

**Therapeutische Aktivität eines  
*Entamoeba histolytica* - NKT Zelliganden  
gegen experimentelle kutane  
Leishmaniose und Tuberkulose**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Siew Ling Jacqueline Choy**

Hamburg 2018

Genehmigt vom Fachbereich der Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

auf Antrag von Prof. Dr. med. vet. Hannelore Lotter

Weiterer Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. rer. nat. Tim-Wolf Gilberger

Tag der Disputation: 19. Oktober 2018

Hamburg, den 29. Oktober 2018

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. med. vet. Hannelore Lotter  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Abteilung Molekulare Infektionsimmunologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

1. Prüfer: Prof. Dr. med. vet. Hannelore Lotter

2. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Tim-Wolf Gilberger  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Abteilung Zelluläre Parasitologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>II. Zusammenfassung und Abstract.....</b>	<b>IX</b>
Zusammenfassung.....	IX
Abstract.....	XI
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Invariante Natürliche Killer T Zellen (iNKT-Zellen).....	2
1.2. Leishmaniose.....	3
1.2.1. Transmission und Lebenszyklus der Leishmanien.....	4
1.2.2. Verschiedene Formen der Leishmaniose.....	6
1.2.3. Immunantwort des Wirtes auf die Infektion mit Leishmanien.....	8
1.2.4 Mechanismen der Immunzellmanipulation durch <i>L. major</i> .....	10
1.2.5 Möglichkeiten der Leishmanien-Therapie mit damit verbundenen Problemen .....	11
1.3 Tuberkulose.....	14
1.4 <i>Entamoeba histolytica</i> ( <i>E. histolytica</i> ) Lipopeptidphosphoglykan ( <i>EhLPPG</i> ) und davon abgeleitete synthetische <i>EhPI</i> -Analoge .....	16
1.5 Zielsetzung.....	22
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien .....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	24
2.1.3 Reaktionskits.....	25
2.1.4 Enzyme.....	25
2.1.5 Antikörper .....	25
2.1.6 DNA-Primer.....	26
2.1.7 Zellkulturmedium und Zusätze .....	27
2.1.8 Puffer und Lösungen .....	29
2.1.9 Stimulanzen .....	30
2.1.10 Liposomen.....	30
2.1.11 Geräte und Software.....	31
2.1.12 Modelorganismen und Zelllinien .....	32
2.1.12.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	32
2.1.12.2 <i>Leishmania major</i> .....	32
2.1.12.3 Mäuse .....	32

2.1.12.4 THP1-Zelllinie.....	33
2.1.12.5 <i>Mykobacterium tuberculosis</i> .....	33
2.2. Zellbiologische Methoden.....	33
2.2.1 Kultivierung der THP1-Zellen.....	33
2.2.2 Kultivierung von <i>E. histolytica</i> .....	33
2.2.3 Zellzahlbestimmung.....	34
2.2.4 Isolierung von Leukozyten aus eukaryotischem Gewebe und Spenderblut.....	34
2.2.4.1 Isolierung von Leukozyten aus humanem Spenderblut.....	34
2.2.4.2 Isolierung von Leukozyten aus murinem Knochenmark.....	35
2.2.4.3 Isolierung von Leukozyten aus murinem Lebergewebe .....	36
2.2.4.4 Isolierung von Leukozyten aus murinem Milzgewebe.....	36
2.2.5 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen .....	36
2.2.6 Gewinnung dendritischer Zellen und Makrophagen aus murinem Knochenmark .....	37
2.2.7 <i>in vitro</i> -Stimulationsassays .....	38
2.2.7.1 Humaner Zellzytokinexpressionsassay .....	38
2.2.7.2 Muriner Zellzytokinexpressionsassay.....	38
2.2.8 <i>In vitro</i> -Test zur Bestimmung der anti-Leishmanien Aktivität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga .....	40
2.2.8.1 Infektion von murinen Knochenmarksmakrophagen (BMDM) mit <i>L. major</i> .....	40
2.2.8.2 Infektion von humanen Makrophagen (THP1) mit <i>L. major</i> .....	41
2.2.9 <i>In vitro</i> -Test zur Bestimmung der anti-Mykobakterien Aktivität von <i>EhLPPG</i> und synthetischer <i>EhPI</i> -Analoga .....	42
2.2.10 Durchflusszytometrie.....	43
2.2.11 Zytotoxizitätsprüfung von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in murinen und humanen Lymphozyten .....	44
2.2.11.1 Zytotoxizitätsprüfung von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in murinen Milzlymphozyten .....	45
2.2.11.2 Zytotoxizitätsassay von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in humanen Lymphozyten (PBMCs) .....	45
2.3 Biochemische Methoden .....	45
2.3.1 ELISA .....	45
2.3.1.1. Muriner IFN $\gamma$ -ELISA .....	46
2.3.1.2. Muriner IL 4-ELISA .....	46
2.3.2 Cytometric Bead Array (LEGENDplex™) .....	47
2.3.2.1 Humanes Multi-Analyte Flow Assay Kit (Custom panel, 13-plex) .....	47
2.3.2.2 Murines Multi-Analyte Flow Assay Kit (Custom panel, 12-plex).....	47
2.3.2.3. Murines Multi-Analyte Flow Assay Kit (Custom panel, 10-plex).....	48
2.3.3 Histologie und Immunhistologie.....	48

2.3.4 Hämolytische Aktivität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga .....	49
2.3.5 Immunfluoreszenz (IF)-Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop Opera Phenix™ .....	50
2.3.6 Herstellung von Gewebelysaten.....	51
2.3.7 Präparation der Liposomen .....	51
2.4. Molekularbiologische Methoden .....	52
2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>L. major</i> -infizierten Makrophagen .....	52
2.4.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>L. major</i> -infizierten Gewebe.....	52
2.4.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>L. major</i> -infizierten Makrophagen .....	52
2.4.4 cDNA-Synthese der isolierten Gesamt-RNA für die qPCR mit SYBR Green® .....	53
2.4.5 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR) .....	53
2.4.5.1 Quantitative <i>real-time</i> PCR mit TaqMan Sonden .....	54
2.4.5.2 Quantitative <i>real-time</i> PCR mit SYBR Green® .....	56
2.5 <i>in vivo</i> - <i>Leishmania major</i> -Infektionsmodelle zur Untersuchung der kutanen Leishmaniose .....	57
2.5.1 Anti-Leishmanien Aktivität der synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in einem <i>L. major</i> -Fuß- Infektionsmodell in Balb/c-Mäusen .....	57
2.5.2 Anti-Leishmanien Aktivität der synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in einem <i>L. major</i> -Ohr- Infektionsmodell in C57BL6-Mäusen.....	58
2.6 Statistische Analysen .....	59
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
3.1. Immunstimulatorische Eigenschaften von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga durch Analyse des induzierten Zytokinprofils muriner und humaner iNKT-Zellen nach Stimulation mit diesen Molekülen.....	60
3.1.1. Bestimmung der optimalen Zellzahl und Inkubationszeit muriner Leber- sowie Milzlymphozyten für den Zellzytokinexpressionsassay .....	61
3.1.2 Zytokinproduktion muriner Leberlymphozyten nach Stimulation mit <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga .....	63
3.1.3. Zytokinprofil humaner PBMCs nach Stimulation mit <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga mittels LEGENDplex™ .....	65
3.1.4. Zytokinprofil muriner Lymphozyten nach Stimulation mit glykosylierten <i>EhPI</i> - Analoga.....	68
3.2. Evaluierung der Toxizität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga.....	72
3.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in murinen Milzlymphozyten .....	72
3.2.2 Bestimmung der Zytotoxizität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in humanen PBMCs .....	74

3.2.3 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge in humanen Erythrozyten .....	76
3.3 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge gegen die kutanen Leishmaniose .....	77
3.3.1 Einfluss von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge auf <i>in vitro</i> <i>L. major</i> -infizierte murine Knochenmarksmakrophagen .....	77
3.3.1.1 Evaluierung des induzierten Zytokinprofils <i>L. major</i> -infizierter muriner Makrophagen nach Behandlung von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge .....	79
3.3.2 Einfluss von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge auf <i>in vitro</i> <i>L. major</i> -infizierte humane Makrophagen (THP1-Zellen) .....	81
3.3.3 Einfluss von Liposomen-formulierten <i>EhPI</i> -Analoge auf die <i>in vitro</i> <i>L. major</i> -Infektion humaner und muriner Makrophagen .....	83
3.3.3.1 Einfluss von Liposomen-formuliertem <i>EhPIa</i> C30:1 cis auf die <i>in vitro</i> <i>L. major</i> -Infektion in humanen Makrophagen (THP1-Zellen) .....	84
3.3.4 Einfluss von Liposomen-formulierten <i>EhPI</i> -Analoge auf die <i>in vitro</i> <i>L. major</i> -Infektion muriner Makrophagen am Opera Phenix™ .....	87
3.3.4.1 Zytokinprofil muriner BMDMs nach Stimulation mit in Liposomen integrierten <i>EhPI</i> -Analoge mittels LEGENDplex™ .....	91
3.4 Einfluss von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge auf <i>in vivo</i> Infektionsmodelle für die kutane Leishmaniose .....	93
3.4.1 Einfluss der synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge <i>EhPIa</i> C30:1 cis und <i>EhPIb</i> C30:1 cis auf <i>in vivo</i> <i>L. major</i> -infizierte Balb/c-Mäusen .....	93
3.4.1.1 Bestimmung der Parasitenlast <i>L. major</i> -infizierter Balb/c-Mäuse nach Behandlung mit den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge <i>EhPIa</i> C30:1 cis und <i>EhPIb</i> C30:1 cis .....	94
3.4.1.2 Zytokinprofil <i>L. major</i> -infizierter Balb/c-Mäuse nach Behandlung mit den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoge <i>EhPIa</i> C30:1 cis und <i>EhPIb</i> C30:1 cis mittels LEGENDplex™ .....	95
3.4.2 Einfluss des synthetischen <i>EhPI</i> -Analogons <i>EhPIb</i> C16:0 DR <i>in vivo</i> auf <i>L. major</i> -infizierte C57BL/6-Mäusen .....	96
3.4.2.1 Bestimmung der Parasitenlast <i>L. major</i> -infizierter C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit dem synthetischen <i>EhPI</i> -Analogon <i>EhPIb</i> C16:0 DR .....	99
3.4.2.2 Immunhistologische Lokalisation der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sowie Arg 1 und iNOS exprimierender Zellen in <i>L. major</i> -infizierten C57BL/6-Mäusen .....	100
3.4.2.3 Untersuchung auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied in <i>in vivo</i> <i>L. major</i> -infizierten C57BL/6-Mäusen während der Behandlung mit dem synthetischen <i>EhPI</i> -Analogon <i>EhPIb</i> C16:0 DR .....	103
3.4.2.4 Bestimmung der Parasitenlast <i>L. major</i> -infizierter C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit dem synthetischen <i>EhPI</i> -Analogon <i>EhPIb</i> C16:0 DR .....	104

3.5 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in einem <i>M. tuberculosis</i> -Infektionsmodell mit murinen Knochenmarksmakrophagen.....	105
3.5.1. Bestimmung der Infektionsrate und Inkubationszeit für den <i>in vitro M. tuberculosis</i> -Infektionsversuch mit murinen Knochenmarksmakrophagen .....	105
3.5.2 Einfluss von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga auf <i>in vitro M. tuberculosis</i> -infizierte murine Knochenmarksmakrophagen .....	106
<b>4. Diskussion</b> .....	109
4.1. Immunstimulatorische Eigenschaften von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga durch Analyse des induzierten Zytokinprofils muriner und humaner iNKT-Zellen.....	110
4.2 Evaluierung der Toxizität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga.....	115
4.3 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga gegen die kutanen Leishmaniose <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	117
4.4 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga auf ein <i>in vitro M. tuberculosis</i> -Infektionsmodell .....	127
4.5 Fazit und Ausblick .....	129
<b>5. Eigene Publikationen</b> .....	131
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	132
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b> .....	138
<b>8. Tabellenverzeichnis</b> .....	141
Danksagung.....	142
Eidesstattliche Erklärung.....	144

## I. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Flour
AK	Antikörper
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin 7
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BioStoffV	Biostoffverordnung
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C <sub>T</sub>	<i>cycle threshold</i> , Schwellenwert
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungscluster
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	<i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dubblecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
<i>E.</i>	<i>Entamoeba</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Eh</i> LPPG	<i>Entamoeba histolytica</i> Lipopeptidphosphoglykan
<i>Eh</i> PI	<i>Entamoeba histolytica</i> Phosphatidylinositol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i> , Durchflusszytometer
Fc	<i>crystallisable fragment</i> , kristallisierbares Fragment
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
<i>fwd</i>	<i>forward</i>

x g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	<i>good manufacturing practice</i> , Gute Herstellungspraxis
GOI	<i>gene of interest</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
HEPES	4-2-Hydrogenethylpiperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IFA	<i>immunofluorescence analysis</i> , Immunfluoreszenzanalyse
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
iNKT	invariante Natürliche Killer T-Zelle
iNOS	induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthasen
KMR	kanzerogen, mutagen, reproduktionstoxisch
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol pro Liter
m	milli
MCP 1 auch CCL2	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i> auch CC-Chemokinligand 2
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> , Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i> , Adaptermolekül
n	nano
NK	Natürliche Killer Zelle

NKT	Natürliche Killer T-Zelle
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , pathogen-assoziierten molekularen Muster
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat 13-Acetat
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
Rel.	relativ
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
Std	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Trisgepufferte Salzlösung
TcR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
vergl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$ GalCer	alpha-Galactosylceramid
$\mu$	mikro
$\Delta$	Delta, Differenz

## II. Zusammenfassung und Abstract

### Zusammenfassung

Erkrankungen wie die Leishmaniose und die Tuberkulose weisen eine spezifische Wirt-Pathogen-Interaktion auf, die durch eine kontinuierliche, wechselseitige Anpassung beider Komponenten geprägt ist. Die kutane Leishmaniose ist mit weltweit jährlich 600.000 bis 1 Mio. Neuerkrankungen die häufigste Form der Leishmaniose. Die Infektion mit Leishmanien (vorwiegend *Leishmania major* (*L. major*)) führt zu ulzerierenden Hautläsionen und entstellenden Narben, während Tuberkulose die weitverbreiteste bakterielle Infektionskrankheit der Atemwege darstellt, mit der schätzungsweise ein Drittel der Weltbevölkerung latent infiziert ist. Im Laufe der Evolution haben Leishmanien und Mykobakterien zahlreiche Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort des Wirts zu entgehen und ihr Überleben zu sichern. Die Plastizität der Pathogene und die zunehmende Entwicklung von Medikamenten-resistenten Spezies erschweren eine erfolgreiche Therapie dieser Krankheiten. Daher ist die kontinuierliche Entwicklung neuer Medikamente von hoher Notwendigkeit. Die Aktivierung spezifischer Immunzellen des Wirtsimmunsystems durch Effektormoleküle ist eine der vielversprechendsten Möglichkeiten der Behandlung dieser Erkrankungen.

Das membranständige Lipopeptidphosphoglykan aus *Entamoeba histolytica* (*EhLPPG*) kann iNKT-Zellen spezifisch aktivieren und stellt solch ein Effektormolekül dar. Synthetische Analoga des Glykophosphatidylinositol-Ankers (*EhPI*) des *EhLPPG* erlauben zum einen aufgrund von Modifikationen der chemischen Struktur eine optimierte Immunzellaktivierung und zum anderen ein spätere Synthese nach GMP-Richtlinien. Daher könnten *EhLPPG* und die synthetische *EhPI*-Analoga eine neue Möglichkeit für die Therapie der kutanen Leishmaniose und Tuberkulose darstellen.

In ersten Teil dieser Arbeit wurden zunächst die immunstimulatorischen Fähigkeiten des nativen Moleküls *EhLPPG* und verschiedener synthetischer *EhPI*-Analoga nachgewiesen. Die Stimulation von murinen und humanen Lymphozyten mit den Glykolipiden führte zur spezifischen Produktion der pro-inflammatorische Zytokine  $\text{IFN } \gamma$  und  $\text{TNF } \alpha$ , die die Entwicklung einer protektiven Immunantwort des Wirts unterstützen können. Zudem wurde gezeigt, dass die Moleküle nur geringe zytotoxische Effekte in murinen und humanen Lymphozyten induzierten.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde der immuntherapeutische Einfluss von *EhLPPG* und der synthetischen *EhPI*-Analoga in *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen für die kutane Leishmaniose untersucht. Die Behandlung von murinen und humanen *L. major*-infizierten Makrophagen mit *EhLPPG* und den synthetische *EhPI*-Analoga induzierte eine signifikante Reduktion der Parasitenlast. In murinen *L. major*-infizierten Makrophagen führte die Behandlung mit *EhLPPG* und dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIa* C30:1 cis dabei zu einer erhöhten mRNA Synthese von IL 1 $\beta$  und iNOS. Beide Moleküle stellen wichtige Signalmoleküle dar, die maßgeblich an einer protektiven Immunantwort des Wirtes beteiligt sind. In einem *in vivo* *L. major*-Infektionsmodell mit Balb/c-Mäusen führte die Behandlung mit *EhPIb* C30:1 cis zu einer verzögerten Zunahme der Fußschwellung. Im gleichen *in vivo* Modell konnte gezeigt werden, dass *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine herunterregulierten. In einem weiteren *in vivo* *L. major*-Infektionsmodell mit C57BL/6-Mäusen wiesen *L. major*-infizierte Mäuse, die mit dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIb* C16:0 DR behandelt wurden, eine geringere Ohrschwellung und schnellere Heilung auf.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde das immuntherapeutische Potential der Glykolipide in einem *in vitro* Infektionsmodell für die Krankheit Tuberkulose ermittelt. Die Behandlung von murinen *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagen mit *EhPIb* C16:0 DR führte zu einer signifikanten Reduktion der Bakterienlast.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse daraufhin, dass *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoga ein Potential als Therapeutikum für die kutane Leishmaniose und Tuberkulose aufweisen. Sie aktivieren Immunzellen und regen diese gezielt zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine an. Das induzierte Zytokinprofil unterstützt die Entwicklung einer protektiven Immunantwort und fördert damit die Eliminierung der Pathogene. Dieses Potential sollte weiter verfolgt und untersucht werden. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt und ist Ziel zukünftiger Untersuchungen.

## Abstract

Infectious diseases like leishmaniasis and tuberculosis show a specific host-pathogen-interaction, which is characterized by a continuous, reciprocal adaptation of both compartments. The cutaneous leishmaniasis is the most common form of leishmaniasis with 600.000 to 1 million annual incidences worldwide. The infection with *Leishmania* parasites (predominantly *Leishmania major* (*L. major*)) causes ulcerating skin lesions and disfiguring scars, whereas tuberculosis represents the most widespread infectious disease of the respiratory tract that causes a latent infection in approximately one third of the world population.

During evolution *Leishmania* and *Mycobacteria* developed numerous mechanisms to evade the immune reaction of the host and ensure their own survival. The plasticity of the pathogens and the increasing development of drug-resistant species hinder a successful treatment of this disease, which is why a continuous enhancement of new pharmaceuticals is inevitable. Activation of specific immune cells of the host's immune system by the use of effector molecules provides a promising way to treat these diseases.

The membrane based lipopeptidophosphoglycan isolated from *Entamoeba histolytica* (*EhLPPG*) is able to specifically activate iNKT-cells and represents such an effector molecule. Out of *EhLPPG* synthetic *EhPI*-analogs of the glycosylphosphatidylinositol anchor were constructed, which allow a synthesis following GMP-guidelines and the integration of additional modifications to optimize immune cell activation. Therefore, *EhLPPG* and the synthetic *EhPI*-analogs could present a new treatment for cutaneous leishmaniasis and tuberculosis.

In the first section of this thesis the immunostimulatory properties of the native molecule *EhLPPG* and the synthetic *EhPI*-analogs were proven. The stimulation of murine and human lymphocytes with the glycolipids leads to specific production of the pro-inflammatory cytokines IFN  $\gamma$  and TNF  $\alpha$ , which support the development of the host protective immune response and encourage the elimination of the parasites. Furthermore, it was shown that the molecules induce only minor cytotoxic effects to murine and human lymphocytes.

The second part of this thesis investigated the immunotherapeutic effect of *EhLPPG* and the synthetic *EhPI*-analogs in *in vitro* and *in vivo* infection models for cutaneous leishmaniasis. The treatment of murine and human *L. major*-infected macrophages with *EhLPPG* and the synthetic *EhPI*-analogs induced a significant reduction of the parasite load. Further, the treatment with *EhLPPG* and the synthetic *EhPI*-analog *EhPIa* C30:1 cis resulted in an

increased mRNA synthesis of IL 1 $\beta$  and iNOS in murine *L. major*-infected macrophages. Both molecules represent important signal molecules that are significantly involved in the hosts immune response. During an *in vivo* *L. major*-infection model with Balb/c mice, the treatment with *EhPIb* C30:1 cis resulted in a delayed growth of the foot pad lesions. The same *in vivo* model showed that the production of anti-inflammatory cytokines was down-regulated after treatment with *EhPIa* C30:1 cis and *EhPIb* C30:1 cis. In an additional *in vivo* *L. major*-infection model with C57BL/6 mice, the treatment of the *L. major*-infected mice with the synthetic *EhPI*-analog *EhPIb* C16:0 DR resulted in lesser swelling of the ears and in faster healing of those swelling.

The last section of this thesis examined the immune therapeutic potential of *EhLPPG* and the synthetic *EhPI*-analogs within *in vitro* infection models for the tuberculosis disease. The treatment of murine *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages with *EhPIb* C16:0 DR resulted in a significant reduction of bacteria load.

In summary the results indicate that *EhLPPG* and the synthetic *EhPI*-analogs possess the potential to act as a therapeutic agent for cutaneous leishmaniasis and tuberculosis. They are mobilizing immune cells and stimulate them to generate pro-inflammatory cytokines. The induced cytokine profile supports the development of a protective immune response, which enhances the elimination of the *Leishmania* and *Mycobacteria*. This potential should be further pursued and investigated. The precise mechanism has not been completely elucidated and is the object of future examinations.

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Abwehrsystem, das den Organismus vor Umwelteinflüssen und verschiedenen Pathogenen wie Pilzen, Viren, Bakterien sowie ein- und mehrzelligen Parasiten schützt. Es besteht aus einem dynamischen Zusammenspiel unterschiedlicher Organe, Zelltypen und Effektormolekülen, die die Gesundheit aufrechterhalten und essentiell für den Menschen ist. Das Immunsystem unterteilt sich in zwei Komponenten: das angeborene (unspezifische) Immunsystem und das adaptive (spezifische) Immunsystem (Kuby 2007).

Die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems setzen sofort beim ersten Kontakt mit einem Pathogen ein, unabhängig von der Art des eindringenden Pathogens. Die Haut und die Mukosa sind die ersten anatomischen Barrieren, die das Eindringen von Pathogenen verhindern sollen. Haben die Pathogene diese Barrieren jedoch überwunden, werden sie von myeloiden Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und phagozytiert. Zu den myeloiden Zellen gehören neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs). Nachdem ein infektiöser Erreger von diesen Zellen erkannt wurde, beginnen diese zudem mit der Sekretion von Effektormolekülen wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, um zusätzliche Immunzellen zum Infektionsort zu leiten und den weiteren Verlauf der Immunantwort zu steuern (Kuby 2007). Des Weiteren können über die vorangegangene Phagozytose die erregerspezifischen Fremdantigene durch die Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (*major histocompatibility complex*, MHC) dieser Zellen präsentiert werden und aktivieren so das adaptive Immunsystem, welches in der späten Phase der Infektion (Tage bis Wochen nach Infektion) vermehrt aktiv ist (Abbas et al. 2010).

T-Lymphozyten (im Thymus gereifte Zellen) und B-Lymphozyten (im Knochenmark (*Bone marrow*) gereifte Zellen) sind Teil des adaptiven Immunsystems und vermitteln eine zellspezifische Immunantwort. T-Lymphozyten erkennen die über die MHC-Moleküle-präsentierten Fremdantigene mittels T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR) und differenzieren sich daraufhin zu aktiven T-Helferzellen des Typs 1 oder des Typs 2 (Th1-oder Th2-(CD4<sup>+</sup>)-Zellen), zu zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>-Zellen) oder zu regulatorischen T-Zellen aus. B-Lymphozyten stellen die humorale Immunabwehr dar. Sie erkennen das Fremdantigen ohne

zusätzliche Präsentation über ihren B-Zellrezeptor und entwickeln sich zu Plasmazellen, die Antigen-spezifische Antikörper produzieren (Kuby 2007).

Das Immunsystem ist ein hoch komplexes und dynamisches Netzwerk, indem jede Zellkomponente ihre spezifische Rolle ausübt. Für manche Immunzellen ist die Zuordnung allerdings nicht ganz eindeutig, da sie sowohl Eigenschaften der angeboren als auch der adaptiven Immunantwort besitzen. Invariante Natürliche Killer T Zellen (iNKT-Zellen) sind ein Beispiel solch einer Zellpopulation, die diverse Funktionen übernimmt und ein Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort darstellt (Van Kaer, Parekh et al. 2011).

### **1.1.1 Invariante Natürliche Killer T Zellen (iNKT-Zellen)**

iNKT-Zellen sind eine besondere Subpopulation der T-Lymphozyten, die Oberflächenmarker sowohl von T-Zellen als auch von Natürlichen Killerzellen (NK Zellen) vorweisen und eine wichtige Verbindung zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort darstellen (Juno, Keynan et al. 2012). Sie entwickeln sich wie klassische T-Zellen im Thymus, unterscheiden sich allerdings funktionell von den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Godfrey and Berzins 2007). Die Aktivierung der iNKT-Zellen kann entweder direkt über die semi-invarianten T-Zellrezeptoren erfolgen oder indirekt über Toll-like Rezeptoren (TLRs), einer Familie von Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs), als auch über Zytokine erfolgen (Van Kaer, Parekh et al. 2011). Im Gegensatz zu klassischen T-Zellen, die mit MHC-Moleküle der Klasse I und II präsentierten Peptidantigenen interagieren, erkennen iNKT-Zellen Glykolipidantigene über ihre invarianten T-Zellrezeptoren, die durch das MHCI-ähnliche Oberflächenmolekül CD1d (*cluster of differentiation*, CD) präsentiert werden (Kinjo, Tupin et al. 2006). iNKT-Zellen besitzen eine unvergleichbare funktionelle Plastizität, da sie die zellvermittelte Immunantwort verstärken oder auch unterdrücken können, indem sie in der Lage sind, sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine zu sezernieren (Godfrey and Berzins 2007).

Außer im Blut, Knochenmark und Lymphknoten kommen iNKT-Zellen auch vorwiegend in den Organen Milz und Leber vor. Mäuse weisen im Vergleich zum Menschen eine höhere Anzahl an iNKT-Zellen auf. Im peripheren Blut des Menschen variiert die Anzahl an iNKT-Zellen individuell zwischen 0,01 % und 5,15% (Crough, Purdie et al. 2004) (Jing, Gravenstein et al. 2007) (Kee, Park et al. 2012), während in der Maus eine konstante Menge an iNKT-Zellen von 0,5 % im Blut und Lymphknoten nachweisbar ist (Bendelac, Savage et al. 2007). Die menschliche Leber beinhaltet bis zu 0,5 % iNKT-Zellen (Kenna, Golden-

Mason et al. 2003), wohingegen die murine Leber etwa 30 % iNKT-Zellen in der Maus aufweist. Zudem kommen in der murinen Milz etwa 2,5 % iNKT-Zellen vor (Bendelac, Savage et al. 2007).

Aufgrund ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten und ihrer funktionellen Plastizität rücken iNKT-Zellen immer weiter in den Fokus von Immuntherapien. Durch ihre Fähigkeit sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine zu produzieren, stellen sie einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Therapie dar. Bei Infektionen mit den gramnegativen Bakteriengattungen *Ehrlichia*, *Novosphingobium* und *Borrelia* oder bei Infektionen mit der pathogenen Amöbenspezies *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) induzieren iNKT-Zellen beispielsweise eine protektiven Wirkung (Van Kaer, Parekh et al. 2011) (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009). Zudem konnte Gonzalez-Aseguinolaza, de Oliveira et al. (2000) zeigen, dass die Applikation des iNKT-Zellliganden  $\alpha$ Galactosylceramid ( $\alpha$ GalCer) eine starke Immunantwort gegen Malaria auslöst.

Eine immunsupprimierende Rolle übernehmen iNKT-Zellen hingegen bei einer *Chlamydia muridarum*-Infektion. Die iNKT-Zellen sezernieren nach Aktivierung durch die Bakterien eine Reihe bestimmter Zytokine wie IL 4, die die bakterielle Manifestation erleichtern, sodass es zur Entwicklung einer Sepsis kommen kann (Joyee, Qiu et al. 2007) (Van Kaer, Parekh et al. 2011).

Eine vielversprechende Therapiemöglichkeit wäre daher, die herkömmliche Behandlungsweise (Immun- oder Chemotherapie) zusätzlich mit einer iNKT-Zellaktivierung zu kombinieren. So konnte das bakterielle Wachstum in *Mykobakterium tuberculosis*-infizierten Mäusen nach einer Behandlung mit  $\alpha$ GalCer in Kombination mit dem Antibiotikum Isoniazid stärker gesenkt werden als nach einer  $\alpha$ GalCer-Behandlung allein (Sada-Ovalle, Skold et al. 2010).

## 1.2. Leishmaniose

Die Leishmaniose ist eine Gruppe parasitärer Infektionskrankheiten, die durch protozoische Erreger der Gattung *Leishmania* (*L.*) hervorgerufen werden können. Diese wurden erstmals 1903 von W.B. Leishman und C. Donovan unabhängig voneinander beschrieben (Fulton and Joyner 1949). Laut Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO, 2018) treten Leishmaniosen weltweit in 97 Ländern endemisch auf und schätzungsweise sind etwa 350 Mio. Menschen akut von dieser Krankheit bedroht. Damit zählt die Leishmaniose zu einer der wichtigsten tropischen Infektionskrankheiten der Welt.

Vorwiegend sind Leishmaniosen in den warmen Regionen der Erde wie Südamerika, dem mittleren Osten, Zentralasien, Afrika und in mediterranen Ländern verbreitet. Es handelt sich um eine Armut-assoziierte Erkrankung, die mit einem niedrigen Lebensstandard, Mangelernährung, möglichen Vorerkrankungen bzw. Ko-Infektionen und primitiven Behausungen mit unzureichendem Mückenschutz einhergeht. Zudem ist in diesen Ländern oft nur ein schlecht ausgebautes, staatliches Gesundheitssystem vorzufinden (Murray, Berman et al. 2005). Aufgrund der Globalisierung und der Migration von Flüchtlingen gewinnt die Leishmaniose mittlerweile auch in den Regionen auf der Welt wieder an Bedeutung, die bisher nur geringfügig von der Krankheit betroffen waren, wie beispielsweise Nordamerika, dem Mittelmeerraum und Zentraleuropa.

Es gibt über 20 humanpathogene Leishmanien-Spezies (Markle and Makhoul 2004), die sich morphologisch kaum voneinander unterscheiden. Bei genauerer Betrachtung lassen sie sich allerdings anhand ihres Genotyps, ihres Tropismus, ihrem Vorkommen und ihrer Präferenz gegenüber einem bestimmten Säugetierwirts differenzieren (Gregory, Sladek et al. 2008). Die Leishmanien werden durch den Stich einer weiblichen Sandmücke auf den Wirt übertragen. In den Ländern der alten Welt (AW) Afrika, Asien, Europa geschieht dies über Sandmücken der Gattung *Phlebotomus sp.*, wohingegen in den Ländern der Neuen Welt (NW) Nord- und Südamerika die Gattung *Lutzomyia sp.* für die Übertragung verantwortlich ist (Murray, Berman et al. 2005) (Markle and Makhoul 2004). Die Transmission der Leishmanien kann sowohl zoonotisch (Tier zu Mensch-Transmission) als auch anthroponotisch (Mensch zu Mensch-Transmission) erfolgen (Murray, Berman et al. 2005).

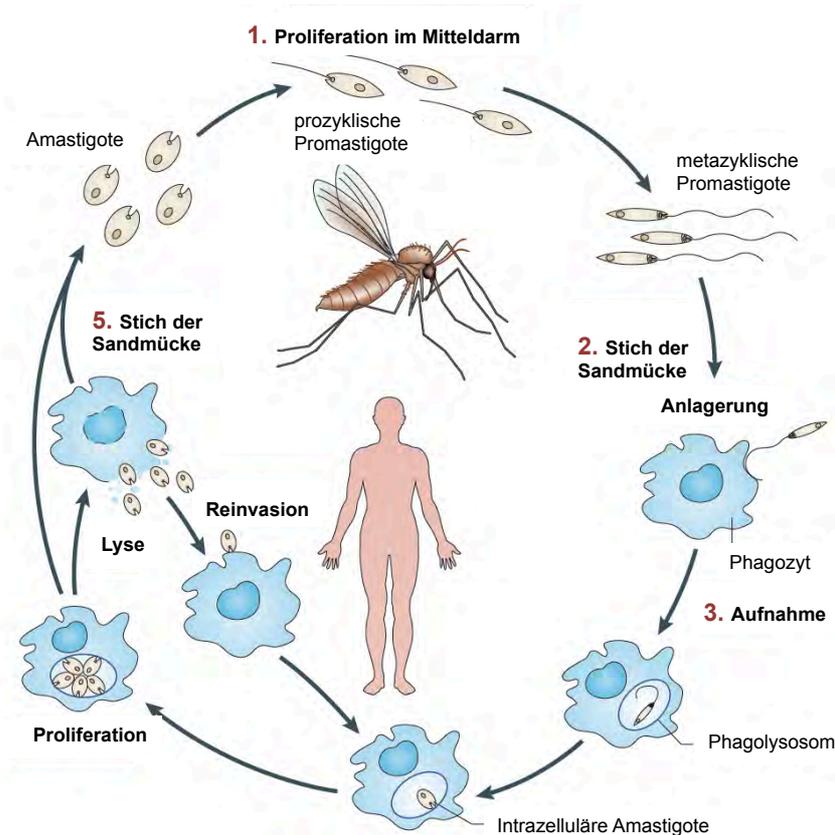
### **1.2.1. Transmission und Lebenszyklus der Leishmanien**

Leishmanien sind obligat intrazelluläre Parasiten mit einem biphasischen Lebenszyklus, während dessen die Leishmanien zwischen einer promastigoten und einer amastigoten Morphologie wechseln (Abbildung 1, (Kaye and Scott 2011)).

Die promastigote Form ist das begeißelte, motile Stadium dieser Parasiten, welches in der 2 mm-großen weiblichen Sandmücke, dem Vektor der Leishmanien, vorkommt. Prozyklischen Promastigoten entwickeln sich im Mitteldarm der Sandmücke (*Phlebotomus sp.*, *Lutzomyia sp.*) innerhalb von zehn Tagen zu metazyklischen Promastigoten, die die für Säugetiere infektiöse Form der Leishmanien darstellen (Abbildung 1: 1, (Markle and Makhoul 2004)). Während der Blutmahlzeit überträgt die infizierte Sandmücke bis zu 1000 metazyklische Promastigoten auf den Säugetierwirt (Abbildung 1: 2, (Mougneau, Bihl et al. 2011)), in dem sie von phagozytierenden

Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) phagozytiert werden (Abbildung 1: 3). Innerhalb von 1-2 Tagen nach der Aufnahme der metazyklischen Promastigoten werden auch die nun infizierten neutrophilen Granulozyten und Monozyten durch Makrophagen phagozytiert, die die Leishmanien in Phagolysosomen einschließen (Ribeiro-Gomes, Otero et al. 2004). DCs hingegen nehmen parasitäre Bestandteile auf, migrieren in die drainierenden Lymphknoten und präsentieren dort den CD4<sup>+</sup>-Zellen diese Antigene, um weitere Zellen des Immunsystems zu rekrutieren.

Die Promastigoten können in der säurehaltigen Umgebung des Phagolysosom überleben. Im Phagolysosomen werden die Leishmanien abgetötet und degradiert. Es wird gebildet, indem das Lysosom, das hydrolysierende Enzyme enthält, und das Phagosom, in dem die Parasiten umschlossen sind, fusionieren (Forestier, Gao et al. 2014). Die Promastigoten differenzieren innerhalb von 24 Stunden nach Aufnahme zur unbegeißelten amastigoten Form. In dieser Form kommt es zur Proliferation mittels longitudinaler Teilung bis die Parasiten die Zellwand des Makrophagen rupturieren, um anschließend weitere Immunzellen zu infizieren (Abbildung 1: 4). Einige der frei-zirkulierenden Amastigoten können während der Nahrungsaufnahme erneut von der Sandmücke aufgenommen werden (Abbildung 1: 5). Die Amastigoten gelangen in den Mitteldarm der Sandmücke, in dem sie sich weiter zu prozyklischen Promastigoten differenzieren, womit sich der Kreislauf schließt (Murray, Berman et al. 2005).



**Abbildung 1: Biphasische Lebenszyklus der Leishmanien in der weiblichen Sandmücke sowie im Säugetierwirt.** 1. Prozyklische Promastigoten proliferieren im Mitteldarm der Sandmücke zu metazyklischen Promastigoten, dem infektiösen Leishmanienstadium. 2. Während der Blutmahlzeit überträgt die Sandmücke die metazyklischen Promastigoten auf den Säugetierwirt. 3. Phagozyten wie Makrophagen nehmen die Leishmanien in Phagolysosomen auf, in denen die Leishmanien sich zu amastigoten Form differenzieren. 4. Intrazellulären Amastigoten proliferieren durch longitudinaler Teilung. Durch Penetration der Zellmembran werden die Parasiten freigesetzt, um weitere Makrophagen zu infizieren. 5. Ein Teil der freigesetzten Leishmanien wird von der Sandmücke während der Blutmahlzeit aufgenommen, in deren Mitteldarm sich die Leishmanien zu prozyklischen Promastigoten weiter differenzieren. (Kaye and Scott 2011, modifiziert)

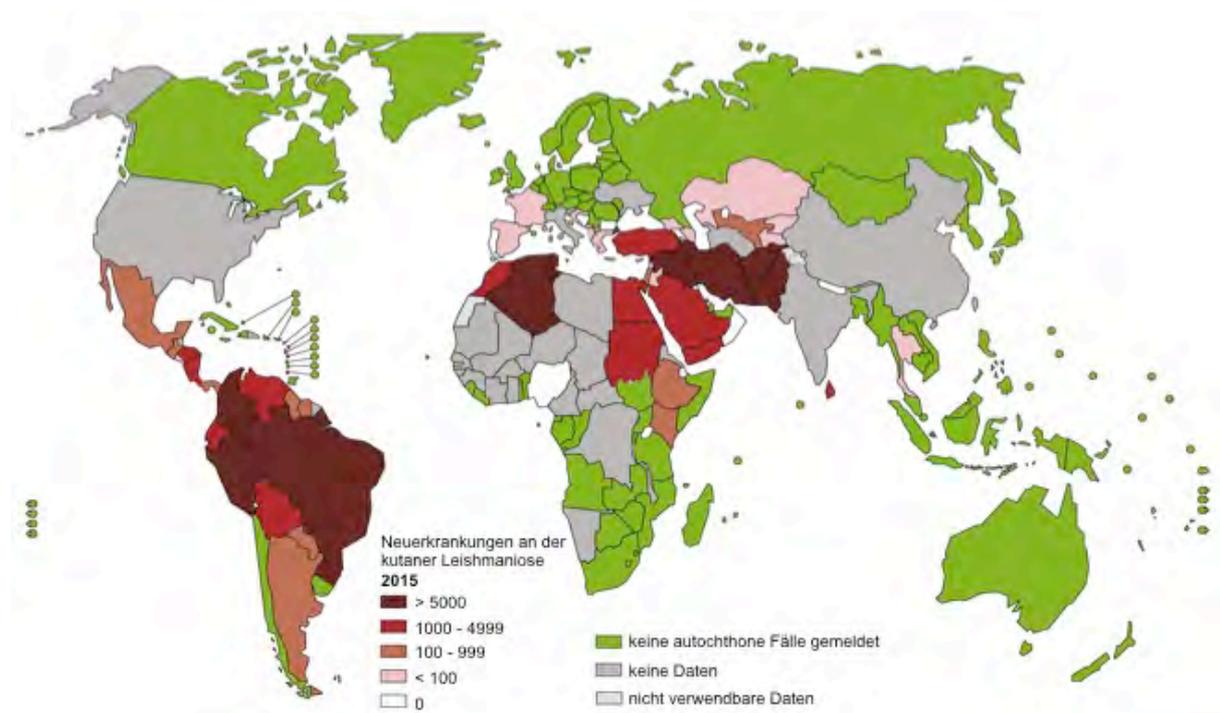
### 1.2.2. Verschiedene Formen der Leishmaniose

Infektionen mit Leishmanien können insgesamt drei Formen der Leishmaniose auslösen: die viszerale Leishmaniose, die kutane Leishmaniose und die mukokutane Leishmaniose. Das verursachte Krankheitsbild variiert in Abhängigkeit der infizierenden Leishmanien-Spezies.

