet, im Falle von Blutserum mit ½ Ansatz. Weiterhin wurden die Proben in Doppelansätzen analysiert, wobei Non-Responder von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

#### 4.3.3 Histologie & Immunhistochemie

Sowohl die Histologie als auch die Immunhistochemie dienen dem mikroskopischen Nachweis verschiedener Zelltypen in Gewebeschnitten, nutzen hierfür jedoch verschiedene Hilfsmittel. So werden bei der Histologie lediglich Färbelösungen verwendet, während bei der Immunhistochemie Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen oder partikulärem Material wie Goldpartikeln oder auch radioaktiven Isotopen gekoppelt sind, genutzt werden. In dieser Arbeit wurden Gewebeschnitte murinen Lebergewebes erstellt. Hierfür wurde der große Leberlappen infizierten und nicht infizierter Mäuse entnommen und für mind. 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung bei RT konserviert. In Kooperation mit Anke Kuhfuss und Birgit Raschdorff (Abteilung Pathologie von Prof. Dr. Racz, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) Hamburg) sowie Claudia Marggraff (Abteilung Molekulare Parasitologie von Prof. Dr. Tannich, BNITM) wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und nach Aushärtung als Schnitte von 0,2 µm Schichtdicke auf Objektträgern fixiert. Um verschiedene Zellpopulationen in einer Gewebeprobe nachweisen zu können, wurden aufeinanderfolgende Schnitte mit verschiedenen histologischen und immunhistochemischen Verfahren behandelt. Zur allgemeinen Darstellung einzelner Zellen im Gewebe wurde zunächst die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) durchgeführt, durch welche Zellplasma rötlich und der Zellkern

blau-violett erscheinen. *E. histolytica* Trophozoiten erscheinen in dieser Färbung weiß. Um diese spezifisch anzufärben, wurde die sogenannte *E. his*-Färbung angewandt. Bei dieser handelt es sich um ein immunhistochemisches Verfahren, bei dem zur Visualisierung der Trophozoiten ein Kaninchenserum als Primärantikörper verwendet wird, welches gegen verschiedene Proteine von *E. histolytica* gerichtet ist (170-kD Lektin; *surface protein (P) 1*; *superoxide dismutase surface*; Verdünnung 1:30000) (zur Verfügung gestellt von Iris Bruchhaus und Egbert Tannich, Abteilung Molekulare Parasitologie, BNITM). Weiterhin wurde zum Nachweis von Neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen) und Monozyten ein gegen das Oberflächenprotein 7/4 gerichteter Primärantikörper eingesetzt ( $\alpha$ -7/4; Klon 7/4; Cedarlane; Verdünnung 1:1000). Zur Visualisierung von Makrophagen wurde ein Primärantikörper verwendet, welcher gegen das Makrophagen-spezifische Oberflächenprotein F4/80 gerichtet ist ( $\alpha$ -F4/80; Klon Cl:A3-1; Serotec; Verdünnung 1:3000). Beide Antikörper wurden mit Hilfe eines *horseradish Peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers (DSC) und der Entwicklung mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (40  $\mu$ L DAB Konzentrat in 100  $\mu$ L DAB Substratpuffer) visualisiert, wobei eine mikroskopisch detektierbare bräunliche Färbung entsteht. Für die Detektion von Arg1 im Gewebe wurde ein gegen das Apolipoprotein gerichteter Antikörper verwendet ( $\alpha$ -Arg1) und mit Hilfe des *Vector® M.O.M.™ Immunodetection Kits* von Vector Laboratories für die Analyse am Mikroskop visualisiert.

Die Färbung von iNOS und CD11b erfolgte in Kooperation mit der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Die Visualisierung von iNOS wurde dabei mit Hilfe des polyklonalen  $\alpha$ -iNOS-Antikörpers (Abcam; Verdünnung 1:50) und CD11b mittels des monoklonalen  $\alpha$ -CD11b-Antikörpers [EPR 1344] (Abcam; ab133357; Verdünnung 1:4000) sowie unter Verwendung des *Ventana diagnostic systems* (Roche) erreicht. Die Färbung von Ki-67 erfolgte in Kooperation mit Penelope Pelczar aus der medizinischen Klinik und Poliklinik des UKEs. Hierbei wurde der gegen Ki-67 gerichtete monoklonale Maus anti-human Antikörper B56 verwendet (BD Biosciences; Verdünnung 1:50) und mittels eines HRP-Sekundärantikörpers und dessen Substrat DAB sichtbar gemacht. Die Visualisierung von FXII erfolgte in Kooperation mit Dr. Andy Long vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des UKEs. Die Detektion von FXII wurde dabei über einen  $\alpha$ -FXII-Antikörper (Abcam) erreicht und ebenfalls durch HRP-DAB-Reaktion für die Mikroskopie visualisiert.

### 4.3.4 Elektronenmikroskopie

Um die durch *E. histolytica*-Trophozoiten synthetisierten Polyphosphate (polyP) in der Elektronenmikroskopie (EM) sichtbar zu machen, wurde der Parasit zunächst über Nacht auf *Glass-Chamber-Slides* bei 37 °C bis zu einer Konfluenz von 70 – 80% kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Trophozoiten mit Typ I Kollagen und  $\text{Ca}^{2+}$  für 4 Stunden bei 37 °C, um die polyP-Synthese im Parasiten zu stimulieren. Es folgte ein Waschschriff durch vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes, Zugabe von PBS und erneuter vorsichtiger Abnahme des Überstandes. Zum Fixieren der Zellen wurden diese für 15 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mittels 0,05% Saponin in PBS für 30 min. Auf eine 30-minütige Inkubation mit Blockier-Lösung (2% FCS in PBS) folgten ein Waschschriff sowie eine einstündige Inkubation mit dem gegen polyP gerichteten Antikörper *polyphosphate binding domain* (PPBD; PPX $\Delta$ 12; 100  $\mu$ g/mL) bei 37 °C. Dieser kann aufgrund seines His-Tags mit einem anti-His-Tag-Immunogold-Antikörper in der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die weitere Verarbeitung der Präparate erfolgte durch Katharina Höhn, Leiterin der Elektronenmikroskopie des BNITMs, und beinhaltete die Dehydrierung in einer aufsteigenden

Ethanol-Reihe mit anschließender Einbettung in epoxy resin (Epon). Mit Hilfe des *Ultracut E Ultramicrotomes* (Reichert) wurden ultradünne Schnitte angefertigt, welche schließlich in einem *Tecnai Spirit transmission electron microscope* bei 80 kV begutachtet wurden.

### 4.4 Zellbiologische Methoden

#### 4.4.1 Kultivierung von *E. histolytica*

Die Kultivierung von *E. histolytica* Trophozoiten wurde durch Dr. Jenny Matthiesen und Corinna Lender durchgeführt und erfolgte in komplettiertem TY-I-SS-Medium in 70 mL- oder 250 mL-Kulturflaschen bei 37 °C unter axenischen, mikroaerophilen Bedingungen. In regelmäßigen Abständen wurden die adhärennten Trophozoiten durch Inkubation auf Eis von der Kulturflasche abgelöst, 4 – 10 % der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und diese mit frischem komplettiertem TY-I-SS-Medium aufgefüllt.

#### 4.4.2 Isolierung von Leukozyten aus murinem Gewebe

Zur Analyse verschiedener Leukozyten-Populationen wurden diese aus murinem Blut oder Lebergewebe isoliert.

##### 4.4.2.1 Isolierung von Leukozyten aus murinem Blut

Zur Untersuchung der Ly6C<sup>hi</sup>- und Ly6C<sup>lo</sup>-Monozyten im Blut von männlichen und weiblichen WT- und ApoA1<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels Durchflusszytometrie wurden wenige Tropfen peripheren Blutes in EDTA-Röhrchen entnommen. Nach anschließender 2 – 3-minütiger Inkubation mit 2 mL auf 37 °C vorgewärmtem Erylyse-Puffer wurden die Zellen bei 300 x g und 4 °C für 8 min in PBS sedimentiert. Zur Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie siehe Abschnitt 4.4.7 und 4.4.8.

##### 4.4.2.2 Isolierung von Leukozyten aus murinem Lebergewebe

Zur Isolierung der Leukozyten aus murinem Lebergewebe wurde zunächst der große Leberlappen eines infizierten oder nicht infizierten Tieres mit 10 mL eiskaltem PBS perfundiert, entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in kaltem PBS gelagert. Das Gewebe wurde im Anschluss mit 10 mL PBS und einem flachen Mörser durch ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falcon gerieben. Nach einem Waschschrift bei 300 x g und 4 °C für 8 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 mL 80 % Percoll in RPMI resuspendiert. Das Gemisch wurde in ein 15 mL Falcon überführt und mit 5 mL 40 % Percoll in RPMI vorsichtig überschichtet. Die Auftrennung der Zellen im Percoll-Dichtegradienten erfolgte durch Zentrifugation ohne Bremse bei 1250 x g und 21 °C für 25 min. Die obere Schicht des Gradienten wurde abgenommen und verworfen. Die Interphase, welche sowohl Lymphozyten als auch Erythrozyten enthielt, wurde großzügig aufgenommen, in ein neues 15 mL Falcon überführt und zweimal mit 10 mL PBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Zellpellet mit 1 mL Erylysepuffer versetzt, das Gemisch für eine Minute bei RT inkubiert und sofort mit 10 mL PBS versetzt und gewaschen. Wenn nötig, erfolgte eine zweite Erylyse mit derselben Vorgehensweise. Das weitestgehend Erythrozyten-freie Zellpellet wurde abschließend in 1 mL PBS resuspendiert und die Zellen entsprechend der Abschnitte 4.4.7 und 4.4.8 für die Analyse mittels Durchflusszytometrie weiterführend behandelt.



#### 4.4.3 Isolierung humaner Zellen aus peripherem Blut

Für die Stimulation und Analyse humaner Zellen *in vitro* erfolgte die Isolation verschiedener Zellpopulationen aus humanem peripherem Blut.

##### 4.4.3.1 Isolierung humaner PBMCs aus peripherem Vollblut

Die Entnahme peripheren Blutes humaner männlicher und weiblicher Blutspender in Heparin-Röhrchen erfolgte durch Dr. Egbert Tannich (BNITM). Jeweils 15 mL Blut wurden im Anschluss in einer sterilen Atmosphäre mit 15 mL DPBS in einem 50 mL Falcon vermischt. In einem weiteren 50 mL Falcon vorgelegtes Biocoll (15 mL) wurde anschließend mit dem Blut/DPBS-Gemisch überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 430 x g und 21 °C für 30 min ohne Bremse, um eine gute Auftrennung der Zellen im Dichtegradienten zu erreichen. Die obere gelbliche Plasmaphase wurde bis auf ca. 2 cm oberhalb der Interphase abgenommen und verworfen. Die Leukozyten- und Thrombozyten-haltige Interphase wurde abgenommen (ca. 15 mL). Dabei wurden je zwei Fraktionen gepoolt, in ein neues 50 mL Falcon überführt und mit DPBS versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 20 min wurde der Überstand verworfen. Dabei wurde das Falcon im Anschluss in einer waagerechten Position gehalten, das Thrombozyten-haltige Residualvolumen abpipettiert und ebenfalls verworfen. Die Zellpellets wurden jeweils in 1 mL DPBS resuspendiert, in einem 50 mL Falcon gepoolt und erneut in DPBS gewaschen. Die gewonnenen PBMCs wurden im Anschluss zur Isolation von Gesamt- oder CD14<sup>+</sup>-Monozyten verwendet (s. 4.4.3.2 und 4.4.3.3).

##### 4.4.3.2 Isolierung der Gesamt-Monozyten aus humanen PBMCs

Zur Isolierung der Gesamt-Monozyten aus humanen PBMCs wurde eine Negativselektion der Zellen mit Hilfe des *Pan-monocytes-Kits* (Miltenyi) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die PBMCs zunächst durch ein mit MACS-Puffer angefeuchtetes 30 µm Nylonsieb gefiltert und der Durchfluss bei 300 x g und 21 °C für 10 min zentrifugiert. Pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurden 30 µL MACS-Puffer, 10 µL *FcR blockin reagent* und 10 µL *Biotin-Antibody* hinzugegeben, das Pellet resuspendiert und das Gemisch gut gevortext. Nach einer Inkubation bei 4 °C für 5 min wurden pro  $1 \times 10^7$  Zellen erneut 30 µL MACS-Puffer sowie 20 µL Anti-Biotin hinzugefügt. Das Gemisch wurde gut gevortext und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Eine der Zellzahl entsprechende Anzahl LS-Säulen wurde an einem Magneten befestigt und die Säulen jeweils mit 3 mL MACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Probe auf die LS-Säulen gegeben (max.  $1 \times 10^8$  gelabelte Zellen pro Säule) und in einem 15 mL Falcon aufgefangen. Abschließend wurden die Säulen je dreimal mit 3 mL MACS-Puffer gewaschen. Der gesamte Durchfluss wurde sedimentiert, das Pellet in einem seiner Größe entsprechenden Volumen RPMI-human-komplett gelöst und die Zellzahl bestimmt. Die gewonnenen Gesamt-Monozyten wurden im Anschluss in einem *in vitro* Stimulationsassay eingesetzt (s. 4.4.6.2).

##### 4.4.3.3 Isolierung von CD14<sup>+</sup>-Monozyten aus humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden wie in Abschnitt 4.4.3.1 beschrieben aus peripherem Blut isoliert und mit 5 mL MACS-Puffer für 5 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 50 µL magnetischen anti-human CD14-*Beads* pro  $1 \times 10^6$  gezählten Zellen gelöst und das Gemisch für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde 1 mL MACS-Puffer hinzugefügt, die Suspension in ein FACS-Röhrchen überführt und für 10 min am Magneten inkubiert. Die nicht gebundenen CD14<sup>-</sup>-Zellen wurden vorsichtig abgenommen. Das die CD14<sup>+</sup>-Fraktion enthaltende Tube wurde vom Magneten genommen und die *Beads* sowie die daran gebundenen Zellen vorsichtig durch Zugabe von 1 mL MACS-Puffer gelöst. Es folgte eine 4-minütige Inkubation am Magneten mit angeschlossenem Waschschrift wie zuvor beschrieben, sowie eine

weitere Inkubation am Magneten für 4 min in 1 mL MACS-Puffer. Der Überstand wurde abgenommen, die an die *Beads* gebundenen CD14<sup>+</sup>-Zellen in 1,5 mL RPMI-human-komplett gelöst und die Zellzahl bestimmt. Je  $1 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden in ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät und die Generierung von *monocyte derived macrophages* (MDMs) eingeleitet (s. 4.4.4).