Bei der **viszeralen Leishmaniose** (VL), auch Kala-Azar (Hindi: Schwarzes Fieber) genannt, handelt es sich um eine schwere systemische Infektion der inneren Organe, bei der u.a. Leber, Milz und Knochenmark betroffen sind. Sie wird durch *L. donovani* (Indien, Asien, Afrika), *L. infantum* (Mittelmeerraum, Asien, Südamerika), *L. tropica* (Mittlerer Osten) und *L. amazonensis* (Südamerika) verursacht (Murray, Berman et al. 2005). Zwei bis vier Monaten nach Infektion treten Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust, eine Schwarzfärbung der Haut sowie eine vergrößerte Milz und Leber (Spleno-/Hepatomegalie)

auf. Jährlich erkranken weltweit 50.000 - 90.000 Menschen an der viszeralen Leishmaniose, die überwiegend in Brasilien, Ostafrika, und Südostasien vorkommt und ohne Behandlung in 95 % der Fälle zum Tod führt (WHO 2018).

Die **kutane Leishmaniose (KL)** ist die am häufigsten auftretende Form der Leishmaniose, die durch *L. major* und *L. tropica* in der Alten Welt (Europa, Afrika, Zentralasien, Mittleren Osten) und durch *L. braziliensis*, *L. guyanensis* und *L. mexicana* (Südamerika) in der Neuen Welt ausgelöst wird (Dorlo, Balasegaram et al. 2012). Der Stich einer infizierten Sandmücke führt zu einer lokalen Hautinfektion. Es entsteht eine geschlossene Papel, die sich innerhalb von mehreren Wochen oder Monaten zu einer ulzerierenden, offenen Hautläsion entwickeln kann (Soto, Arana et al. 2004). Die Hautgeschwüre heilen in der Regel von selbst ab, hinterlassen allerdings oft entstellende Narben. Weltweit werden jährlich 600.000 bis 1 Mio. Neuerkrankungen gezählt, von denen 95 % der Fälle in Amerika, dem Mittelmeerraum, dem Mittleren Osten und Zentralasien auftreten (Abbildung 2, WHO 2018).



**Abbildung 2: Geographische Verbreitung der kutanen Leishmaniose, 2015.** Südamerika, der Mittelmeerraum sowie der mittlere Osten und Zentralasien weisen die meisten Neuerkrankungen auf. (WHO 2018, modifiziert).

Die **mukokutane Leishmaniose** (MKL) ist meistens eine Folgeerkrankung der kutanen Leishmaniose, bei der sich die Leishmanien über das Lymphsystem und den Blutstrom in der Mukosa des Nasopharynx ausbreiten. Infolgedessen kommt es zur teilweisen oder vollständigen Zerstörung des mukosalen Gewebes von Nase, Mund und Rachen (Dorlo, Balasegaram et al. 2012). Über 90 % der Fälle kommen in den südamerikanischen Ländern Bolivien, Brasilien, Peru sowie im afrikanischen Äthiopien vor und werden durch die Leishmanien-Spezies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* und *L. panamensis* ausgelöst (WHO 2018). Die mukokutane Leishmaniose ist im Gegensatz der kutanen Leishmaniose nicht selbstheilend und nimmt ohne Behandlung einen tödlichen Verlauf (Murray, Berman et al. 2005).

### **1.2.3. Immunantwort des Wirtes auf die Infektion mit Leishmanien**

Die klinische Manifestation der Leishmaniose ist von verschiedenen Umweltfaktoren abhängig. So spielt die Virulenz der jeweiligen Leishmanien-Spezies ebenso eine Rolle, wie die Beteiligung des Vektors und die Immunantwort des Wirts (Murray, Berman et al. 2005). Nach Infektion werden die Leishmanien über ihre pathogen-assoziierten molekularen Muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMPs) von den wirtseigenen Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkannt. Infolgedessen wird eine Signalkaskade über die Adaptermoleküle MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) und TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) ausgelöst, die die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden induziert (Kawai and Akira 2010).

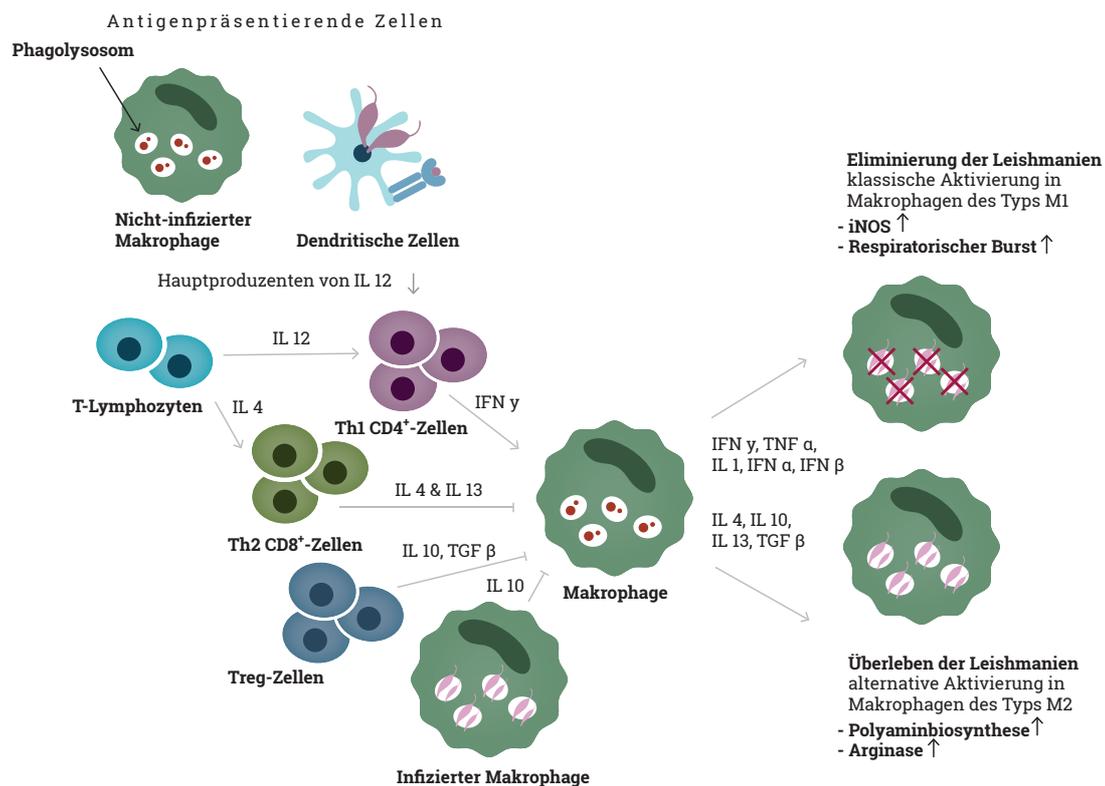
Die Haupteffektorzellen während der Infektion sind Makrophagen, die eine bedeutende Rolle im Krankheitsverlauf einnehmen. Auf der einen Seite sind sie für die Eliminierung der Leishmanien zuständig, auf der anderen Seite dienen sie den Parasiten als Zielzellen, in denen sie sich vermehren können. Im Zuge einer Infektion können Makrophagen generell auf zwei verschiedene Weisen aktiviert werden: die klassische Aktivierung und die alternative Aktivierung (Abbildung 3).

Bei der klassischen Aktivierung der Makrophagen werden zunächst CD4<sup>+</sup>-Zellen (Typ1-T-Helferzellen, Th1-Zellen) wie NK-Zellen durch Interleukin 12 (IL 12) aktiviert. Daraufhin produzieren die Th1-Zellen pro-inflammatorische Zytokine wie IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  und IL 1. Die Makrophagen wiederum werden durch das Zytokin IFN  $\gamma$  aktiviert und verstärken daraufhin die Produktion von induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthasen (*inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS auch NOS2). Das Enzym iNOS katalysiert die Umsetzung der Aminosäure L-Arginin zu Stickstoffmonoxid (*Nitric Oxide*, NO). Dieses toxische Molekül übernimmt eine

wichtige Rolle bei der Eliminierung der intrazellulären Parasiten (Liu and Uzonna 2012). Diese Aussage wird durch den Nachweis unterstützt, dass Makrophagen von iNOS-defizienten Mäusen nicht in der Lage sind Leishmanien zu eliminieren, was diese Tiere hochsuszeptibel für Leishmanien-Infektionen werden lässt (Seger and Krebs 1995). Darüber hinaus stimulieren Makrophagen die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS), welche oxidativen Stress während der Phagozytose verursachen und ebenfalls zur Eliminierung der Leishmanien beitragen (Scott and Novais 2016).

Die alternative Aktivierung der Makrophagen wird durch die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL 4, IL 10 und IL 13, sowie dem transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ , TGF  $\beta$ ) vermittelt. Zudem wird die Synthese schützender, pro-inflammatorischer Zytokine herabgesetzt. Auf diese Weise wird die Produktion des Enzyms Arginase 1 (Arg 1) induziert, das mit iNOS um das Substrat L-Arginin konkurriert (Liu and Uzonna 2012). Die Arginase hydrolysiert L-Arginin zu Ornithin, einem Grundbaustein der Polyaminbiosynthese, und unterstützt das Überleben der Leishmanien in den Makrophagen (Kropf, Fuentes et al. 2005).

Neben den Makrophagen sind dendritische Zellen von essentieller Bedeutung, um eine Leishmanien-Infektion zu kontrollieren. Sie sind die Hauptproduzenten des pro-inflammatorischen IL 12, welches die Th1-Zellen anregt, weitere schützende Zytokine zu sezernieren. Zudem sind sie spezialisiert in der Aufnahme parasitärer Antigene, um diese anschließend im Lymphknoten CD4<sup>+</sup>-Zellen zu präsentieren (Mougneau, Bihl et al. 2011).



**Abbildung 3: Aktivierungswege von Makrophagen nach Infektion mit Leishmanien.** Die Sekretion von IFN  $\gamma$  der Th1-Zellen führt zur klassischen Aktivierung von Makrophagen, die infolgedessen weitere proinflammatorische Zytokine wie IFN  $\gamma$  und TNF  $\alpha$  produzieren. Die Produktion von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffspezies wird induziert, die an der Eliminierung der Leishmanien beteiligt sind. Die alternative Aktivierung der Makrophagen wird durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL 4 und IL 13 vermittelt. Makrophagen induzieren die Sekretion des Enzyms Arginase, wodurch die Umsetzung des toxischen Stickstoffmonoxid verhindert wird und ein Überleben der Leishmanien begünstigt. (Eigene Darstellung, nach Liu and Uzonna 2012)

### 1.2.4 Mechanismen der Immunzellmanipulation durch *L. major*

Im Laufe der Evolution haben Leishmanien zahlreiche Mechanismen entwickelt, der Immunantwort des Wirts zu entgehen und ihr Überleben zu ermöglichen. Die Oberfläche der Parasiten ist beispielsweise mit einer Variation an verschiedenen Glykoproteinen bedeckt, die den Leishmanien beim ersten Kontakt mit dem Wirt einen mechanischen Schutz vor enzymatischer Degradierung bieten. Um sich bestmöglich an die äußeren Umgebungsbedingungen innerhalb ihres Wirtes anzupassen, verändern die Leishmanien die Zusammensetzung dieser Oberflächen-Glykokalyx im Verlauf ihres Lebenszyklus. So beschreiben Forestier, Gao et al. (2014), dass die Expression des Lipophosphoglykans (LPG) der Leishmanien während der Differenzierung der infektiösen promastigoten Form zur obligat intrazellulären amastigoten Form drastisch herunterreguliert wird. Zudem begünstigt die Bindung des LPGs an TLR 2 und TLR 4 auf Makrophagen und NK-Zellen das Überleben der

Leishmanien, da die Interaktion von LPG mit beiden TLRs zur Inhibition der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine sowie der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und NO führt (Becker, Salaiza et al. 2003) (Chandra and Naik 2008) (de Assis, Ibraim et al. 2012).

Gleichzeitig unterdrücken Leishmanien die Aktivierung der MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), Enzyme einer mehrstufigen Signaltransduktionskaskade, die an der Regulation verschiedener Makrophagenfunktionen beteiligt sind, und zum Abtöten der Leishmanien führen würden (Liu and Uzonna 2012).

Außerdem sind Leishmanien auch in der Lage in die Aktivierung dendritischer Zellen und deren Funktionen einzugreifen. Dafür degradieren sie zum einem Effektormoleküle des Wirts, die an dem JAK/STAT- und NFκB-Signalweg beteiligt sind. Diese Signalwege induzieren zum einem die TLR 4-vermittelte Aktivierung dendritischer Zellen, welche durch die Leishmanien inhibiert wird. Zum anderen werden die DCs bei ihrer Aufgabe parasitäre Antigene optimal zu präsentieren und pro-inflammatorische Zytokine wie IL 12 zu sezernieren durch die Leishmanien behindert (Xin, Li et al. 2008).

Am Ende entscheidet ein Zusammenspiel aus den verschiedenen Faktoren des Wirts und deren Parasiten, ob und wie sich die Infektion entwickelt.

### **1.2.5 Möglichkeiten der Leishmanien-Therapie mit damit verbundenen Problemen**

Obwohl die kutane Leishmaniose weltweit von großer Bedeutung ist, von dem über 97 Länder betroffen sind, gibt es nach wie vor keine optimalen Therapieoptionen für diese Krankheit. Das Repertoire der anti-leishmanialen Medikamente ist begrenzt und die Behandlungsweisen variieren in Abhängigkeit der Leishmanien-Spezies zwischen den Ländern. Gegenwärtig sind intraläsionale Injektionen anti-parasitärer pentavalenter Antimonverbindungen wie Natriumstibogluconat oder Megluminantimoniat der Goldstandard für die Behandlung der kutanen Leishmaniose (Shio, Hassani et al. 2012). Eins der wenigen oral verabreichten Medikament in der Leishmanien-Therapie stellt das anti-protozoische Miltefosin dar, welches die Phospholipid- und Sterolbiosynthese der Leishmanien inhibiert (Soto, Arana et al. 2004). Die Behandlung mit dem anti-bakteriellen Paromomycin zeigt ebenfalls einen Effekt auf die Parasiten, die Wirkungsweise des Arzneimittels ist bisher jedoch nicht aufgeklärt (Ben Salah, Ben Messaoud et al. 2013). Weitere wertvolle Alternativen sind das Antiprotozoikum Pentamidin und fungizide Imidazole wie Ketoconazol, welche die Ergosterolsynthese der Leishmanien blockieren (Sundar and Chakravarty 2015).

Allen Medikamenten ist gemeinsam, dass sie mit hohen Kosten verbunden sind und somit oft unerschwinglich für die Patienten sind, die überwiegend in Armut leben.

Generell werden die oben genannten Medikamente für alle drei Formen der Leishmaniose (VL, KL, MKL) eingesetzt und dem Patienten systemisch oder in Kombination miteinander verabreicht. Zudem werden sie häufig zusammen mit anderen Agentien wie Immunmodulatoren (z.B. Imiquimod) verwendet (Sundar and Chakravarty 2015). Der Behandlungserfolg ist von Faktoren wie der Leishmanien-Spezies, dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten, seinem Krankheitsstadium und der Möglichkeit einer kontinuierlichen Therapie abhängig (Blum, Buffet et al. 2014).

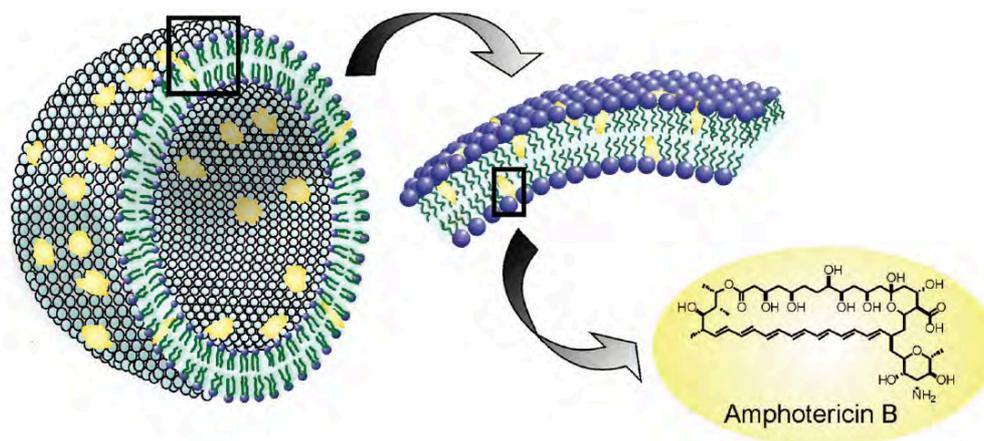
Ein großer Nachteil der aktuell verfügbaren Medikamente ist neben den hohen Kosten die lange Behandlungsdauer und das Risiko, dass zusätzlich unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können. Mögliche Nebenwirkungen können neben Fieber, Erbrechen, Übelkeit, Bauch-, Muskel- und Kopfschmerzen auch Herzrhythmusstörungen, Pankreatitis oder Nierenversagen sein (Murray, Berman et al. 2005) (Sundar and Chakravarty 2015). Im Fall der viszeralen Leishmaniose, der schwersten Infektionsform der Leishmaniose, werden diese Nebenwirkungen toleriert. Solch schwerwiegende Effekte sind jedoch nicht akzeptabel für die mildere Form der kutanen Leishmaniose, weshalb die Entwicklung neuer, weniger toxischer Medikamente notwendig ist. Ein weiteres großes Problem, gegenwärtig und zukünftig, stellt die zunehmende Resistenz der Leishmanien gegenüber den bestehenden Therapieoptionen dar und weist nochmals auf die Notwendigkeit neuer Behandlungsstrategien hin. Sekundärinfektionen des Wirts erschweren zudem in endemischen Ländern häufig eine erfolgreiche Behandlung (Stich, Ponte-Sucre et al. 2013).

Eine neue Herangehensweise und vielversprechende Möglichkeit in der anti-Leishmanien-Therapie ist die Integration hoch toxischer Wirkstoffe in Liposomen. Liposomen sind synthetische Vesikel, die aus amphiphilen Substanzen wie Phospholipiden und Cholesterol aufgebaut sind, und als Transportsysteme für Arzneimittel dienen. Ein exemplarisches Beispiel sind die sogenannten AmBisome® (Gilead Sciences): Liposomen, in denen der Wirkstoff Amphotericin B formuliert wurde (Abbildung 4). Amphotericin B, das in seiner reinen Form verabreicht wird, verursacht schwere Nebenwirkungen im Patienten, während die Integration in Liposomen zu einer geringeren Toxizität führt (Adler-Moore and Proffitt 2002) (Gangneux, Sulahian et al. 1996) (Nicoletti, Seifert et al. 2009).

Mehrere Studien zeigten bereits, dass AmBisome® intravenös allein oder in Kombination mit herkömmlichen anti-Leishmanien Medikamenten erfolgreich in Patienten, die an der viszeralen Leishmaniose erkrankt waren, eingesetzt wurden (Balasegaram, Ritmeijer et al. 2012). Die Anwendung der AmBisome® in der kutanen Leishmaniose ist jedoch umstritten und nicht geläufig, da sie bisher nicht effektiv in die Haut gelangen, um zu wirken und die

Behandlung zu kostenintensiv für eine selbstlimitierende Erkrankung ist (Wortmann, Zapor et al. 2010).

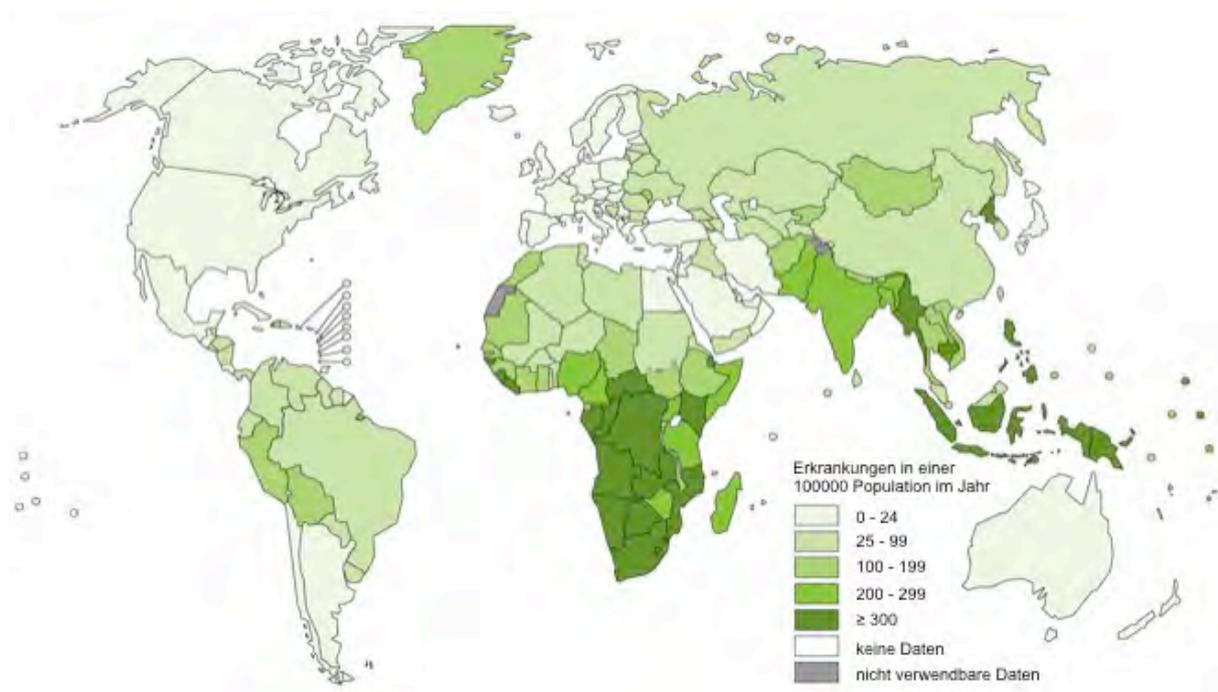
Eine Herausforderung in der Entwicklung neuer Medikamente stellt die optimale Aufnahme und Verfügbarkeit des Wirkstoffs dar, da sich diese Parasiten nur intrazellulär vermehren können und durch die Wirtszelle geschützt sind. Liposomen sind in der Lage solche biologischen Barrieren zu überwinden, indem sie die Membran der Makrophagen penetrieren. Aufgrund dessen können sie den Wirkstoff gezielt zum Bestimmungsort transportieren, wo dieser seine optimale Wirkung entfalten kann. Die Integration des Wirkstoffs in Liposomen bietet zahlreiche Möglichkeiten die Behandlung mit den herkömmlichen Medikamenten in der anti-Leishmanien Therapie neu zu entwickeln. Liposomen verhindern die enzymatische Degradierung des Arzneimittels, während sie zugleich seine Toxizität reduzieren und mögliche Nebenwirkungen für den Patienten verhindern bzw abschwächen. Durch die Liposomen-Formulierung kann die Pharmakokinetik eines Medikaments neu moduliert werden. So kann beispielsweise die Löslichkeit und die Biostabilität eines Medikaments verbessert werden. Eine weitere Option ist die Integration von mehr als einem Wirkstoff in die Liposomen. Eine solche Kombinationstherapie kann möglicherweise zu synergistischen Effekten führen, die die Wirkung der einzelnen Präparate verstärken (Gutierrez, Seabra et al. 2016).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung von in Liposomen-formuliertem Amphotericin B** (Gutierrez et al. 2016). Der Wirkstoff Amphotericin B ist in die liposomale Membran integriert.

### 1.3 Tuberkulose

Tuberkulose (TB) ist eine schwerwiegende Infektionskrankheit der Atemwege und wird durch den Erreger *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) verursacht. Robert Koch beschrieb die Tuberkulose-Bakterien erstmals 1882, wofür er 1905 den Nobelpreis in Medizin oder Physiologie erhielt (Daniel 2006). Schätzungsweise ist ein Drittel der Weltbevölkerung latent mit diesem Erreger infiziert (Stewart, Robertson et al. 2003). Für 2016 verzeichnet die WHO 10,4 Mio Neuerkrankungen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Geschätzte Anzahl an Tuberkulose-erkrankter Menschen weltweit im Jahr 2016.** In Afrika, Südasien und Südamerika liegt die Infektionsrate besonders hoch (WHO TB-Report 2017, modifiziert).

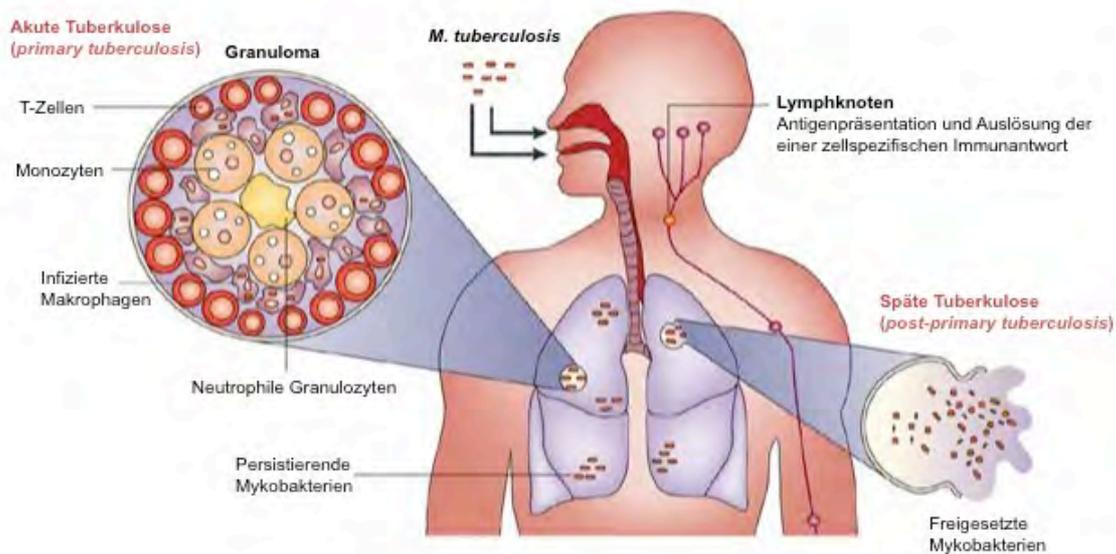
*M. tuberculosis* wird über eine Tröpfcheninfektion von Individuum zu Individuum verbreitet (Abbildung 6). Insbesondere Menschen mit einem schwachen Immunsystem besitzen ein erhöhtes Risiko an Tuberkulose zu erkranken. Etwas 5-10 % der infizierten Menschen entwickeln innerhalb der ersten 1 - 2 Jahre nach Infektion eine akute Tuberkuloseerkrankung (*primary TB*). Eine erneute, aber späte Tuberkulose (*Post-primary TB*) kann noch Jahre später nach der Infektion auftreten und durch eine Reaktivierung der Bakterien im Körper oder aufgrund einer Reinfektion ausgelöst werden (Stewart, Robertson et al. 2003).

Über die Inhalation infektiöser Tröpfchen gelangen die Bakterien in den respiratorischen Trakt, wo sie vermehrt die Alveolen der Lunge befallen und residente Immunzellen wie

Alveolarmakrophagen und DCs infizieren (Divangahi, Behar et al. 2013) (Orme, Robinson et al. 2015) (Harding and Boom 2010). Nach Infektion initiieren die Makrophagen vermehrt die Formierung weiterer Immunzellen und die Bildung fibrotischen Gewebes um die Bakterien. Es bilden sich kleine Knötchen in der Lunge, sogenannte Granuloma, die eine weitere Ausbreitung der Bakterien verhindern soll (Orme, Robinson et al. 2015). DCs nehmen vorwiegend Bakterien oder mykobakterielle Fragmente auf, die sie im Lymphknoten zur Rekrutierung weiterer T-Lymphozyten präsentieren (Stewart, Robertson et al. 2003). Der weitere Infektionsverlauf ist von der Interaktion zwischen Wirt und Bakterien abhängig.

Wie bereits die Leishmanien haben auch Mykobakterien Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort des Wirts zu entkommen und sich ihr Überleben zu sichern. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die Bindung bakterieller Lipoproteine an TLR 2 des Wirts zur Inhibition der Expression von MHCII-Moleküle führt, wodurch eine optimale Antigenpräsentation und Auslösung einer spezifischen Immunantwort verhindert wird. Zudem veranlassen virulente Mykobakterien infizierte Makrophagen spezifisch zur Nekrose, sodass sich die Bakterien nach der Zellyse weiter im Wirt ausbreiten können (Behar, Divangahi et al. 2010). Des Weiteren können die Bakterien die Reifung der Phagolysosomen unterbrechen, indem sie die Fusion von Lysosom und *M. tuberculosis*-infiziertem Phagosom unterbinden und damit einer Ansäuerung des Milieus durch das Lysosom entgehen (Brodin, Poquet et al. 2010).

Zur Behandlung empfiehlt die WHO eine 6-monatige Therapie für Tuberkulose-Patienten: in den ersten beiden Monaten werden Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol verabreicht. In den nachfolgenden vier Monaten wird die Behandlung mit Isoniazid und Rifampicin fortgeführt (WHO Report 2017). Die verschiedenen Manipulationsmechanismen der Mykobakterien und deren Überdauern im Körper erschweren die Therapie der Krankheit zusätzlich. Das vermutlich größere Problem stellt jedoch die zunehmende Entwicklung von Resistenzen gegenüber den Medikamenten von Seiten der Mykobakterien dar. Im Jahr 2016 waren weltweit 490.000 Menschen mit einem resistenten *M. tuberculosis*-Stamm infiziert, die nicht erfolgreich therapiert werden konnten (WHO Report 2017). Die Anpassungsfähigkeit der Mykobakterien ist schnell und effektiv, während die Entwicklung neuer Medikamente nur langsam voranschreitet. Der bisherige Fokus in der Therapie lag auf der Unterbrechung der bakteriellen Transmission, die jedoch eine lange Behandlungsdauer fordert und für viele Patienten in den betroffenen Ländern zu kostenintensiv ist.



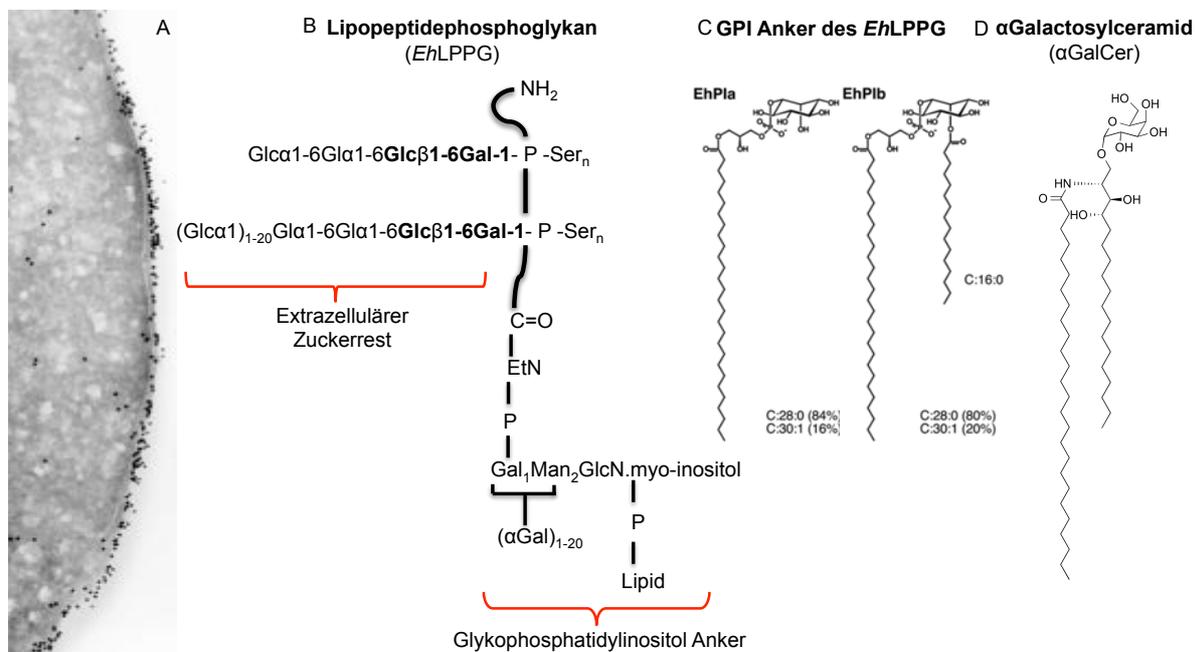
**Abbildung 6: *M. tuberculosis*-Infektion im Menschen.** Mykobakterien gelangen über Aerosole in den Respiratorischtrakt. Innerhalb von 1 - 2 Jahren nach Infektion kann sich eine akute Tuberkulose manifestieren. Es bilden sich Granuloma, in denen die Bakterien von Immunzellen umschlossen werden, um deren Verbreitung im Körper zu verhindern. Mehrere Jahre nach der akuten Tuberkulose, kann durch Reaktivierung von Mykobakterien oder Reinfektion die Tuberkulose erneut ausbrechen (Späte Tuberkulose). (Stewart et al. 2003, modifiziert)

#### 1.4 *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) Lipopeptidphosphoglykan (*EhLPPG*) und davon abgeleitete synthetische *EhPI*-Analoga

*Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) ist der protozoische Erreger der Amöbiasis. *E. histolytica*-Infektionen verlaufen in 90 % der Fälle asymptomatisch, während 10 % der erkrankten Patienten eine invasive, intestinale Amöbiasis (auch Amöbenkolitis) entwickeln (Nicoletti, Seifert et al. 2009). Die intestinale Amöbiasis manifestiert sich anhand von Bauchschmerzen und starken Diarrhöen im Körper und führt zu massiven Gewebszerstörungen im Darm. Durch das perforierte Darmgewebe gelangen die Amöben über den Blutkreislauf in weitere Organe. Von dieser extraintestinalen Amöbiasis ist oftmals die Leber betroffen, in der es zur Entwicklung eines Amöbenleberabszesses kommen kann (Nowak, Lotter et al. 2004). Weltweit sterben jährlich bis zu 100.000 Menschen an dieser Erkrankung (WHO/PAHA/UNESCO, 1997).

Die Pathogenität dieser Parasiten wird mit der Expression eines Oberflächenmoleküls, dem Lipopeptidphosphoglykan (*EhLPPG*), assoziiert (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009) (Marinets, Zhang et al. 1997). *EhLPPG* ist über ein Phosphatidylinositol (PI) des Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker in der Membran der Amöben fixiert (Abbildung 7: B). Der GPI-Anker besteht aus einem *E. histolytica*-spezifischen

Gal<sub>1</sub>Man<sub>2</sub>GlcN-*myo*-inositol-Motiv, das mit einem Phosphoserin-Rückgrat verbunden ist. Dieses Polypeptid-Rückgrat ist zusätzlich mit einem extrazellulären Zuckerrest ([Glcα1-6]<sub>n</sub>Glcβ1-6Gal) substituiert (Moody-Haupt, Patterson et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass zwei Varianten des *E. histolytica* PI natürlich vorkommen: *EhPIa* und *EhPIb* (Abbildung 7: C, (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009). Beide *EhPIs* bestehen aus einem Phosphatidyl-(D)-Inositolring und einem (S)-Glycerin. *EhPIa* ist zudem mit einer langen Fettsäurekette (C30:1) versehen, während *EhPIb* neben einer langen Fettsäurekette (C30:1 oder C28:0) eine zusätzliche kurze Fettsäurekette (C16:0) besitzt. Das Molekül αGalactosylceramid (αGalCer) weist einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie das *EhLPPG* auf (Abbildung 7: D). αGalCer ist einer der meist untersuchten iNKT-Zellligand und führt nachweislich zu deren Aktivierung (Fujii, Shimizu et al. 2002).

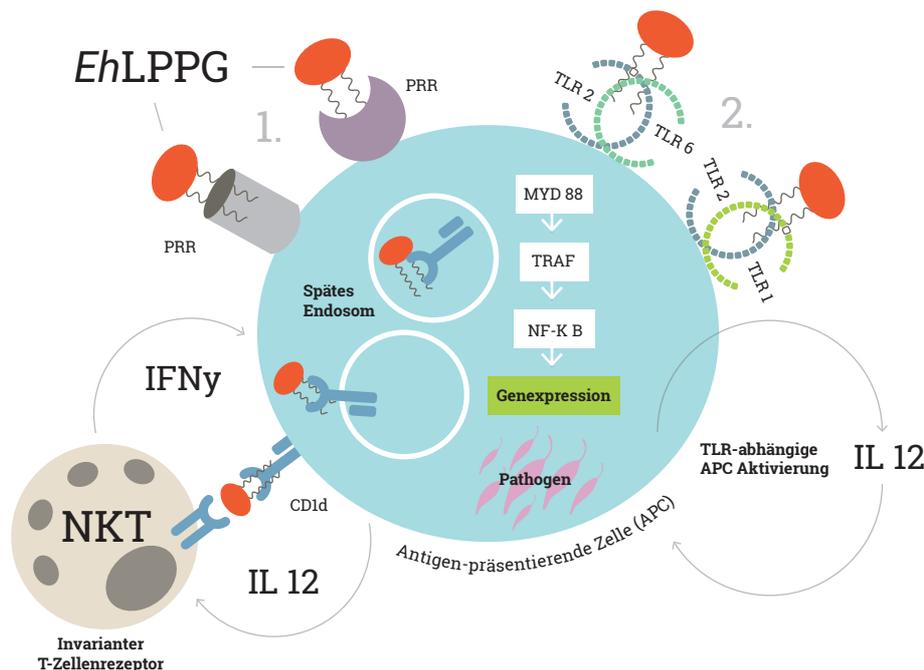


**Abbildung 7: Lokalisation des *E. histolytica*-membranständigen Lipopeptidphosphoglykans aus *E. histolytica* (*EhLPPG*) sowie die chemische Struktur von *EhLPPG* und αGalCer.** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. histolytica*, *EhLPPG* sind als schwarze Punkte zu sehen (A). Chemische Struktur von: *EhLPPG* (B), GPI-Anker von *EhLPPG* (*EhPIa* und *EhPIb*, C) und αGalCer (D). (Marinets et al. 1997, modifiziert)

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass *EhLPPG* iNKT-Zellen sowohl über Toll-like Rezeptoren als auch über die Präsentation von CD1d-Molekülen aktivieren kann (Abbildung 8, (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009)). Im Gegensatz zum αGalCer, führt die *EhLPPG*-vermittelte Aktivierung der iNKT-Zellen zu einer starken Sekretion des pro-inflammatorischen IFN γ und nur zu einer schwachen Produktion des anti-inflammatorischen

IL 4 (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009). Darüber hinaus zeigten Lotter, Gonzalez-Roldan et al. (2009), dass *EhLPPG* von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen wird und im Lysosom und/oder spätem Endosom (*late endosome*) auf CD1d-Moleküle geladen wird, die im weiteren Verlauf die Erkennung durch iNKT-Zellpräsentation ermöglicht. Im gleichen Versuch wurde ebenfalls nachgewiesen, dass  $\alpha$ GalCer direkt an CD1d-Moleküle binden kann. Die iNKT-Zellaktivierung ist zusätzlich von einem weiteren Aktivierungsweg abhängig, der über die Bindung von *EhLPPG* an Toll-like Rezeptoren erfolgt und zur IL 12-Sekretion der antigen-präsentierenden Zellen führt (Abbildung 8: 2; (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009)). Ferner konnten Lotter, Gonzalez-Roldan et al. (2009) zeigen, dass der *EhPI*-Teil des Moleküls, die entscheidende Komponente für die iNKT-Zellaktivierung ist.

Aufgrund der nachweislichen Aktivierung von Immunzellen und der damit verbundenen Möglichkeit Einfluss auf die immunstimulatorische Regulation zu nehmen, stellt *EhLPPG* einen vielversprechenden Wirkstoff für die Immuntherapie dar.