### 4.4.4 Generierung humaner MDMs aus CD14<sup>+</sup>-Monozyten

CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden wie in Abschnitt 4.4.3.3 beschrieben aus humanem peripheren Blut isoliert und je  $1 \times 10^6$ -Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte in 5 mL RPMI-human-komplett ausgesät. Nach Zugabe von 10 ng/mL M-CSF wurden die Zellen für eine Dauer von 7 – 10 Tagen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. An Tag 3 und 5 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel. Dabei wurden 2,5 mL Medium vorsichtig abgenommen und verworfen und 2,5 mL frisches RPMI-human-komplett sowie weitere 10 ng/mL M-CSF hinzugegeben. Zur Ernte der adhärennten Makrophagen wurde zunächst der gesamte Überstand abgenommen, 1 mL frisches RPMI-human-komplett hinzugegeben und die Zellen mit Hilfe eines *Cell-Scrapers* vom Boden der Kulturplatte gelöst.

### 4.4.5 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl, der *E. histolytica*-Trophozoiten, der murinen Leukozyten sowie der humanen PBMCs, Monozyten und MDMs wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 mit dem Farbstoff Trypan-Blau versetzt. Dieser bewirkt eine Blaufärbung toter Zellen, wodurch diese im Mikroskop von vitalen Zellen unterschieden werden können und eine Zählung ausschließlich Letzterer ermöglicht wird. 10 µL der Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer *bright-line*, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>) gegeben, vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl pro mL wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Gesamtzellzahl in ausgezählten Großquadraten}}{\text{ausgezählte Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

### 4.4.6 In vitro Stimulationsassays humaner Zellen

Humane Gesamt- oder CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden wie in Abschnitt 4.4.3.2 und 4.4.3.3 beschrieben aus dem peripheren Blut humaner Blutspender isoliert. CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden zunächst wie in 4.4.4 beschrieben zu MDMs differenziert. Generierte MDMs sowie Gesamt-Monozyten wurden anschließend in *in vitro* Stimulationsassays eingesetzt.

#### 4.4.6.1 In vitro Makrophagen-Stimulationsassay

Humane *monocyte derived macrophages* (MDMs) wurden wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben generiert und geerntet. Je  $5 \times 10^4$  MDMs wurden in 50 µL in ein Well einer 96-Well-Kulturplatte gegeben. Ein Teil der Zellen wurde mit 50 µL humanem RPMI-komplett versetzt, ein weiterer Teil mit 100 µg/mL ApoA1 in 50 µL RPMI-human-komplett. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurde je eine Stimulanz in 100 µL RPMI-komplett-human zu den Zellen gegeben. Die Konzentrationen der Stimulanzen waren dabei wie folgt: 0,1 µg/mL LPS; 50 mg/mL LTA; 10 µg/mL EhLPPG; 100 µg/mL SAA;  $2 \times 10^5$  *infection units* eines humanen inaktivierten Hepatitis B-positiv Serums. Für die Konzentrationsbestimmung verschiedener Chemokine/Zytokine mittels *Bead*-basiertem Immunoassay (s. 4.3.2) wurde der Überstand der MDMs nach 48 Stunden in eine Polypropylen-Platte überführt und bis zur Weiterverarbeitung im *Bead*-basierten Immunoassay bei -20 °C gelagert.

#### 4.4.6.2 *In vitro* Monozyten & Makrophagen-Stimulationsassay

Humane MDMs wurden wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben generiert. Je  $2 \times 10^4$  MDMs wurden in 50  $\mu$ L RPMI-komplett-human in ein Well einer 96-Well-Kulturplatte gegeben. Ein Teil der Zellen wurde für 16 Stunden mit 100  $\mu$ g/mL ApoA1 in 50  $\mu$ L RPMI-human-komplett bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, während zu den restlichen Zellen ApoA1-freies RPMI-komplett-human gegeben wurde. Im Anschluss wurden die MDMs mit 50  $\mu$ L RPMI-komplett-human versetzt, welches je eine der folgenden Stimulanzen in der entsprechenden Konzentration enthielt: 0,1  $\mu$ g/mL LPS; 10  $\mu$ g/mL *EhLPPG*; 100  $\mu$ g/mL SAA;  $2 \times 10^6$  *infection units* eines humanen inaktivierten Hepatitis B-positiv Serums. Während der 4-stündigen Stimulation erfolgte die Isolation humaner Gesamt-Monozyten aus peripherem Blut (s. 4.4.3.1 und 4.4.3.2). Je  $6 \times 10^4$  aufgereinigte Gesamt-Monozyten wurden im Anschluss in 50  $\mu$ L RPMI-komplett-human zu den vorstimulierten MDMs gegeben. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen geerntet und für die Analyse im Durchflusszytometer weiterverarbeitet (s. 4.4.7 und 4.4.8).

#### 4.4.7 Antikörperfärbung für die Durchflusszytometrie

Für die Charakterisierung von murinen und humanen Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle und die Analyse der intrazellulären Zytokin-Expression per Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben präpariert. Es folgte eine Zentrifugation für 4 min bei 4 °C und 300 x g. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300  $\mu$ L PBS resuspendiert. Um tote Zellen während der Analyse von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Probe (murin/human) für 15 min bei RT mit einem lebend/tot-Farbstoff im Verhältnis 1:1000 unter Lichtausschluss inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 4 min bei 4 °C und 300 x g wurde der Überstand verworfen und ein weiterer Waschschrift in PBS durchgeführt. Murine Zellen, nicht jedoch humane Zellen, wurden im Anschluss für 20 min bei 4 °C in 100  $\mu$ L Fc-Block (1:10; Ratte anti-Maus CD16/CD32-Antikörper aus dem Überstand von CD16/CD32 Hybridomzellen (Fc- $\gamma$  III/II Rezeptor), zur Verfügung gestellt von Thomas Jacobs, Abteilung für Immunologie, BNITM) geblockt. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet (murin/human) in 100  $\mu$ L Fixierungs-Puffer-Lösung (Biolegend) resuspendiert und die Zellen für 20 min bei RT im Dunkeln fixiert. Nach einem Waschschrift folgte eine Zentrifugation in 150  $\mu$ L Permeabilisierungspuffer (4 min bei 4 °C und 300 x g; Biolegend). Im Anschluss wurde das Pellet mit 100  $\mu$ L Permeabilisierungspuffer versetzt und die Zellen für 15 min bei RT und unter Ausschluss von Licht permeabilisiert. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen für eine Stunde bei 4 °C (murin) oder für 45 min bei RT (human) mit einem zuvor austitrierten optimalen Volumen der jeweiligen Antikörper unter Ausschluss von Licht inkubiert. Dabei wurde der jeweilige Antikörpermix in 100  $\mu$ L Permeabilisierungspuffer zu der 100  $\mu$ L Zellsuspension hinzugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 2 mL PBS wurden die Zellen in 200  $\mu$ L PBS aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie am LSRII analysiert (s. 4.4.8).

#### 4.4.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der qualitativen und quantitativen Analyse von Zellen in einer Probe. Dabei passieren die mittels einer hochpräzisen Küvette vereinzelt Zellen nacheinander einen Laserstrahl. Das durch das Passieren der Zellen entstehende Streulicht erreicht einen Detektor, welcher die empfangenen Daten auswertet. Der ermittelte *Forwardscatter* (FSC) stellt dabei ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel dar und hängt vom Volumen der Zelle ab. Die Granularität einer Zelle spiegelt sich im *Sidewardscatter* (SSC) wieder, welcher ein Maß für die

Brechung des Lichts im rechten Winkel darstellt. Weiterhin kann eine Differenzierung der Zellen anhand ihrer Eigenfluoreszenz sowie der Fluoreszenz spezifischer gebundener Antikörper erreicht werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen erfolgten am LSRII. Zur Analyse der Daten wurden die Zellen von Interesse zunächst anhand ihrer Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) eingegrenzt. Durch Verwendung der Parameter SSC-A und SSC-H erfolgte der Ausschluss von Zelldubletten. Mit Hilfe eines lebend/tot-Farbstoffs, welcher eine Färbung toter Zellen bewirkt, konnten diese in der weiteren Analyse ebenfalls ausgeschlossen werden. Abschließend wurden die Zellen einer Probe anhand der Fluoreszenzemission der an spezifische Moleküle von Interesse gekoppelten Antikörper mit Hilfe der Software FACS Diva™ sowie FlowJo analysiert.

## 4.5 Das murine Infektionsmodell des Amöbenleberabszesses

### 4.5.1 Induktion des Amöbenleberabszesses

Um den Amöbenleberabszess (ALA) im Mausmodell zu untersuchen, wurden 8–12 Wochen alte, männlichen oder weibliche C57BL/6J (WT)- sowie diverse *Knockout*-Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten durch PD Dr. med. vet. Hannelore Lotter oder Dr. rer. nat. Helena Fehling infiziert. Etwa 10 min nach intraperitonealer (ip) Applikation eines Sedativums (pro Tier: 6,25 µL Cepetor (1 mg/mL), 27 µL Ketamin Inresa (50 mg/mL), 66 µL steriles PBS) wurde die Bauchhöhle der Tiere mit einem ca. 1 cm großen Schnitt eröffnet. Es folgte eine Injektion von  $1,25 \times 10^5$  *E. histolytica* Trophozoiten des pathogenen Klons B2 in 25 µL nicht-komplettiertem TY-I-SS-Medium in den linken kaudalen Leberlappen. Nach erfolgreicher Injektion wurde das Bauchfell vernäht und die Wunde mit Wundklammern fixiert. 45 min nach Einleitung der Sedierung erfolgte die intramuskuläre Applikation von 50 µL Antisedan® pro Tier (1:10 in sterilem PBS verdünnt; 5 mg Atipamezolhydrochlorid, 1 mg Methyl-4-hydroxybenzoat), was den Kreislauf der Tiere stabilisiert und zeitgleich das Aufwachen einleitet. Während des gesamten Vorgangs wurden die Mäuse mittels Wärmeplatten vor dem Auskühlen geschützt. Die Tiere standen unter ständiger Beobachtung. Die Wundklammern wurden frühestens fünf Tage nach dem Eingriff entfernt.

### 4.5.2 Immundepletion und Neutralisation *in vivo*

Zur Depletion von IL-13 in männlichen WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden den Tieren 100 µg eines α-IL-13-Antikörpers in 100 µL PBS einen Tag vor Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten i.p. appliziert. Als Kontrolle dienten WT- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Tiere, denen 100 µg eines Ziege-Kontroll-IgG-Antikörpers zum selben Zeitpunkt verabreicht wurden.

Die Depletion von FXII in männlichen WT-Mäusen erfolgte durch retro-orbitale Applikation von 100 µg/mL des gegen FXII gerichteten Antikörpers 3F7 in PBS 30 min vor Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten. Kontrolltieren wurden 100 µg/mL eines Kontroll-IgGs verabreicht.

### 4.5.3 Applikation von rIL-13 und rIL-13/α-IL-13 *in vivo*

Die Applikation von rekombinantem IL-13 (rIL-13) in männlichen WT-Mäusen erfolgte durch die Verabreichung von 1,2 µg rIL-13 in 100 µL PBS i.p. direkt im Anschluss an die Infektion sowie an Tag 1 und 2 nach Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten. Zur Kontrolle wurden WT-Mäusen 100 µL PBS appliziert.

Zur Herstellung des rIL-13/ $\alpha$ -IL-13-Komplexes wurden 9  $\mu$ g rIL-13 mit 48  $\mu$ g  $\alpha$ -IL-13 in 1032  $\mu$ L PBS für 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden WT-Mäusen je 1,2  $\mu$ g rIL-13 und 6,4  $\mu$ g  $\alpha$ -IL-13 in 150  $\mu$ L PBS i.p. direkt im Anschluss an die Infektion an Tag 1 und 2 nach Infektion appliziert. Den Tieren einer WT-Kontrollgruppe wurden je 6,4  $\mu$ g eines Ziege-Kontroll-IgG-Antikörpers in 150  $\mu$ L PBS verabreicht.

### 4.5.4 Bestimmung der Abszessvolumina mittels MRT

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Verfahren, bei welchem Atomkerne im Gewebe durch hochfrequente elektromagnetische Strahlung angeregt und visualisiert werden können. Dazu wird in einem Magnetresonanztomographen ein starkes äußeres Magnetfeld angelegt, entlang dessen sich die einzelnen Atomkerne ausrichten. Anschließend werden kurze intensive elektromagnetische Impulse passender Frequenz auf das im MRT befindliche Objekt eingestrahlt. Da Wasserstoff zu einem hohen Anteil in biologischem Gewebe vorhanden ist und durch magnetische Strahlung angeregt werden kann, wird bei einer MRT-Messung der *Kernspin* des Wasserstoff-Isotops für die Bildgebung genutzt. Ein Teil der Energie der elektromagnetischen Impulse wird bei der Messung von den Wasserstoff-Atomkernen aufgenommen und im Anschluss zeitversetzt wieder abgegeben. Die dabei entstehenden elektromagnetischen Wellen werden von einer Empfängerspule verarbeitet und in ein visuelles Bild umgerechnet. Da sich Wasserstoffatome für die Messung am MRT am besten eignen, lassen sich wasserhaltige Gewebe besonders differenziert darstellen. Diese erscheinen auf den Schnittaufnahmen hell, Organe hingegen stellen sich deutlich dunkler dar. Wasserarme Strukturen wie Knochen erscheinen hingegen fast schwarz. Auch Blutgefäße und der Darm heben sich aufgrund ihres hohen Luftgehalts nicht gut vom Hintergrund ab.