**Abbildung 8: *EhLPPG*-induzierte Aktivierungswege von iNKT-Zellen.** *EhLPPG* aktiviert iNKT-Zellen auf der einen Seite indirekt über die Bindung an Toll-like Rezeptoren (TLR), wodurch die Zytokinexpression über den MYD 88-Signalweg induziert wird (2.). Auf der anderen Seite wird *EhLPPG* nach der Bindung an Pathogen-Erkennungsrezeptoren (PRR) in Endosomen auf CD1d-Molekülen geladen. Die Präsentation von *EhLPPG* über CD1d-Molekülen führt zu einer direkten Aktivierung von iNKT-Zellen (1.). (Eigene Darstellung)

Da die Isolierung und Aufreinigung des nativen Molekül *EhLPPG* sehr aufwendig ist, wurden synthetische *EhPI*-Analoge des *EhLPPGs* entwickelt und synthetisiert. Die synthetischen Moleküle bestehen lediglich aus dem GPI-Anker (*EhPIa* oder *EhPIb*) und bieten zudem die Möglichkeit der Modifikation, um die Stimulation von Immunzellen weiter zu optimieren. Ferner können sie später unter GMP-Richtlinien produziert werden, was für die Anwendung als Medikament am Menschen nötig ist. Die synthetischen Moleküle variieren in ihrem GPI-Anker, der Länge und Saturierung der Fettsäureketten sowie der Konformation und Glykosylierung des Phosphatidylinositolrings.

Insgesamt wurden 12 synthetische *EhPI*-Analoge hergestellt. In Zusammenarbeit mit Prof. Yukari Fujimoto (Keio Universität, Yokohama, Japan) und Prof. Koichi Fukase (Universität Osaka, Osaka, Japan) wurde die erste Gruppe synthetischer *EhPI*-Analoge, bestehend aus sechs Molekülen, synthetisiert (Choy, Bernin et al. 2017) (Aiba, Suehara, Choy et al. 2017). Sechs weitere synthetische *EhPI*-Analoge wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Chris Meier (Arbeitsgruppe für Organische Chemie, Universität Hamburg) für diese Doktorarbeit synthetisiert.

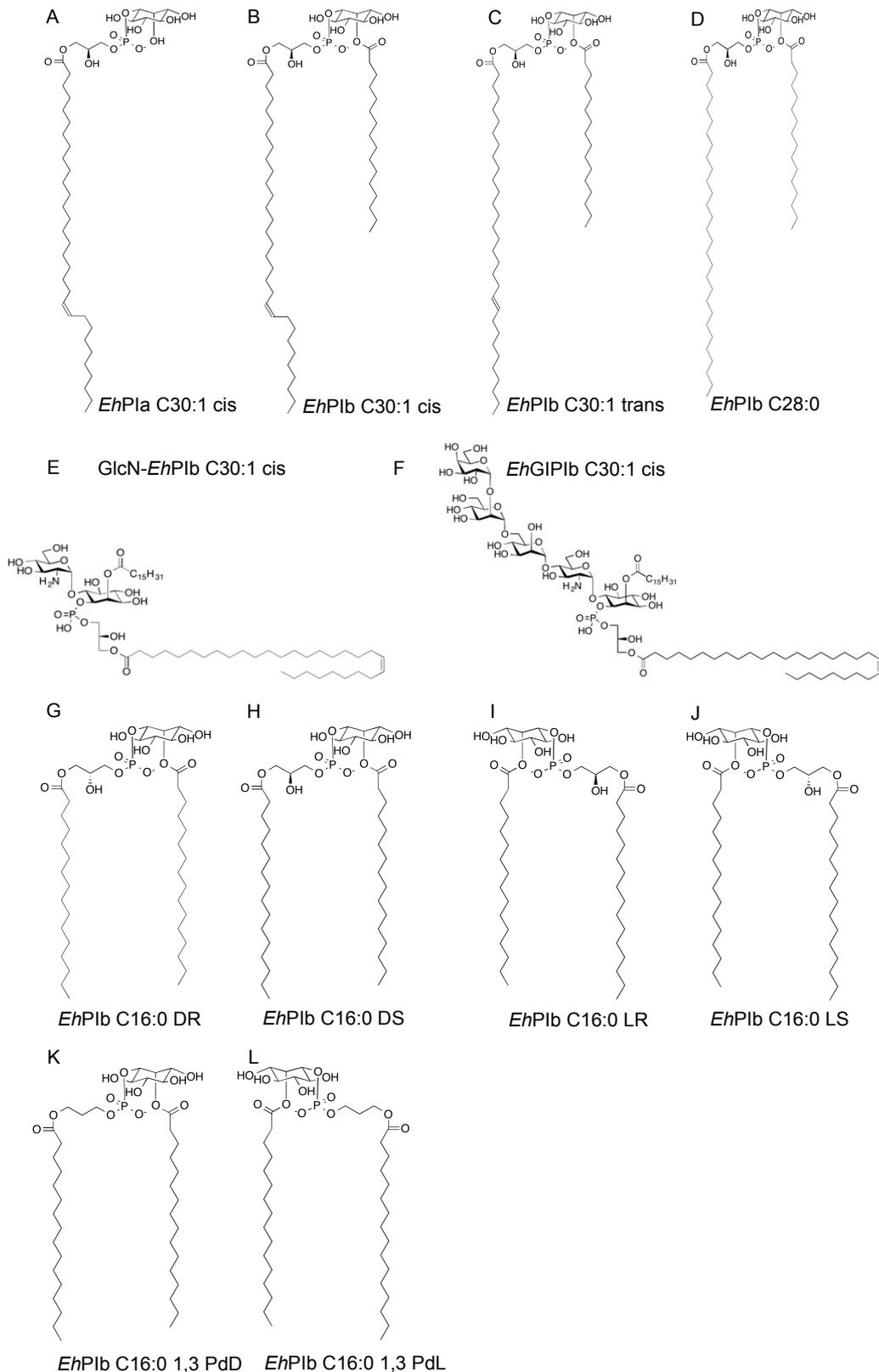
Die synthetischen *EhPI*-Analoge der ersten Gruppe bestehen aus dem *EhPIa*- oder *EhPIb*-Anker und unterscheiden sich in der Länge sowie der Saturierung der langen Fettsäurekette. Zudem wurde der Phosphatidylinositolring von zwei dieser Moleküle zusätzlich noch glykosyliert. Das synthetische *EhPI*-Analogon *EhPIa* C30:1 cis ist aus einem Phosphatidyl-(D)-inositolring aufgebaut, der an Position 1 über S-Glycerin mit einer langen Fettsäurekette mit cis-Doppelbindung (C30:1) verknüpft ist (Abbildung 9: A).

Die *EhPIb*-Analoge weisen die gleiche Basisstruktur auf, besitzen jedoch neben der langen Fettsäurekette (C30:1 oder C28:0) eine zweite, kürzere Fettsäurekette (C16:0). Die lange Fettsäurekette von *EhPIb* C30:1 cis weist eine cis-Doppelbindung auf, während die Fettsäurekette von *EhPIb* C30:1 trans eine trans-Doppelbindung enthält (Abbildung 9: B, Abbildung 9: C). Das Molekül *EhPIb* C28:0 besitzt eine lange Fettsäurekette, die vollständig saturiert ist (Abbildung 9: D; (Choy, Bernin et al. 2017)).

Die zwei synthetischen *EhPI*-Analoge *GlcN-EhPIb* C30:1 cis und *EhGIPIb* C30:1 cis weisen beide eine cis-Doppelbindung der langen Fettsäurekette. Zudem wurde der Phosphatidyl-(D)-inositolring von *GlcN-EhPIb* C30:1 cis mit einem Glucosamin verknüpft, während *EhGIPIb* C30:1 cis mit einer Zuckerkette aus Galaktose, Mannose, Mannose und Glucosamin am Phosphatidyl-(D)-inositolring glykosyliert wurde (Abbildung 9: E, Abbildung 9: F; (Aiba, Suehara, Choy et al. 2017)).

Alle sechs *EhPI*-Analoge der zweiten Gruppe besitzen den *EhPIb*-Anker aus Phosphatidylinositolring und zwei kurzen (C16:0) Fettsäureketten. Der Phosphatidylinositolring des synthetischen *EhPI*-Analogons *EhPIb* C16:0 DR hat eine D-Konformation und ist an Position 1 über ein R-Glycerin mit der kurzen Fettsäurekette verbunden (Abbildung 9: G). *EhPIb* C16:0 DS weist ebenfalls einen Phosphatidyl-D-inositolring auf, der hingegen an Position 1 über ein S-Glycerin mit der kurzen Fettsäurekette verknüpft ist (Abbildung 9: H). Das Molekül *EhPIb* C16:0 LR besitzt einen Phosphatidylinositolring mit L-Konformation, der an Position 1 über ein R-Glycerin mit der kurzen Fettsäurekette gekoppelt ist (Abbildung 9: I). *EhPIb* C16:0 LS ist auch aus einem Phosphatidyl-L-inositolring aufgebaut, jedoch an Position 1 über ein S-Glycerin mit der kurzen Fettsäurekette verbunden (Abbildung 9: J).

Die beiden synthetischen *EhPI*-Analoge *EhPIb* C16:0 1,3 PdD und *EhPIb* C16:0 1,3 PdL sind beide an Position 1 mit einem 1,3-Propandiol mit der kurzen Fettsäurekette verknüpft (Abbildung 9: K, Abbildung 9: L). Der Phosphatidylinositolring von *EhPIb* C16:0 1,3 PdD weist jedoch eine D-Konformation auf, während *EhPIb* C16:0 1,3 PdL einen Phosphatidyl-L-inositolring besitzt.



**Abbildung 9: Chemische Struktur der synthetischen *EhPI*-Analoga.** Chemische Struktur der Moleküle aus Gruppe 1 (zur Verfügung gestellt von Prof. Yukari Fujimoto (Keio Universität, Yokohama, Japan) und Prof. Koichi Fukase (Universität Osaka, Osaka, Japan): *EhPIa* C30:1 cis (A), *EhPIb* C30:1 cis (B), *EhPIb* C30:1 trans (C), *EhPIb* C28:0 (D), GlcN-*EhPIb* C30:1 cis (E) und *EhGIPIb* C30:1 cis (F). Chemische Struktur der Moleküle aus Gruppe 2 zur Verfügung gestellt von Prof. Chris Meier (Universität Hamburg): *EhPIb* C16:0 DR (G), *EhPIb* C16:0 DS (H), *EhPIb* C16:0 LR (I), *EhPIb* C16:0 LS (J), *EhPIb* C16:0 1,3 PdD (K) und *EhPIb* C16:0 1,3 PdL (L).

## 1.5 Zielsetzung

Das Immunsystem in der Bekämpfung einer Infektion zu unterstützen stellt eine vielversprechende supportive Behandlungsstrategie dar. Ein möglicher Einsatz immunstimulatorischer Substanzen bietet sich beispielsweise in der spezifischen Aktivierung bestimmter Immunzellen. iNKT-Zellen eignen sich besonders gut für diese Aufgabe, da sie nach Aktivierung schnell große Mengen an Zytokinen freisetzen und damit in der Lage sind, die Immunantwort zu modulieren. Vorgegangene Untersuchungen zeigten, dass ein Lipopeptidphosphoglykan aus der Membran von *E. histolytica* (*EhLPPG*), über die Stimulation von Makrophagen zur Aktivierung von iNKT-Zellen führen kann.

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich daher mit den immunstimulatorischen Fähigkeiten von *EhLPPG* und davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoga, deren immuntherapeutischen Potential anschließend im Krankheitsbild der kutanen Leishmaniose und der Tuberkulose evaluiert werden sollte. Dazu wurden *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoga wie folgt untersucht:

1. Charakterisierung der immunstimulatorischen Eigenschaften von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga durch Analyse des induzierten Zytokinprofils muriner und humaner iNKT-Zellen
2. Evaluierung der Toxizität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga
3. Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen gegen die kutane Leishmaniose
  - A. Bestimmung der anti-Leishmanien Aktivität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in murinen und humanen *L. major*-infizierten Makrophagen
  - B. Evaluierung des induzierten Wirkmechanismus der anti-Leishmanien Aktivität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga
  - C. Bestimmung der anti-Leishmanien Aktivität von Liposomen-formulierten *EhPI*-Analoga in murinen und humanen *L. major*-infizierten Makrophagen
  - D. Bestimmung der anti-Leishmanien Aktivität von den synthetischen *EhPI*-Analoga in zwei *in vivo* *L. major*-Infektionsmodellen
4. Etablierung eines *in vitro* Infektionsmodell für die Krankheit Tuberkulose zur Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Angabe des Herstellers.

Chemikalie	Hersteller
Biocoll	Biochrom AG
Bovines Serum Albumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Diamond Vitamin Tween 80 Lösung	JRH Biosciences
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco by Life Technologies
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN Biotech
Ethanol	Merck Chemicals
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH
HPLC-Wasser	J.T. Baker
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	Sigma-Aldrich
Isove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Biochrom AG
MgCl <sub>2</sub>	Promega
Penicillin/Streptomycin	AppliChem
Percoll	GE Healthcare
Paramethoxyamphetamine (PMA)	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 versetzt mit 25 mM HEPES	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 (ohne L-Glutamin)	Gibco by Life Technologies
Eukitt	Carl Roth GmbH
Trypanblau 0,4 %	Gibco by Life Technologies

Chemikalie	Hersteller
Überstand transfizierter X63-mGM-CSF Hybridoma-Zellen, <i>beinhaltet Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)</i>	Abteilung Immunologie, BNITM
Überstand der Fibroblastenzelllinie L929, <i>beinhaltet Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)</i>	Arbeitsgruppe Clos, BNITM

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die am häufigsten gebrauchten Materialien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Verbrauchsmaterialien des alltäglichen Laborbedarfs wurden nicht separat aufgeführt.

**Tabelle 2:** Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24/96-Well Zellkultur-Platten	Greiner bio-one
CellCarrier Ultra, 96-Well	Perkin Elmer
Zellschaber (CellScraper)	Sarstedt
CellTrics (30 µm)	PARTEC SYSMEX
CellStrainer (70 µm, Nylon)	BD Biosciences
FACS-Röhrchen	Sarstedt
High-Binding 96-Well ELISA Mikrotiterplatte	Greiner bio-one
Kanüle (Größe 20)	B. Braun
Kryokonservierungsröhrchen	Carl Roth GmbH
Medium-Binding 96-Well ELISA Mikrotiterplatte	Greiner bio-one
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Zellkultur-Petrischale	Sarstedt
S-Monovette® und Multi-Adapter	Sarstedt
T175 Zellkulturflaschen, 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
T75 Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Venenpunktionsbesteck Venofix A 19G	B. Braun
Zirkonia-Kügelchen, 2 mm	Carl Roth GmbH

### 2.1.3 Reaktionskits

Die in dieser Arbeit verwendeten Reaktionskits sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Auflistung der verwendeten Reaktionskits mit Angabe des Herstellers.

Reaktionskit	Hersteller
Blocking Kit	Vector
DAB 2-Komponenten-Kit	DCS Innovative Diagnostik-Systeme
DNeasy-Blood and Tissue Kit (50)	QIAGEN
ELISA IFN $\gamma$ (murin)	R&D Systems
ELISA IL 4 (murin)	R&D Systems
InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit (50)	Stratec
KAPA PROBE FAST Universal	peqlab
LEGENDPlex™ (human)	BioLegend
LEGENDPlex™ (murin)	BioLegend
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN
Supervision 2	DCS Innovative Diagnostik-Systeme
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences
Vector M.O.M. Immunodetection Kit	Vector
ZombieUV™ Fixable Viability Kit	BioLegend

### 2.1.4 Enzyme

Enzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4:** Auflistung der verwendeten Enzyme mit Angabe des Herstellers.

Enzym	Hersteller
Accutase	PAN Biotech
Protease Inhibitor Tablets, „SigmaFast“	Sigma-Aldrich

### 2.1.5 Antikörper

Die folgenden humanen und murinen Antikörper wurden in durchflusszytometrischen Analysen für Immunfluoreszenzfärbungen und für immunhistologische Färbungen eingesetzt (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Auflistung der eingesetzten Antikörper mit Verwendung und Herstellern.

Antikörper	Klon	Konjugat	Verwendung	Hersteller
anti-human CD11c	3.9	BV421	FACS	BioLegend
anti-human CD14	M5E2	AlexaFlour700	FACS	BioLegend
anti-human CD16	3G8	APC-Cy7	FACS	BioLegend
anti-Maus HSP90	-	-	IF & Immunhistologie	BNITM
anti Ziege IgG	-	AlexaFlour647	IF	Invitrogen
anti-Maus Arg1	-	-	Immunhistologie	BD Biosciences
anti-Maus 7/4	-	-	Immunhistologie	Cedarline
anti-Maus Ig-HRP	-	-	Immunhistologie	Deko
anti-Maus CD11b	-	-	Immunhistologie	Abcam
anti-Maus iNOS	-	-	Immunhistologie	Abcam

### 2.1.6 DNA-Primer

Die folgenden Primer wurden in einer quantitativen real-time PCR (qPCR) in Kombination mit humanen sowie murinen TaqMan Sonden (Tabelle 7) bzw. mit SYBR Green® (Tabelle 6) verwendet. Die Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Für die Benutzung wurden die Primer nach Herstellerangaben in TE-Puffer (Stammlösung: 100 pmol/µl) gelöst.

**Tabelle 6:** Auflistung der verwendeten Primer und deren Sequenz für die qPCR in Kombination mit SYBR Green®.

Primer	Sequenz (5' - 3')
mIL1β ( <i>fwd</i> )	GGAGAACCAAGCAACGACAAAATA
mIL1β ( <i>rev</i> )	TGGGGAACCTCTGCAGACTCAAAC
mIL4 ( <i>fwd</i> )	CCAAGGTGCTTCGCATATTT
mIL4 ( <i>rev</i> )	ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT
mIL10 ( <i>fwd</i> )	CCAAGCCTTATCGGAAATGA
mIL10 ( <i>rev</i> )	TCTCACCCAGGGAATTCAA
mIL12p35 ( <i>fwd</i> )	AGGTGGCACAGCTACCTCAG
mIL12p35 ( <i>rev</i> )	GACGTCTTCGCCCTTAAC

Primer	Sequenz (5' - 3')
mIL13 ( <i>fwd</i> )	ATCTACAGGACCCAGAGGATATTG
mIL13 ( <i>rev</i> )	CTGATGTGAGAAAGGAAAATGAGTCC
mARG1 ( <i>fwd</i> )	AACACTCCCCTGACAACCAG
mARG1 ( <i>rev</i> )	CCAGCAGGTAGCTGAAGGTC
mIFN $\gamma$ ( <i>fwd</i> )	GATGCATTCATGAGTATTGCCAAGT
mIFN $\gamma$ ( <i>rev</i> )	GTGGACCACTCGGATGAGCTC
miNOS ( <i>fwd</i> )	TGGTGGTGACAAGCACATTT
miNOS ( <i>rev</i> )	AAGGCCAAACACAGCATAACC
mTNF $\alpha$ ( <i>fwd</i> )	AGTTCCCAAATGGCCTCCCTCTCA
mTNF $\alpha$ ( <i>rev</i> )	GTGGTTTGCTACGACGTGGGCT
mTGF $\beta$ ( <i>fwd</i> )	TGGAGCAACATGTGGAACTC
mTGF $\beta$ ( <i>rev</i> )	CGTCAAAGACAGCCACTCA

**Tabelle 7:** Auflistung der verwendeten Primer und deren Sequenz für die qPCR in Kombination mit TaqMan Sonden.

Primer und Sonden	Sequenz (5' - 3')
Primer <i>L. Aktin</i> ( <i>fwd</i> )	CAGAACCGTGAGAAGATG
Primer <i>L. Aktin</i> ( <i>rev</i> )	ACAGCCTGAATACCAATG
Sonde <i>L. Aktin</i>	FAM-ATTCAATGTGCCGTCGCTGT-BHQ-1
Primer HumanAktin ( <i>fwd</i> )	CCCATCTACGAGGGGTATG
Primer HumanAktin ( <i>rev</i> )	TCGGTGAGGATCTTCATG
Sonde HumanAktin	Cy5-CCTGGCTGGCCGGGACCTGAC-BHQ-3
Primer MausAktin ( <i>fwd</i> )	CTGGAGAAGAGCTATGAG
Primer MausAktin ( <i>rev</i> )	CTTACCCAAGAAGGAAGGCTG
Sonde MausAktin	Cy5-CATCACTATTGGCAACGAGCGG-BHQ-3

### 2.1.7 Zellkulturmedium und Zusätze

Folgende Zellkulturmedien und Zusätze wurden verwendet:

#### Einfriermedium:

FCS + 10 % DMSO

**Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM):**

56,5 % DMEM (high Glucose)                      DMEM<sup>++</sup>: enthält 1 % Penicillin/Streptomycin  
10 % FCS    DMEM<sup>+</sup>: ohne Penicillin/Streptomycin  
5 % Pferdeserum  
30 % Überstand von L929-Zellen  
1 % L-Glutamin (2 mM)  
1 % Penicillin/Streptomycin  
1 % Natriumpyruvat  
0,5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (100  $\mu$ M, aus 1 M Stocklösung)

**Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM<sup>+</sup>):**

55 % IMDM (ohne Glutamin)  
10 % inaktiviertes FCS (30 min, 56°C)  
5 % Pferdeserum (optional)  
30 % Überstand von L929-Zellen  
20  $\mu$ g/ml Gentamycin

**Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium für humane Zellen (THP1-RPMI<sup>+</sup>):**

88 % RPMI-1640 mit 25 mM HEPES  
10 % FCS  
1 % L-Glutamin  
1 % Penicillin/Streptomycin

**Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium für murine Zellen (RPMI<sup>+</sup>):**

87,5 % RPMI 1640  
10 % FCS  
1 % L-Glutamin  
1 % Natriumpyruvat  
0,5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Stock: 100 ml 0,9 % NaCl + 70  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol)  
50  $\mu$ g/ml Gentamycin

**X-VIVO<sup>TM</sup> 15-Medium:**

X-VIVO<sup>TM</sup> 15-Medium + 1 % Penicillin/Streptomycin

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die Versuche dieser Doktorarbeit angesetzt und verwendet.

**ELISA-Substratpuffer:**

0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,5

**ELISA-Tetramethylbenzidin**

**(TMB)-Stammlösung:**

DMSO, 25 mM TMB

**ELISA-Substratlösung:**

98,35 % ELISA-Substratpuffer

1,64 % ELISA-TMB-Stammlösung

0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)

**PBS + 1 % BSA:**

1 % BSA in PBS, steril filtrieren

Lagerung bei -20°C

**TBS (1x) für Immunhistologie:**

43,9 g NaCl (150 mM)

30,3 g Tris (50 mM)

auf 5 L mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen , pH 7,4

**PBS (1x):**

2,7 mM KCl

1,5 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

137 mM NaCl

**Permeabilisierungspuffer für**

**Immunfluoreszenz (IF):**

50 mM NH<sub>4</sub>Cl

0,1 % Triton-X-100

in 1x PBS, pH 7,0

**Waschpuffer für IF:**

0,1 % Triton-X-100

in 1x PBS, pH 7,0

**Blockierungspuffer für IF:**

2 % BSA

0,1 % Triton-X-100

in 1x PBS, pH 7,0

**Citratpuffer für Immunhistologie:**

4,2 g Citronensäuremonohydrat

auf 2 L mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH 6,0

**Waschpuffer für Immunhistologie:**

41 g NaCl

6 g Tris

auf 5 L mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH 7,4

**EDTA-Puffer für Immunhistologie:**

16,4 g NaCl

2,4 g Tris

auf 2 L mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH 7,4

### 2.1.9 Stimulanzen

Die Stimulanzen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 8 aufgeführt.  $\alpha$ Galactosylceramid ( $\alpha$ GalCer) und die synthetischen *Eh*PI-Analoga wurden in DMSO gelöst, während *Eh*LPPG in LPS-freiem Wasser eluiert wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Vor der Verwendung wurden die Stimulanzen für 10 min bei RT im Ultraschallbad sonifiziert.

**Tabelle 8:** Auflistung der verwendeten Stimulanzen, deren Stammkonzentration und Hersteller.

Stimulanz	Konzentration	Hersteller
Maus anti-human CD28 unkonjugiert	0,5 mg/ml	BD Biosciences
PMA	0,5 mg/ml	Sigma-Aldrich
$\alpha$ GalCer	1 mg/ml	Enzo Life Sciences
<i>Eh</i> LPPG Pool aus den Chargen 11 - 14	1 mg/ml	BNITM
<i>Eh</i> PIa C30:1 cis <i>Eh</i> PIb C30:1 cis <i>Eh</i> PIb C30:1 trans <i>Eh</i> PIb C28:0 GlcN- <i>Eh</i> PIb C30:1 cis <i>Eh</i> GIPIb C30:1 cis	1 mg/ml	Prof. Yukari Fujimoto, Keio University, Japan Prof. Koichi Fukase, Universität Osaka, Japan
<i>Eh</i> PIb C16:0 DR <i>Eh</i> PIb C16:0 DS <i>Eh</i> PIb C16:0 LR <i>Eh</i> PIb C16:0 LS <i>Eh</i> PIb C16:0 1,3 PdD <i>Eh</i> PIb C16:0 1,3 PdL	1 mg/ml	Prof. Chris Meier (F. Ting und D. Landschulze) Fachbereich Chemie, Universität Hamburg

### 2.1.10 Liposomen

Es wurden zwei Arten von Liposomen in dieser Arbeit verwendet. Die Liposomen der ersten Art wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Andrä (Hochschule für Angewandte Wissenschaft (HAW), Hamburg) synthetisiert (Tabelle 9), während die zweite Art von Liposomen von Sara Menina unter der Leitung von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr (HIPS, Saarland) hergestellt wurden (Tabelle 10). Die Liposomen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung der Liposomenbestandteile und ihrer Größe (2.3.7).

**Tabelle 9:** Auflistung der verwendeten Liposomen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW, Hamburg).

Liposomen	<i>EhPIa C30:1 cis</i> und Rh-DHPE Konzentration
leere Liposomen	-
leere Liposomen + 1 % Rh-DHPE	≅ 10 µg Rh-DHPE in 1 mg/ml Liposomen
1 % <i>EhPIa C30:1 cis</i> -Liposomen	≅ 10 µg <i>EhPIa C30:1 cis</i> in 1 mg/ml Liposomen
10 % <i>EhPIa C30:1 cis</i> -Liposomen	≅ 100 µg <i>EhPIa C30:1 cis</i> in 1 mg/ml Liposomen
1 % <i>EhPIa C30:1 cis</i> -Liposomen + 1 % Rh-DHPE Liposomen	≅ 100 µg <i>EhPIa C30:1 cis</i> in 1 mg/ml Liposomen + 10 µg Rh-DHPE in 1 mg/ml Liposomen

**Tabelle 10:** Auflistung der verwendeten Liposomen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr (HIPS, Saarland).

Liposomen	Konzentration
leere Liposomen	10,42 mM Liposomen
<i>EhPIa C30:1 cis</i> -Liposomen	63,2 µg/ml <i>EhPIa C30:1 cis</i> in 8,89 mM Liposomen
<i>EhPIb C30:1 cis</i> -Liposomen	21,1 µg/ml <i>EhPIb C30:1 cis</i> in 8,2 mM Liposomen
<i>EhPIb C16:0 DR</i> -Liposomen	61,1 µg/ml <i>EhPIb C16:0 DR</i> 10,4 mM Liposomen

### 2.1.11 Geräte und Software

Geräte des täglichen Laborbedarfs wurden nicht separat aufgeführt (Tabelle 11, Tabelle 12).

**Tabelle 11:** Auflistung der verwendeten Geräte mit Modelltyp und Herstellerangabe.

Gerät	Modell	Hersteller
ELISA-Reader	MRXII	Dynex Technologies
FACS	LSR II	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	Evos FL Auto	Life Technologies
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000	Keyence
Konfokales Mikroskop	Opera Phenix	Perkin Elmer
Mikroskop	Evos XL	Life Technologies
Real-time PCR Cycler	Rotor-Gene RG-3000	Corbett Life Science
Tissue Lyser	Tissue Lyser LT	QIAGEN
Ultraschallbad	Sonorex Super DIGITAL	Bandelin
Zentrifuge	5810R	Eppendorf

**Tabelle 12:** Auflistung der verwendeten Software mit Herstellerangabe.

Software	Hersteller
Fiji Is Just Image J (Fiji)	Freeware
FlowJo 7.6.3	Treestar
Harmony Software	Perkin Elmer
LEGENDplex™ Software	BioLegend
Rotor-Gene Q Software	Corbett Life Science
PRISM®7 for Mac OSX	GraphPad Software Inc.

## 2.1.12 Modelorganismen und Zelllinien

### 2.1.12.1 *Entamoeba histolytica*

Das in dieser Arbeit verwendete Lipopeptidphosphoglykan (*Eh*LPPG) wurde aus dem virulenten Klon B2 der *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*, SCHAUDINN, 1903)-Zelllinie B isoliert (Biller, Schmidt et al. 2009). Die Zelllinie B wurde aus dem ursprünglichen Kulturoisolat HM-1:IMSS (American Type Culture Collection (ATCC), Katalog-Nummer 30459) generiert.

### 2.1.12.2 *Leishmania major*

Für die *in vitro*- und *in vivo*-Infektionen wurden Parasiten des *Leishmania major* (*L. major*)-Stamms 5ASKH (MHOM/TM/1973/5ASKH, passagiert in der Balb/c-Maus oder in der C57BL/6-Maus) verwendet, die von der Arbeitsgruppe Clos (BNITM) bzw. Rafael de Freitas e Silva, PhD, der Arbeitsgruppe Protozoen-Immunologie zur Verfügung gestellt wurden.

### 2.1.12.3 Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse der Art *Mus musculus* (LINNAEUS, 1758) verwendet, die aus der Hauszucht des BNITMs stammen. Es wurden 8-12 Wochen alte Weibchen der Mausstämme Balb/c und C57BL/6 eingesetzt. Die Tierversuche wurden von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg nach §8 des Tierschutzgesetzes Deutschland genehmigt (134/15, 54/17).

#### **2.1.12.4 THP1-Zelllinie**

Die humane Monozyten-Zelllinie THP1 (American Type Culture Collection (ATCC), Katalognummer TIB-202) wurde ehemals aus einem Patientenisolat mit akuter Monozytenleukämie generiert. Für diese Arbeit wurden THP1-Monozyten mittels PMA zu Makrophagen differenziert und *in vitro* mit Leishmanien infiziert.

#### **2.1.12.5 *Mykobacterium tuberculosis***

Für die *in vitro*-Infektionen wurden Bakterien des *Mykobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)-Stamms des Typs H37Rv (ATCC 27294) verwendet, die vom Forschungszentrum Borstel (Arbeitsgruppe von Dr. Christoph Hölscher) zur Verfügung gestellt wurden.

### **2.2. Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1 Kultivierung der THP1-Zellen**

Die THP1-Zellen wurden in 75- bzw. 175 ml-Zellkulturflaschen mit THP1-RPMI<sup>+</sup>-Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 5 - 8 Tage wurden die Suspensionszellen passagiert, wofür sie bei 300 x g, 4°C, 8 min abzentrifugiert wurden und das Pellet in 1 - 5 ml warmem Medium resuspendiert wurde. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt (siehe 2.2.3) und die gewünschte Zellzahl in Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt. Die Zelldichte sollte in 75 ml-Zellkulturflaschen bei 2x10<sup>6</sup> Zellen/Flasche und in 175 ml-Zellkulturflaschen bei 2x10<sup>7</sup> Zellen/Flasche liegen.

#### **2.2.2 Kultivierung von *E. histolytica***

Die Kultivierung des *E. histolytica*-Klons B2 erfolgte in komplettiertem TY-I-SS Medium (Diamond, Harlow et al. 1978) in 75 ml- bzw. 300 ml-Kulturflaschen bei 37°C unter axenischen, mikroaerophilen Bedingungen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden alle 2 - 3 Tage passagiert und die gewünschte Zellzahl in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt. Für die Isolierung des Lipopeptidphosphoglykans (*EhLPPG*) wurde die benötigte Anzahl an *E. histolytica* vom Klon B2 von Dr. Jenny Matthiesen zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung

Um eine definierte Zellkonzentration in *in vitro*-Versuchen und in der Zellkultur einzustellen, wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurde ein Anteil der Zellsuspension im Verhältnis von 1:50 bis 1:100 mit Trypanblau verdünnt und 10 µl dieser verdünnten Färbelösung auf die Zählkammer aufgetragen. Insgesamt wurden vier Großquadrate ausgezählt und das Ergebnis in folgende Formel zur Ermittlung der Zellzahl pro Milliliter eingetragen:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Gesamtzellzahl der ausgezählten Großquadrate}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

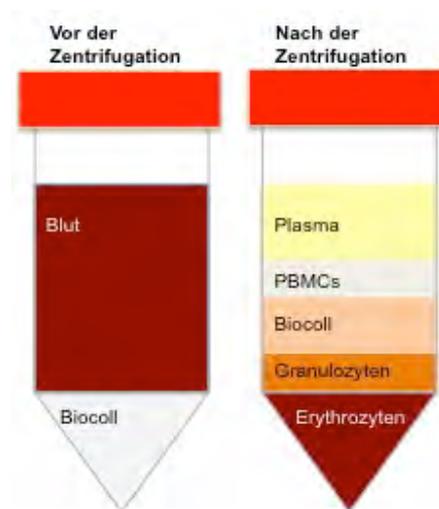
Durch die Verwendung des Trypanblau-Farbstoffs ist eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich. Der Farbstoff gelangt durch die rupturierte Zellmembran ausschließlich in bereits abgestorbenen Zellen, die aufgrund dessen bläulich gefärbt werden. Lebende Zellen nehmen keinen Farbstoff auf und haben ein transparentes Erscheinungsbild. Für die Zellzahlbestimmung wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt.

### 2.2.4 Isolierung von Leukozyten aus eukaryotischem Gewebe und Spenderblut

#### 2.2.4.1 Isolierung von Leukozyten aus humanem Spenderblut

Die humanen Leukozyten (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden aus frischem Spenderblut, abgenommen in Heparin-Blutentnahmeröhrchen, aufgereinigt. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Unter sterilen Bedingungen wurden jeweils 15 ml Blut mit 15 ml DPBS bei Raumtemperatur (RT) in einem 50 ml-Röhrchen vermengt. Im Anschluss wurden 15 ml vorgelegtes Biocoll in einem weiteren 50 ml-Röhrchen mit diesem 30 ml Blut/DPBS-Gemisch überschichtet und bei 450 x g, RT für 30 min ohne Bremse zentrifugiert, wodurch eine optimale Auftrennung der Zellen mittels Dichtegradienten erreicht wurde (Abbildung 10). Die obere, gelbliche Plasmaphase wurde bis auf 1 - 2 cm oberhalb der Interphase abgenommen und verworfen. Danach wurde die trübe Leukozyten- und Thrombozyten-haltige Interphase (PBMCs) vollständig (ca. 15 ml) abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt, wobei jeweils zwei Fraktionen zusammengeführt und mit kaltem DPBS auf 50 ml aufgefüllt wurden. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 300 x g, 4°C für 20 min mit Bremse. Der Überstand wurde dekantiert. Danach wurden die verbliebenden

Thrombozyten durch eine waagerechte Haltung des 50 ml-Röhrchens entfernt und verworfen. Die Leukozyten-Pellets wurden jeweils in 1 ml DPBS resuspendiert, in einem 50 ml-Röhrchen zusammengeführt, mit weiteren 20 ml DPBS vermischt und bei 300 x g, 4°C für 12 min gewaschen. Der Überstand wurde erneut dekantiert, die restlichen Thrombozyten abgenommen und das Zellpellet in 1 ml X-VIVO™ 15-Medium resuspendiert. Die isolierten humanen Leukozyten wurden anschließend für die *in vitro*-Stimulationsassays verwendet (siehe 2.2.7.1).



**Abbildung 10: Biocoll Gradient humaner Blutproben nach der Zentrifugation.** Von oben nach unten: Plasmaphase, PBMCs-Schicht, Biocoll-Schicht, Granulozyten-Schicht, Erythrozyten-Schicht. (Eigene Darstellung)

#### 2.2.4.2 Isolierung von Leukozyten aus murinem Knochenmark

Für die Isolierung von Leukozyten aus murinem Knochenmark wurden Tibia und Femur frei präpariert. Zur Desinfektion wurden die Knochen für 2 min in 70-prozentigem Isopropanol eingelegt. Die Enden der Knochen wurden anschließend mit einer sterilen Schere abgesetzt und die Knochenmarkszellen mit einer Kanüle mit ca. 10 ml IMDM<sup>+</sup>-Medium herausgespült. Zur Sedimentation von Knochenbestandteilen wurde die Zellsuspension in 15 ml-Röhrchen überführt und für 5 - 10 min auf Eis stengelassen. Der Überstand, der in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt wurde, wurde bei 300 x g, 4°C für 8 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml IMDM<sup>+</sup>-Medium aufgenommen und zur Reinigung auf einen bereits mit 1 ml-Medium benetzten Filter gegeben. Der Filter wurde abschließend mit ca. 5 ml Medium nachgespült. Die Zellsuspension wurde erneut wie zuvor zentrifugiert und das Pellet in 2 - 3 ml IMDM<sup>+</sup>-Medium aufgenommen. Die isolierten Leukozyten wurden zur Herstellung von dendritischen Zellen oder Knochenmarksmakrophagen (siehe 2.2.6) verwendet.

### **2.2.4.3 Isolierung von Leukozyten aus murinem Lebergewebe**

Für den murinen Zellzytokinexpressionsasssay (siehe 2.2.7.2) wurden Leukozyten aus murinem Lebergewebe isoliert. Zunächst wurde die Leber eines C57BL/6-Weibchens freipräpariert und *in vivo* perfundiert, um eine möglichst Erythrozyten-freie Leber zu erhalten. Die entnommene Leber wurde dann auf einen 70 µm Falcon-Sieb gegeben, das Gewebe zerrieben und mit 10 ml kaltem DPBS nachgespült. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g, 4°C für 8 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml 80-prozentiger Percoll™-Lösung (5 ml 100 % Percoll™ [1 Teil Percoll™ + 1 Teil 10x PBS] + 1,25 ml RPMI<sup>+</sup>-Medium, RT) resuspendiert und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Suspension aus 80-prozentigem Percoll™ und Zellen vorsichtig mit 5 ml 40-prozentiger Percoll™-Lösung (2,5 ml 100 % Percoll™ + 3,75 ml RPMI<sup>+</sup>-Medium) überschichtet, wodurch ein Gradient entsteht, welcher bei 800 x g, 21°C für 25 min ohne Bremse zentrifugiert wurde.

Nach der Zentrifugation wurde die obere gelb-braune Schicht zügig abgenommen und verworfen. Der Lymphozytenring an der Grenzschicht zwischen Medium und Percoll™ wurde abgenommen und in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt, das mit kaltem PBS auf 10 ml aufgefüllt wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend erneut bei 300 x g, 4°C für 8 min gewaschen. Zuletzt wurde das Zellpellet resuspendiert und die Zellen im Zellzytokinexpressionsasssay eingesetzt.

### **2.2.4.4 Isolierung von Leukozyten aus murinem Milzgewebe**

Die murinen Leukozyten aus der Milz wurden für den murinen iNKT-Zellzytokinexpressionsasssay (siehe 2.2.7.2) isoliert. Die Milz wurde einer weiblichen C57BL/6-Maus entnommen und in kaltem RPMI<sup>+</sup>-Medium bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Danach wurde die Milz mit Hilfe einer Kanüle und Spritze solange mit RPMI<sup>+</sup>-Medium durchspült, bis diese eine helle, transparente Färbung annahm. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei 300 x g, 4°C für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml warmem RPMI<sup>+</sup>-Medium resuspendiert und für den Zellzytokinexpressionsasssay weiterverwendet.

### **2.2.5 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen**

Um eukaryotische Zellen langfristig bei -80°C zu lagern, wurden die Zellen zunächst bei 300 x g, 4°C für 8 min zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet in einem 1 ml Gemisch bestehend aus 500 µl FCS und 500 µl FCS/20 % DMSO resuspendiert und in ein

Kryoröhrchen überführt. Mit Hilfe eines Mr. Frosty™ Freezing Containers wurde die Zellsuspension anschließend in Schritten von jeweils einem Grad pro Minute stufenweise auf -80°C heruntergekühlt und eingefroren. Das DMSO fungiert während des Einfrierprozesses als Gefrierschutzmittel und verhindert die Bildung von Eiskristallen in den Zellen.