Um die Entwicklung des Amöbenleberabszesses über den Verlauf der ersten sieben Tage nach Infektion genauer analysieren zu können und dabei die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Dieckhoff, Dipl. Phys. Thomas Ernst und Priv. Doz. Dr. med. Harald Ittrich der Radiologie des UKEs eine Messung der Abszessvolumina mittels MRT durchgeführt. An Tag 3, 5 und 7 nach intrahepatischer Infektion der Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten wurden diese im Kleintier-MRT (Bruker ClinScan 7 T, Bruker BioSpin) analysiert, welcher 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 aus 98 % Sauerstoff und 1,5 – 2,0 % Isofluran bei einer Gasflussrate von 500 mL/min sediert und ihre Körpertemperatur mit Hilfe einer Wärmematte aufrechterhalten. Um klare Bilder zu generieren, wurden die Messungen möglichst in den Atempausen der Tiere durchgeführt, weshalb die Atemfrequenz dauerhaft überwacht wurde.

Die Untersuchung des Amöbenleberabszesses wurde mittels T2-gewichteter Turbo-Spin Echo-Sequenz (T2SE) durchgeführt. Die physikalischen Parameter dieser Sequenz waren 32 mm Field-of-View, 256 x 256 Bildpunkte, eine Schichtdicke von 0,6 mm, ein Schichtabstand von 0 % (Voxelgröße 125 x 125 x 600  $\mu$ m<sup>3</sup>), ein TR von 935 ms (effektives TR  $\approx$  1500, entsprechend der mittleren Atemrate), ein TE von 51 ms, 4 Mittelungen, ein Turbofaktor von 14 sowie ein Flipwinkel von 180 Grad. Unter Verwendung der genannten Parameter hob sich der Amöbenleberabszess als weiße Struktur deutlich von dem dunkel-erscheinenden Lebergewebe ab.

Die transversalen Schnitte wurden im Anschluss mit Hilfe des Programms *OsiriX Imaging Software DICOM Viewer* ausgewertet. Hierbei wurde der Abszess in jedem Schnitt digital per Hand umrandet und, unter Berücksichtigung des Abstandes zwischen den einzelnen Schnitten, das Volumen des Abszesses berechnet.

### 4.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der Software PRISM® 6 for OSX (Graphpad) durchgeführt. Es wurde je nach Statistik sowohl der *Unpaired Student's t-Test* als auch der parameterfreie *Mann-Whitney U-Test* angewandt.

## Literaturverzeichnis

1. Gao, B., W.I. Jeong, and Z. Tian, *Liver: An organ with predominant innate immunity*. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 729-36.
2. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
3. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking*. Science, 1998. **282**(5388): p. 480-3.
4. Serbina, N.V. and E.G. Pamer, *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 311-7.
5. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
6. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
7. Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood*. Blood, 1989. **74**(7): p. 2527-34.
8. Cros, J., et al., *Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors*. Immunity, 2010. **33**(3): p. 375-86.
9. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
10. Zimmermann, H.W., et al., *Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14<sup>CD16</sup> monocytes to inflammation and human liver fibrosis*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11049.
11. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nature reviews. Immunology, 2011. **11**(11): p. 762-74.
12. Wong, K.L., et al., *The three human monocyte subsets: implications for health and disease*. Immunol Res, 2012. **53**(1-3): p. 41-57.
13. Martinez, F.O., *The transcriptome of human monocyte subsets begins to emerge*. J Biol, 2009. **8**(11): p. 99.
14. Kreider, T., et al., *Alternatively activated macrophages in helminth infections*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 448-53.
15. Tacke, F., *Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**(Suppl 1): p. S27.
16. Tacke, F. and G.J. Randolph, *Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 609-18.
17. Wong, K.L., et al., *Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets*. Blood, 2011. **118**(5): p. e16-31.
18. Ingersoll, M.A., et al., *Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets*. Blood, 2010. **115**(3): p. e10-9.
19. Rogacev, K.S., et al., *Lower Apo A-I and lower HDL-C levels are associated with higher intermediate CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte counts that predict cardiovascular events in chronic kidney disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(9): p. 2120-7.
20. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3733-9.
21. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
22. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.

23. Montserrat-de la Paz, S., et al., *Pharmacological effects of mitraphylline from Uncaria tomentosa in primary human monocytes: Skew toward M2 macrophages*. J Ethnopharmacol, 2015. **170**: p. 128-35.
24. Rojas-Duran, M.F. and W.V. Gilbert, *Alternative transcription start site selection leads to large differences in translation activity in yeast*. RNA, 2012. **18**(12): p. 2299-305.
25. Jia, T., et al., *Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during Listeria monocytogenes infection*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6846-53.
26. Dal-Secco, D., et al., *A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury*. The Journal of experimental medicine, 2015. **212**(4): p. 447-56.
27. Tacke, F. and C. Kurts, *Infiltrating monocytes versus resident Kupffer cells: do alternatively activated macrophages need to be targeted alternatively?* Hepatology, 2011. **54**(6): p. 2267-70.
28. Bosschaerts, T., et al., *Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001045.
29. Serbina, N.V., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.
30. Sica, A. and V. Bronte, *Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1155-66.
31. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends in immunology, 2004. **25**(12): p. 677-86.
32. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
33. Dawson, T.C., et al., *Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Atherosclerosis, 1999. **143**(1): p. 205-11.
34. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
35. Helk, E., et al., *TNFalpha-mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during Entamoeba histolytica infection*. PLoS pathogens, 2013. **9**(1): p. e1003096.
36. Nascimento, M., et al., *Ly6Chi monocyte recruitment is responsible for Th2 associated host-protective macrophage accumulation in liver inflammation due to schistosomiasis*. PLoS Pathog, 2014. **10**(8): p. e1004282.
37. Carlin, L.M., et al., *Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal*. Cell, 2013. **153**(2): p. 362-75.
38. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. The Journal of clinical investigation, 2007. **117**(1): p. 185-94.
39. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
40. Geissmann, F., et al., *Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity*. Nature reviews. Immunology, 2010. **10**(6): p. 453-60.
41. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
42. Kastelein, R.A., C.A. Hunter, and D.J. Cua, *Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 221-42.
43. Awasthi, A., et al., *Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells*. Journal of immunology, 2009. **182**(10): p. 5904-8.
44. Wang, Q., et al., *Hepatitis B virus induces IL-23 production in antigen presenting cells and causes liver damage via the IL-23/IL-17 axis*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003410.
45. Parham, C., et al., *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. Journal of immunology, 2002. **168**(11): p. 5699-708.



46. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 285-94.
47. Haas, J.D., et al., *CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(12): p. 3488-97.
48. Yang, X.O., et al., *Regulation of inflammatory responses by IL-17F*. *The Journal of experimental medicine*, 2008. **205**(5): p. 1063-75.
49. Shahrara, S., et al., *IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis*. *Journal of immunology*, 2009. **182**(6): p. 3884-91.
50. Chen, K., et al., *IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke*. *PLoS one*, 2011. **6**(5): p. e20333.
51. Dambach, D.M., et al., *Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse*. *Hepatology*, 2002. **35**(5): p. 1093-103.
52. Seki, E., et al., *TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis*. *Nature medicine*, 2007. **13**(11): p. 1324-32.
53. Marra, F. and F. Tacke, *Roles for chemokines in liver disease*. *Gastroenterology*, 2014. **147**(3): p. 577-594 e1.
54. Serbina, N.V., et al., *Monocyte-mediated defense against microbial pathogens*. *Annual review of immunology*, 2008. **26**: p. 421-52.
55. Flynn, J.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice*. *Immunity*, 1995. **2**(6): p. 561-72.
56. Bekker, L.G., et al., *Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent*. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 6954-61.
57. Gaffen, S.L., et al., *The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing*. *Nature reviews. Immunology*, 2014. **14**(9): p. 585-600.
58. Indramohan, M., et al., *Inflammatory monocyte recruitment is regulated by interleukin-23 during systemic bacterial infection*. *Infection and immunity*, 2012. **80**(12): p. 4099-105.
59. Khader, S.A., et al., *IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available*. *Journal of immunology*, 2005. **175**(2): p. 788-95.
60. Burd, P.R., et al., *Activated mast cells produce interleukin 13*. *J Exp Med*, 1995. **181**(4): p. 1373-80.
61. Schmid-Grendelmeier, P., et al., *Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases*. *J Immunol*, 2002. **169**(2): p. 1021-7.
62. Halim, T.Y., et al., *Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation*. *Immunity*, 2014. **40**(3): p. 425-35.
63. Murata, T., et al., *Structure of IL-13 receptor: analysis of subunit composition in cancer and immune cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **238**(1): p. 90-4.
64. Sato, M., et al., *Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(10): p. 1486-94.
65. Rael, E.L. and R.F. Lockey, *Interleukin-13 signaling and its role in asthma*. *The World Allergy Organization journal*, 2011. **4**(3): p. 54-64.
66. Wynn, T.A., *Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(8): p. 583-94.
67. Mattes, J., et al., *IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the IL-4R alpha chain in the allergic lung*. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1683-92.
68. Mandal, D. and A.D. Levine, *Elevated IL-13Ralpha2 in intestinal epithelial cells from ulcerative colitis or colorectal cancer initiates MAPK pathway*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(5): p. 753-64.
69. McKenzie, G.J., et al., *Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses*. *J Exp Med*, 1999. **189**(10): p. 1565-72.

70. Sethi, A.A., et al., *Apolipoprotein A-I mimetic peptides: possible new agents for the treatment of atherosclerosis*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007. **8**(3): p. 201-12.
71. Hashmi, S., et al., *Human cancer: is it linked to dysfunctional lipid metabolism?* *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1850**(2): p. 352-64.
72. Haas, M.J. and A.D. Mooradian, *Therapeutic interventions to enhance apolipoprotein A-I-mediated cardioprotection*. *Drugs*, 2010. **70**(7): p. 805-21.
73. Sengupta, M.B., et al., *Increased expression of ApoA1 after neuronal injury may be beneficial for healing*. *Mol Cell Biochem*, 2017. **424**(1-2): p. 45-55.
74. Badimon, J.J., L. Badimon, and V. Fuster, *Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(4): p. 1234-41.
75. Navab, M., et al., *Mechanisms of disease: proatherogenic HDL--an evolving field*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2006. **2**(9): p. 504-11.
76. Yao, X., et al., *5A, an apolipoprotein A-I mimetic peptide, attenuates the induction of house dust mite-induced asthma*. *J Immunol*, 2011. **186**(1): p. 576-83.
77. Florentin, M., et al., *Multiple actions of high-density lipoprotein*. *Curr Opin Cardiol*, 2008. **23**(4): p. 370-8.
78. Xia, P., et al., *High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(46): p. 33143-7.
79. Tilly-Kiesi, M., et al., *Impact of gender on the metabolism of apolipoprotein A-I in HDL subclasses LpAI and LpAI:All in older subjects*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(12): p. 3513-8.
80. Knopp, R.H., et al., *Sex differences in lipoprotein metabolism and dietary response: basis in hormonal differences and implications for cardiovascular disease*. *Curr Cardiol Rep*, 2006. **8**(6): p. 452-9.
81. Barton, M., *Cholesterol and atherosclerosis: modulation by oestrogen*. *Curr Opin Lipidol*, 2013. **24**(3): p. 214-20.
82. Zannis, V.I., A. Chroni, and M. Krieger, *Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL*. *J Mol Med (Berl)*, 2006. **84**(4): p. 276-94.
83. Rye, K.A. and P.J. Barter, *Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(3): p. 421-8.
84. Plump, A.S., C.J. Scott, and J.L. Breslow, *Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(20): p. 9607-11.
85. Oram, J.F. and J.W. Heinecke, *ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(4): p. 1343-72.
86. Getz, G.S., G.D. Wool, and C.A. Reardon, *Apoprotein A-I mimetic peptides and their potential anti-atherogenic mechanisms of action*. *Curr Opin Lipidol*, 2009. **20**(3): p. 171-5.
87. Gomaschi, M., et al., *Anti-inflammatory and cardioprotective activities of synthetic high-density lipoprotein containing apolipoprotein A-I mimetic peptides*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **324**(2): p. 776-83.
88. Navab, M., et al., *Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006. **3**(10): p. 540-7.
89. Brewer, H.B., Jr., *HDL metabolism and the role of HDL in the treatment of high-risk patients with cardiovascular disease*. *Curr Cardiol Rep*, 2007. **9**(6): p. 486-92.
90. Tang, C., et al., *The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(47): p. 32336-43.
91. Kim, K.D., et al., *Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(2): p. 1126-36.
92. Worm, M., et al., *The factor XIIa blocking antibody 3F7: a safe anticoagulant with anti-inflammatory activities*. *Ann Transl Med*, 2015. **3**(17): p. 247.