Um die gefrorenen Zellen in einem Versuch zu verwenden, wurden diese zuerst in der Hand angetaut und dann die gelöste Zellsuspension zügig in 10 ml RPMI<sup>+</sup>-Medium aufgenommen.

Die Zellen wurden anschließend bei 300 x g, 4°C für 8 min zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch ein weiteres Mal durchgeführt, um verbliebene DMSO-Reste zu entfernen.

### **2.2.6 Gewinnung dendritischer Zellen und Makrophagen aus murinem Knochenmark**

Für die Gewinnung dendritischer Zellen (DCs) und Makrophagen aus murinem Knochenmark wurden zunächst Leukozyten, wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, isoliert.

Um DCs zu generieren, wurden ca.  $4 \times 10^6$  Knochenmarkszellen zusammen mit 10 ml RPMI<sup>+</sup>-Medium und 1 ml GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) in einer Zellkulturschale für insgesamt sieben Tage bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das verwendete GM-CSF wurde aus dem Zellüberstand der Hybridoma-Zelllinie X63-mGM-CSF gewonnen. Nach drei Tagen Inkubation wurden 10 ml frisches RPMI<sup>+</sup>-Medium und 1 ml GM-CSF zu den Zellen hinzugegeben. Am Tag sechs der Kultivierung wurden 10 ml des Mediums vorsichtig abgenommen und durch 10 ml frisches RPMI<sup>+</sup>-Medium, versetzt mit weiterem 1 ml GM-CSF, ersetzt. Nach insgesamt sieben Tagen Kultivierung konnten die Zellen entweder in *in vitro*-Stimulationsversuchen (siehe 2.2.7.2) eingesetzt werden oder wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (siehe 2.2.5).

Für die Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow derived macrophages - BMDMs*) wurden  $2 \times 10^6$  aus dem Knochenmark isolierte Leukozyten (siehe 2.2.4.2) verwendet. Diese wurden in 10 ml warmem IMDM<sup>+</sup>-Medium aufgenommen und für zehn Tage in einer Zellkulturschale bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das im Medium enthaltene M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) wird von der Fibroblasten-Zelllinie L929 produziert und in den Überstand sezerniert. Es bewirkt insbesondere, dass hämatopoetische Stammzellen sich zu mononukleäre Phagozyten, wie beispielsweise BMDMs, ausdifferenzieren. Am Tag drei der Kultivierung wurden 5 ml frisches IMDM<sup>+</sup>-Medium und am Tag sechs und neun jeweils 2 ml frisches IMDM<sup>+</sup>-Medium in die Zellkulturschale hinzugegeben. Nach zehn Tagen wurden die ausdifferenzierten BMDMs mit einem sterilen Zellkratzer abgelöst und die Zellsuspension bei 300 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Die

ausdifferenzierten BMDMs wurden für die *in vitro*-Infektionsassays mit *Leishmania major* (siehe 2.2.8.1) eingesetzt.

## 2.2.7 *in vitro*-Stimulationsassays

### 2.2.7.1 Humaner Zellzytokinexpressionsassay

Um die Sekretion verschiedener Zytokine humaner iNKT-Zellen nach Stimulation mit *EhLPPG* und davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoge zu bestimmen, wurde ein leicht modifizierter Zellzytokinexpressionsassay nach Sandberg, Bhardwaj et al. (2003) durchgeführt. Nach der Isolierung humaner Leukozyten (PBMCs) aus Vollblut (siehe 2.2.4.1) wurden  $1 \times 10^6$  PBMCs/Well in 100  $\mu$ l X-VIVO™ 15-Medium in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die humanen PBMCs wurden mit 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ GalCer, 10  $\mu$ g/ml *EhLPPG* oder 0,1 - 5  $\mu$ g/ml synthetischen *EhPI*-Analoge in je 100  $\mu$ l X-VIVO™ 15-Medium stimuliert. Jedes Stimulans wurde in einem Ansatz mit vier Replikaten getestet.

Um eine optimale Stimulation der iNKT-Zellen zu erzielen und keine weiteren antigenpräsentierende Zellen hinzugeben, wurden die Ansätze mit je 3  $\mu$ g/ml anti-CD28 Ko-Stimulans versetzt. Als Kontrolle dienten die X-VIVO™ 15-Medium-Ansätze, zu denen ebenfalls 3  $\mu$ g/ml anti-CD28 Ko-Stimulanz hinzugegeben wurde. Die stimulierten PBMCs wurden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden (Std) inkubiert, um die Zytokinproduktion anzuregen. Der Überstand wurde abgenommen und im LEGENDplex™ (siehe 2.3.2) zur Bestimmung des Zytokinprofils verwendet.

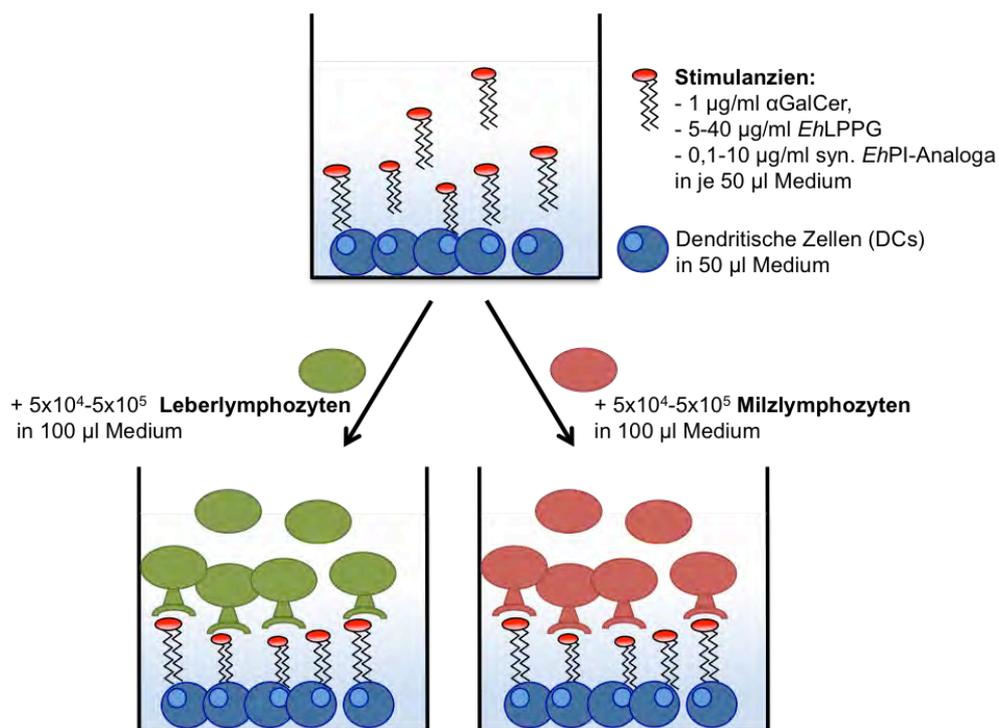
### 2.2.7.2 Muriner Zellzytokinexpressionsassay

Zur Untersuchung des Zytokinprofils muriner Immunzellen nach Stimulation mit *EhLPPG* und davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoge wurde ein muriner Zellzytokinexpressionsassay durchgeführt. In diesem Assay wurden zunächst antigenpräsentierende DCs zusammen mit den oben genannten Stimulanzen inkubiert. Anschließend wurden entweder Leber- oder Milzlymphozyten zu den Zellen hinzugegeben.

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, wurden zu Beginn des Assays  $5 \times 10^4$  DCs in 50  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>-Medium/Well in Duplikaten oder Triplikaten in einer sterilen 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Für die Stimulation wurden 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ GalCer, 20  $\mu$ g/ml *EhLPPG* oder 0,1 - 10  $\mu$ g/ml der synthetischen *EhPI*-Analoge in je 50  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>-Medium für 3 Std bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> zu den jeweiligen Ansätzen hinzugegeben. Um die bestmögliche Wirkung zu erzielen, wurden die Stimulanzen vor ihrer Verwendung 10 min im Wasserbad bei 37°C sonifiziert, was zu einer Vereinzelung der Moleküle und zur Freilegung der

Molekülfettsäureketten führte. DMSO-versetztes Medium wurde als Negativkontrolle eingesetzt, da sowohl das  $\alpha$ GalCer als auch die synthetischen *Eh*PI-Analoga in DMSO gelöst wurden.

Nach einer dreistündigen Inkubationszeit wurden verschiedene Zellzahlen muriner Lymphozyten (siehe 2.2.4.3, 2.2.4.4) in je 100  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>-Medium zu den Ansätzen gegeben. Der Assay wurde bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> für weitere 24 bis 72 Std inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (24 Std, 48 Std, 72 Std) wurden vorsichtig jeweils 60  $\mu$ l Überstand abgenommen und bis zur Verwendung im IFN  $\gamma$ - und IL 4-ELISA (siehe 2.3.1) oder im LEGENDplex™ (siehe 2.3.2) bei -20°C eingefroren.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des murinen Zellzytokinexpressionsassays.** Für den Zellzytokinexpressionsassay wurden  $5 \times 10^4$  DCs in 50  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>-Medium/Well ausgesät und mit 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ GalCer, 20  $\mu$ g/ml *Eh*LPPG oder 0,1 - 10  $\mu$ g/ml der synthetischen *Eh*PI-Analoga in 50  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>-Medium/Well bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> für 3 Std. stimuliert. Anschließend wurden  $5 \times 10^4$  -  $5 \times 10^5$  Leber- oder Milzlymphozyten hinzugegen und für 24 - 72 Std kokultiviert.

### 2.2.7.2.1 Muriner Zellzytokinexpressionsassay mit Leberlymphozyten

Zur Durchführung des murinen Zellzytokinexpressionsassays mit Leberlymphozyten wurden, wie in Abschnitt 2.2.7.2 beschrieben, zunächst DCs mit den unterschiedlichen Molekülen stimuliert. Nachfolgend wurden  $5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^5$  Leberlymphozyten in 100  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>-Medium zu den zuvor stimulierten DCs hinzugegeben, die vorher wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben, isoliert wurden.

### **2.2.7.2.2 Muriner Zellzytokinexpressionsassay mit Milzlymphozyten**

Zur Durchführung des Zellzytokinexpressionsassay mit Milzlymphozyten wurden, wie in Abschnitt 2.2.7.2 beschrieben, zunächst DCs mit den unterschiedlichen Molekülen stimuliert. Nachfolgend wurden  $5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^5$  Milzlymphozyten in 100  $\mu\text{l}$  RPMI<sup>+</sup>-Medium zu den jeweiligen Ansätzen hinzugegeben, die zuvor wie in Abschnitt 2.2.4.4 beschrieben, isoliert wurden.

### **2.2.8 In vitro-Test zur Bestimmung der anti-Leishmanien Aktivität von EhLPPG und den synthetischen EhPI-Analoga**

Um den Einfluss von EhLPPG sowie der synthetischen EhPI-Analoga auf den Erreger der kutanen Leishmaniose *Leishmania major* (*L. major*) zu untersuchen, wurden murine Knochenmarksmakrophagen bzw. humane THP1-Makrophagen mit metazyklischen Leishmanien-Promastigoten infiziert. Dr. Eugenia Bifeld (Arbeitsgruppe PD Joachim Clos, BNITM) stellte die Leishmanien zur Verfügung und führte auch die Infektionen durchgeführt.

#### **2.2.8.1 Infektion von murinen Knochenmarksmakrophagen (BMDM) mit *L. major***

Für die Untersuchung der anti-Leishmanien Aktivität der Moleküle EhLPPG und den davon abgeleiteten synthetischen EhPI-Analoga wurden die murinen Knochenmarksmakrophagen wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben hergestellt und abgelöst.

Für die Analyse der anti-Leishmanien Aktivität von EhLPPG und den synthetischen EhPI-Analoga mittels quantitativer *real-time* PCR mit TaqMan Sonden:

In eine 24-Well-Platte wurden  $1,5 \times 10^6$  ausdifferenzierte BMDMs pro Well wurden ausgesät und zum Adhären der Zellen für 72 Std bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Infektion wurden die Zellen zwei Mal mit warmem DPBS gewaschen, um nicht adhären Zellen zu entfernen. Die Infektion erfolgte mit  $7,5 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten, was einem Infektionsverhältnis von 1:5 entspricht. Nach vierstündiger Inkubation wurden die BMDMs drei Mal mit warmem DPBS gewaschen, wodurch noch freie Leishmanien entfernt wurden. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit 4  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{GalCer}$ , 2 - 8  $\mu\text{g/ml}$  EhLPPG oder 0,1 - 10  $\mu\text{g/ml}$  synthetischen EhPI-Analoga (siehe 2.1.8) in einem Milliliter IMDM<sup>+</sup>-Medium ohne M-CSF behandelt und für 48 Std bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle dienten infizierte BMDMs, die nicht behandelt wurden.

In Vorbereitung auf die Ernte wurden die Zellen zwei Mal mit warmem DPBS gewaschen und nachfolgend mit 150  $\mu\text{l}$  Accutase für 10 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von einem

Milliliter IMDM<sup>+</sup>-Medium wurde die Accutase-Reaktion gestoppt und die Zellen mit Hilfe eines Zellkratzers vom Plattenboden gelöst. Zuletzt wurde die Zellsuspension in 1,5 ml-Reaktionsröhrchen überführt und bis zur Aufreinigung der genomischen DNA (gDNA, siehe 2.4.1) und zur Bestimmung der Parasitenlast mittels TaqMan Sonden-qPCR (siehe 2.4.5.1) bei -20°C gelagert.

Für die Analyse der anti-Leishmanien-Aktivität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga mittels Konfokalmikroskop Opera Phenix™:

In eine 96-Well-Platte wurden  $6 \times 10^4$  ausdifferenzierte BMDMs pro Well (CellCarrier Ultra, Perkin Elmer) ausgesät und zum Adhärenieren der Zellen für 72 Std bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden vor der Infektion zwei Mal mit warmem DPBS gewaschen, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Die Infektion erfolgte mit  $4,8 \times 10^5$  metazytischen *L. major*-Promastigoten, was einem Infektionsverhältnis von 1:8 entspricht. Nach vierstündiger Inkubation wurden die BMDMs drei Mal mit warmem DPBS gewaschen, wodurch noch freie Leishmanien entfernt wurden. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit Liposomen, in denen *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis oder *EhPIb* C16:0 DR (im Verhältnis 1:10 - 1:80, siehe 2.1.10) integriert wurden, in 200 ml IMDM<sup>+</sup>-Medium ohne M-CSF behandelt und für 24 Std bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle dienten infizierte BMDMs, die nicht behandelt wurden und nur mit DMSO behandelte Makrophagen.

Nach 24-stündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und für den LEGENDplex™ (siehe 2.3.2) bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden zwei Mal mit 100 µl warmem DPBS gewaschen und anschließend mit 100 µl 4 % PFA für 20 min bei RT fixiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit DPBS, bevor 200 µl DPBS zu den Ansätzen gegeben wurde. Die Platte wurde bei 4°C bis zur Immunfluoreszenz-Färbung für die Opera Phenix™-Aufnahmen (siehe 2.3.5) gelagert.

### **2.2.8.2 Infektion von humanen Makrophagen (THP1) mit *L. major***

Um die anti-Leishmanien Aktivität der Moleküle *EhLPPG* und den davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoga auf die Infektion humaner Makrophagen mit *L. major* zu untersuchen, wurde die humane THP1-Zelllinie verwendet.

Zu Beginn des Versuchs wurden  $6 \times 10^5$  THP1-Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte ausgesät und zur Differenzierung der Zellen 50 ng/ml PMA hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 72 Std bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Infektion wurden die Zellen zwei Mal mit warmem DPBS gewaschen, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen.

Die Infektion der humanen Makrophagen erfolgte mit  $4,8 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten pro Well (Infektionsverhältnis von 1:8). Nach vierstündiger Inkubation wurden die Zellen drei Mal mit warmem DPBS gewaschen, um freie Parasiten zu entfernen. Es folgte die Behandlung der infizierten Makrophagen mit  $4 \mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{GalCer}$ ,  $2 - 8 \mu\text{g/ml}$  *EhLPPG* oder  $0,1 - 10 \mu\text{g/ml}$  synthetischen *EhPI*-Analoge (siehe 2.1.9) oder Liposomen mit 1 % oder 10 % *EhPIa* C30:1 cis (siehe 2.1.10), in 1 ml THP1-RPMI<sup>+</sup>-Medium bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Nach 48 Stunden wurden die Zellen erneut mit warmem DPBS gewaschen und mit einem Zellkratzer von dem Plattenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bis zur gDNA Isolierung (siehe 2.4.1) und der Bestimmung der Parasitenlast mittels TaqMan Sonden-qPCR (siehe 2.4.5.1) bei -20°C gelagert.

### **2.2.9 *In vitro*-Test zur Bestimmung der anti-Mykobakterien Aktivität von *EhLPPG* und synthetischer *EhPI*-Analoge**

Um den Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge auf die anti-bakterielle Aktivität von *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagen zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Mykobakterien-Infektionsversuch durchgeführt. Da es sich für den Menschen bei *M. tuberculosis* um einen hochpathogenen Erreger handelt, wurden ab dem Zeitpunkt der Infektion unter Bedingungen der Schutzstufe 3 nach der Biostoffverordnung (BioStoffV) bzw. Sicherheitsstufe 3 nach der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) gearbeitet. Die Versuche fanden am Forschungszentrum Borstel, unter der Leitung von Dr. Christoph Hölscher statt.

Zunächst wurden murine Makrophagen, wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, aus dem Knochenmark isoliert, mit DMDM<sup>++</sup>-Medium kultiviert und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Zu Beginn des Infektionsversuchs wurden die Zellen aufgetaut und  $8 \times 10^4$  BMDMs/Well zusammen mit  $100 \mu\text{l}$  DMDM<sup>+</sup>-Medium in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Std bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, damit diese an den Plattenboden adhärieren können. Die Zellen wurden drei Mal mit warmem DMDM<sup>+</sup>-Medium gewaschen und jedes Well danach wieder mit  $200 \mu\text{l}$  DMDM<sup>+</sup>-Medium aufgefüllt. Für die Infektion wurde der *M. tuberculosis*-Stamm des Typs H37Rv (ATCC 27294) aufgetaut und in warmen DMDM<sup>+</sup>-Medium gelöst. Während der Versuchsetablierung wurden die Zellen mit einem Faktor der Infektion-Multiplizität (*multiplicity of infection*, MOI) von 0,5 und 1 mit dem *M. tuberculosis* H37Rv infiziert. Die MOI beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Partikel und der Zielzelle. Bei einer MOI von 1 befinden sich die gleiche Anzahl an infektiösen Partikeln und Zellen in der Suspension. Bei einer MOI von 0,5 wird nur die

Hälfte an infektiöse Partikeln im Vergleich zur Zellmenge eingesetzt. Eine MOI von 0,5 erwies sich als ausreichend und wurde daher in allen nachfolgenden Experimenten eingesetzt.

Für die Infektion über 4 Std wurden die Zellen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit DMDM<sup>+</sup>-Medium gewaschen und mit den Stimulanzen αGalCer (4 µg/ml), EhLPPG (2 - 8 µg/ml) oder den synthetischen EhPI-Analoga (0,1 - 10 µg/ml, siehe 2.1.9) behandelt. Als Kontrollen wurden eine Medium-Kontrolle und eine DMSO-Kontrolle angesetzt. Es wurde in Triplikaten gearbeitet, um Schwankungen zu minimieren. Zum Nachweis einer möglichen anti-mykobakteriellen Wirkung der Stimulanzen wurden *M.tuberculosis*-infizierte und behandelte BMDMs für 24 - 96 Std bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Um den Grad der Infektion zu überprüfen, wurden bereits nach vierstündiger Infektion erste Ansätze ausplattiert. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000) aus unbehandelten Medium-Ansätzen in H<sub>2</sub>O/0,05 % Tween hergestellt. Jeweils zwei dieser Verdünnungsstufen wurden auf eine Rinderserum-Agarplatte ausplattiert, sodass pro Ansatz sechs Verdünnungen auf drei Kultivierungsplatten ausgestrichen wurden. Die Platten wurden umgekehrt, mit dem Agar nach oben, bei 37°C für vier Wochen bebrütet. Von den weiteren Ansätzen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten eine Verdünnungsreihe erstellt, die Verdünnungen auf Kultivierungsplatten ausgestrichen und bebrütet. Nach vier Wochen konnten auf den Rinderserum-Agarplatten gewachsene Mykobakterien-Kolonien manuell ausgezählt werden. Anhand der ausgezählten Daten wurde die koloniebildende Einheit (*colony forming unit*, CFU) ermittelt, welche eine Quantifizierung von vitalen Keimen auf Zellen erlaubt. Zur Analyse der Daten wurde der lineare CFU bestimmt:

linearer CFU = ((Anzahl gezählter Kolonien \* ausplattiertes Volumen)\*(10<sup>Verdünnung</sup>)).

### **2.2.10 Durchflusszytometrie**

Das Verfahren der Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) ist sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Analyse von Zellen mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Messungen am FACS LSR II (BD Biosciences) durchgeführt. Während der Messung werden die Zellen in einem laminaren Probenstrom an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Dies führt sowohl zu einer Lichtstreuung als auch zu einer Emission der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in einer bestimmten

Wellenlänge. Das ausgesendete Licht wird von einem Detektor empfangen und ausgewertet. Jeder Fluoreszenzfarbstoff stellt ein individuelles Signal dar, sodass über die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle der Zellen, die zuvor mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert wurden, eine spezifische Aussage getroffen werden kann. Unabhängig von der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen können die Zellen im Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) anhand ihrer Granularität und im Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) anhand ihrer Größe und ihres Volumens genauer definiert werden.

Zur Analyse der Daten wurden die Zellpopulation von Interesse eingegrenzt, wodurch ein Ausschluss von Zelldetritus und unerwünschten Partikeln erfolgte. Die Einstellung der Parameter SSC-A gegen SSC-H führt zu einer Aufführung der Einzelzellen in einer Diagonalen, sodass Zelldubletten ausgeschlossen werden können. Ferner erfolgte eine Lebend-Tot-Diskriminierung mit Hilfe des Lebend-Tot-Farbstoffs ZombieUV™ (BioLegend). Dieser Vitalfarbstoff färbt ausschließlich abgestorbene Zellen an und besitzt dadurch ein höheres Fluoreszenzsignal, sodass nur lebende Zellen in die weitere Analyse einbezogen werden können. Im Anschluss konnten die Zellen anhand der Emission ihrer spezifischen Fluoreszenz-gekoppelten Oberflächenmoleküle identifiziert und mit Hilfe der Software FlowJo (Treestar) ausgewertet werden.

### **2.2.11 Zytotoxizitätsprüfung von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge in murinen und humanen Lymphozyten**

Zur Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften von *EhLPPG* und den davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoge wurde ein Zytotoxizitätsassay mit murinen (siehe 2.2.11.1) und humanen Lymphozyten (siehe 2.2.11.2) durchgeführt. Diese Studien waren Bestandteile der Masterarbeit von Melina Mühlenpfordt aus unserer Arbeitsgruppe für Molekulare Parasitologie.

Zu Beginn des Versuchs wurden  $1 \times 10^6$  murine oder humane Lymphozyten pro Well in 50  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>-Medium in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Stimulation mit  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge erfolgte jeweils in einer Konzentration von 0,1  $\mu$ g; 1  $\mu$ g und 10  $\mu$ g für 12 Std, 24 Std und 48 Std bei 37°C, 5 CO<sub>2</sub>. Als Kontrollen dienten sowohl Zellkulturmedium, als auch DMSO, da dies als Lösungsmittel für die synthetischen *EhPI*-Analoge verwendet wurde. Darüber hinaus wurde eine Positivkontrolle zur Verwendung des ZombieUV™-Farbstoffs aus abgetöteten Zellen generiert, indem  $5 \times 10^5$  Zellen für 15 min bei 95°C inkubiert wurden. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurde das sedimentierte Zellpellet resuspendiert und die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen

wurden bei 400 x g, 4°C für 4 min in 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert und mit 0,3 µl ZombieUV™ (siehe 2.1.3) gefärbt. Die Zellen wurden dabei für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und daraufhin erneut mit 1 ml PBS bei 400 x g, 4°C für 4 min zentrifugiert. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden die gefärbten Zellen in 150 µl PBS gelöst und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

#### **2.2.11.1 Zytotoxizitätsprüfung von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge in murinen Milzlymphozyten**

Um die Zytotoxizität von *EhLPPG* und den davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoge zu bestimmen, wurden  $1 \times 10^6$  murine Milzlymphozyten, die wie zuvor in Abschnitt 2.2.4.4 beschrieben isoliert wurden, mit 50 µl RPMI<sup>+</sup>-Medium/Well in einer 96-Well-Platte inkubiert. Die Stimulation der Zellen mit den genannten Molekülen und die weitere Probenaufbereitung ist in Abschnitt 2.2.11 dargestellt. Insgesamt wurden 100.000 Zellen am Durchflusszytometer gemessen.

#### **2.2.11.2 Zytotoxizitätsassay von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge in humanen Lymphozyten (PBMCs)**

Die zytotoxische Wirkung von *EhLPPG* und den davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoge auf humane Lymphozyten (PBMCs) wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  isolierte humane PBMCs (siehe 2.2.4.1) in 50 µl RPMI<sup>+</sup>-Medium/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nachfolgend wurden die Zellen zunächst mit den Molekülen wie in Absatz 2.2.11 aufgeführt, stimuliert und anschließend gefärbt (siehe 2.2.11). Während der Analyse am Durchflusszytometer wurden 250.000 Zellen gezählt.

### **2.3 Biochemische Methoden**

#### **2.3.1 ELISA**

Der Antikörper-basierende ELISA (*enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ermöglicht den Nachweis eines Antigens von Interesse, welches spezifisch durch Antikörpern gebunden und markiert wurde. Mit Hilfe dieser spezifischen Antikörper können Protein- oder Antikörperkonzentrationen quantifiziert werden. Das Prinzip des symmetrischen Sandwich-ELISAs beruht auf der Verwendung von zwei spezifischen Antikörpern. Eine Flachboden-Mikrotiterplatte wurde zunächst mit einem primären Antikörper (*capture*-Antikörper), der

sich gegen das gewünschte Antigen richtet, beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Am Folgetag wurde die Mikrotiterplatte drei Mal mit 0,05 % Tween/PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Freie, unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1 % BSA/PBS für 1 Std, bei RT blockiert. Im Anschluss an diesen Blockierungsschritt wurde die Mikrotiterplatte wiederholt gewaschen, bevor Zellüberstände in geeigneter Verdünnung in die Platte gegeben wurden. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei erfolgt eine Bindung des nachzuweisenden Antigens aus dem Zellüberstand an den Primärantikörper am Plattenboden.

Im Anschluss wurde die Platte erneut mit 0,05 % Tween/PBS gewaschen. Um das gebundene Antigen zu nachzuweisen, wurde anschließend ein spezifischer Biotin-konjugierter Sekundärantikörper auf die Platte gegeben und für 1 Std bei RT inkubiert. Zum Nachweis des Sekundärantikörpers und damit des Antigens wurde ein Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (HRP, *horseradish peroxidase*) zu den Ansätzen gegeben. Das Streptavidin bindet derweil an das Biotin des Sekundärantikörpers. Nach einem weiteren Waschschrift wurde eine TMB-haltige Substratlösung zu den Ansätzen hinzugefügt, was zu einer enzymatischen Reaktion zwischen der Peroxidase und dem TMB-Substrat führt und dadurch ein Farbumschlag hervorruft. Die Farbintensität ist dabei proportional zur Menge des nachzuweisenden Antigens. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde der Farbumschlag anhand einer photometrischer Messung (ELISA-Reader MRXII) und einer Standardreihe quantifiziert.

#### **2.3.1.1. Muriner IFN $\gamma$ -ELISA**

Um den Gehalt an murinem IFN  $\gamma$  in den gesammelten Überstände aus den Zellzytokinexpressionsassays mit Leberlymphozyten (siehe 2.2.7.2.1) zu quantifizieren, wurde das murine IFN  $\gamma$  ELISA-Kit von R&D Systems (siehe 2.1.3) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **2.3.1.2. Muriner IL 4-ELISA**

Der murine IL 4-ELISA von R&D Systems (siehe 2.1.3) zur Bestimmung der IL 4-Konzentration wurde mit den Überständen der Zellzytokinexpressionsassays mit Leberlymphozyten (siehe 2.2.7.2.1) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.3.2 Cytometric Bead Array (LEGENDplex™)**

Der LEGENDplex™-Assay der Firma BioLegend ist ein *Bead*-basierter Immunoassay, der auf dem Sandwich-Prinzip eines herkömmlichen ELISA-Test basiert. Mit Hilfe des LEGENDplex™ können bis zu 13 unterschiedliche lösliche Analyte (Zytokine und Chemokine) gleichzeitig in einer biologischen Probe quantifiziert werden.

Ein LEGENDplex™-Kit umfasst ein Set aus zwei *Bead*-Populationen (*Capture-Beads*), die sich in ihrer Größe und dem APC Fluoreszenzlevel unterscheiden. Darüber hinaus sind die *Beads* an ihrer Oberfläche mit spezifischen Antikörpern für einen bestimmten Analyten konjugiert. Nach dem die Probenanalyten an diese *Capture-Beads* gebunden haben, werden biotinylierte Detektionsantikörper hinzugegeben. Diese Antikörper binden an den nachzuweisenden Analyten und bilden so einen Sandwich-Komplex aus Detektionsantikörper, Analyt und *Capture-Bead*. Durch Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin, welches an den biotinylierten Detektionsantikörper bindet, wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das am Durchflusszytometer gemessen werden kann. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des gebundenen Analyten. Die spezifischen Analyten-Populationen können durch die *Bead*-Größe und die Fluoreszenzintensität unterschieden und am Durchflusszytometer aufgetrennt werden. Die Konzentration eines bestimmten Analyten kann anhand einer Standardkurve mit der LEGENDplex™ Analyse-Software ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene LEGENDplex™-Kits (siehe 2.1.3) verwendet, wobei die Assays nach Herstellerangaben durchgeführt wurden.

#### **2.3.2.1 Humanes Multi-Analyte Flow Assay Kit (Custom panel, 13-plex)**

Mit dem humanen Multi-Analyte Flow Assay Kit können 13 verschiedene Analyte (IL 2, IL 4, IL 5, IL 6, IL 9, IL 10, IL 13, IL 17a, IL 17f, IL 21, IL 22, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ ) nachgewiesen werden. Es wurde zur Analyse der Überstände aus dem Zellzytokinexpressionsassay (siehe 2.2.7.1) verwendet.

#### **2.3.2.2 Murines Multi-Analyte Flow Assay Kit (Custom panel, 12-plex)**

Zur Analyse der Leishmanien-infizierten Fußlyssate (siehe 2.5.1) wurde ein muriner Multi-Analyte Flow Assay Kit durchgeführt, der den Nachweis von 12 verschiedenen Analyten (IL 1 $\beta$ , IL 4, IL 6, IL 10, IL 12p70, IL 13, IL 17a, IL 23, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , CCL 2, CCL 3) erlaubt.

### **2.3.2.3. Murines Multi-Analyte Flow Assay Kit (Custom panel, 10-plex)**

Das murine Multi-Analyte Flow Assay Kit ermöglicht die Analyse von 10 verschiedenen Analyten (IL 1 $\alpha$ , IL 6, IL 10, IL 17a, IL 27, IFN $\beta$ , IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , MCP 1, GM-CSF) und wurde für den Zytokin-Nachweis in den Überständen aus dem Zellzytokinexpressionsassay mit Leberlymphozyten (siehe 2.2.7.2.1) benutzt.

### **2.3.3 Histologie und Immunhistologie**

Die Histologie und die Immunhistologie sind zwei verschiedene Methoden zum mikroskopischen Nachweis verschiedener Zelltypen in Gewebeschnitten. Für die Anfertigung histologischer Gewebeschnitten werden Färbelösungen verwendet, während Zellen in der Immunhistologie mit Antikörpern, die u.a. mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, verschiedenen Partikeln wie Goldpartikel oder radioaktiven Isotopen gekoppelt sind, markiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeschnitte von murinem Ohrgewebe aus dem *in vivo*-*L. major*-Infektionsmodell für die kutane Leishmaniose (siehe 2.5.2) angefertigt. Die Leishmanien-infizierten Ohren wurden zu diesem Zweck vom Kopf des Tieres entfernt und in 4 % Formaldehydlösung für mindestens 24 Std bei RT konserviert. Die konservierten Gewebe wurden anschließend von Petra Allartz (Arbeitsgruppe Zoonosen von Prof. Dr. Tappe, BNITM) in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung wurden von dem eingebetteten Gewebe 0,2  $\mu$ m-dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger fixiert. Zum Nachweis verschiedener Zelltypen im Ohrgewebe wurden mit den aufeinanderfolgenden Schnitten sowohl histologische als auch immunhistologische Methoden durchgeführt.

Um einen Überblick über das Gewebe zu bekommen, wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) durchgeführt. Der natürlich vorkommende Farbstoff Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen, wie beispielsweise Zellkerne blau-violett, wohingegen alle acidophilen Strukturen, wie Zellplasmaproteine, durch den synthetischen Farbstoff Eosin rötlichen gefärbt werden. Die Leishmanien erscheinen in dieser Färbung leicht blau-violett. Mittels einer modifizierten Giemsa-Färbung wurden die Leishmanien in einem weiteren Schnitt angefärbt, durch die der Kinetoplast der Leishmanien dunkel-violett im Schnittbild erscheint. Die HE- und die Leishmanien-Giemsa-Färbung wurden ebenfalls von Petra Allartz durchgeführt.

Da mit der Leishmanien-Giemsa-Färbung allerdings auch umliegende Zellkomponenten angefärbt werden, wurde eine Leishmanien-spezifische Antikörper-Färbung nach immunhistologischem Verfahren etabliert. Zum Nachweis der Parasiten wurden diese mit einem anti-Maus HSP90-Antikörper (Hitzeschockprotein, 1:600, siehe 2.1.5), hergestellt von

Stefan Hoenow aus unserer Arbeitsgruppe für Molekulare Infektionsimmunologie, markiert. HSP90 ist ein in Leishmanien konstitutiv exprimiertes Protein, das den Parasiten eine höhere Toleranz gegenüber Temperatur- und pH-Stress im Wirtsorganismus verleiht. In einem weiteren Schritt wurde ein gegen den Primärantikörper gerichteter, polyklonaler anti-Maus IgG-Sekundärantikörper (1:200, siehe 2.1.5) verwendet, der an HRP gekoppelt ist. Durch Zugabe des Substrats 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, 40 µl DAB-Konzentrat in 1 ml DAB-Substratpuffer, kommt es zu einer enzymatischen Reaktion zwischen Substrat und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper, wodurch die HSP90-Moleküle in den Leishmanien visualisiert werden konnten. Die Reaktion führte zu einer bräunlichen Färbung, welche lichtmikroskopisch sichtbar ist.

Neben der Leishmanien-spezifischen Antikörper-Färbung wurden noch zwei weitere immunhistologische Färbungen durchgeführt. Zum einem wurden neutrophile Granulozyten mit einem Primärantikörper markiert, welcher gegen das Oberflächenprotein 7/4 (1:1000, siehe 2.1.5) gerichtet ist. Der Antikörper dient der Bindung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers aus dem Supervision2-Kit (DCS) und wurde nach Reaktion mit dem Substrat DAB wie oben beschrieben visualisiert. Zum anderem wurde zum Nachweis von Arginase 1 (Arg1) ein gegen das Protein gerichteter Antikörper eingesetzt und mittels Vector M.O.M. Immunodetection Kits (siehe 2.1.3) nach Herstellerangaben für die lichtmikroskopische Auswertung sichtbar gemacht.

In Kooperation mit der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden Färbungen von dem Enzym iNOS und CD11b, ein Marker für Monozyten und Makrophagen, in den Gewebeschnitten angefertigt. Zur Visualisierung von iNOS wurde ein polyklonale anti-iNOS-Antikörper verwendet und für den CD11b-Nachweis ein monoklonaler anti-CD11b-Antikörper (siehe 2.1.5) eingesetzt. Die Antikörper wurden mit dem Ventana diagnostic systems-Kit (Roche, siehe 2.1.3) sichtbar gemacht.

### **2.3.4 Hämolytische Aktivität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga**

Die hämolytische Aktivität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga wurde mit Hilfe eines Hämolyseassay bestimmt, der von Sarah Corinna Lender im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe für Molekulare Parasitologie durchgeführt wurde.

Hierfür wurden Erythrozyten 1:10 in PBS verdünnt und zusammen mit  $\alpha$ GalCer, synthetischen *EhPI*-Analoga (jeweils 0,01 - 10 µg/ml) oder 0,1 - 20 µg/ml *EhLPPG* (siehe 2.1.9) für 1 Std bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 800 x g, RT für 10 min zentrifugiert und 50 µl des Überstands abgenommen. Der Überstand wurde

photometrisch bei 530 nm (Referenzfilter: 630 nm) in Hinblick auf eine mögliche Hämolyse untersucht. Die hämolytische Aktivität (in %) wurde mittels der unten aufgeführten Formel errechnet:

$$\text{Hämolytische Aktivität} = \frac{A - A_0}{A_{\max} - A_0} * 100 \%$$

$A_{\max}$  beschreibt die maximale Hämolyse nach Inkubation mit dH<sub>2</sub>O.

$A_0$  stellt die Negativkontrolle durch Inkubation mit PBS dar.

### **2.3.5 Immunfluoreszenz (IF)-Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop Opera Phenix™**

Das konfokale Mikroskop Opera Phenix™ ist ein High Content Screening System, das es ermöglicht hochauflösende Fotos mit bis zu vier Laserkanälen gleichzeitig aufzunehmen. Durch eine rotierende Nipkow-Lochscheibe (*Spinning disk*) mit Mikrolinsen im Inneren des Mikroskops wird eine Zwei-Sicht-Optik erschaffen. Diese separiert die Exzitation und die Emission der einzelnen Fluoreszenzlichter und verhindert damit ein Überstrahlen der Fluoreszenzkanäle. So wird auch bei hoher Durchsatzquote eine maximale Sensitivität der Probenqualität gewährleistet. Die Aufnahmen in dieser Arbeit wurden mit einem 20 x NA Wasser-Immersionsobjektiv aufgenommen.

Über die „Harmony“-Software von Perkin Elmer wurden die einzelnen Messparameter eingestellt und die Messung gestartet, die dann voll automatisch durch das Opera Phenix™ Konfokalmikroskop durchgeführt wurde. Die spätere Analyse und Evaluation der Daten erfolgte ebenfalls mit der „Harmony“-Software. Der Algorithmus, der dafür verwendet wurde, wurde von Hanno Niss und Stefan Hoenow aus der Arbeitsgruppe für Molekulare Infektionsimmunologie (BNITM) programmiert.

Für die Messung am konfokalen Mikroskop Opera Phenix™ wurden die fixierten BMDMs in der 96-Well-Platte zuerst einer Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen. Die Zellen wurden zwei Mal mit 200 µl Waschlösung (siehe 2.1.8) für je 5 min auf einem Schüttler bei RT gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Permeabilisierungspuffer (siehe 2.1.8) für 15 min bei RT permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 150 µl Blocklösung (siehe 2.1.8) blockiert. Im Anschluss wurden die Zellen in dem primären anti-HSP90 Maus Antikörper (siehe 2.1.5) im Verhältnis 1:4000 in Blocklösung für 1 Std auf dem Schüttler (RT) inkubiert. Vor der zweiten Antikörper-Inkubation wurden die Zellen wie zuvor

drei Mal gewaschen. Der sekundäre Antikörper anti-Ziege IgG (1:8000, siehe 2.1.5) wurde zusammen mit einem DAPI-Farbstoff (1:100) zu den Zellen gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen aufgrund des Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers und dem DAPI-Fluoreszenzfarbstoff mit Alufolie abgedeckt. Die Zellen wurden für 1 Std auf einem Schüttler (RT) im Dunkeln inkubiert und nachfolgend zwei Mal mit der Waschlösung und einmal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden zu jedem Well 200 µl PBS gegeben und die Platte bis zur Messung am Opera Phenix™ bei 4°C gelagert.