93. Konings, J., et al., *Factor XIIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin*. Blood, 2011. **118**(14): p. 3942-51.
94. Maas, C., et al., *Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3208-18.
95. Muller, F., et al., *Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo*. Cell, 2009. **139**(6): p. 1143-56.
96. Luo, D., et al., *Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram-negative bacterium Yersinia enterocolitica*. J Immunol, 2011. **187**(4): p. 1866-76.
97. Shannon, O., et al., *Histidine-rich glycoprotein promotes bacterial entrapment in clots and decreases mortality in a mouse model of sepsis*. Blood, 2010. **116**(13): p. 2365-72.
98. Johnson, L.L., et al., *Fibrin-mediated protection against infection-stimulated immunopathology*. J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 801-6.
99. Kwiecinski, J., et al., *Activation of plasminogen by staphylokinase reduces the severity of Staphylococcus aureus systemic infection*. J Infect Dis, 2010. **202**(7): p. 1041-9.
100. Sato, E., et al., *Bradykinin stimulates alveolar macrophages to release neutrophil, monocyte, and eosinophil chemotactic activity*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 3122-9.
101. Renne, T., *The procoagulant and proinflammatory plasma contact system*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 31-41.
102. Lima, A.P., et al., *Heparan sulfate modulates kinin release by Trypanosoma cruzi through the activity of cruzipain*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 5875-81.
103. Rapala-Kozik, M., et al., *Adsorption of components of the plasma kinin-forming system on the surface of Porphyromonas gingivalis involves gingipains as the major docking platforms*. Infect Immun, 2011. **79**(2): p. 797-805.
104. Ko, Y.P. and M.J. Flick, *Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in Staphylococcus aureus Infection*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(4): p. 408-21.
105. Sriskandan, S., et al., *Contact activation in shock caused by invasive group A Streptococcus pyogenes*. Crit Care Med, 2000. **28**(11): p. 3684-91.
106. Nickel, K.F. and T. Renne, *Crosstalk of the plasma contact system with bacteria*. Thromb Res, 2012. **130 Suppl 1**: p. S78-83.
107. Gershon, E.S., et al., *Involvement of the contact phase and intrinsic pathway in herpes simplex virus-initiated plasma coagulation*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(5): p. 1037-43.
108. Renne, T., et al., *In vivo roles of factor XII*. Blood, 2012. **120**(22): p. 4296-303.
109. Denis, M. and K. Chadee, *Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of Entamoeba histolytica trophozoites*. Infect Immun, 1989. **57**(6): p. 1750-6.
110. Stanley, S.L., Jr., *Amoebiasis*. Lancet, 2003. **361**(9362): p. 1025-34.
111. Marshall, M.M., et al., *Waterborne protozoan pathogens*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(1): p. 67-85.
112. Clark, C.G., et al., *Structure and content of the Entamoeba histolytica genome*. Adv Parasitol, 2007. **65**: p. 51-190.
113. Petri, W., Jr., *Amebiasis and the Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside*. J Investig Med, 1996. **44**(2): p. 24-36.
114. Horstmann, R.D., M. Leippe, and E. Tannich, *Host tissue destruction by Entamoeba histolytica: molecules mediating adhesion, cytolysis, and proteolysis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992. **87 Suppl 5**: p. 57-60.
115. Leippe, M., et al., *Pore-forming peptide of pathogenic Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7659-63.
116. Bruchhaus, I., et al., *The intestinal protozoan parasite Entamoeba histolytica contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation*. Eukaryot Cell, 2003. **2**(3): p. 501-9.

117. Olivos-Garcia, A., et al., *Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters*. Parasitology, 2004. **129**(Pt 1): p. 19-25.
118. Scholze, H. and E. Tannich, *Cysteine endopeptidases of Entamoeba histolytica*. Methods Enzymol, 1994. **244**: p. 512-23.
119. Que, X., et al., *Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **119**(1): p. 23-32.
120. Stanley, S.L., Jr., et al., *Role of the Entamoeba histolytica cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice*. Infect Immun, 1995. **63**(4): p. 1587-90.
121. Keene, W.E., et al., *The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica*. J Exp Med, 1986. **163**(3): p. 536-49.
122. Blessmann, J., et al., *Longitudinal study of intestinal Entamoeba histolytica infections in asymptomatic adult carriers*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4745-50.
123. Blessmann, J. and E. Tannich, *Treatment of asymptomatic intestinal Entamoeba histolytica infection*. N Engl J Med, 2002. **347**(17): p. 1384.
124. Blessmann, J., et al., *Treatment of amoebic liver abscess with metronidazole alone or in combination with ultrasound-guided needle aspiration: a comparative, prospective and randomized study*. Trop Med Int Health, 2003. **8**(11): p. 1030-4.
125. Powell, S.J., A.J. Wilmot, and R. Elsdon-Dew, *Single and low dosage regimens of metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess*. Ann Trop Med Parasitol, 1969. **63**(2): p. 139-42.
126. Chadee, K. and E. Meerovitch, *The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (Meriones unguiculatus)*. Am J Pathol, 1984. **117**(1): p. 71-80.
127. Lushbaugh, W.B., et al., *Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg, 1978. **27**(2 Pt 1): p. 248-54.
128. Blessmann, J., et al., *Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **66**(5): p. 578-83.
129. Lotter, H., et al., *Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease*. Infection and immunity, 2006. **74**(1): p. 118-24.
130. Seydel, K.B., S.J. Smith, and S.L. Stanley, Jr., *Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease*. Infect Immun, 2000. **68**(1): p. 400-2.
131. Lotter, H., et al., *Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFN $\gamma$  secretion in natural killer T cells*. PLoS one, 2013. **8**(2): p. e55694.
132. Salata, R.A., et al., *The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for Entamoeba histolytica trophozoites*. Am J Trop Med Hyg, 1987. **37**(1): p. 72-8.
133. Lotter, H., et al., *Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from Entamoeba histolytica are critically important to control amebic liver abscess*. PLoS pathogens, 2009. **5**(5): p. e1000434.
134. Noll, J., et al., *IL-23 prevents IL-13-dependent tissue repair associated with Ly6C(lo) monocytes in Entamoeba histolytica-induced liver damage*. J Hepatol, 2016. **64**(5): p. 1147-57.
135. Viebahn, C.S., et al., *Invading macrophages play a major role in the liver progenitor cell response to chronic liver injury*. J Hepatol, 2010. **53**(3): p. 500-7.
136. Platt, A.M., et al., *An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 6843-54.
137. Badalyan, V., et al., *TNF-alpha/IL-17 synergy inhibits IL-13 bioactivity via IL-13Ralpha2 induction*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2014. **134**(4): p. 975-8 e5.
138. Fadini, G.P., et al., *Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals*. Acta Diabetol, 2013. **50**(6): p. 977-82.

## Literaturverzeichnis

139. Stout, R.D., et al., *Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 342-9.
140. Lieberman, L.A., et al., *IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12*. Journal of immunology, 2004. **173**(3): p. 1887-93.
141. Thakker, P., et al., *IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2589-98.
142. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Macrophage inflammatory protein-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(6): p. 455-81.
143. Egawa, M., et al., *Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 570-80.
144. Hanna, R.N., et al., *NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis*. Circulation research, 2012. **110**(3): p. 416-27.
145. Jenkins, S.J., et al., *Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation*. Science, 2011. **332**(6035): p. 1284-8.
146. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
147. Livermore, T.M., J.R. Chubb, and A. Saiardi, *Developmental accumulation of inorganic polyphosphate affects germination and energetic metabolism in Dictyostelium discoideum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(4): p. 996-1001.
148. Romer, J., et al., *Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 287-92.
149. Okada, K., et al., *The regulation of liver regeneration by the plasmin/alpha 2-antiplasmin system*. J Hepatol, 2004. **40**(1): p. 110-6.
150. Rono, B., et al., *Gender affects skin wound healing in plasminogen deficient mice*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59942.
151. Hotary, K.B., et al., *Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 295-308.
152. Grandas, O.H., et al., *Regulation of vascular smooth muscle cell expression and function of matrix metalloproteinases is mediated by estrogen and progesterone exposure*. J Vasc Surg, 2009. **49**(1): p. 185-91.
153. Khaled, W.T., et al., *The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development*. Development, 2007. **134**(15): p. 2739-50.
154. Diamond, L.S., D.R. Harlow, and C.C. Cunnick, *A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica*. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 1978. **72**: p. 431-432.
155. Biller, L., et al., *Differences in the transcriptome signatures of two genetically related Entamoeba histolytica cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties*. BMC genomics, 2010. **11**: p. 63.
156. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