### **2.3.6 Herstellung von Gewebelysaten**

Zur Herstellung von Lysaten aus den Fußballen wurde das Gewebe vom Knochen abgetrennt, in kleine Stücke geschnitten und zusammen mit 200 µl Proteaseinhibitor (siehe 2.1.4) und Zirkonia-Beads (siehe 2.1.2) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Die Proben wurden in einem Tissue Lyser für 10 min bei 50 ms gemixt und anschließend für 10 min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand bzw. das Lysat wurde abgenommen und bei -20°C eingefroren. Das Lysat wurde zur Analyse der Zytokine und Chemokine in einem LEGENDplex™ (siehe 2.3.2) verwendet.

### **2.3.7 Präparation der Liposomen**

Die synthetischen *EhPI*-Analoge *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis und *EhPIb* C16:0 DR wurden auf zwei verschiedene Arten in Liposomen formuliert.

Die erste Art von Liposomen, wurden nach dem Vorbild der AmBisome® (Gilead Sciences 2012) synthetisiert, die bereits zu den gut etablierten Agentien in der medizinischen Therapie gehörten (Sundar and Chakravarty 2015). Das Grundgerüst besteht aus zwei Phospholipid-Arten, einem hydriertem Soja L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (HSPC) und einem Phosphatidylglycerol (PG, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol), DSPG). Weitere Bestandteile der Liposomen sind Cholesterol,  $\alpha$ -Tocopherol, ein Antioxidans, und das Stimulanzmolekül *EhPIa* C30:1 cis. Darüber hinaus wurden fluoreszierende Lipide (Lissamine™: Rhodamine B 1,2-dihexadecanoly-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Rh-DHPE)) in die Membran integriert, wodurch die Liposomen auch für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden können. Sie sind ungefähr 80 nm - 120 nm groß. Die Liposomen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. André (Hochschule für Angewandte Wissenschaft (HAW), Hamburg) synthetisiert und zur Verfügung gestellt (Tabelle 9). Sie wurden zur Behandlung von humanen *L. major*-infizierter Makrophagen verwendet (2.2.8.2).

Die zweite Art von Liposomen wurde am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) in der Arbeitsgruppe Wirkstoff-Transport von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr von Sara Menina synthetisiert. Die Liposomen bestehen aus zwei Phospholipid-Arten, einem 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC) und einem 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-glutaryl (DPPE-GA). Zudem ist Cholesterol in der Liposomenmembran integriert. Der Anteil an *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C16:0 DR beträgt jeweils 50 % in den Liposomen, während *EhPIb* C30:1 cis etwas geringer konzentriert mit 20 % in die Liposomen integriert wurde (Tabelle 10). Ferner wurden die Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin (Lissamine rhodamine B sulfonyl von Avanti Polar Lipids) markiert, der direkt an integrierte Lipide gekoppelt ist. Sie sind etwas 200 nm groß und wurden zur Behandlung von murinen *L. major*-infizierter Makrophagen verwendet (2.2.8.1).

## **2.4. Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus *L. major*-infizierten Makrophagen**

Zur Isolierung der genomischen DNA aus *L. major*-infizierten murinen und humanen Makrophagen (siehe 2.2.8.1/2.2.8.2) wurde das QIAamp DNA Mini Kit von QIAGEN (siehe 2.1.3) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Aus BMDMs gewonnene gDNA wurde in 30 µl Elutionspuffer eluiert, während gDNA aus THP1-Zellen in 60 µl Elutionspuffer (THP1) eluiert wurde. Die Konzentration beider Eluate wurde mittels Nano Drop 2000 bestimmt. Bis zum Einsatz in der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) mit TaqMan Sonden (siehe 2.4.5.1) wurde die gDNA bei -20°C gelagert.

### **2.4.2 Isolierung genomischer DNA aus *L. major*-infiziertem Gewebe**

Die gDNA aus *L. major*-infiziertem Fuß- und Ohrgehör (siehe 2.5) wurde mit dem DNeasy-Blood and Tissue Kit (QIAGEN, siehe 2.1.3) nach Herstellerangaben isoliert und in 50 µl Elutionspuffer eluiert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die isolierte gDNA am Nano Drop 2000 gemessen. Anschließend wurde die gDNA in der TaqMan Sonden-qPCR (siehe 2.4.5.1) zur Analyse der Parasitenlast eingesetzt.

### **2.4.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus *L. major*-infizierten Makrophagen**

Die Gesamt-RNA aus *L. major*-infizierten murinen Makrophagen wurde mit dem InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit von Stratec (siehe 2.1.3) nach Herstellerangaben isoliert und in 50 µl Elutionspuffer eluiert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde am Nano Drop 2000 gemessen und die RNA anschließend mittels reverser Transkription in komplementäre DNA

(*complementary*, cDNA, siehe 2.4.4) umgeschrieben. Die cDNA wurde in der qPCR mit SYBR Green® (siehe 2.4.5.2) verwendet. Die isolierten RNA-Proben wurden bei -80°C verwahrt.

#### 2.4.4 cDNA-Synthese der isolierten Gesamt-RNA für die qPCR mit SYBR Green®

Um die spezifische mRNA Expression in den Proben mittels qPCR mit SYBR Green® zu untersuchen, wurde die isolierte RNA zunächst in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, siehe 2.1.3) nach Herstellerangaben verwendet. Der Reaktionsmix wurde bei 25°C für 10 min inkubiert, gefolgt von zwei weiteren Inkubationsschritten bei 50°C für 15 min und 95°C für 5 min inkubiert (Tabelle 13). Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung für maximal zwei Wochen gelagert.

**Tabelle 13:** Reaktionsmix (1x) und Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese.

<b>Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese (1x)</b>
4 µl 5x Reaktionspuffer
2 µl Enzym-Mix
1 µl RNA-Template
auf 20 µl mit HPLC H <sub>2</sub> O auffüllen
<b>cDNA-Synthese-Programm (50 min)</b>
25°C für 10 min
50°C für 15 min
95°C für 5 min

#### 2.4.5 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Die quantitative *real-time* PCR (qPCR) ist eine Methode, die gleichzeitig eine Vervielfältigung als auch eine quantifizierte Analyse der Genexpression des Zielgens ermöglicht. Dabei werden die gleichen Reaktionsschritte innerhalb eines PCR-Zyklus wie bei einer konventionellen PCR durchlaufen. Ein Zyklus umfasst dabei die Aufschmelzung der doppelsträngigen DNA (Denaturierung), die Anlagerung der Primer (Primerhybridisierung, *annealing*) und die Verlängerung des Produktes (Elongation). Für die Detektion der zu amplifizierenden DNA gibt es verschiedene Methoden. Bei Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs wie SYBR Green®, interkaliert dieser in der doppelsträngigen DNA und ermöglicht eine Quantifizierung. Eine andere Methode ist die Nutzung von spezifischen

DNA-Sonden, wie zum Beispiel die TaqMan Sonden. Diese sind mit einem Fluoreszenzfähigem Reporter am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende versehen. Solange sich Reporter und Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, unterdrückt der Quencher das Fluoreszenzsignal des Reporters. Im Laufe der PCR baut die Polymerase die Sonde ab während sie den Gegenstrang synthetisiert. Aufgrund dessen entfernt sich der Quencher vom Reporter wodurch das Fluoreszenzsignal frei gesetzt wird. Bei beiden Methoden steigt die Emission des Fluoreszenzlichts proportional zur Menge des Amplifikats und wird am Ende der Elongation in jedem Zyklus mit der Rotor Gene 3000 Software (Corbett Life Science) in Echtzeit gemessen.

Die Quantifizierung des Amplifikats erfolgt über den Zyklus-Schwellenwert (Cycle threshold,  $C_T$ ), welcher den Zeitpunkt beschreibt, indem das Fluoreszenzsignal des Amplifikats erstmals das Hintergrundsignal (Schwellenwert) überschreitet.

#### **2.4.5.1 Quantitative *real-time* PCR mit TaqMan Sonden**

Um die Leishmanienlast sowohl in murinen und humanen *L. major*-infizierten Makrophagen (humane THP1: siehe 2.2.8.2, murine BMDMs: siehe 2.2.8.1) als auch in Leishmanieninfiziertem Gewebe (siehe 2.5) zu analysieren, wurde eine qPCR mit TaqMan Sonden durchgeführt. Mit dieser Methode wurde die relative Parasitenlast zwischen der Leishmanieninfizierten Aktin-DNA (*Gene of Interest*, GOI) und der Makrophagen spezifischen Aktin-DNA (Referenzgen) bestimmt.

Die TaqMan Sonden-qPCR wurde mit dem KAPA PROBE FAST Universal Kit (Peqlab) laut Herstellerangaben durchgeführt, wobei 2  $\mu$ l der Ziel-gDNA in einem 20  $\mu$ l Reaktionsmix eingesetzt wurden (siehe Tabelle 14 für murine und Tabelle 16 für humane Makrophagen). Um mögliche Ungenauigkeiten beim Ansetzen des Reaktionsansatzes auszuschließen und zu relativieren wurden die Proben in Duplikaten angesetzt. Für die Negativkontrolle wurde die gDNA durch 2  $\mu$ l HPLC-H<sub>2</sub>O ersetzt. Das qPCR-Programm für die Corbett 3000 (siehe Tabelle 15 für murine und Tabelle 17 für humane Makrophagen) wurde von der Arbeitsgruppe Clos (BNITM) zur Verfügung gestellt.

Die Daten wurden nach der  $2^{\Delta C_T}$ -Methode ausgewertet. Hierfür wurde zunächst die Differenz ( $\Delta$ ) aus den  $C_T$ -Werten von der Leishmanien spezifischen Aktin-DNA (GOI) im Verhältnis zur Makrophagen-spezifischen Aktin-DNA (Referenzgen) mit der nachfolgenden Formel ermittelt:

$$\Delta C_T = C_{T(GOI)} - C_{T(Ref)}$$

Zuletzt wurde die relative Parasitenlast bestimmt: Relative Parasitenlast =  $2^{\Delta C_T}$ .

### 2.4.5.1.1 Quantitative *real-time* PCR mit TaqMan Sonden zur Bestimmung der Parasitenlast aus Leishmanien-infizierten murinen Makrophagen und murinem Gewebe

Der verwendete Reaktionsansatz als auch das qPCR-Programm zur Durchführung der quantitativen *real-time* PCR mit TaqMan Sonden zur Bestimmung der Parasitenlast aus Leishmanien-infizierten murinen Makrophagen und murinem Gewebe sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgeführt.

**Tabelle 14:** 20 µl Reaktionsansatz (1x) zur Durchführung der qPCR mit TaqMan Sonden zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in murinen Makrophagen und Gewebe.

Bezeichnung	Endkonzentration	Volumen
Master Mix (2x)	1x	10 µl
Primer <i>L.</i> Aktin ( <i> fwd </i> )	200 nmol	1 µl
Primer <i>L.</i> Aktin ( <i> rev </i> )	200 nmol	1 µl
Sonde <i>L.</i> Aktin	100 nmol	1 µl
Primer MausAktin ( <i> fwd </i> )	900 nmol	1 µl
Primer MausAktin ( <i> rev </i> )	900 nmol	1 µl
Sonde MausAktin	200 nmol	1 µl
gDNA		2 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	unverdünnt	2 µl

**Tabelle 15:** qPCR-Programm zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in murinen Makrophagen.

PCR-Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	7 min
<b>40 Zyklen:</b>		
1. Denaturierung	95°C	10 sek
2. Primer-Annealing (in den ersten 16 Zyklen jeweils -0,5°C)	66 - 58°C	25 sek
3. Elongation und Messung	40°C	30 sek

### 2.4.5.1.2 Quantitative *real-time* PCR mit TaqMan Sonden zur Bestimmung der Parasitenlast aus Leishmanien-infizierten humanen Makrophagen

Der verwendete Reaktionsansatz als auch das qPCR-Programm zur Durchführung der quantitativen *real-time* PCR mit TaqMan Sonden zur Bestimmung der Parasitenlast aus Leishmanien-infizierten humanen Makrophagen sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgeführt.

**Tabelle 16:** 20 µl Reaktionsansatz (1x) zur Durchführung der qPCR mit TaqMan Sonden zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in humanen Makrophagen.

Bezeichnung	Endkonzentration	Volumen
Master Mix (2x)	1x	10 µl
Primer <i>L.</i> Aktin ( <i>fwd</i> )	300 nmol	1 µl
Primer <i>L.</i> Aktin ( <i>rev</i> )	300 nmol	1 µl
Sonde <i>L.</i> Aktin	200 nmol	1 µl
Primer humanAktin ( <i>fwd</i> )	300 nmol	1 µl
Primer humanAktin ( <i>rev</i> )	900 nmol	1 µl
Sonde humanAktin	200 nmol	1 µl
gDNA		2 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	unverdünnt	2 µl

**Tabelle 17:** qPCR-Programm zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in humanen Makrophagen.

PCR-Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	12 min
<b>40 Zyklen:</b>		
1. Denaturierung	95°C	15 sek
2. Primer-Annealing (in den ersten 14 Zyklen jeweils -0,5°C)	67 - 58°C	25 sek
3. Elongation und Messung	40°C	30 sek

### 2.4.5.2 Quantitative *real-time* PCR mit SYBR Green®

Zur Bestimmung der relativen mRNA Expression verschiedener Effektormolekülen (IL 1β, IL 4, IL 10, IL 13, Arg1, IL 12p35, TNF α, TGF β, IFN γ, iNOS) in murinen Makrophagen wurde eine qPCR unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green® durchgeführt. Zur Normalisierung und zum Kalibrieren der Daten wurde die mRNA Expression des konstitutiv exprimierten Referenzgens RPS9 und die mRNA Expression einer unbehandelten

Probe verwendet. Für die qPCR wurde ein 10 µL Reaktionsansatz des Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR master mix (2x, Fermentas) nach Herstellerangaben mit einer Primer-Endkonzentration von 0,3 µM angesetzt. In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch HPLC-H<sub>2</sub>O ersetzt. Zum Ausschluss und Relativierung möglicher Ungenauigkeiten während des Ansetzens der qPCR wurde mit Duplikaten gearbeitet.

Um die relative mRNA Expression zu ermitteln, wurde die vergleichende C<sub>T</sub>-Methode angewendet. Dafür wurde zunächst die Differenz (Δ) aus den C<sub>T</sub>-Werten des Zielgens und denen des Referenzgens gebildet:

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(\text{Referenzgen})}$$

Die relative mRNA Expression des Zielgens wurde anschließend im Bezug zu dem Referenzgen bestimmt:

$$\text{relative mRNA Expression}_{\text{Zielgen}} = 2^{\Delta C_T}$$

## **2.5 *in vivo*-Leishmania major-Infektionsmodelle zur Untersuchung der kutanen Leishmaniose**

### **2.5.1 Anti-Leishmanien Aktivität der synthetischen EhPI-Analoga in einem *L. major*-Fuß-Infektionsmodell in Balb/c-Mäusen**

Um den therapeutischen Einfluss der synthetischen EhPI-Analoga im Tiermodell der kutanen Leishmaniose zu untersuchen, wurden die Moleküle in einem etablierten Leishmanien-Balb/c-Infektionsmodell eingesetzt. Zunächst wurden  $2 \times 10^5$  metazyklische *L. major*-Promastigoten (Stamm 5ASKH), gelöst in 50 µl DPBS, subkutan in den rechten Hinterlauf einer weiblichen Balb/c-Maus injiziert. Der Infektionsverlauf wurde regelmäßig über mehrere Wochen beobachtet und kontrolliert (Abbildung 12). Die Fußdicke wurde mehrmals wöchentlich mit einer Schiebelehre gemessen und dokumentiert. Mit Einsetzen einer Fußschwellung wurden die Tiere einmal wöchentlich mit 5 µg EhPIa C30:1 cis oder 5 µg EhPIb C30:1 cis behandelt. Hierfür wurden die Stimulanzien in 25 µl DPBS gegeben und subkutan in den infizierten Fuß injiziert. Kontrolltieren wurde eine Suspension aus DMSO und PBS gespritzt. Beim Auftreten von ulzerierenden Läsion wurden die Tiere gemäß der Abbruchkriterien des Tierversuchs (TVA Nr. 134/15) aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Für weitere Untersuchungen wurde den Mäusen nach der Tötung der infizierte Fuß amputiert und das Probenmaterial in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren. Im Zuge der weitergehenden Bearbeitung wurde ein Lysat (siehe 2.3.6) aus dem Fußballen hergestellt, das im

LEGENDplex™ zur Analyse von Zytokinen und Chemokinen (siehe 2.3.2.2) verwendet wurde.

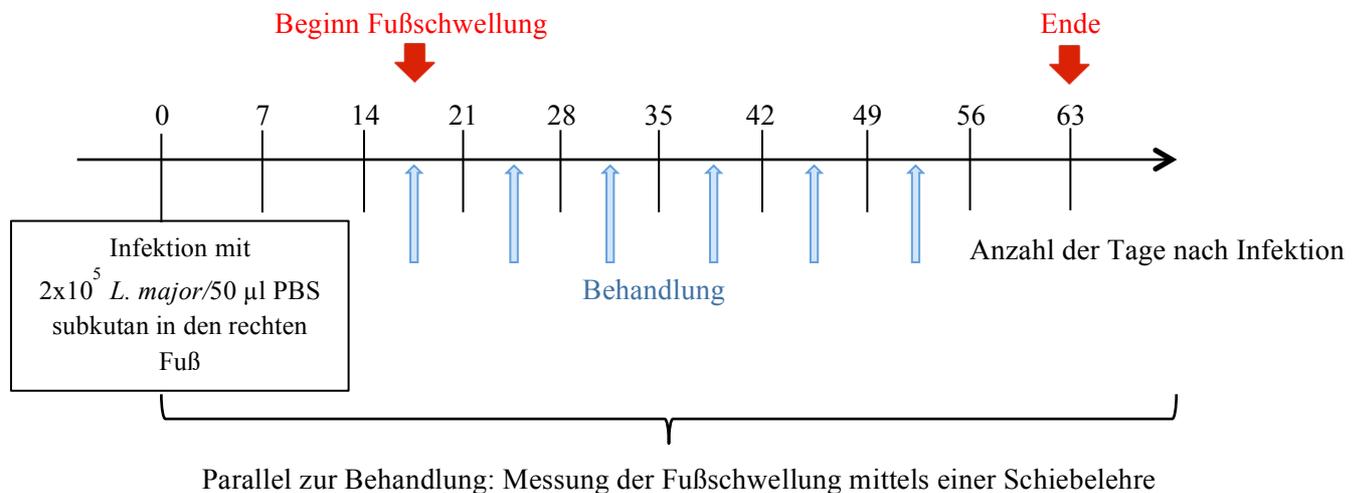


Abbildung 12: Schematische Darstellung des *L. major*-Fuß-Infektionsmodells in Balb/c-Mäusen.

### 2.5.2 Anti-Leishmanien Aktivität der synthetischen *EhPI*-Analoge in einem *L. major*-Ohr-Infektionsmodell in C57BL6-Mäusen

Das Leishmanien-Infektionsmodell für die kutane Leishmaniose mit C57BL/6-Mäusen musste zunächst am Institut etabliert werden. Um eine geeignete Infektionsdosis mit *L. major*-Parasiten zu bestimmen, wurden weiblichen C57BL/6-Mäusen mit metazyklischen Promastigoten (Stamm 5ASKH) in drei verschiedenen Infektionsdosen infiziert. Subkutan wurden  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^5$  und  $3 \times 10^6$  Leishmanien in 10 µl DPBS ins Ohr injiziert. Der Infektionsverlauf wurde regelmäßig über mehrere Wochen verfolgt und ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Erste Schwellungen der Ohren traten um die dritte Woche nach Infektion auf. Die Ohren der infizierten Tiere wurden drei Mal wöchentlich fotografiert. Die Ohrschwellungen wurden mittels Fiji-Software (siehe 2.1.11) analysiert.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass mit einer Infektionsdosis von  $3 \times 10^6$  Leishmanien ein optimaler Infektionsverlauf erzielt wurde, weshalb diese Dosis in den folgenden Versuchen verwendet wurde.

Um den Einfluss der synthetischen *EhPI*-Analoge auf *L. major*-infizierte C57BL/6-Mäuse zu bestimmen, wurden Weibchen dieses Mausstamms mit  $3 \times 10^6$  Leishmanien in 10 µl DPBS subkutan am Ohr infiziert. Der Infektionsverlauf wurde durch die Vermessung der Ohren mittels Fotoanalyse überwacht. Ab dem Zeitpunkt einer Ohrschwellung wurden die Tiere drei Mal wöchentlich mit *EhPI* C16:0 DR in Konzentration von 5 µg, 10 µg und 25 µg (in

DPBS) behandelt, indem die Moleküllösung auf das Ohr gegeben und sanft einmassiert wurde. Da es sich bei der kutanen Leishmaniose in der C57BL/6-Maus um eine selbstlimitierende Infektionsschwellung handelt, wurden die Mäuse nach Abklingen der Ohrschwellung abgetötet. Für histologische Färbungen wurde ein Teil der infizierten Mäuseohren in Formaldehyd konserviert, das restliche Gewebe sowie die Lymphknoten wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zur Bestimmung der Parasitenlast mittels TaqMan Sonden-qPCR (siehe 2.4.5.1.1) eingefroren.

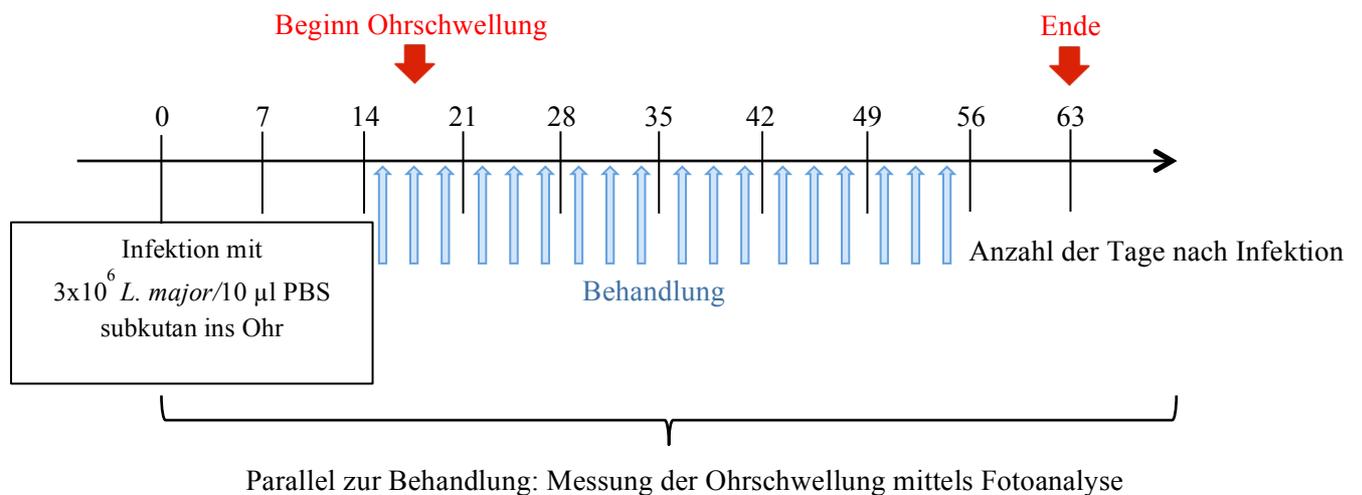


Abbildung 13: Schematische Darstellung des *L. major*-Ohr-Infektionsmodells in C57BL/6-Mäusen.

## 2.6 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism®7 durchgeführt (siehe 2.1.11). Um Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln, wurde der *unpaired Student's t-Test* verwendet. Ein Unterschied wurde als signifikant betrachtet, wenn der p-Wert bei  $p \leq 0.05$  lag. Die verschiedenen Signifikanzniveaus wurden wie folgt definiert: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

### 3. Ergebnisse

Vor einigen Jahren wurde das Lipopeptidphosphoglykan, *EhLPPG*, aus der Membran von *E. histolytica* in unserer Arbeitsgruppe isoliert und charakterisiert. Das Molekül weist strukturelle Ähnlichkeiten zu  $\alpha$ Galactosylceramid ( $\alpha$ GalCer) auf, einem bekannten und häufig in der Immuntherapie eingesetzten iNKT-Zellliganden (Saubermann, Beck et al. 2000) (Sullivan and Kronenberg 2005) (Van Kaer 2005). Wie das  $\alpha$ GalCer ist auch das *EhLPPG* in der Lage iNKT-Zellen zu aktivieren und zu modulieren. Die iNKT-Zellstimulation mit  $\alpha$ GalCer oder *EhLPPG* hat nachweislich in einigen Krankheiten eine protektive Wirkung (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009) (Van Kaer, Parekh et al. 2011). Da die Isolierung des *EhLPPGs* zeitaufwendig und kostenintensiv ist, wurden synthetische Analoga des Membranankers des Moleküls synthetisiert. Diese Moleküle sind aus den natürlich vorkommenden *EhPIa*- oder *EhPIb*-GPI-Anker aufgebaut und wurden darüber hinaus im Vergleich zum *EhLPPG* modifiziert. Die Fähigkeit von *EhLPPG* und den davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoga die Immunantwort zu modulieren, ist weitestgehend unbekannt und wurde in dieser Arbeit näher charakterisiert.

Die stimulatorischen und zytotoxischen Eigenschaften dieser Moleküle wurden in *in vitro*-Versuchen bestimmt. Ihr immuntherapeutisches Potential und der Wirkmechanismus wurden anschließend in einem Modell für die kutane Leishmaniose *in vitro* und *in vivo* untersucht. Um die Bioverfügbarkeit und Stabilität der Moleküle in der Therapie zu optimieren, wurden die effektivsten Moleküle in Liposomen integriert und *in vitro* getestet. Des Weiteren wurden die immuntherapeutischen Fähigkeiten im *in vitro*-Modell für die Infektionskrankheit Tuberkulose überprüft.

#### **3.1. Immunstimulatorische Eigenschaften von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga durch Analyse des induzierten Zytokinprofils muriner und humaner iNKT-Zellen nach Stimulation mit diesen Molekülen**

Für das native Molekül *EhLPPG* wurde bereits eine immunstimulierende Wirkung auf iNKT-Zellen sowie Makrophagen nachgewiesen (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009) (Doktorarbeit Bernin, 2014), während die immunstimulatorischen Fähigkeiten von den *EhLPPG* abgeleiteten *EhPI*-Analoga noch unbekannt sind. Zur Charakterisierung der Stimulationsfähigkeit von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga wurde das induzierte Zytokinprofil nach Behandlung muriner und humaner iNKT-Zellen mit diesen

Molekülen bestimmt. Hierfür wurde ein Zellzytokinexpressionsassay mit murinen und humanen iNKT-Zellen etabliert, um das Zytokinprofil mittels ELISA und LEGENDplex™ zu charakterisieren.

### **3.1.1. Bestimmung der optimalen Zellzahl und Inkubationszeit muriner Leber- sowie Milzlymphozyten für den Zellzytokinexpressionsassay**

Für die Etablierung des Zellzytokinexpressionsassays wurde zunächst bestimmt, ob sich Lymphozyten aus dem Milzgewebe oder aus dem Lebergewebe für diesen Assay eignen. Die Lymphozyten wurden auf zuvor mit  $\alpha$ GalCer oder *EhLPPG* stimulierte DCs gegeben. Es wurden verschiedene Zellzahlen dieser Lymphozytenpopulationen ausgetestet sowie die IFN $\gamma$ -Konzentration im Zellüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

Bei der Zugabe von  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Leberlymphozyten konnte keine Stimulation der Zellen durch *EhLPPG* und damit keine messbare Menge an IFN  $\gamma$  nachgewiesen werden (Abbildung 14 A). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation der Leberlymphozyten mit  $\alpha$ GalCer bereits nach 24 Std zu einer hoch signifikanten Menge an IFN  $\gamma$  (4000 pg/ml; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ) im Vergleich zur Medium-Kontrolle (276 pg/ml). Die Stimulationsfähigkeit durch die  $\alpha$ GalCer-Behandlung konnte auch über einen Zeitraum von 48 und 72 Std aufrechterhalten werden, mit einem leichten Anstieg der IFN  $\gamma$ -Konzentration über die Zeit (48 Std: 4185 pg/ml; \*\* $p \leq 0,01$ ; 72 Std: 4102 pg/ml; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

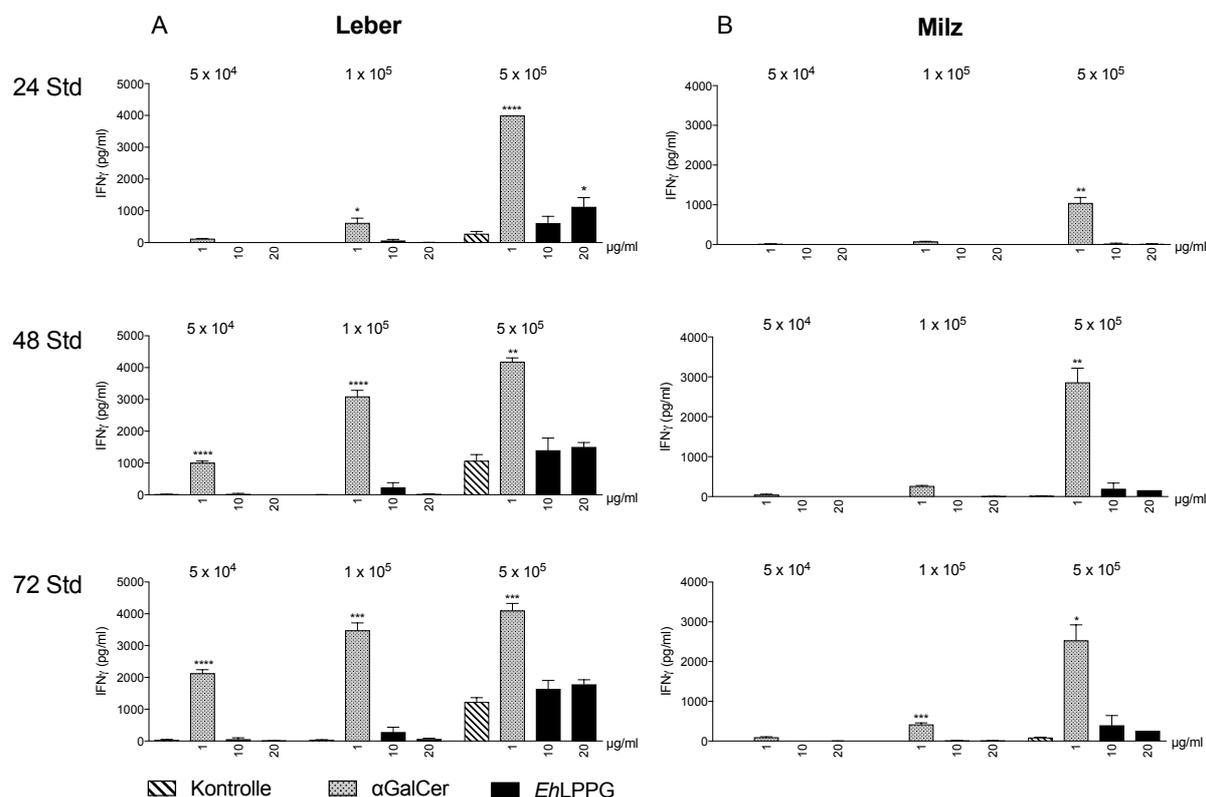
Die Stimulation der Leberlymphozyten mit 20  $\mu$ g/ml *EhLPPG* induzierte zwar eine geringere, aber ebenfalls signifikant erhöhte IFN  $\gamma$ -Konzentration nach 24 Std im Vergleich zur Medium-Kontrolle im Überstand (1121 pg/ml; \* $p \leq 0,05$ ). Mit zunehmender Inkubationszeit war kein Unterschied in der IFN  $\gamma$ -Konzentration zwischen Kontrolle und den *EhLPPG*-stimulierten Zellen festzustellen.

Für den Zellzytokinexpressionsassay mit Milzlymphozyten wurden die gleichen Zellzahlen verwendet und die IFN  $\gamma$ -Konzentration zu den gleichen Zeitpunkten gemessen wie zuvor im Zellzytokinexpressionsassay mit Leberlymphozyten. Auch in diesem Assay führt die *EhLPPG*-Stimulation bei  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Milzlymphozyten zu keiner messbaren IFN  $\gamma$ -Konzentration im Überstand (Abbildung 14 B). Die Stimulation der Milzlymphozyten mit  $\alpha$ GalCer induzierte eine signifikante Produktion an IFN  $\gamma$ , messbar im Überstand zu allen drei Zeitpunkten (24 Std: 1185,7 pg/ml; \*\* $p \leq 0,01$ ; 48 Std: 4302 pg/ml; \*\* $p \leq 0,01$ ; 72 Std: 2976 pg/ml; \* $p \leq 0,05$ ). Mit zunehmender Inkubationszeit stieg auch die IFN  $\gamma$ -Menge nach Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml (24 Std: 0 pg/ml, 48 Std: 22,7 pg/ml, 72 Std: 307,6 pg/ml) und

20 pg/ml (24 Std: 61,5 pg/ml, 48 Std: 154,8 pg/ml, 72 Std: 278,1 pg/ml) *EhLPPG* an, wies jedoch zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zur Medium-Kontrolle auf.

Aus den erzielten Ergebnissen ergibt sich eine optimale Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen für einen Assay mit Milzlymphozyten, die eine Inkubationszeit von 72 Std benötigen, um eine messbare IFN  $\gamma$ -Konzentration nach Stimulation mit *EhLPPG* im Überstand zu produzieren.

In dem Zellzytokinexpressionsversuch mit Leberlymphozyten führt eine Stimulation mit  $\alpha$ GalCer oder *EhLPPG* von  $5 \times 10^5$  Lymphozyten bereits nach 24 Std zu einer messbaren IFN  $\gamma$ -Konzentration. Dabei induzierte die Stimulation von Leberlymphozyten eine deutlich höhere IFN  $\gamma$ -Produktion im Vergleich zu den stimulierten Milzlymphozyten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die stimulatorischen Eigenschaften der synthetischen *EhPI*-Analoge im Zellzytokinexpressionsassay mit  $5 \times 10^5$  Leberlymphozyten zum Zeitpunkt 24 Std getestet.

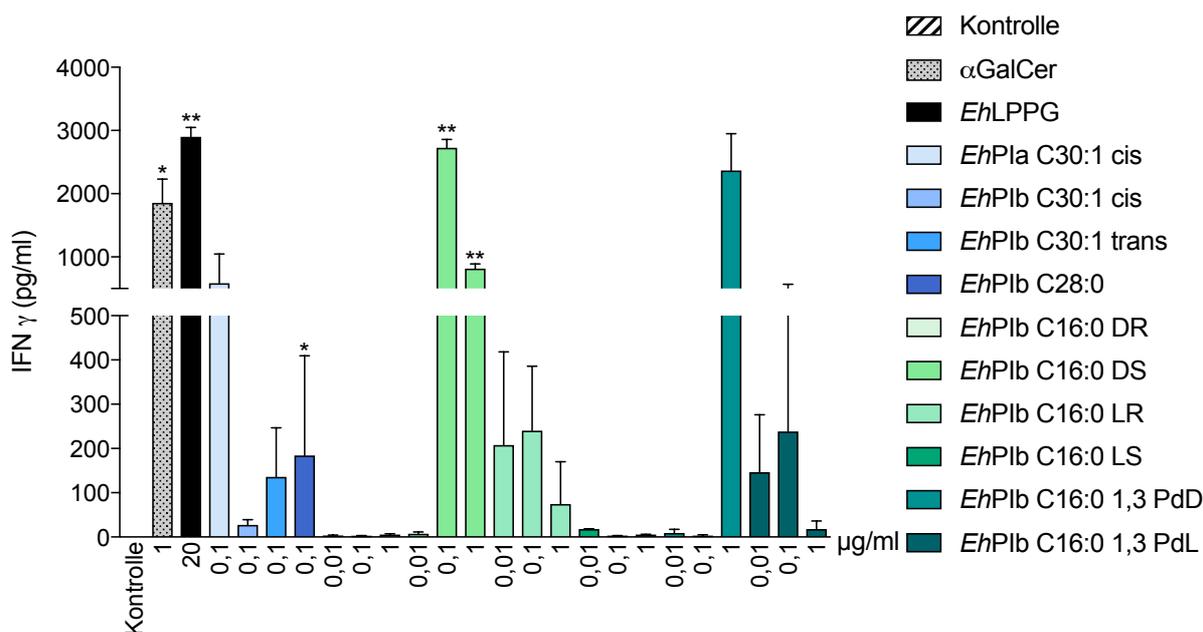


**Abbildung 14: Bestimmung der optimalen Zellzahl und Inkubationszeit muriner Leber- sowie Milzlymphozyten zur Etablierung eines Zellzytokinexpressionsassays.**  $5 \times 10^4$  DCs wurden mit 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ GalCer oder *EhLPPG* (10  $\mu$ g/ml & 20  $\mu$ g/ml) inkubiert. 4 Std später erfolgte die Zugabe von  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  murinen Leber- (A) oder Milzlymphozyten (B). Die von den Lymphozyten produzierte IFN  $\gamma$ -Konzentration der Lymphozyten wurde im Überstand nach 24 Std, 48 Std und 72 Std mittels ELISA ermittelt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, *unpaired Student's t-test*, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

### 3.1.2 Zytokinproduktion muriner Leberlymphozyten nach Stimulation mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga

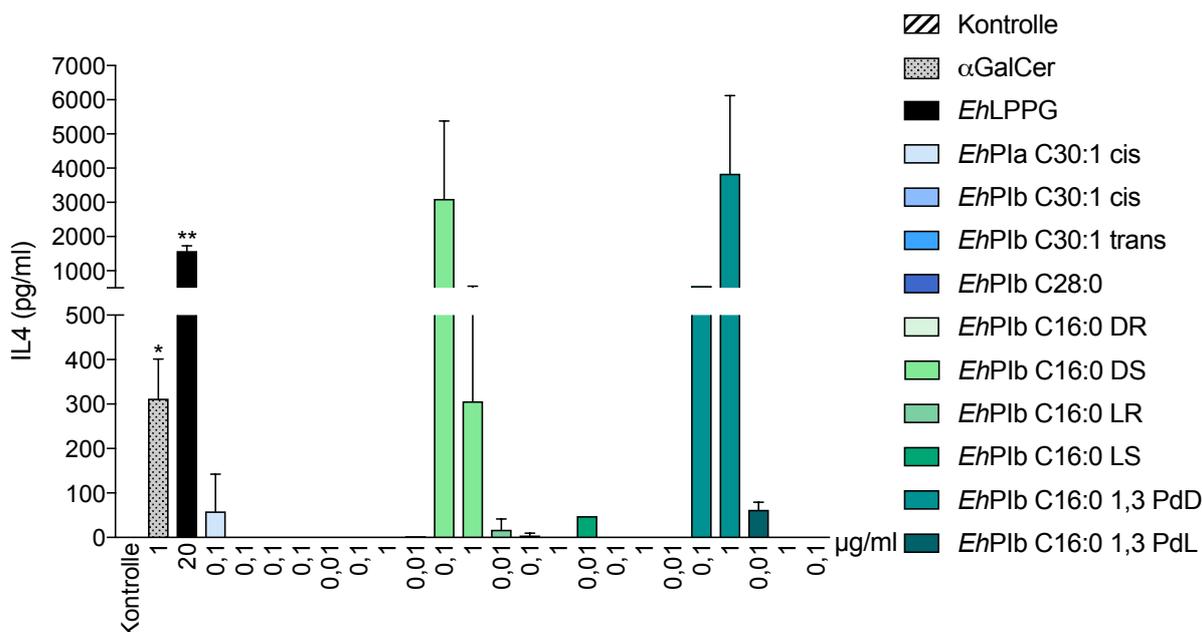
Zur Bestimmung der Stimulationsfähigkeit von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga wurde die Zytokinproduktion in Leberlymphozyten untersucht, da aufgrund des höheren Anteils an iNKT-Zellen in der Leber im Vergleich zur Milz eine stärkere Zytokinexpression zu erwarten war. Dafür wurden DCs zusammen mit den Stimulanzen  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* oder den synthetischen *EhPI*-Analoga inkubiert und anschließend die Leberlymphozyten hinzugegeben. Der Überstand wurde nach 24 Stunden abgenommen und die IFN  $\gamma$ - und IL 4-Konzentration gemessen.