## Abbildungsverzeichnis

Abb.	Thema	Seite
1.1.1.2.1	Rekrutierung und Differenzierung muriner Ly6C <sup>hi</sup> -Monozyten	3
1.1.1.2.2	Rekrutierung, Adhäsion und Polarisierung muriner Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten	4
1.3	FXII-abhängige Aktivierung der Inflammation sowie der Fibrin-Synthese	7
2.1.1	Abszessausbildung und Überleben von <i>E. histolytica</i> in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus	12
2.1.2	mRNA-Akkumulation von CCL2 und CCR2 in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus	13
2.1.3	Rekrutierung von Ly6C <sup>hi</sup> - und Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus	14
2.1.4	Rekrutierung von Ly6C <sup>hi</sup> - und Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten in der CCR2 <sup>-/-</sup> -Maus	15
2.1.5	Zytokin-Expressionsprofil in der CCR2 <sup>-/-</sup> -Maus	16
2.2.1	mRNA-Akkumulation von in die Rekrutierung und Polarisierung regenerativer Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten involvierten Chemokinen, Zytokinen und Adhärenzfaktoren in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus	18
2.2.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der IL-13-Produktion von Leukozyten, monozytären Zellen und Lymphozyten in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus	20
2.2.3	Identifizierung der IL-13 produzierenden Zellpopulation in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus	21
2.2.4	mRNA-Akkumulation von IL-13Rα1, IL-4Rα und IL-13Rα2 in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus	22
2.2.5	Abszessausbildung in der WT-Maus nach rIL-13-Applikation sowie in IL-13-transgenen Mäusen	23
2.2.6	Abszessausbildung in WT- und IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Mäusen nach IL-13-Depletion sowie in der WT-Maus nach Applikation eines rIL-13/αIL-13-Komplexes	24
2.2.7	Expression von Arg1 und iNOS in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus nach Infektion	26
2.2.8	Immunhistologie des Amöbenleberabszesses in der IL-23p19 <sup>-/-</sup> -Maus	28
2.3.1	Abszessausbildung und CCL2-Expression in männlichen und weiblichen infizierten Mäusen	30
2.3.2	Rekrutierung und IL-13-Expression von Ly6C <sup>hi</sup> - und Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten in Abhängigkeit des Geschlechts	31
2.3.3	Zytokin-Expressionsprofil in männlichen und weiblichen infizierten Mäusen	33
2.3.4	Geschlechtsspezifische Abszessausbildung in Abhängigkeit von ApoA1	34
2.3.5	Geschlechtsspezifische Rekrutierung und IL-13-Expression von Ly6C <sup>hi</sup> - und Ly6C <sup>lo</sup> -Monozyten in Abhängigkeit von ApoA1	35
2.4.1	Geschlechtsspezifische Chemokin- und Zytokin-Expression von mit <i>E. histolytica</i> spezifischen Antigenen stimulierten MDMs	37
2.4.2	Geschlechtsspezifische Chemokin- und Zytokin-Expression stimulierter MDMs	39
2.4.3	Chemokin- und Zytokin-Expression stimulierter MDMs in Abhängigkeit von ApoA1 und des Geschlechts	41
2.4.4	CD206-Expression stimulierter Monozyten in Abhängigkeit von ApoA1	43
2.5.1	Polyphosphat-Synthese Kollagen-aktivierter <i>E. histolytica</i> Trophozoiten im EM	44
2.5.2	Immunhistologischer Nachweis der FXII-Expression im Amöbenleberabszess	46
2.5.3	Die Entwicklung des Amöbenleberabszesses in Abhängigkeit von FXII	47
2.5.4	Abszessausbildung in B2R <sup>-/-</sup> - und FXI <sup>-/-</sup> -Mäusen	48

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab.</b>	<b>Thema</b>	<b>Seite</b>
4.1.1	Verwendete Chemikalien	59
4.1.2	Verwendete Kits & Reagenzien	59
4.1.3	Verwendete Gebrauchsmaterialien	60
4.1.4	Verwendete Geräte	60
4.1.5	Verwendete Software und Internetdatenbanken	60
4.1.6	Verwendete Antikörper	61
4.1.7	Sequenz, Schmelztemperatur ( $T_m$ ), <i>Threshold</i> und anzunehmende Produktgröße der in der <i>qPCR</i> eingesetzten Oligonukleotide	62 – 63
4.1.11	Verwendete Mausstämme	65
4.2.3	Reaktionsschritte der <i>qPCR</i>	66

## Publikation

**IL-23 prevents IL-13-dependent tissue repair associated with Ly6C(lo) monocytes in *Entamoeba histolytica*-induced liver damage.**

Noll J, Helk E, Fehling H, Bernin H, Marggraff C, Jacobs T, Huber S, Pelczar P, Ernst T, Ittrich H, Otto B, Mittrücker HW, Hölscher C, Tacke F, Bruchhaus I, Tannich E, Lotter H.

J Hepatol. 2016 May. **64**(5):1147-57. doi: 10.1016/j.jhep.2016.01.013. Epub 2016 Jan 22.



# Danke ...

... Hanna Lotter für die Betreuung und dafür, dass ich mich während meiner Doktorarbeit mit einem solch spannenden Thema auseinandersetzen durfte.

... Thomas Jacobs & Hans-Willi Mittrücker für die Betreuung meiner Arbeit.

... Labor 6. Ich danke jedem von euch für die tolle & freundschaftliche Atmosphäre.

... liebe Entenfamilie, dass ihr mich als Tante in eure Reihen aufgenommen habt und wir uns immer aufeinander verlassen können.

... an Klossi, die beste TA im Universum. Du bist großartig.

... Heidrun, Göttin der PCR, für deine vielen nützlichen Tipps.

... an Labor 4 & 5 für jede Menge Spaß beim Mittagessen.

... Iris Bruchhaus & Egbert Tannich für immer wieder neue Anregungen und Ideen.

... AG Jacobs für die Lösung diverser FACS-Probleme.

... Aline & Constantin für all eure Hilfe, wann immer ich sie brauchte.

... Andy for such a great collaboration.

... Jan Dieckhoff für viele Stunden am MRT.



*... Elena für die großartige Einarbeitung.*



*... Juja für viele tolle Mittagessen und dafür dass ich dir immer alles erzählen kann.*

*... Mamma & Papa & Holger für all eure Unterstützung zu jeder Zeit.*

*... Schatz, dass du immer für mich da gewesen bist und mich motiviert hast, sobald es nötig war.*



## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Hamburg, den 14. März 2017