Sowohl die Stimulation mit  $\alpha$ GalCer (1857,4 pg/ml; \* $p \leq 0,05$ ) als auch die *EhLPPG*-Stimulation (2899,9 pg/ml; \*\* $p \leq 0,01$ ) der Leberlymphozyten führte zu einer signifikanten IFN  $\gamma$ -Konzentration im Überstand verglichen mit der Kontrolle (0,153 pg/ml) nach 24 Std (Abbildung 15). Des Weiteren konnte für die Behandlung mit *EhPIb* C16:0 DS eine stimulierende Wirkung auf die Leberlymphozyten aufgrund der erhöhten IFN  $\gamma$ -Menge im Überstand (0,1  $\mu$ g/ml: 2727,6 pg/ml; \*\* $p \leq 0,01$ ; 1,0  $\mu$ g/ml: 815,4 pg/ml; \*\* $p \leq 0,01$ ) festgestellt werden. Auch die Stimulation der Leberlymphozyten mit *EhPIb* C30:1 trans induzierte eine signifikant erhöhte IFN  $\gamma$ -Konzentration (136,1 pg/ml; \* $p \leq 0,05$ ) im Überstand. Die IFN  $\gamma$ -Produktion nach Behandlung mit *EhPIa* C30:1 cis (583,6 pg/ml), *EhPIb* C30:1 cis (27,3 pg/ml), *EhPIb* C16:0 LR (0,01  $\mu$ g/ml: 207,8 pg/ml; 0,1  $\mu$ g/ml: 240,4 pg/ml; 1,0  $\mu$ g/ml: 74,4 pg/ml), *EhPIb* C16:0 1,3 PdD (1,0  $\mu$ g/ml: 2368,9  $\mu$ g/ml) und *EhPIb* C16:0 1,3 PdL war messbar, jedoch im Vergleich zur Medium-Kontrolle nicht signifikant erhöht. Die IFN  $\gamma$ -Konzentrationen nach Stimulation mit *EhPIb* C28:0 (184,3 pg/ml), *EhPIb* C16:0 DR (0,01  $\mu$ g/ml: 3,04 pg/ml; 0,1  $\mu$ g/ml: 2,24 pg/ml; 1,0  $\mu$ g/ml: 5,7 pg/ml), *EhPIb* C16:0 LS (0,01  $\mu$ g/ml: 17,13 pg/ml; 0,1  $\mu$ g/ml: 2,87 pg/ml, 1,0  $\mu$ g/ml: 5,42 pg/ml) lagen nur geringfügig über dem Detektionslimit des verwendeten ELISAs und besitzen damit keinen stimulierenden Effekt auf die Leberlymphozyten.



**Abbildung 15: Bestimmung der induzierten IFN  $\gamma$ -Konzentration muriner Leberlymphozyten nach Stimulation mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge.**  $5 \times 10^4$  DCs wurden mit  $1 \mu\text{g/ml}$   $\alpha$ GalCer,  $20 \mu\text{g/ml}$  *EhLPPG* oder den synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1 & 2 ( $0,01 - 1 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. 4 Std später erfolgte die Zugabe von  $5 \times 10^5$  murinen Leberlymphozyten. Die IFN  $\gamma$ -Konzentration der Lymphozyten wurde im Überstand nach 24 Std mittels ELISA gemessen. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, *unpaired Student's t test*, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

Neben der IFN  $\gamma$ -Konzentration ist auch die IL 4-Produktion ein Indiz für iNKT-Zellaktivierung, weshalb die Überstände des Zellzytokinexpressionsassays auch auf ihren IL 4-Gehalt überprüft wurden. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, war eine signifikante IL 4-Konzentration nach Stimulation mit  $\alpha$ GalCer ( $312 \text{ pg/ml}$ ; \* $p \leq 0,05$ ) wie auch *EhLPPG* ( $1578,4 \text{ pg/ml}$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ) im Überstand nach 24 Std messbar. Die Behandlung mit *EhPIb* C16:0 DS ( $0,1 \mu\text{g/ml}$ :  $3101,1 \text{ pg/ml}$ ;  $1,0 \mu\text{g/ml}$ :  $305,9 \text{ pg/ml}$ ) und *EhPIb* C16:0 1,3 PdD ( $0,1 \mu\text{g/ml}$ :  $556,2 \text{ pg/ml}$ ;  $1,0 \mu\text{g/ml}$ :  $3841 \text{ pg/ml}$ ) führte zwar zu einer erhöhten Produktion von IL 4, diese ist jedoch nicht signifikant. Auch die Stimulation von *EhPIa* C30:1 cis ( $118 \text{ pg/ml}$ ), *EhPIb* C16:0 LR ( $0,01 \mu\text{g/ml}$ :  $34,3 \text{ pg/ml}$ ;  $0,1 \mu\text{g/ml}$ :  $7,7 \text{ pg/ml}$ ), *EhPIb* C16:0 LS ( $0,01 \mu\text{g/ml}$ :  $47,9 \text{ pg/ml}$ ) und *EhPIb* C16:0 1,3 PdD ( $0,01 \mu\text{g/ml}$ :  $62 \text{ pg/ml}$ ) induzierte in den Leberlymphozyten nur eine sehr geringe IL 4-Menge. Die Behandlung mit *EhPIb* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 trans, *EhPIb* C28:0 und *EhPIb* C16:0 DR ergab keine stimulierende Wirkung auf die IL 4-Produktion.



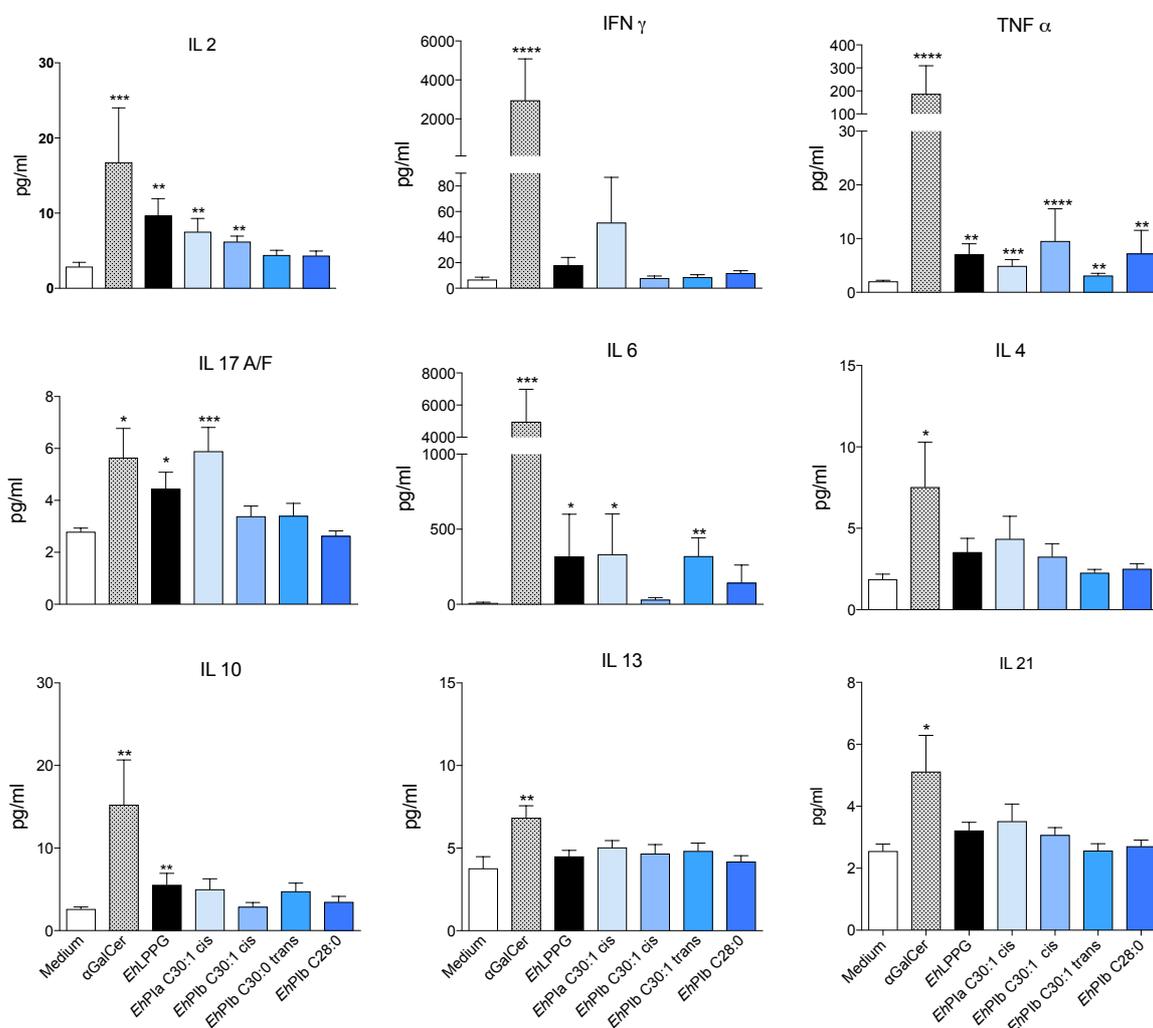
**Abbildung 16: Bestimmung der induzierten IL 4-Konzentration muriner Leberlymphozyten nach Stimulation mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga.**  $5 \times 10^4$  DCs wurden mit  $1 \mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{GalCer}$ ,  $20 \mu\text{g/ml}$  *EhLPPG* oder den synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 1 & 2 ( $0,01 - 1 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. 4 Std später erfolgte die Zugabe von  $5 \times 10^5$  murinen Leberlymphozyten. Die IL 4-Konzentration der Lymphozyten wurde im Überstand nach 24 Std mittels ELISA gemessen. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, *unpaired Student's t test*, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

### 3.1.3. Zytokinprofil humaner PBMCs nach Stimulation mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga mittels LEGENDplex™

Um die immunstimulatorischen Eigenschaften von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga zu untersuchen, wurden humane PBMCs aus Spenderblut zusammen mit den genannten Stimulanzien für 48 Std inkubiert. Die Überstände wurden mit einem LEGENDplex™-Kit aufgearbeitet und am Durchflusszytometer gemessen.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, führte die  $\alpha\text{GalCer}$ -Stimulation der humanen PBMCs zu einer hoch signifikanten Produktion aller pro- und anti-inflammatorischen Zytokine im Vergleich zur Kontrolle. Die Stimulation mit *EhLPPG* hingegen induzierte deutlich geringere Zytokin-Konzentrationen, mit einem größeren Einfluss auf die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL 2, TNF  $\alpha$ , IL 17, IL 6) als auf das anti-inflammatorische Zytokine (IL 10). Eine Behandlung der PBMCs mit *EhPIa* C30:1 cis hatte keinen Effekt auf die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine (IL 4, IL 10, IL 13), führte aber bei den pro-inflammatorischen Zytokinen (IL 2, TNF  $\alpha$ , IL 17A/F, IL 6) zu einem vergleichbaren Expressionslevel wie dem das durch *EhLPPG* induziert wurde. *EhPIb* C30:1 cis stimulierte ebenfalls die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL 2 und TNF  $\alpha$ . Die Stimulation mit *EhPIb* C30:1 trans und *EhPIb* C28:0 induzierte die Expression von TNF  $\alpha$ ,

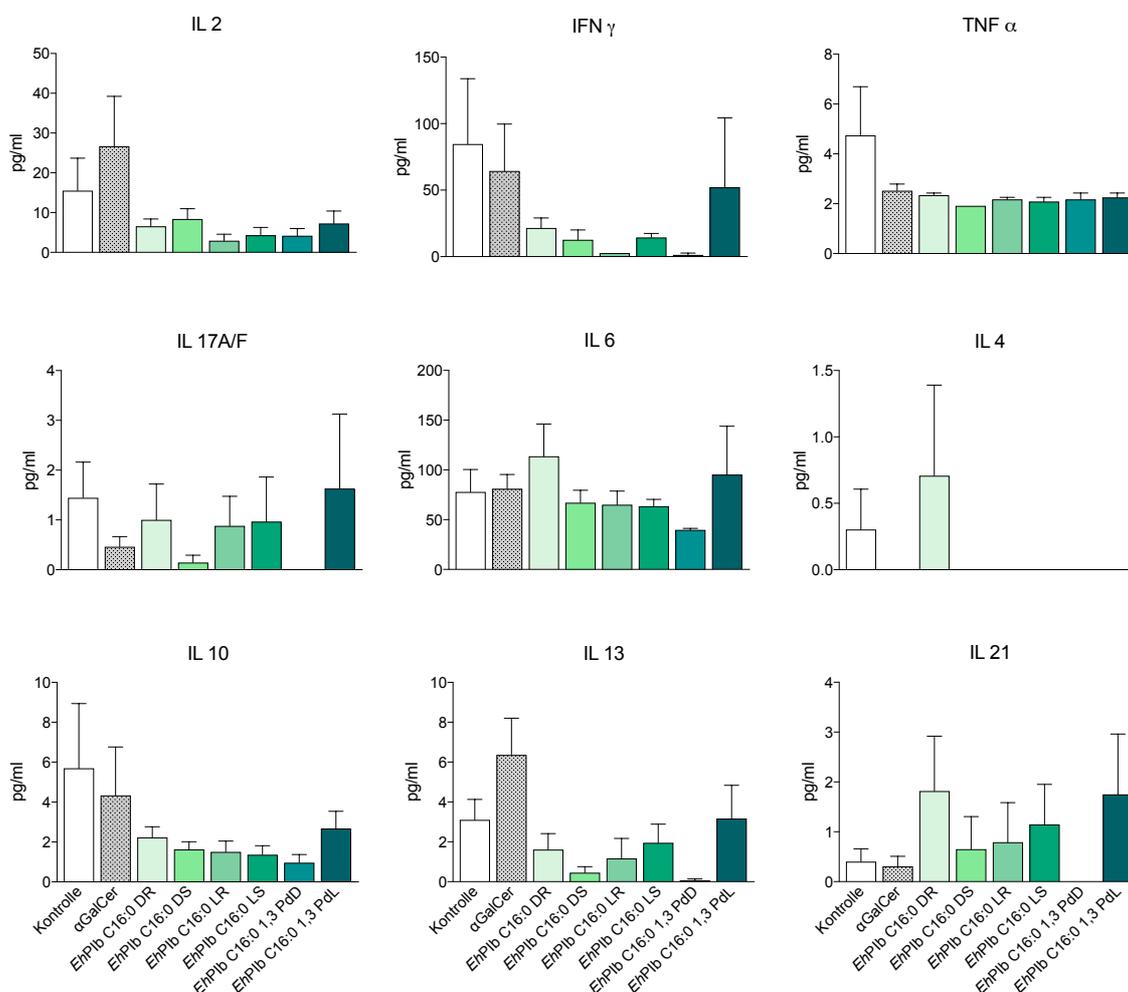
die Behandlung mit *EhPIb C28:0* zeigte darüber hinaus jedoch noch ein höheres IL 6-Level in den humanen PBMCs (Choy, Bernin et al. 2017).



**Abbildung 17: Induziertes Zytokinprofil humaner PBMCs nach Stimulation mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga.**  $1 \times 10^6$  PBMCs wurden zusammen mit  $1 \mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{GalCer}$ ,  $5 \mu\text{g/ml}$  *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 1 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) für 24 Std inkubiert. Die Überstände wurden anschließend im LEGENDplex™-Assay eingesetzt und die Zytokinkonzentrationen durchflusszytometrisch bestimmt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $n=4$ , *unpaired Student's t test*, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

Die zweite Gruppe synthetischer *EhPI*-Analoga, die in ihrem stereometrischen Zentrum modifiziert wurden, wurden ebenfalls mit humanen PBMCs für 48 Std inkubiert und das induzierte Zytokinprofil ermittelt (Abbildung 18). Im Vergleich zu der ersten Gruppe an synthetischen *EhPI*-Analoga, die in ihrer Sättigung der langen Fettsäurekette modifiziert sind, waren die Expressionslevel für IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  und IL 4 in den stimulierten PBMCs deutlich geringer. Weder die Stimulation mit  $\alpha\text{GalCer}$ , noch mit den synthetischen *EhPI*-Analoga

*EhPI* C16:0 DR, *EhPI* C16:0 DS, *EhPI* C16:0 LR, *EhPI* C16:0 LS, *EhPI* C16:0 1,3 PdD oder *EhPI* C16:0 1,3 PdL führte zu einem signifikanten Unterschied in der Zytokinproduktion im Vergleich zur Kontrolle. Die DMSO-Kontrolle fiel hingegen relativ hoch aus.



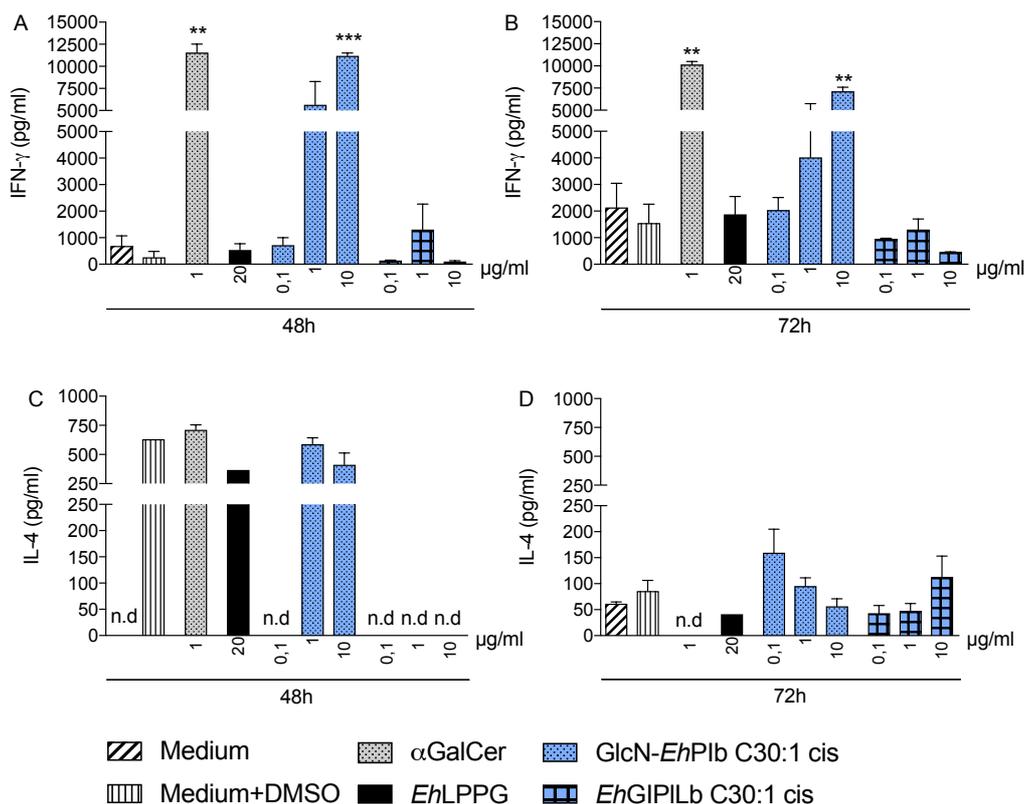
**Abbildung 18: Induziertes Zytokinprofil humaner PBMCs nach Stimulation mit den synthetischen *EhPI*-Analoga.**  $1 \times 10^6$  PBMCs wurden zusammen mit  $1 \mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{GalCer}$  und den synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 2 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) für 48 Std inkubiert. Die Überstände wurden anschließend im LEGENDplex™-Assay eingesetzt und die Zytokinkonzentrationen durchflusszytometrisch bestimmt.  $n=4$ .

### 3.1.4. Zytokinprofil muriner Lymphozyten nach Stimulation mit glykosylierten *EhPI*-Analoga

Die Behandlung von Immunzellen mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga bestätigte deren stimulatorische Eigenschaften. Zur potentiellen Verbesserung dieser Eigenschaften wurden GlcN-*EhPIb* C30:1 cis und *EhGIPIb* C30:1 cis auf der Basis der synthetischen *EhPI*-Analoga aus der Gruppe 1 zusätzlich an deren Inositolring glykosyliert (Aiba, Suehara, Choy et al. 2017). Beide Moleküle wurden in dem Zellzytokinexpressionassay mit Leberlymphozyten auf ihre immunstimulatorischen Eigenschaften hin untersucht. Dafür wurden DCs für 3 Std mit den Stimulanzen inkubiert und anschließend Leberlymphozyten hinzugegeben. Der Überstand wurde nach 48 Std und 72 Std abgenommen und die IFN  $\gamma$ - sowie die IL 4-Konzentration bestimmt.

Wie in Abbildung 19 A und B zu sehen ist, führte die  $\alpha$ GalCer-Stimulation nach 48 Std zu einem hoch signifikanten Anstieg der IFN  $\gamma$ -Konzentration (11561 pg/ml;  $**p \leq 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle (690 pg/ml), die auch nach 72 Std weiterhin signifikant erhöht war (10162 pg/ml;  $**p \leq 0,01$ ). Nach der Stimulation mit GlcN-*EhPIb* C30:1 cis war eine konzentrationsabhängige IFN  $\gamma$ -Produktion festzustellen (24 Std und 48 Std). Die IFN  $\gamma$ -Produktion war nach Zugabe von 10  $\mu$ g GlcN-*EhPIb* C30:1 cis-Behandlung signifikant erhöht (24 Std: 11189 pg/ml,  $***p \leq 0,001$ ; 48 Std: 7131 pg/ml;  $**p \leq 0,01$ ). Die Stimulation mit *EhGIPIb* C30:1 cis hatte keinen Effekt auf die IFN  $\gamma$ -Expression der Leberlymphozyten.

Die IL 4-Produktion wurde hingegen weder durch die Behandlung mit  $\alpha$ GalCer oder *EhLPPG* noch mit den beiden glykosylierten *EhPI*-Analoga signifikant erhöht (48 Std und 72 Std, Abbildung 19 C und D). Nach 72 Std war lediglich mit GlcN-*EhPIb* C30:1 cis eine konzentrationsabhängige IL 4-Produktion festzustellen war. Mit steigender Konzentration an GlcN-*EhPIb* C30:1 cis sank die Menge an IL 4 (0,1  $\mu$ g/ml: 159 pg/ml; 1,0  $\mu$ g/ml: 96 pg/ml; 10  $\mu$ g/ml: 56 pg/ml). Eine *EhGIPIb* C30:1 cis-Behandlung wiederum führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der IL 4-Produktion (0,1  $\mu$ g/ml: 43 pg/ml; 1,0  $\mu$ g/ml: 47 pg/ml; 10  $\mu$ g/ml: 114 pg/ml).

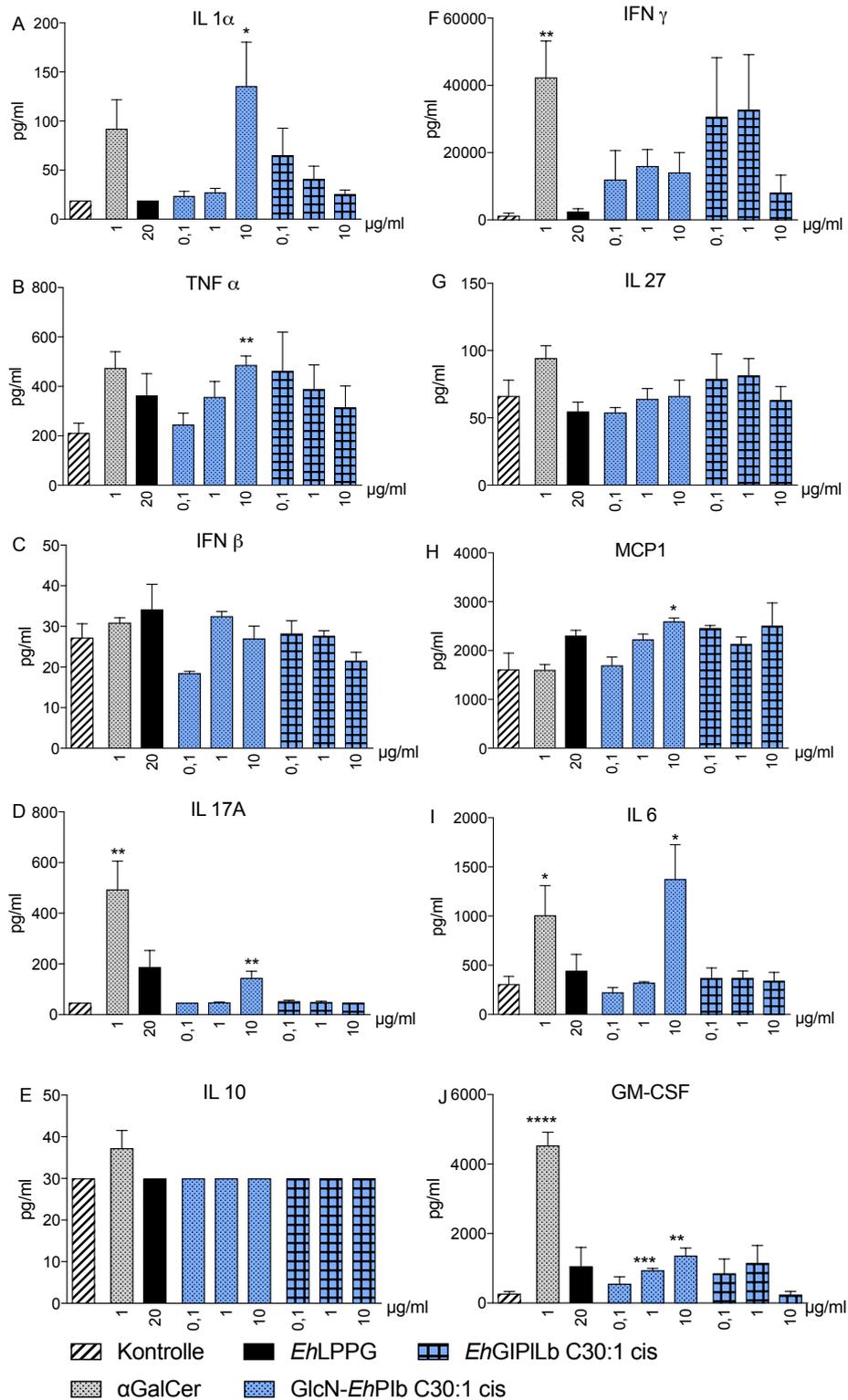


**Abbildung 19: Induzierte IFN  $\gamma$ - und IL 4-Produktion muriner Lymphozyten nach Stimulation mit den glykosylierten EhPI-Analoga GLcN-EhPIb C30:1 cis und EhGIPIb C30:1 cis.**  $5 \times 10^4$  DCs wurden mit 1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{GalCer}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$  EhLPPG oder den glykosylierten EhPI-Analoga (0,01 - 10  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. 4 Std später erfolgte die Zugabe von  $5 \times 10^5$  murinen Leberlymphozyten. Die IFN  $\gamma$ -Konzentration der Lymphozyten wurde im Überstand nach 48 Std (A) und 72 Std (B) mittels ELISA ermittelt. Die IL 4-Konzentration der Lymphozyten wurde ebenfalls im Überstand nach 48 Std (C) und 72 Std (D) gemessen. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, *unpaired Student's t test*, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Die Analyse des Zytokinprofils mittels ELISA hat gezeigt, dass die glykosylierten EhPI-Analoga GlcN-EhPIb C30:1 cis und EhGIPIb C30:1 cis einen Einfluss auf die IFN  $\gamma$ - und IL 4-Produktion besitzen. Um dieses Zytokinprofil, das nach Stimulation mit den glykosylierten EhPI-Analoga induziert wurde, näher zu definieren, wurde ein LEGENDplex™ Assay durchgeführt. Mit diesem Assay wurden zehn Zytokine (IL 1 $\alpha$ ; IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL 27, IFN  $\beta$ , MCP1, IL 17A, IL 6, IL 10, GM-CSF) in einer Probe gleichzeitig gemessen. Dafür wurden die Überstände zum Zeitpunkt 48 Std nach Behandlung aus dem Zellzytokinexpressionassay mit Leberlymphozyten im LEGENDplex™ Assay verwendet (Abbildung 20 A-J).

Die Stimulation mit  $\alpha\text{GalCer}$  führte zu einer gesteigerten Produktion der Zytokine IL 17A (494,2 pg/ml, \*\* $p \leq 0,01$ ), IFN  $\gamma$  (42361,9,0 pg/ml), IL 6 (1008,2 pg/ml, \* $p \leq 0,05$ ) und des Glykoproteins GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, 3406,1 pg/ml, \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Des Weiteren führte die GLcN-EhPIb C30:1 cis-Stimulation zu

einem signifikanten Anstieg der Zytokinproduktion von IL 1 $\alpha$  (135,6 pg/ml, \*p $\leq$  0,05), TNF  $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ , 487,2 pg/ml, \*\*p $\leq$  0,01), IL 17A (145,3 pg/ml, \*\*p $\leq$  0,01), IL 6 (1375,6 pg/ml, \*p $\leq$  0,05) und MCP 1 (*monocyte chemoattractant protein 1*, auch CC-Chemokinligand 2, CCL2; 2594,7 pg/ml, \*p $\leq$  0,05). Im Gegensatz dazu induzierte die Behandlung mit *EhLPPG* und dem glykosyliertem *EhPI*-Analogon *EhGIPIb* C30:1 cis keine stimulierende Wirkung auf die Zellen.



**Abbildung 20: Induziertes Zytokinprofil muriner Leberlymphozyten nach Stimulation mit *EhLPPG* und den glykosylierten *EhPI*-Analoga *GLcN-EhPIb C30:1 cis* und *EhGPIIb C30:1 cis*.**  $5 \times 10^4$  DCs wurden mit 1 μg/ml αGalCer, 20 μg/ml *EhLPPG* oder den glykosylierten *EhPI*-Analoga (0,01 - 10 μg/ml) inkubiert. 4 Std später erfolgte die Zugabe von  $5 \times 10^5$  murinen Leberlymphozyten. Nach 48 Std wurde die Zytokinproduktion im Überstand mittels LEGENDplex™ gemessen. Produktion der Zytokine von IL 1α (A), TNF α (B), IFN β (C), IL 17A (D), IL 10 (E), IFN γ (F), IL 27 (G), MCP 1 (H), IL 6 (I), GM-CSF (J). Mittelwert ± Standardfehler, unpaired Student's *t* test, \**p* ≤ 0,05, \*\**p* ≤ 0,01, \*\*\**p* ≤ 0,001, \*\*\*\**p* ≤ 0,0001.

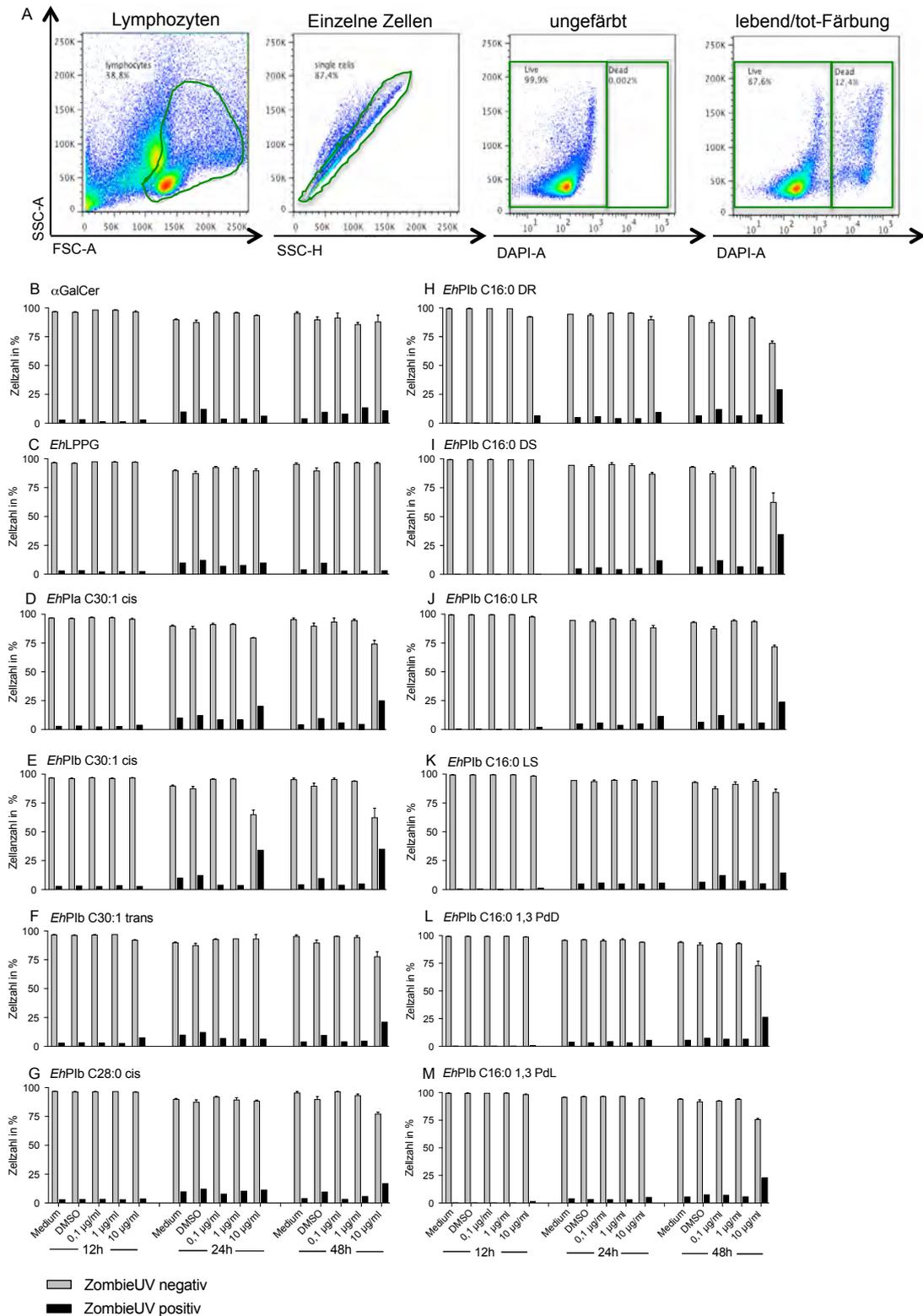
## 3.2. Evaluierung der Toxizität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI-Analoga*

Damit ausgeschlossen werden kann, dass die immunstimulatorischen Fähigkeiten von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI-Analoga* nicht auf toxischen Eigenschaften zurück zu führen sind und mögliche Nebeneffekte vermieden werden, wurden zwei Toxizitätsassays durchgeführt. Zum einem wurde ein klassischer Toxizitätsassay durchgeführt, der die Zytotoxizität der Moleküle auf murinen Lymphozyten und humanen PBMCs bestimmt, und zum anderem wurde die hämolytische Aktivität der genannten Moleküle gegenüber humanen Erythrozyten ermittelt.

### 3.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI-Analoga* in murinen Milzlymphozyten

Um die zytotoxischen Eigenschaften von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI-Analoga* zu bestimmen, wurden murine Milzlymphozyten für 12 Std, 24 Std und 48 Std zusammen mit den zu untersuchenden Molekülen inkubiert. Die murinen Lymphozyten wurden anschließend mit dem Lebend-Tot-Farbstoff ZombieUV™ gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. In der Analyse erscheinen lebende Zellen ZombieUV™ negativ, während tote Zellen ZombieUV™ positiv sind. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden zunächst die Lymphozyten ausgewählt (SSC-A gegen FSC-A, Abbildung 21 A). Die einzelnen Lymphozyten wurden anschließend von Dubletten separiert (SSC-A gegen SSC-H) und die Lebend-Tot-Diskriminierung im Kanal SSC-A gegen DAPI-A durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Anteil toter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Molekülkonzentration und der Inkubationszeit mit den synthetischen *EhPI-Analoga* (0,1 - 10 µg/ml) prozentual leicht anstieg (Abbildung 21 B-M), während die Behandlung mit αGalCer und *EhLPPG* lediglich eine niedrige Zytotoxizität mit max. 13 % toter Zellen nach 48 Std induzierte und damit vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle ist (8 %-13 % ZombieUV™ positiv). Die synthetischen *EhPI-Analoga* *EhPIb* C30:1 cis (10 µg/ml: 35 % ZombieUV™ positiv) und *EhPIb* C16:0 DS (10 µg/ml: 34,7 % ZombieUV™ positiv) hingegen führten zu einer gesteigerten Toxizität nach 48 Std. Die weiteren synthetischen *EhPI-Analoga* (*EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 trans, *EhPIb* C28:0, *EhPIb* C16:0 DR, *EhPIb* C16:0 LR, *EhPIb* C16:0 LS, *EhPIb* C16:0 1,3 PdD *EhPIb* C16:0 1,3 PdL) induzierten nur geringfügige zytotoxische Effekte (48 Std. 14 % - 26 % ZombieUV™ positiv).



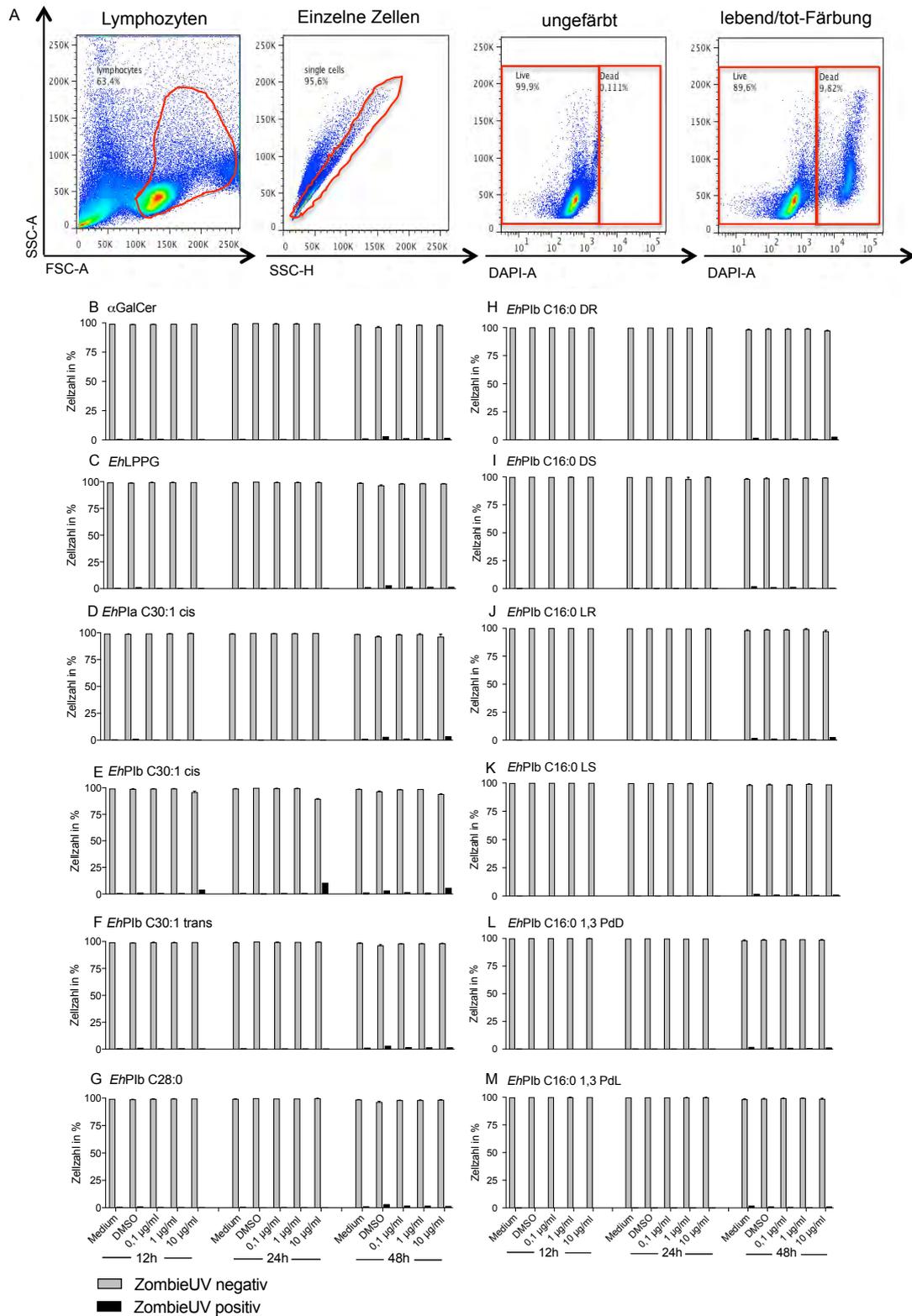
**Abbildung 21: Zytotoxizität von EhLPPG und den synthetischen EhPI-Analoga in murinen Milzlymphozyten.** Murine Milzlymphozyten wurden zusammen mit  $\alpha$ GalCer, EhLPPG oder den synthetischen EhPI-Analoga der Gruppe 1 & 2 (0,1 - 10  $\mu$ g/ml) für 12 Std, 24 Std und 48 Std inkubiert und anschließend mit ZombieUV<sup>TM</sup> gefärbt. Lebende (ZombieUV<sup>TM</sup> negativ) sowie tote (ZombieUV<sup>TM</sup> positiv) Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und anhand dessen die Zytotoxizität bestimmt. Gating Strategie muriner Lymphozyten (A). Prozentualer Anteil ZombieUV<sup>TM</sup> positiver bzw. negativer Zellen nach 12 Std-, 24 Std- und 48 Std-Inkubation mit  $\alpha$ GalCer (B), EhLPPG (C), EhPIa C30:1 cis (D), EhPIb C30:1 cis (E), EhPIb C30:1 trans (F), EhPIb C28:0 (G), EhPIb C16:0 DR (H), EhPIb C16:0 DS (I), EhPIb C16:0 LR (J), EhPIb C16:0 LS (K), EhPIb C16:0 1,3 PdD (L), EhPIb C16:0 1,3 PdL (M).

### 3.2.2 Bestimmung der Zytotoxizität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in humanen PBMCs

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in humanen PBMCs wurden  $1 \times 10^6$  PBMCs zusammen mit den zu untersuchenden Molekülen inkubiert. Nach 12 Std, 24 Std und 48 Std wurden die humanen Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff ZombieUV™ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. ZombieUV™ negativ erscheinende lebende Zellen, wohingegen ZombieUV™ positive Zellen abgestorben sind.

Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden zunächst die Lymphozyten ausgewählt (SSC-A gegen FSC-A, Abbildung 22 A). Anschließend wurden die einzelnen Lymphozyten von den Dubletten separiert (SSC-A gegen SSC-H). Im Kanal SSC-A gegen DAPI-A wurde die Lebend-Tot-Diskriminierung mittels ZombieUV™-Farbstoff durchgeführt.

Die Analyse am Durchflusszytometer zeigte, dass die Behandlung mit  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga nur minimale zytotoxische Effekte auf humane Zellen induzierte (48 Std: 2 % - 4 % ZombieUV™ positiv, Abbildung 22 B-M) und sind damit vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle (48 Std: max. 4 % ZombieUV™ positiv). Allein das synthetische *EhPI*-Analogon *EhPIb* C30:1 cis führte zu einer erhöhten Zytotoxizität nach 48 Std der Zellen (10  $\mu$ g/ml: 11% ZombieUV™ positiv).



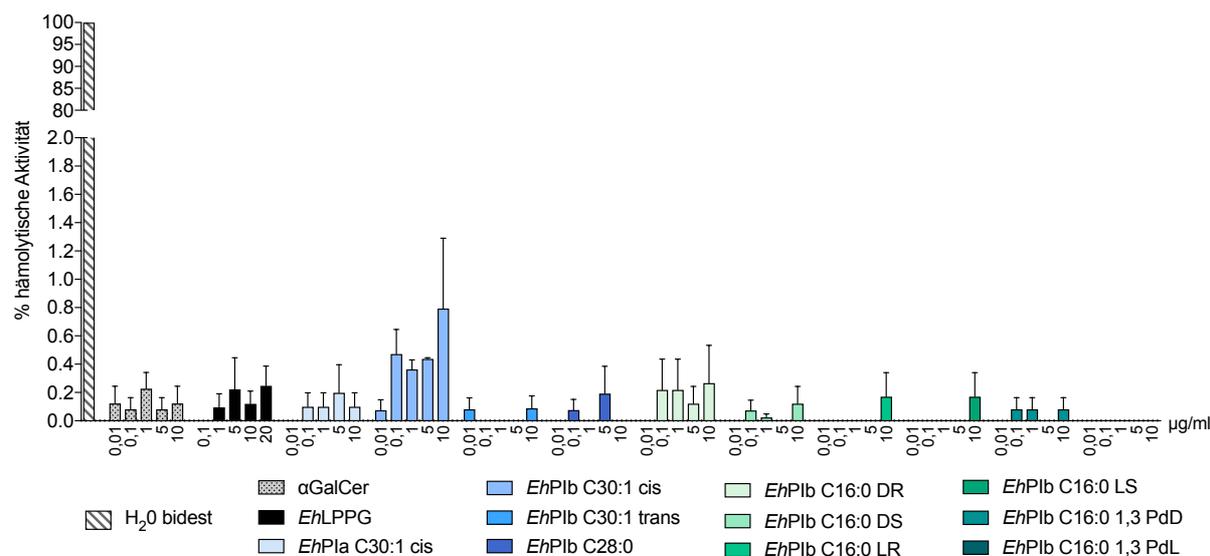
**Abbildung 22: Zytotoxizität von EhLPPG und den synthetischen EhPI-Analoga in humanen PBMCs.** Humane PBMCs wurden zusammen mit  $\alpha$ GalCer, EhLPPG oder den synthetischen EhPI-Analoga der Gruppe 1& 2 (0,1 - 10  $\mu$ g/ml) für 12 Std, 24 Std und 48 Std inkubiert und anschließend mit ZombieUV<sup>TM</sup> gefärbt. Lebende (ZombieUV<sup>TM</sup> negativ) sowie tote (ZombieUV<sup>TM</sup> positiv) Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und anhand dessen die Zytotoxizität bestimmt. Gating Strategie muriner Lymphozyten (A). Prozentualer Anteil ZombieUV<sup>TM</sup> positiver bzw. negativer Zellen nach 12 Std-, 24 Std- und 48 Std-Inkubation mit  $\alpha$ GalCer (B), EhLPPG (C), EhPIa C30:1 cis (D), EhPIb C30:1 cis (E), EhPIb C30:1 trans (F), EhPIb C28:0 (G), EhPIb C16:0 DR (H), EhPIb C16:0 DS (I), EhPIb C16:0 LR (J), EhPIb C16:0 LS (K), EhPIb C16:0 1,3 PdD (L), EhPIb C16:0 1,3 PdL (M).

### 3.2.3 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in humanen Erythrozyten

Die hämolytische Aktivität ermittelt inwieweit eine bestimmte Substanz in der Lage ist, Erythrozyten zu lysieren. Ein Befund, der für die Entwicklung eines potentiellen Therapeutikums von Bedeutung ist. Hierfür wurden humane Erythrozyten zusammen mit  $\alpha$ GalCer (0,01 - 10  $\mu$ g/ml), *EhLPPG* (0,1 - 20  $\mu$ g/ml) oder den synthetischen *EhPI*-Analoga (0,01 - 10  $\mu$ g/ml) für 1 Std inkubiert. Anschließend wurde der Überstand photometrisch gemessen, um die hämolytische Aktivität zu berechnen.

Generell wiesen die Moleküle eine sehr geringe hämolytische Aktivität von unter 1 % auf (Abbildung 23). Die stärkste hämolytische Aktivität induzierte *EhPIb* C30:1 cis mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml, was zu einer Hämolyse von 0,8 % führte. Die Inkubation aller anderen Stimulanzen bewirkte eine maximale Hämolyse der Erythrozyten von unter 0,5 %.  $\alpha$ GalCer war mit einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml hämolytisch am aktivsten (0,23 %), während *EhLPPG* sein Höchstwert mit 20  $\mu$ g/ml erreichte (0,25 %). Die Behandlung mit *EhPIa* C30:1 cis oder *EhPIb* C28:0 erreichte mit 5  $\mu$ g/ml ihr Maximum an hämolytischer Aktivität (*EhPIa* C30:1 cis: 0,2 %; *EhPIb* C28:0: 0,2 %; Choy et al 2017). *EhPIb* C30:1 trans, *EhPIb* C16:0 DR, *EhPIb* C16:0 DS, *EhPIb* C16:0 LR, *EhPIb* C16:0 LS sowie *EhPIb* C16:0 1,3 PdD entwickelten mit 10  $\mu$ g/ml ihre maximale hämolytischen Eigenschaft. Das *EhPI*-Analogon, *EhPIb* C16:0 1,3 PdL, induzierte in allen getesteten Konzentrationen keine Hämolyse.

$\alpha$ GalCer, *EhLPPG* sowie die synthetischen *EhPI*-Analoga wiesen lediglich eine sehr niedrige hämolytische Aktivität mit nicht mehr als 1 % auf, sodass die Moleküle bedenkenlos weiter untersucht werden können im Hinblick auf den Einsatz am Patienten.



**Abbildung 23: Bestimmung der hämolytischen Aktivität von  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga.** Humane Erythrozyten wurden mit  $\alpha$ GalCer (0,01 - 10  $\mu$ g/ml), *EhLPPG* (0,1 - 20  $\mu$ g/ml) oder den synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 1 & 2 (0,01 - 10  $\mu$ g/ml) für 1 Std bei 37°C inkubiert. Die hämolytische Aktivität der Moleküle wurde photometrisch bei 530 nm gemessen und im Vergleich zur 100-prozentigen Hämolyse berechnet. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, n=2 - 4.

### 3.3 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga gegen die kutanen Leishmaniose

Unterschiedliche Immunzellen wie dendritische Zellen oder Makrophagen können durch  $\alpha$ GalCer und das native Molekül *EhLPPG* stimuliert und aktiviert werden. Es wurde gezeigt (Doktorarbeit Hannah Bernin, 2014), dass die Behandlung mit *EhLPPG* sowohl zu einer Senkung des prozentualen Anteils infizierter Makrophagen als auch zu einer Verminderung der Parasitenlast in den infizierten Makrophagen führte. In dieser Arbeit sollte das immuntherapeutische Potential von *EhLPPG* und den davon abgeleiteten *EhPI*-Analoga im Krankheitsbild der kutanen Leishmaniose untersucht werden. Dafür wurde der Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in einem *in vitro*-Leishmanien-Infektionsassay mit murinen und humanen Makrophagen untersucht.

#### 3.3.1 Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auf *in vitro* *L. major*-infizierte murine Knochenmarksmakrophagen

Um das immuntherapeutische Potential von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in der kutanen Leishmaniose zu evaluieren, wurde ein murines *L. major*-Infektionsmodell durchgeführt.  $1,5 \times 10^6$  BMMs wurden mit  $7,5 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten

(Stamm 5ASKH, passagiert in der Balb/c-Maus) infiziert und mit den zu untersuchenden Molekülen behandelt. 48 Std später wurde die gDNA isoliert und in der TaqMan Sonden-qPCR eingesetzt. Zur Bestimmung der Parasitenlast wurde die gemessene *L. major* Aktin DNA-Menge ins Verhältnis zur murinen  $\beta$ -Aktin DNA-Menge gesetzt.

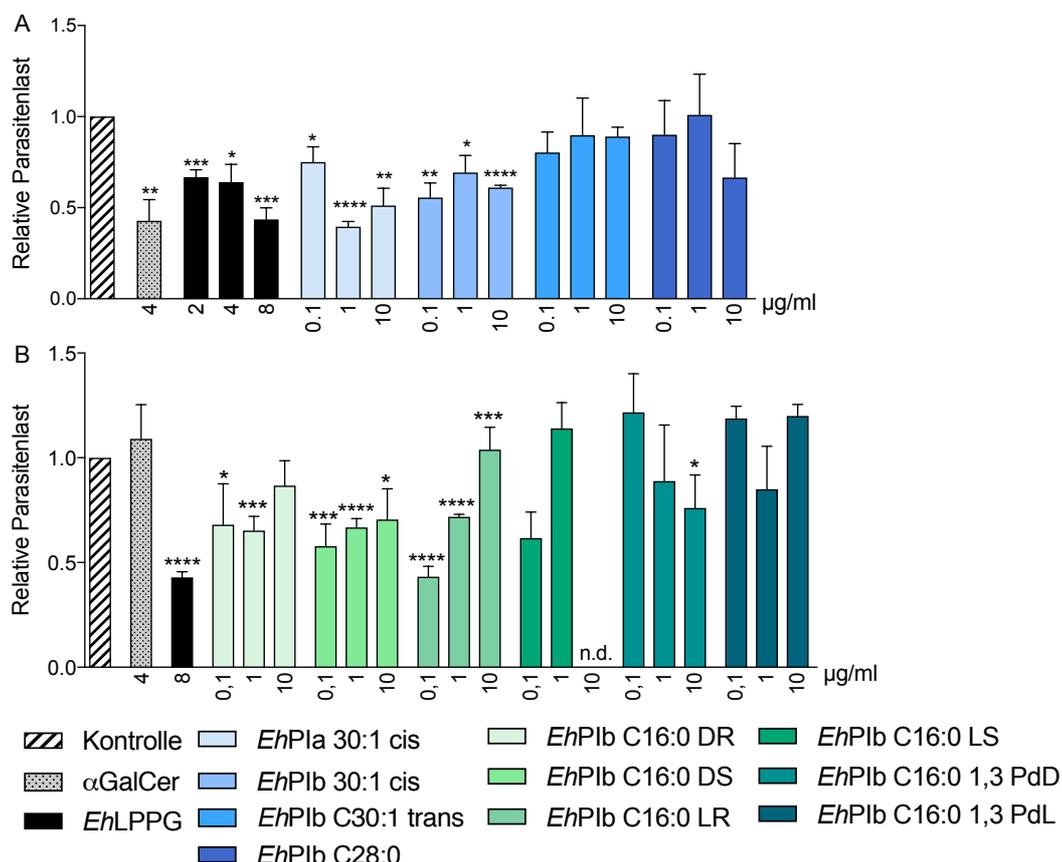
Abbildung 24 zeigt die relative Parasitenlast nach *in vitro* *L. major*-Infektion muriner BMMs und anschließender Behandlung mit  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* oder den synthetischen *EhPI*-Analoge (Gruppe 1: A, Gruppe 2: B).

Die  $\alpha$ GalCer-Behandlung führte zu einer signifikanten Senkung der Parasitenlast in den *L. major*-infizierten BMMs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (\*\* $p \leq 0,01$ , Abbildung 24 A). Ebenso war eine signifikante Reduktion der Leishmanien nach Behandlung mit 4  $\mu\text{g/ml}$  des nativen Moleküls *EhLPPG* zu dieser Kontrolle festzustellen (\* $p \leq 0,05$ ). Die Inkubation mit 2  $\mu\text{g/ml}$  oder 8  $\mu\text{g/ml}$  dieses Moleküls senkte die Anzahl an Leishmanien sogar hoch signifikant (2  $\mu\text{g/ml}$ : \*\*\* $p \leq 0,001$ ; 8  $\mu\text{g/ml}$ : \*\* $p \leq 0,001$ ). Die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1 *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis senkten in allen drei Konzentrationen die Parasitenlast in den infizierten Makrophagen. Während der signifikante Unterschied von *EhPIa* C30:1 cis mit einer Dosis von 1  $\mu\text{g/ml}$  am höchsten ausfiel (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ), erzielte *EhPIb* C30:1 cis seine größte Wirkung mit 10  $\mu\text{g/ml}$  (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Die Behandlung mit *EhPIb* C30:1 trans und *EhPIb* C28:0 hatte keinen Einfluss auf die Leishmanien-infizierten Makrophagen (Choy, Bernin et al. 2017).

Abbildung 24 B zeigt die Ergebnisse des Leishmanien-Infektionsassays mit Behandlung synthetischer *EhPI*-Analoge der Gruppe 2. *EhPI* C16:0 DR induzierte eine signifikante Senkung der Parasitenlast in den infizierten Makrophagen, wobei diese sogar hoch signifikant nach Behandlung mit 1  $\mu\text{g/ml}$  des Moleküls ausfiel (\*\*\* $p \leq 0,001$ ). Die Moleküle *EhPI* C16:0 DS und *EhPI* C16:0 LR reduzierten die Menge der Leishmanien signifikant in allen drei Konzentrationen (0,1-10  $\mu\text{g/ml}$ ). *EhPI* C16:0 DS erzielte mit einer Dosis von 1  $\mu\text{g/ml}$  den höchsten signifikanten Unterschied (\*\*\* $p \leq 0,001$ ), während *EhPI* C16:0 LR in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  die Parasitenlast mit den höchsten Signifikanz senkte (\*\*\* $p \leq 0,001$ ). Darüber hinaus war eine Reduktion der Menge an Leishmanien nach Inkubation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  *EhPI* C16:0 1,3 PdD nachzuweisen. Die Behandlung mit *EhPI* C16:0 LS und *EhPI* C16:0 1,3 PdL hingegen führte zu keiner therapeutischen Wirkung in den *L. major*-infizierten Makrophagen.

Die Ergebnisse des murinen Infektionsassays zeigen, dass  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* sowie die synthetischen *EhPI*-Analoge *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis, *EhPI* C16:0 DR,

*EhPI C16:0 DS*, *EhPI C16:0 LR* und *EhPI C16:0 1,3 PdD* ein immuntherapeutisches Potential auf *L. major*-infizierte Makrophagen besitzen. Des Weiteren wurde die therapeutische Wirkungs-dosis individuell für jedes Molekül in dem murinen Infektionsmodell ermittelt.



**Abbildung 24: Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auf *in vitro* *L. major*-infizierte murine Knochenmarksmakrophagen.**  $1,5 \times 10^6$  BMDMs wurden mit  $7,5 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert und anschließend mit 4 µg/ml  $\alpha$ GalCer, 8 µg/ml *EhLPPG* oder den synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 1 & 2 (0,1 - 10 µg/ml) behandelt. Nach 48 Std wurde die gDNA isoliert und zur Bestimmung der Parasitenlast in einer TaqMan Sonden qPCR eingesetzt. Relative Parasitenlast der synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 1 (A) und der Gruppe 2 (B). Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, n=3, unpaired Student's t test, \*p $\leq$  0,05, \*\*p $\leq$  0,01, \*\*\*p $\leq$  0,001, \*\*\*\*p $\leq$  0,0001.

### 3.3.1.1 Evaluierung des induzierten Zytokinprofils *L. major*-infizierter muriner

#### Makrophagen nach Behandlung von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga

Zytokine sind essentiell an der Regulation der Immunantwort auf Pathogene und krankhafte Zellen beteiligt und bieten damit eine vielversprechende Ansatzmöglichkeit für Immuntherapien (Kopf, Bachmann et al. 2010). Wie wir nachweisen konnten, führt die Stimulation mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga zu einer Induktion bzw. Reduktion verschiedener Zytokine in murinen und humanen Lymphozyten.

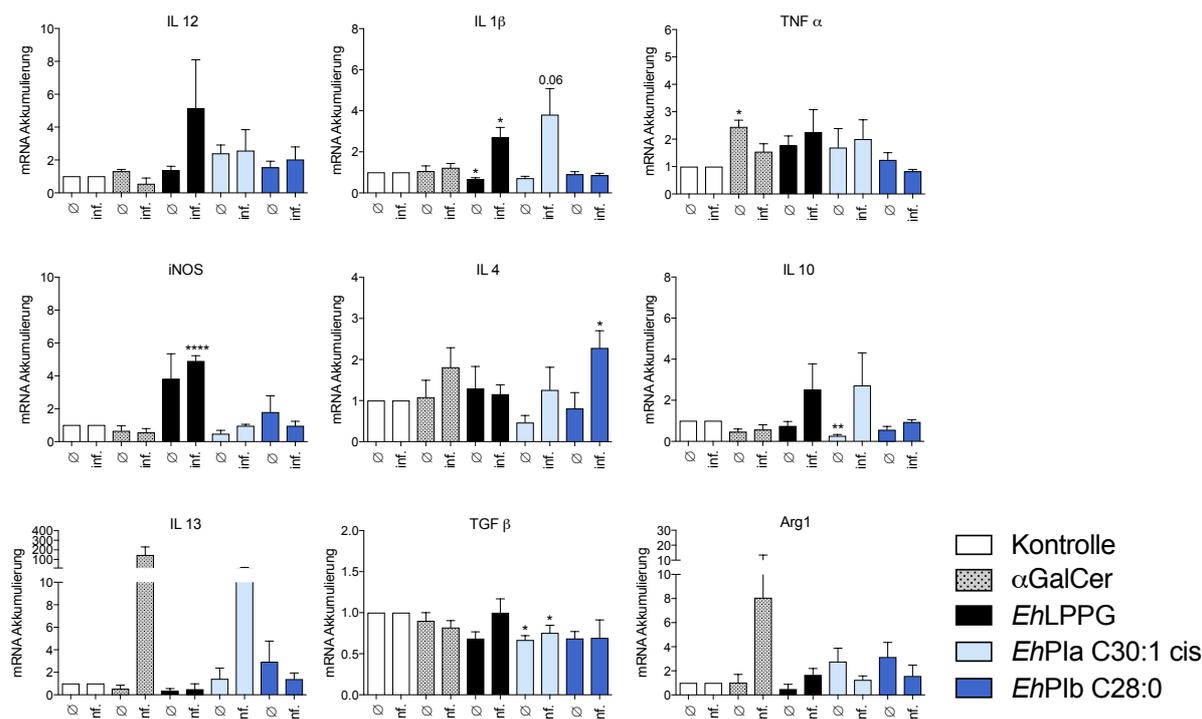
Nachfolgend sollte der immunregulatorische Mechanismus, der durch die Behandlung Leishmanien-infizierter Makrophagen mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge induziert wird, untersucht werden. Hierfür wurde das induzierte Zytokinprofil pro-inflammatorischer (IL 1 $\beta$ , iNOS, IL 12, TNF  $\alpha$ ) sowie anti-inflammatorischer (IL 13, Arg 1, TGF  $\beta$ , IL 4, IL 10) Zytokine von Leishmanien-infizierten Makrophagen nach Behandlung mit den Molekülen untersucht.  $1,5 \times 10^6$  BMDMs wurden mit  $7,5 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert und 4 Std später mit 4  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{GalCer}$ , 8  $\mu\text{g/ml}$  *EhLPPG* oder den beiden synthetischen *EhPI*-Analoge *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C28:0 behandelt. Nach 48 Std wurde die mRNA aus den Makrophagen isoliert, in einer cDNA-Synthese in DNA umgeschrieben und zur Bestimmung des mRNA-Gehalts in der qPCR mit SYBR Green® eingesetzt.

Die Analyse der qPCR-Daten zeigte, dass *EhLPPG* die mRNA-Synthese pro-inflammatorischer Zytokine am stärksten induzierte (Abbildung 25). *EhLPPG* erhöhte sowohl die IL 1 $\beta$ -Expression uninfizierter sowie Leishmanien-infizierter Makrophagen signifikant (\* $p \leq 0,05$ ) als auch die iNOS-Akkumulierung in infizierten Makrophagen hoch signifikant (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

Die  $\alpha\text{GalCer}$ -Behandlung führte zu einer signifikanten Steigerung der TNF  $\alpha$ -Menge (\* $p \leq 0,05$ ) in uninfizierten Makrophagen. Die Expression der anti-inflammatorischen Zytokine IL 4, IL 13 und Arg 1 in Leishmanien-infizierten Makrophagen war nach Stimulation mit  $\alpha\text{GalCer}$  gesteigert, allerdings statistisch nicht signifikant.

Die Behandlung mit dem synthetische *EhPI*-Analogon *EhPIa* C30:1 cis induzierte das in Leishmanien-Infektionen wichtige Zytokin IL 1 $\beta$  ( $p=0,06$ ) in infizierten Makrophagen, führte in diesen jedoch auch zur erhöhten Expression des nicht-schützenden Zytokins IL 13. Das anti-inflammatorische IL 10 war interessanterweise in uninfizierten Makrophagen durch *EhPIa* C30:1 cis signifikant herunterreguliert (\*\* $p \leq 0,01$ ).

Das synthetische *EhPI*-Analogon *EhPIb* C28:0, das in dem Zellzytokinexpressionsassay bisher nur geringe immunmodulatorische Eigenschaften gezeigt hat, führte in Leishmanien-infizierten Makrophagen zu einer gesteigerten Akkumulierung des anti-inflammatorischen Zytokins IL 4 (\* $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 25: mRNA-Expressionsprofil *L. major*-infizierter muriner Makrophagen nach Behandlung von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga.** BMDMs wurden mit *L. major*-Promastigoten infiziert und anschließend mit 4 µg/ml αGalCer, 8 µg/ml *EhLPPG* oder den beiden synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C28:0 behandelt. Nach 48 Std wurde die mRNA isoliert und in einer cDNA-Synthese in DNA umgeschrieben und zur Bestimmung der mRNA Akkumulierung von IL 1β, iNOS, IL 12, TNF α IL 13, Arg 1, TGF β, IL 4, IL 10 in der qPCR mit SYBR Green® eingesetzt. Mittelwert±Standardfehler, unpaired Student's *t* test, \**p*≤0,05, \*\**p*≤0,01, \*\*\*\**p*≤0,0001.

### 3.3.2 Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auf *in vitro* *L. major*-infizierte humane Makrophagen (THP1-Zellen)

Im Hinblick auf die Anwendung am Patienten wurde das immuntherapeutische Potential von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auch in einem humanen *in vitro* Infektionsmodell für die kutane Leishmaniose untersucht.  $6 \times 10^5$  THP1-Zellen wurden hierfür mit  $4,8 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert (Stamm 5ASKH, passagiert in der Balb/c-Maus). Die infizierten Zellen wurden nachfolgend für 48 Std mit αGalCer (4 µg/ml) und *EhLPPG* (8 µg/ml) oder den synthetischen *EhPI*-Analoga (0,1 - 10 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde die isolierte gDNA in einer TaqMan Sonden-qPCR eingesetzt, um die Parasitenlast zu bestimmen.

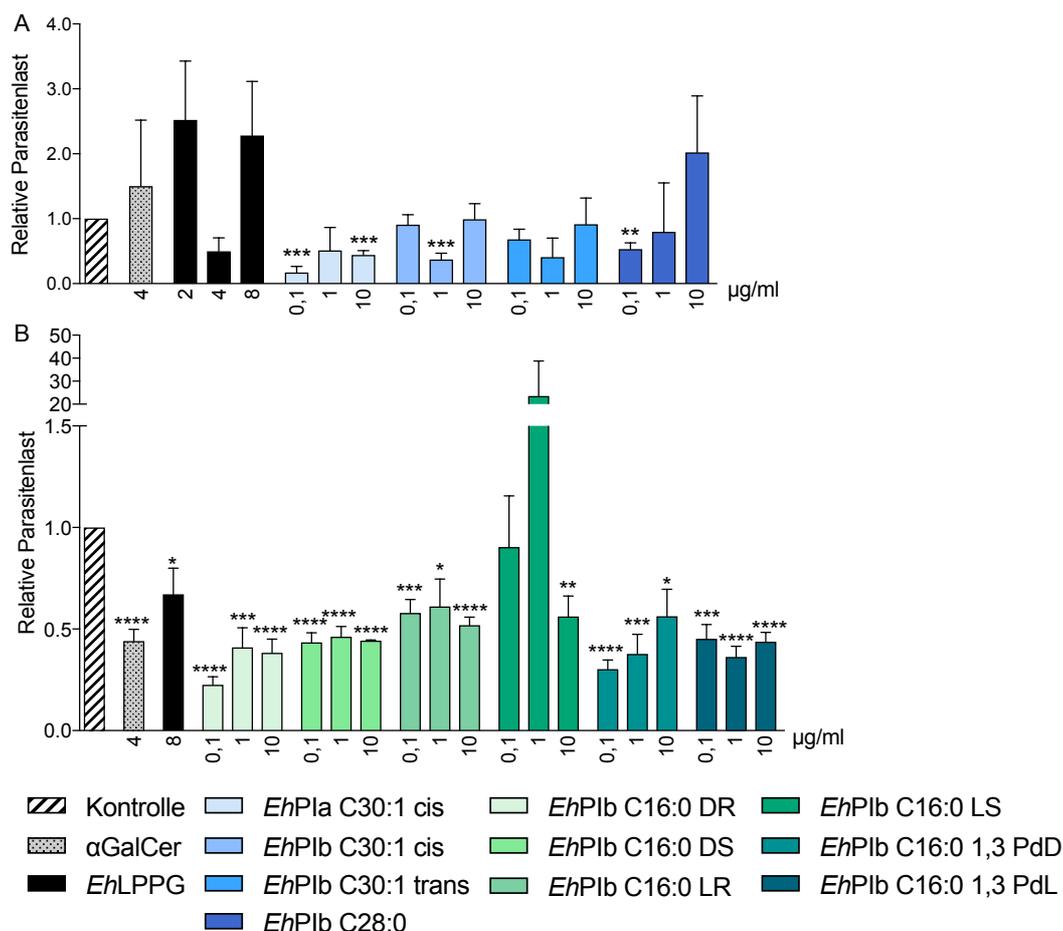
Abbildung 26 zeigt die relative Parasitenlast nach *in vitro* *L. major*-Infektion humaner Makrophagen und anschließender Behandlung mit αGalCer, *EhLPPG* oder den synthetischen *EhPI*-Analoga (Gruppe 1: A, Gruppe 2: B).

Das synthetische *EhPI*-Analogon aus Gruppe 1 *EhPIa* C30:1 cis senkte die Parasitenlast infizierter Makrophagen hoch signifikant mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml und

10 µg/ml (0,1 µg/ml: \*\*\*p ≤ 0,001; 10 µg/ml: \*\*\*p ≤ 0,001; Abbildung 26 A). Die Behandlung mit 1 µg/ml *EhPIb* C30:1 cis induzierte gleichfalls eine signifikante Reduktion der Leishmanien-Menge (\*\*\*p ≤ 0,001), während Leishmanien-infizierte Makrophagen nicht von *EhPIb* C30:1 trans beeinflusst wurden. *EhPIb* C28:0 hingegen verringerte die Parasitenlast signifikant bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml (\*\*p ≤ 0,01) (Choy, Bernin et al. 2017).

Abbildung 26 B zeigt die Ergebnisse des humanen Leishmanien-Infektionsassays mit der Behandlung synthetischer *EhPI*-Analoge der Gruppe 2. In diesen Versuchen führte die αGalCer-Behandlung (4 µg/ml) zu einer hoch signifikanten Reduktion der Parasitenlast in den infizierten Makrophagen (\*\*\*\*p ≤ 0,0001) und auch die Behandlung mit 8 µg/ml *EhLPPG* verminderte die Anzahl an Leishmanien signifikant (\*p ≤ 0,05).

Alle sechs synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 2 besaßen einen therapeutischen Einfluss auf die Leishmanien-infizierten humanen Makrophagen. Die Moleküle *EhPIb* C16:0 DR, *EhPIb* C16:0 DS, *EhPIb* C16:0 LR, *EhPIb* C16:0 1,3 PdD und *EhPIb* C16:0 1,3 PdL senkten die Parasitenlast in allen drei Konzentrationen. Darüber hinaus führten die Moleküle *EhPIb* C16:0 DR (0,1 µg/ml; 10 µg/ml), *EhPIb* C16:0 DS (0,1-10 µg/ml), *EhPIb* C16:0 LR (10 µg/ml), *EhPIb* C16:0 1,3 PdD (0,1 µg/ml), und *EhPIb* C16:0 1,3 PdL (1-10 µg/ml), zu einer hoch signifikanten (\*\*\*\*p ≤ 0,0001) Reduktion der relativen Parasitenlast im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zudem induzierte die Behandlung mit 10 µg/ml *EhPIb* C16:0 LS eine Senkung der Parasitenlast induzierte wird (\*\*p ≤ 0,01).



**Abbildung 26: Einfluss von EhLPPG und den synthetischen EhPI-Analoga auf *in vitro* *L. major*-infizierte humane Makrophagen (THP1-Zellen).**  $6 \times 10^5$  THP1-Zellen wurden mit  $4,8 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert und anschließend mit 4 µg/ml αGalCer, 8 µg/ml EhLPPG oder den synthetischen EhPI-Analoga der Gruppe 1 & 2 (0,1 - 10 µg/ml) behandelt. Nach 48 Std wurde die gDNA isoliert und zur Bestimmung der Parasitenlast in einer TaqMan Sonden qPCR eingesetzt. Relative Parasitenlast der synthetischen EhPI-Analoga der Gruppe 1 (A) und der Gruppe 2 (B). Mittelwert ± Standardfehler, n=3, *unpaired Student's t test*, \*p≤ 0,05, \*\*p≤ 0,01, \*\*\*p≤ 0,001, \*\*\*\*p≤ 0,0001.

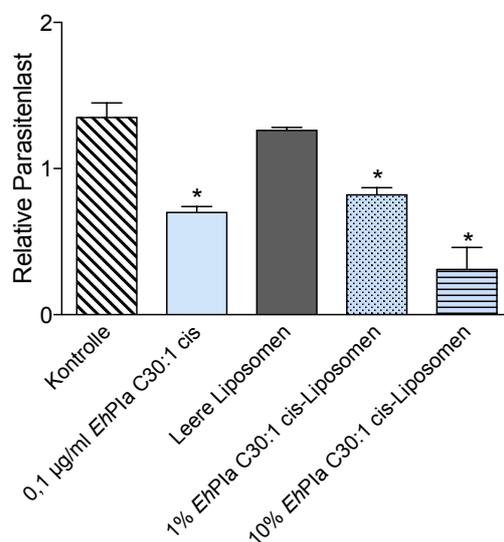
### 3.3.3 Einfluss von Liposomen-formulierten EhPI-Analoga auf die *in vitro* *L. major*-Infektion humaner und muriner Makrophagen

Zur optimalen Bioverfügbarkeit der zu untersuchenden Moleküle wurden diese in zwei verschiedene Arten von Liposomen formuliert, die sich in ihrer Zusammensetzung der liposomalen Bestandteile und ihrer Größe unterscheiden (siehe 2.3.7). Die Liposomen-formulierten Moleküle wurden in dem Leishmanien-Infektionsassay eingesetzt (siehe 2.2.8.1, 2.2.8.2).

### 3.3.3.1 Einfluss von Liposomen-formuliertem *EhPIa* C30:1 cis auf die *in vitro* *L. major*-Infektion in humanen Makrophagen (THP1-Zellen)

Um den immuntherapeutischen Einfluss von Liposomen-formuliertem *EhPIa* C30:1 cis auf *L. major*-infizierte Makrophagen zu bestimmen, wurden  $6 \times 10^5$  THP1-Zellen mit  $7,5 \times 10^6$  metazyklischen Promastigoten infiziert (Stamm 5ASKH, passagiert in der Balb/c-Maus). Die infizierten Makrophagen wurden anschließend mit purem *EhPIa* C30:1 cis oder mit Liposomen-formuliertem *EhPIa* C30:1 cis (1 % & 10 % *EhPIa* C30:1 cis) behandelt. Als Kontrolle dienten sowohl unbehandelte als auch mit leeren Liposomen-behandelte THP1-Zellen. 48 Std später wurde die gDNA isoliert und zur Bestimmung der Parasitenlast in der TaqMan Sonden qPCR eingesetzt.

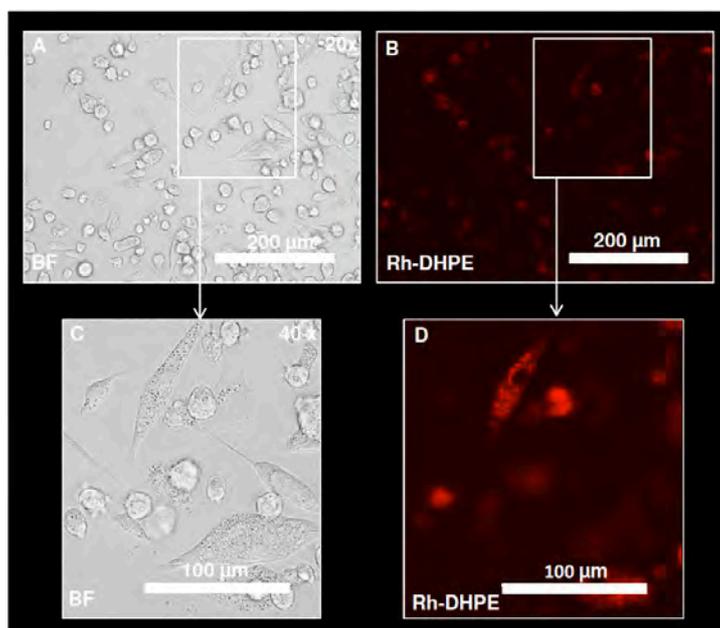
Die Behandlung mit *EhPIa* C30:1 cis in seiner puren Form führte zu einer signifikanten Reduktion der Parasitenlast Leishmanien-infizierter Makrophagen ( $*p \leq 0,05$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 27). Ebenso reduzierte die Inkubation mit Liposomen, in denen entweder 1 % *EhPIa* C30:1 cis oder 10 % *EhPIa* C30:1 cis integriert wurden, die Anzahl an Leishmanien signifikant verglichen mit der leeren Liposomen-Kontrolle ( $*p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 27: Einfluss von Liposomen-formuliertem *EhPIa* C30:1 cis auf *L. major*-infizierte humane Makrophagen (THP1-Zellen).**  $6 \times 10^5$  THP1-Zellen wurden mit  $4,8 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert und anschließend mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  *EhPIa* C30:1 cis oder Liposomen-formuliertem *EhPIa* C30:1 cis (1 % oder 10 % *EhPIa* C30:1 cis) behandelt. Leere Liposomen-behandelte und unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Nach 48 Std wurde die gDNA isoliert und zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in einer TaqMan Sonden qPCR eingesetzt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, *unpaired Student's t test*,  $*p \leq 0,05$ .

Um sicherzustellen, dass die Liposomen auch wirklich an ihren Wirkungsort gelangen, wurde in einem weiteren Versuch die liposomale Aufnahme *L. major*-infizierter humanen Makrophagen untersucht. Hierfür wurden THP1-Zellen wie zuvor beschrieben mit metazyklischen Promastigoten infiziert und mit Liposomen-formuliertem 10 % *EhPIa* C30:1 cis Rh-DHPE behandelt. Als Kontrolle dienten leere Liposomen, die Rh-DHPE markiert waren. Die Lokalisationsstudien wurden 24 Std nach Behandlung am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, indem die Intensität des emittierte Lichts zwischen der leeren Liposomen-Kontrolle und Liposomen-formuliertem 10 % *EhPIa* C30:1 cis berechnet wurde.

In Abbildung 28 sind sowohl die Durchlicht- als auch die Fluoreszenzlichtaufnahmen (Extinktion: 560 nm, Emission: 580 nm) des gleichen Ausschnitts zu sehen. Die Durchlichtaufnahme (*Bright field*, BF) zeigte einen nicht konfluenten Zellrasen aus runden und langgestreckten THP1-Zellen (Abbildung 28 A, Abbildung 28 C). Die Liposomen, in denen 10 % *EhPIa* C30:1 cis integriert wurde (rote Punkte), waren nach der Behandlung der Leishmanien-infizierten Makrophagen im Zellinneren lokalisiert. Dabei waren sie diffus im Zytoplasma verstreut (Abbildung 28 B, Abbildung 28 D).

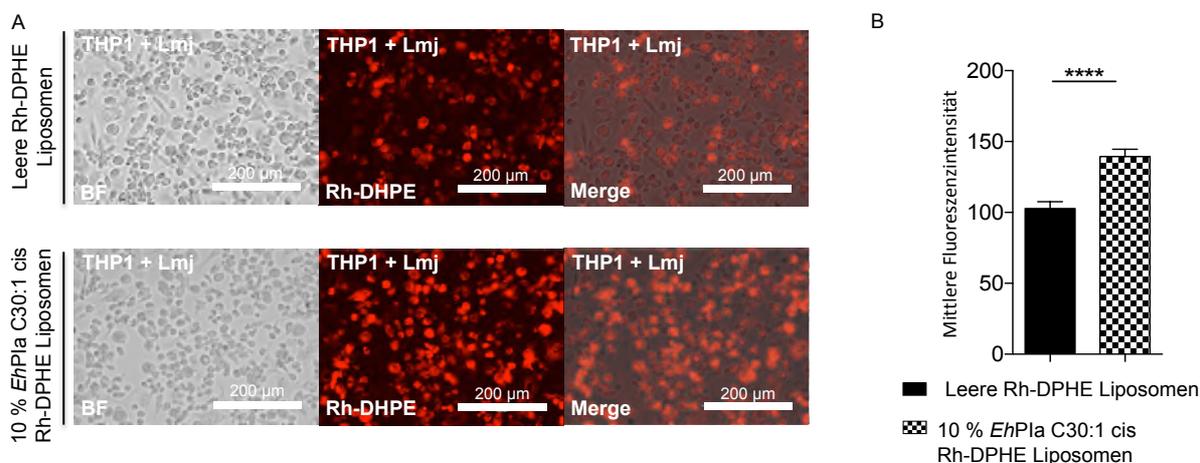


**Abbildung 28: Lokalisation des Liposomen-formulierten 10 % *EhPIa* C30:1 cis in humanen Makrophagen (THP1-Zellen).**  $6 \times 10^5$  THP1-Zellen wurden mit  $4,8 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert und anschließend mit Liposomen-formuliertem 10 % *EhPIa* C30:1 cis Rh-DHPE behandelt. Als Kontrolle dienten leere Liposomen, die Rh-DHPE markiert waren. Nach 24 Std wurde das emittierte Licht am Fluoreszenzmikroskop gemessen. Durchlichtaufnahme (*Bright field*, BF, A) sowie Fluoreszenzlichtaufnahme (B) von THP1-Zellen (200 µm). Höhere Auflösung eines Bildausschnittes von THP1-Zellen im Durchlicht (C) und Fluoreszenzkanal (D, 100 µm). (Abb. in Zusammenarbeit mit M. Mühlenpfordt)

Um mögliche Unterschiede in der Aufnahme leerer Liposomen und von Liposomen, in denen 10 % *EhPIa* C30:1 cis integriert wurde, zu untersuchen, wurde die mittlere Lichtintensität der Fluoreszenzaufnahmen (*Mean Fluorescent Intensity*, MFI) eines definierten Bereichs (*Region of Interest*, ROI) mit Hilfe von ImageJ ausgewertet.

Im Fluoreszenzkanal fluoreszierten sowohl THP1-Zellen, die mit der leeren Liposomen-Kontrolle behandelt wurden, als auch Zellen, die mit dem Liposomen-formuliertem 10 % *EhPIa* C30:1 cis behandelt wurden (Abbildung 29). Vergleicht man die Lichtintensität des definierten Bereichs miteinander, war die mittlere Fluoreszenzintensität von Zellen, die mit dem Liposomen-formulierten 10 % *EhPIa* C30:1 cis Rh-DHPE behandelt wurden, hoch signifikant stärker verglichen zur Kontrolle (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass Liposomen-formuliertes 10 % *EhPIa* C30:1 cis von humanen Makrophagen aufgenommen wurde und sich im Zytoplasma diffus verteilte. Des Weiteren ist festzustellen, dass die THP1-Zellen Liposomen-formuliertes 10 % *EhPIa* C30:1 cis bevorzugt aufgenommen haben, verglichen mit der leeren Liposomen-Kontrolle.

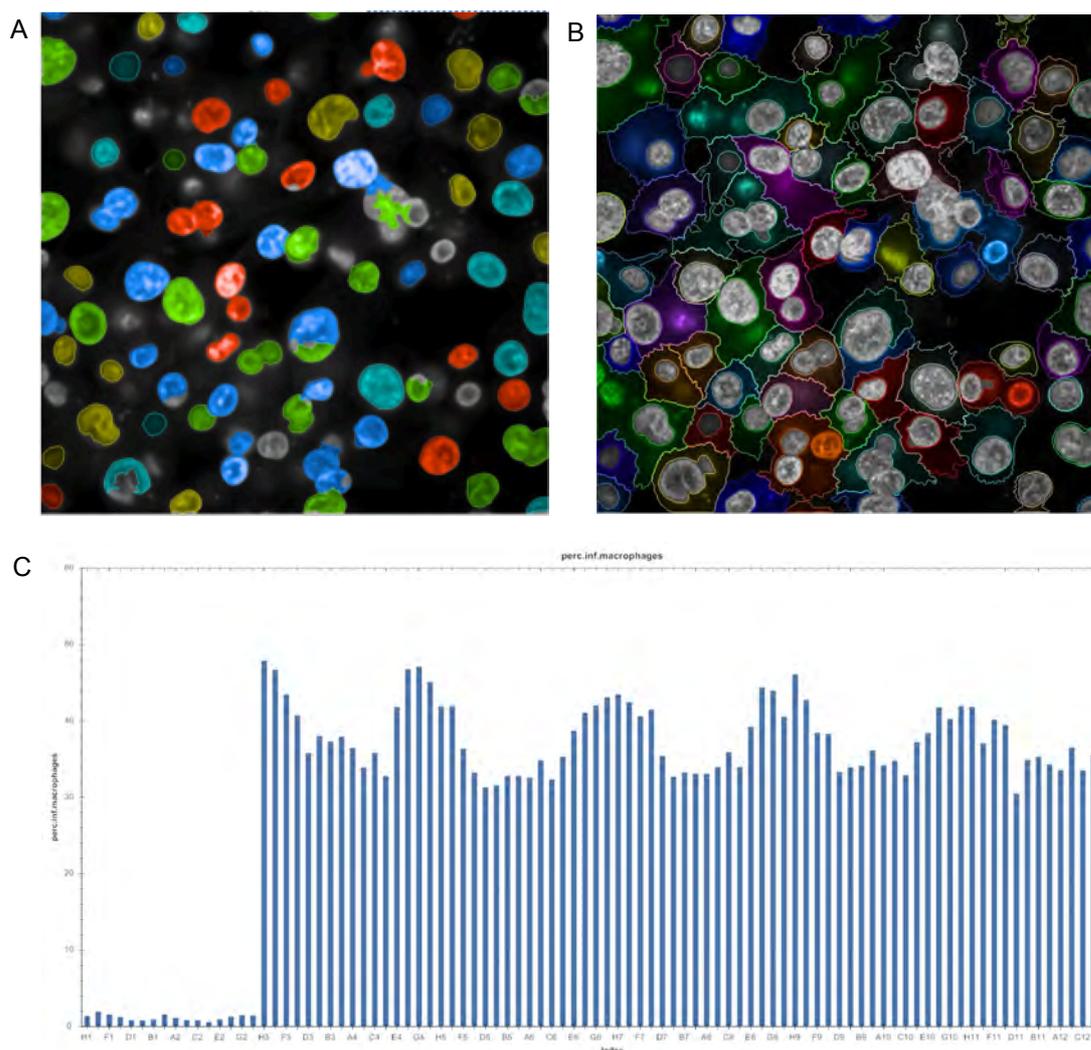


**Abbildung 29: Fluoreszenzaufnahmen und mittlere Fluoreszenzintensität leerer Liposomen und Liposomen-formuliertem 10 % *EhPIa* C30:1 cis von *L. major*-infizierten THP1-Makrophagen.**  $6 \times 10^5$  THP1-Zellen wurden mit  $4,8 \times 10^6$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert und anschließend mit Liposomen-formuliertem 10 % *EhPIa* C30:1 cis Rh-DHPE behandelt. Als Kontrolle dienten leere Liposomen, die Rh-DHPE markiert waren. Nach 24 Std wurde die Fluoreszenzintensität von 20 definierten Bereichen (ROIs) zwischen Liposomen-formuliertem 10 % *EhPIa* C30:1 cis (B) und Kontrolle (A) verglichen (200 µm). Mittlere Fluoreszenzintensität der ROIs von Liposomen-formuliertem 10 % *EhPIa* C30:1 cis und Kontrolle (C). Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, *unpaired Student's t test*, \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . (Abb. in Zusammenarbeit mit M. Mühlenpfordt)

### 3.3.4 Einfluss von Liposomen-formulierten *EhPI*-Analoga auf die *in vitro* *L. major*-Infektion muriner Makrophagen am Opera Phenix™

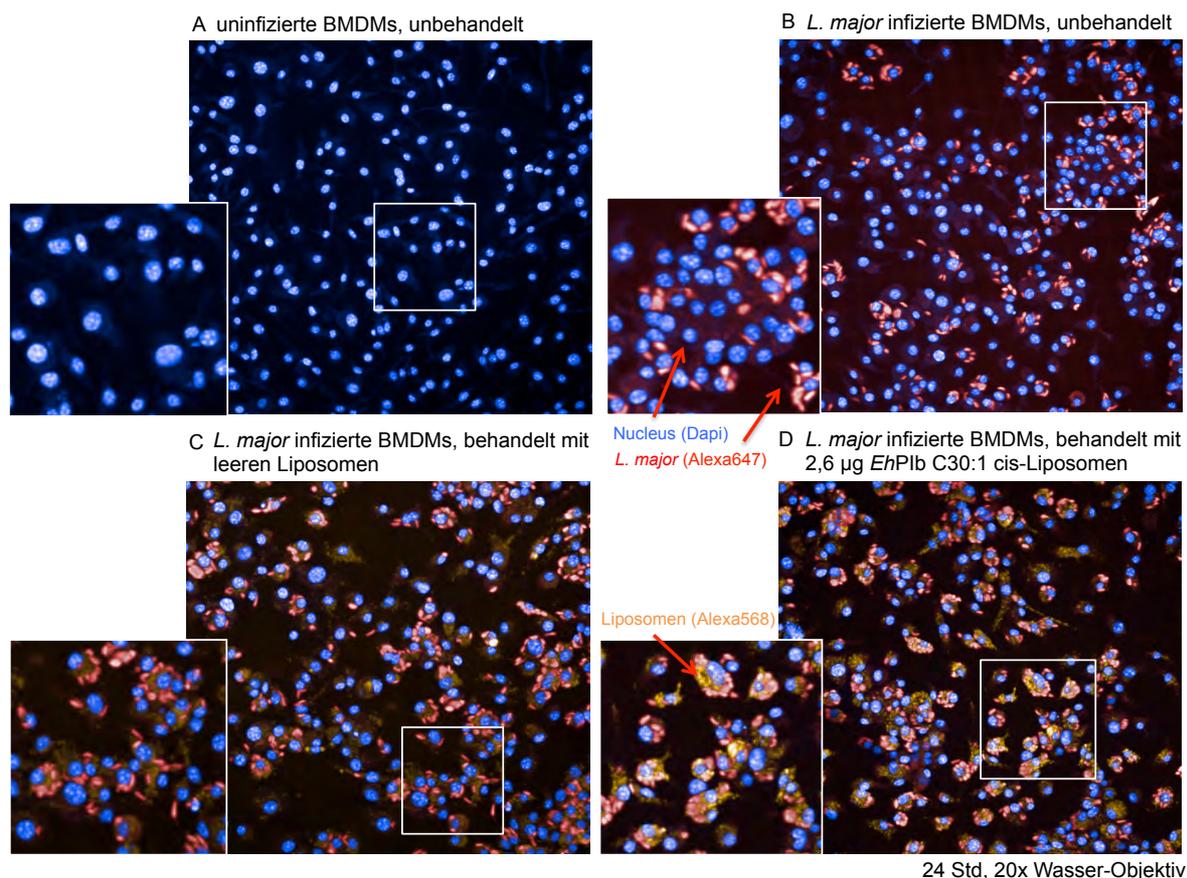
Der immuntherapeutische Einfluss von Liposomen-formulierten *EhPI*-Analoga sollte ebenfalls auf *L. major*-infizierte murine Makrophagen ermittelt werden, wofür  $6 \times 10^4$  BMDMs mit  $4,8 \times 10^5$  metazytischen *L. major*-Promastigoten (5ASKH, passagiert in der Balb/c-Maus) infiziert wurden. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit Liposomen, in denen *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis oder *EhPIb* C16:0 DR integriert wurden, behandelt. Als Kontrolle dienten infizierte BMDMs, die nicht behandelt wurden sowie Makrophagen, die mit DMSO oder leeren Liposomen behandelt wurden. Nach 24 Std wurden die Zellen PFA-fixiert, einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen und am konfokalen Mikroskop Opera Phenix™ gemessen.

Zur Erkennung der unterschiedlichen Messkompartimente wurde zunächst ein Messalgorithmus in der Harmony® Software eingestellt, wofür u.a. die Zellkerne und das Zellzytoplasma in ihrer Größe und Form definiert werden mussten (Abbildung 30 A, Abbildung 30 B). Nachdem alle Messparameter korrekt eingerichtet waren, wurde die eigentliche Messung voll automatisch vom Opera Phenix™ durchgeführt. Abbildung 30 C zeigt den prozentualen Anteil infizierter Makrophagen in der Übersicht einer fertig gemessenen Zellkulturplatte. Die nicht infizierten Proben (H1-H2) zeigen, dass der Messfehler falsch positiv gemessener Leishmanien mit unter 3 % sehr niedrig ausfiel. Zudem ist eine periodische Zu- und Abnahme des Prozentsatzes infizierter Makrophagen in der Messung zu sehen. Dieser periodische Rhythmus lässt sich auf das Messraster des Opera Phenix™ zurückführen. Bei hohem Prozentsatz wurde eine infizierte, unbehandelte Probe gemessen, bei einem niedrigeren Prozentsatz wurde eine Liposomen-behandelte Probe gemessen.



**Abbildung 30: Bildanalyse mittels konfokalen Mikroskop Opera Phenix™.** Erfasste Zellkerne (A) sowie Zytosolen (B) fluoreszenz-gefärbter BMDMs mit dem Messalgorithmus in der Harmony® Software. Übersicht einer gemessenen Zellkulturplatte: prozentualer Anteil infizierter Makrophagen (C).

Fluoreszenzaufnahmen, die vom Opera Phenix™ mit einem 20 x NA Wasser-Immersionsobjektiv aufgenommen wurden und für die Analyse verwendet wurden, sind in Abbildung 31 zusehen. Die DAPI-gefärbten Zellkerne muriner Makrophagen, die nicht infiziert wurden, sind in Abbildung 31 A dargestellt. Deutlich kleiner sind die rot-fluoreszierenden Leishmanien (Alexa647-Kanal), die im Zytoplasma der Zellen wiederzufinden sind (Abbildung 31 B). Ebenso wurden die Alexa568-markierten Liposomen von den behandelten Makrophagen ins Zytoplasma aufgenommen. Es ist allerdings kein Unterschied in der Aufnahme von leeren Liposomen verglichen zu Liposomen-formulierten *EhPI*-Analoge festzustellen (Abbildung 31 C, Abbildung 31 D).



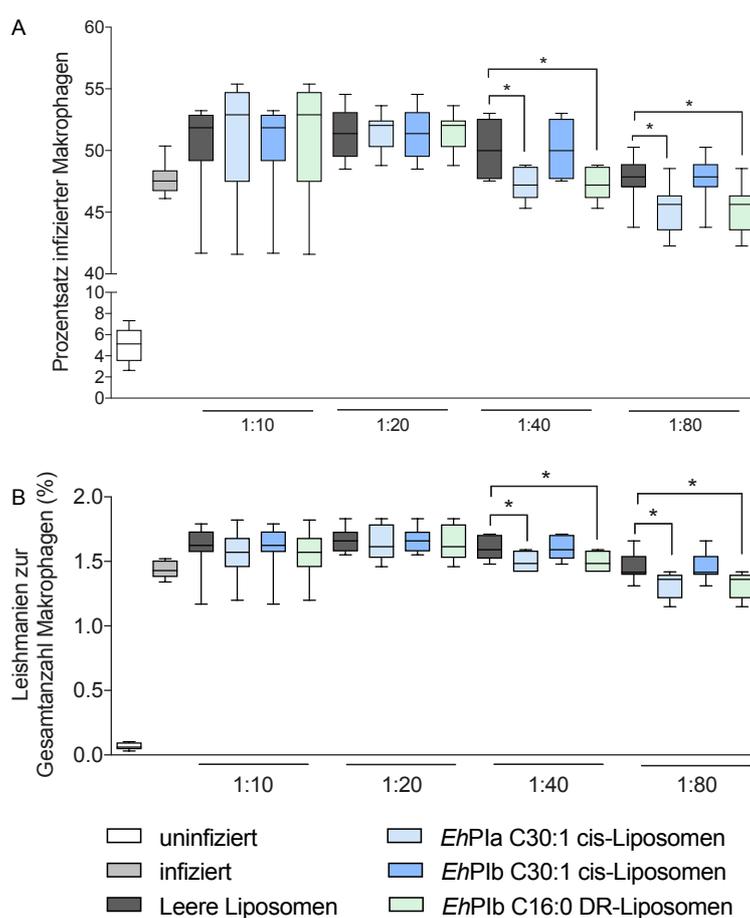
**Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahmen mit dem Opera Phenix™.**  $6 \times 10^4$  BMDMs wurden mit  $4,8 \times 10^5$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert und anschließend mit leeren Liposomen oder Liposomen-formuliertem *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis oder *EhPIb* C16:0 DR behandelt. Die Zellen wurden 24 Std später PFA-fixiert, einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen und am Opera Phenix™ gemessen. Uninfizierte BMDMs (A). Infizierte, unbehandelte BMDMs (B). *L. major*-infizierte BMDMs, behandelt mit leeren Liposomen (C). *L. major*-infizierte BMDMs, behandelt mit Liposomen-formuliertem *EhPIb* C30:1 cis (D). 20x NA Wasser-Objektiv.

Nach der Probenmessung wurden die Daten mit der Harmony® Software evaluiert, um den immuntherapeutischen Einfluss der Liposomen-formulierten *EhPI*-Analoge auf *L. major*-infizierte BMDMs zu ermitteln.

Zum einen wurde der Prozentsatz infizierter Makrophagen definiert und zum anderen wurde die Menge an Leishmanien zur Gesamtanzahl an Makrophagen bestimmt (Abbildung 32). Der prozentuale Anteil falsch positiver Leishmanien in den uninfizierten Proben blieb auch nach gründlicher Analyse mit max. 7 % infizierter Makrophagen gering (Abbildung 32 A). Die Behandlung mit leeren Liposomen sowie mit Liposomen-formuliertem *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis oder *EhPIb* C16:0 DR im Verhältnis 1:10 (entspricht *EhPIa* C30:1 cis & *EhPIb* C16:0 DR: 10,5 µg; *EhPIb* C30:1 cis: 3,6 µg) und 1:20 (entspricht *EhPIa* C30:1 cis & *EhPIb* C16:0 DR: 5,2 µg; *EhPIb* C30:1 cis: 1,8 µg) hatte keine Wirkung auf den Prozentsatz infizierter Makrophagen. Mit erhöhten Verdünnungen auf 1:40 (entspricht 2,6 µg) und 1:80

(entspricht 1,4 µg) hingegen reduzierten das Liposomen-formulierte *EhPIa* C30:1 cis sowie das Liposomen-formulierte *EhPIb* C16:0 DR den prozentualen Anteil infizierter Makrophagen signifikant im Vergleich zur leeren Liposomen-Kontrolle (\*p ≤ 0,05).

Die Menge an Leishmanien im Verhältnis zur Gesamtanzahl an Makrophagen war in diesen Proben ebenfalls signifikant gesenkt (Abbildung 32 B, \*p ≤ 0,05), während die Behandlung mit Liposomen-formuliertem *EhPIb* C30:1 cis keinen Einfluss auf die Leishmanienmenge besitzt.



**Abbildung 32: Einfluss von Liposomen-formulierten *EhPI*-Analoga auf *L. major*-infizierte murine Makrophagen, ausgewertet mittels Opera Phenix™.**  $6 \times 10^4$  BMDMs wurden mit  $4,8 \times 10^5$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten infiziert und anschließend mit leeren Liposomen oder Liposomen-formuliertem *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis oder *EhPIb* C16:0 DR behandelt. Die Zellen wurden 24 Std später PFA-fixiert, einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen und am Opera Phenix™ gemessen. Prozentualer Anteil infizierter Makrophagen (A). Leishmanien zur Gesamtanzahl aller Makrophagen (B). Mittelwert ± Standardfehler, unpaired Student's t test, \*p ≤ 0,05.

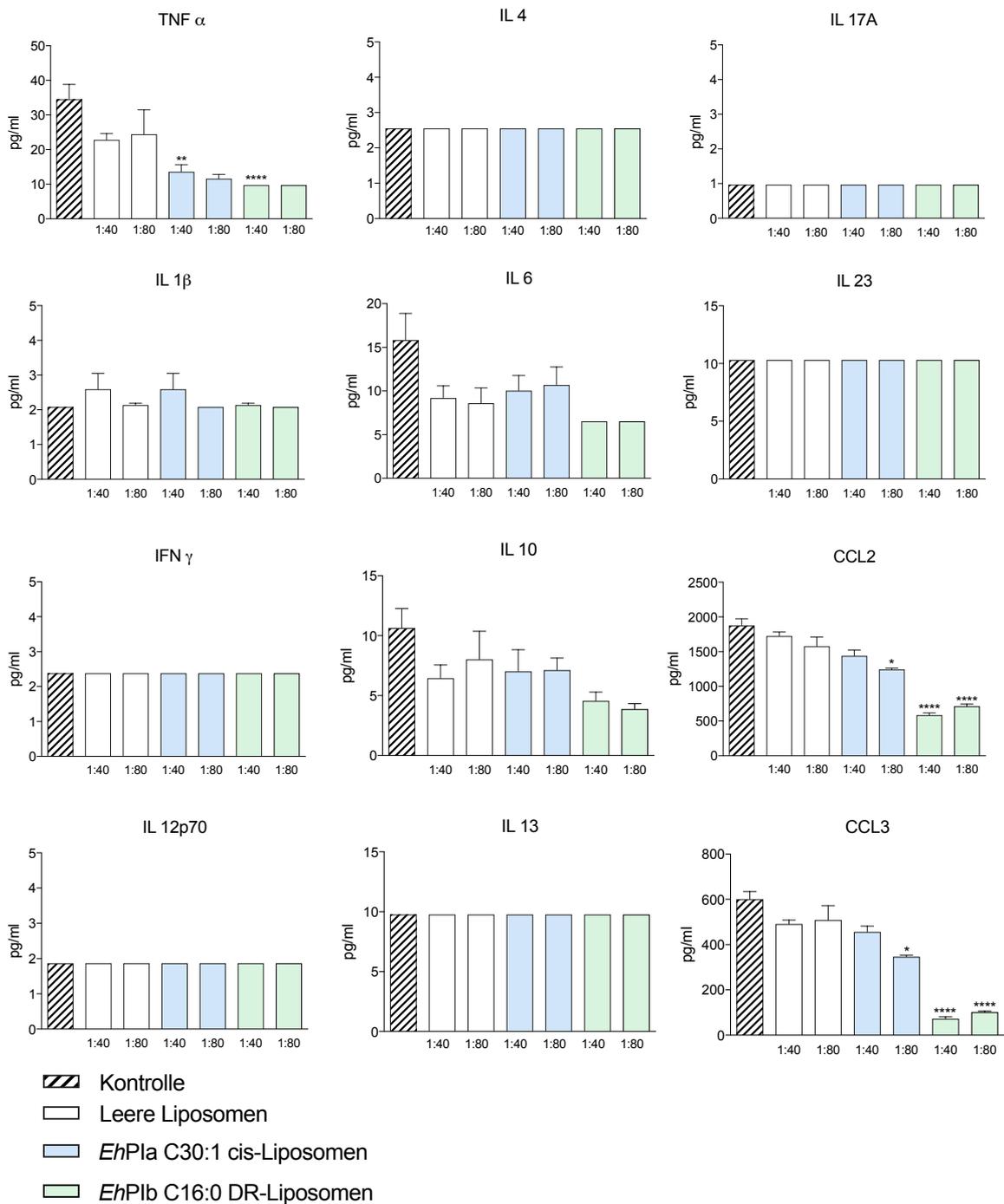
### 3.3.4.1 Zytokinprofil muriner BMDMs nach Stimulation mit in Liposomen integrierten *EhPI*-Analoga mittels LEGENDplex™

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *EhPIa* C30:1 cis-Liposomen und *EhPIb* C16:0 DR-Liposomen in der Lage sind, den prozentualen Anteil *L. major*-infizierter Makrophagen sowie das Verhältnis der Menge an Leishmanien zur Anzahl an Makrophagen signifikant zu reduzieren, ist es von Interesse, die Wirkungsweise der Liposomen aufzuklären. Eine Möglichkeit dies herauszufinden ist, die Produktion beteiligter Zytokine und Chemokine näher zu untersuchen. Hierfür wurden die Überständen von *EhPIa* C30:1 cis- und *EhPIb* C16:0 DR-Liposomen-behandelten Zellen aus dem vorangegangenen Leishmanien-Infektionsversuch (1:80 entspricht 1,4 µg & 1:40 entspricht 2,6 µg, 24 Std) in dem *Bead*-basierten Zytokinassay LEGENDplex™ eingesetzt. Als Kontrolle fungierten Überstände unbehandelter Zellen und Überstände von Zellen, die mit leeren Liposomen inkubiert wurden. Mittels LEGENDplex™-Assay wurde die Produktion von neun pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF α, IFN γ, IL 6, IL 17A, IL 1β, CCL2, CCL3, IL12p70, IL23) und drei anti-inflammatorischen Zytokinen (IL 4, IL 10, IL 13) gleichzeitig überprüft.

Wie in Abbildung 33 dargestellt ist, lagen die Messwerte aller Analyte bis auf die Zytokine TNF α, CCL2 und CCL3 unter der Nachweisgrenze.

Die TNF α-Produktion hingegen war signifikant reduziert nach der Behandlung mit 2,6 µg *EhPIa* C30:1 cis-Liposomen (\*\*p ≤ 0,01). Ebenso führte die Inkubation mit 2,6 µg *EhPIb* C16:0 DR-Liposomen zu einer hoch signifikanten Senkung der TNF α-Konzentration (\*\*\*\*p ≤ 0,0001) im Vergleich zur Kontrolle, die mit leeren Liposomen behandelt wurde.

Des Weiteren war eine verminderte Menge der pro-inflammatorischen Zytokine CCL2 sowie CCL3 im Überstand *EhPIa* C30:1 cis-Liposomen-behandelter Zellen messbar (2,6 µg, \*p ≤ 0,05). *EhPIb* C16:0 DR-Liposomen senkte die Produktion beider Zytokine darüber hinaus hoch signifikant in den untersuchten Konzentrationen (CCL2 & CCL3: 1,4 µg: \*\*\*\*p ≤ 0,0001, 2,6 µg: \*\*\*\*p ≤ 0,0001).



**Abbildung 33: Induziertes Zytokinprofil *L. major*-infizierter muriner BMDMs nach Behandlung mit EhPIa C30:1 cis-Liposomen und EhPIb C16:0 DR-Liposomen.**  $6 \times 10^4$  BMDMs wurden mit  $4,8 \times 10^5$  metazytischen *L. major*-Promastigoten inkubiert und anschließend mit EhPIa C30:1 cis-Liposomen oder EhPIb C16:0 DR-Liposomen (1,4  $\mu\text{g/ml}$  oder 2,6  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelt. Nach 24 Std wurde die Zytokinproduktion (TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL 6, IL 17A, IL 1 $\beta$ , CCL2, CCL3, IL 12p70, IL 23, IL 4, IL 10, IL 13) im Überstand mittels LEGENDplex™ gemessen. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, unpaired Student's *t* test, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

### **3.4 Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auf *in vivo* Infektionsmodelle für die kutane Leishmaniose**

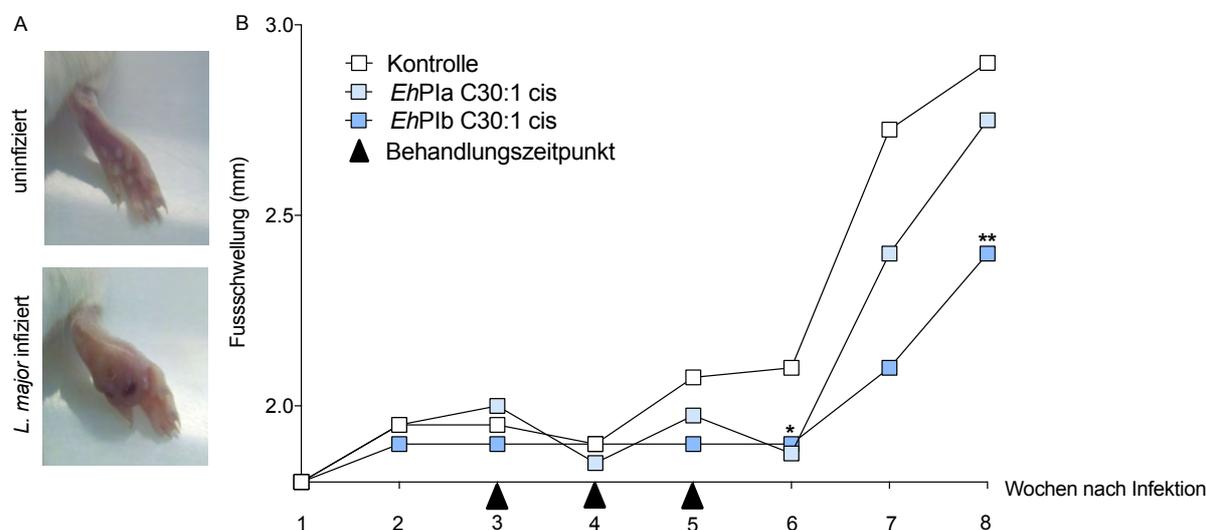
Nachdem durch die *in vitro* Ergebnissen gezeigt wurde, dass *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoga die Leishmanienlast infizierter Makrophagen signifikant senken können, wurde nachfolgend untersucht, ob die Moleküle auch *in vivo* auf die Leishmanieninfektion einwirken. Zu diesem Zweck wurden zwei murine Leishmanien-Infektionsmodelle durchgeführt. Zum einen wurde das Balb/c-Mausmodell für die kutane Leishmaniose verwendet, das von der Arbeitsgruppe Clos (BNITM) zur Verfügung gestellt wurde. Zum anderen wurde das C57BL/6-Mausmodell für *L. major*-Infektionen im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

#### **3.4.1 Einfluss der synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis auf *in vivo* *L. major*-infizierte Balb/c-Mäusen**

Zur Bestimmung der anti-Leishmanien Aktivität der synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis im *in vivo* Infektionsmodell wurden Balb/c-Weibchen subkutan mit  $2 \times 10^5$  metazyklischen *L. major*-Promastigoten (Stamm 5ASKH, passagiert in der Balb/c-Maus) in den Hinterlauf infiziert. Der Infektionsverlauf wurde regelmäßig über mehrere Wochen kontrolliert und die Zunahme der Fußdicke mit einer Schiebelehre gemessen. Mit Einsetzen der Fußschwellung nach ca. 3 Wochen wurden die Tiere einmal wöchentlich über 3 Wochen mit 5 µg *EhPIa* C30:1 cis oder 5 µg *EhPIb* C30:1 cis behandelt.

In Abbildung 34 A ist repräsentativ ein nicht infizierter Balb/c-Fuß im Vergleich zu einem geschwollenen Balb/c-Fuß, der mit *L. major* infiziert wurde, zu sehen (Bilder zur Verfügung gestellt von Dr. Eugenia Bifeld, AG Clos, BNITM). Die Messung der Fußdicke zeigte, dass die Füße zwei Wochen nach Infektion begannen anzuschwellen (Abbildung 34 B). In Woche 4 war ein erster Unterschied zwischen den Tieren, die mit *EhPIa* C30:1 cis oder *EhPIb* C30:1 cis behandelt wurden, und der Kontrollgruppe zu sehen, der sich in Woche 5 noch weiter verdeutlichte. Die Behandlung mit 5 µg *EhPIb* C30:1 cis führte zu einem signifikanten Unterschied der Fußdicke verglichen zur DMSO-Kontrolle in Woche 6 (\* $p \leq 0,05$ ). Auch im weiteren Verlauf der Infektion fiel die Fußschwellung der Molekül-behandelten Tiere geringer aus verglichen mit der Schwellung der Kontrolltiere. In Woche 7 nahm die Schwellung in den Füßen jedoch sowohl bei der Kontroll- als auch bei den behandelten Tieren stark zu. Allerdings konnte in Woche 8 wieder eine signifikant geringere Schwellung der mit 5 µg *EhPIb* C30:1 cis-behandelten Tieren beobachtet werden, im

Vergleich mit den DMSO-behandelten Tieren (\*\* $p \leq 0,01$ ; (Choy, Bernin et al. 2017)). Der Versuch wurde aufgrund der starken Fußschwellung nach der Messung in Woche 8 beendet.



**Abbildung 34: Einfluss der synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis auf *in vivo* *L. major*-infizierte Balb/c-Mäuse.** Fuß einer naiven Balb/c-Maus sowie die Fußschwellung nach *L. major*-Infektion (A). Verlauf der *L. major*-induzierten Fußschwellung mit Behandlung von synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis oder *EhPIb* C30:1 cis (B). Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $n=5-6$ , *unpaired Student's t test*, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

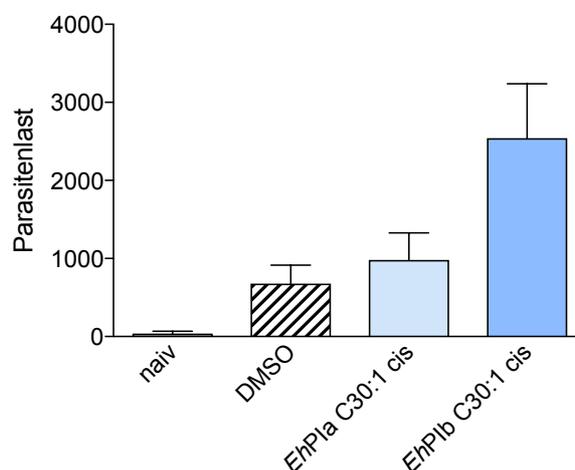
### 3.4.1.1 Bestimmung der Parasitenlast *L. major*-infizierter Balb/c-Mäuse nach

#### Behandlung mit den synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis

Um den Einfluss der synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis auf *L. major*-infizierte Balb/c-Mäuse zu bestimmen, wurde aus einem Teil des infizierten Fußes die gDNA isoliert und in der TaqMan Sonden-qPCR eingesetzt. Zur Bestimmung der Parasitenlast wurde die *L. major* Aktin DNA-Menge in Relation zur murinen  $\beta$ -Aktin DNA-Menge gesetzt. Als Kontrolle fungierten nicht infizierte Tiere (naiv) und *L. major*-infizierte Tiere, die mit dem Lösungsmittel der Stimulanzien, DMSO, behandelt wurden, indem die Stimulanzien gelöst sind.

In Abbildung 35 ist zu sehen, dass die Behandlung mit *EhPIa* C30:1 cis oder *EhPIb* C30:1 cis keinen Einfluss auf die Leishmanienlast in den infizierten Balb/c-Mäuse in der achten Woche hatte. Die relative Parasitenlast der infizierten Tiere, die mit *EhPIb* C30:1 cis behandelt wurden, war wesentlich höher als die Leishmanienlast in den Kontrolltieren, die mit DMSO behandelt wurden. Die Parasitenlast nach Behandlung mit *EhPIa* C30:1 cis war zwar nur leicht erhöht im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, führte aber auch zu keiner Senkung der Parasitenlast zu diesem Zeitpunkt. Dagegen wies die naive Kontrolle eine minimale Menge an

Leishmanien auf, die durch falsch positive Ereignisse, sowie Verschleppungen beim Pipettieren der Proben-gDNA auftreten kann.



**Abbildung 35: Bestimmung der Parasitenlast *L. major*-infizierter Balb/c-Mäuse nach Behandlung mit den synthetischen EhPI-Analoga EhPIa C30:1 cis oder EhPIb C30:1 cis.** Die gDNA wurde aus dem Fußballen *L. major*-infizierter Balb/c-Mäuse isoliert und zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in einer TaqMan Sonden-qPCR eingesetzt. Mittelwert ± Standardfehler, n=3.

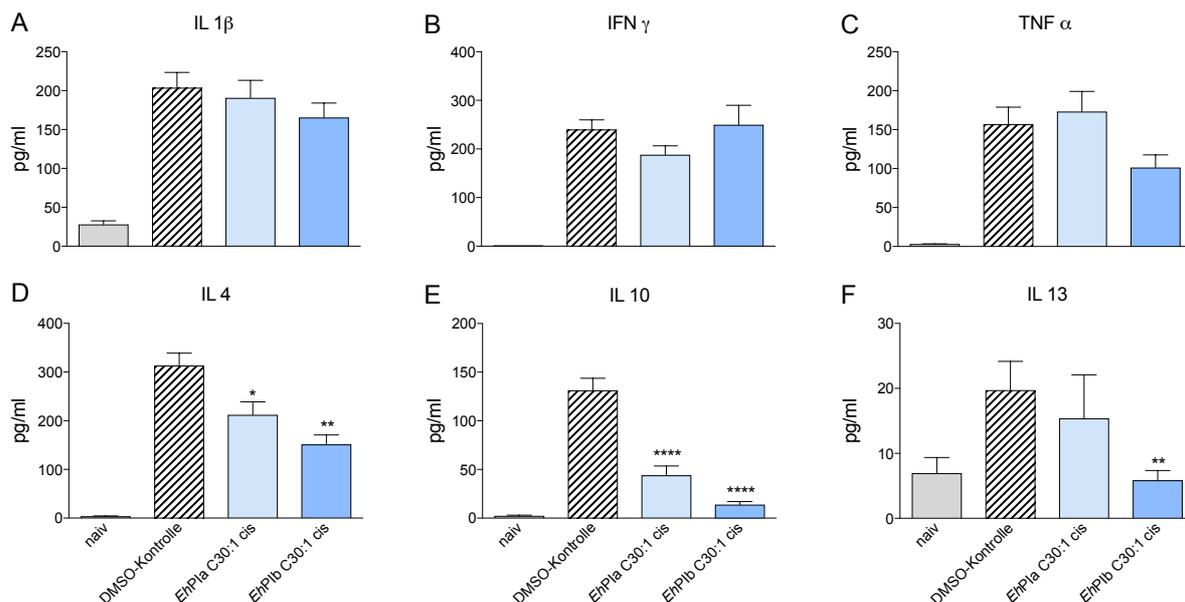
### 3.4.1.2 Zytokinprofil *L. major*-infizierter Balb/c-Mäuse nach Behandlung mit den synthetischen EhPI-Analoga EhPIa C30:1 cis und EhPIb C30:1 cis mittels

#### LEGENDplex™

Zur Analyse von Zytokinen und Chemokinen *L. major*-infizierter Balb/c-Mäuse nach Behandlung mit den synthetischen EhPI-Analoga EhPIa C30:1 cis und EhPIb C30:1 cis wurde aus einem weiteren Teil des infizierten Fußes ein Lysat hergestellt, das im LEGENDplex™ Assay eingesetzt wurde.

Die Behandlung mit EhPIa C30:1 cis oder EhPIb C30:1 cis hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL 1 $\beta$ , IFN  $\gamma$  und TNF  $\alpha$  im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle (naiv, Abbildung 36 A-C).

In Abbildung 36 D ist zu sehen, dass die IL 4-Produktion durch EhPIa C30:1 cis (\*p  $\leq$  0,05) und durch EhPIb C30:1 cis signifikant (\*\*p  $\leq$  0,01) gesenkt wurde. Ebenso führte die Behandlung sowohl mit EhPIa C30:1 cis als auch mit EhPIb C30:1 cis zu einer hoch signifikanten Reduktion der IL 10-Konzentration (\*\*\*\*p  $\leq$  0,0001, Abbildung 36 E). Darüber hinaus induzierte die EhPIb C30:1 cis-Behandlung eine signifikante Senkung der IL 13-Produktion (\*\*p  $\leq$  0,01; Abbildung 36 F; (Choy, Bernin et al. 2017)).



**Abbildung 36: Induziertes Zytokinprofil *L. major*-infizierter Balb/c-Mäuse nach Behandlung mit den synthetischen EhPI-Analoga EhPIa C30:1 cis oder EhPIb C30:1 cis.** Aus den Fußballen *L. major*-infizierter Balb/c-Mäuse, die mit 5 µg EhPIa C30:1 cis oder EhPIb C30:1 cis behandelt wurden, wurde ein Lysat hergestellt. Zur Bestimmung der Zytokinproduktion (IL 1β, TNF α, IFN γ, IL 4, IL 10, IL 13) wurde das Lysat im LEGENDplex™ eingesetzt und durchflusszytometrisch analysiert. Mittelwert ± Standardfehler, n=5, unpaired Student's t test, \*p≤ 0,05, \*\*p≤ 0,01, \*\*\*\*p≤ 0,0001.

### 3.4.2 Einfluss des synthetischen EhPI-Analogons EhPIb C16:0 DR *in vivo* auf *L. major*-infizierte C57BL/6-Mäusen

Da die Balb/c-Maus ein suszeptibler Mausstamm für die kutane Leishmaniose ist, wurde die anti-Leishmanien Aktivität des synthetischen EhPI-Analogons EhPIb C16:0 DR *in vivo* im Infektionsmodell mit C57BL/6-Mäuse untersucht. Die kutane Leishmaniose ist in der C57BL/6-Maus selbstlimitierend, womit sie dem Krankheitsverlauf des Menschen ähnelt und es erlaubt, bessere Rückschlüsse auf die Anwendung am Patienten zu ziehen.

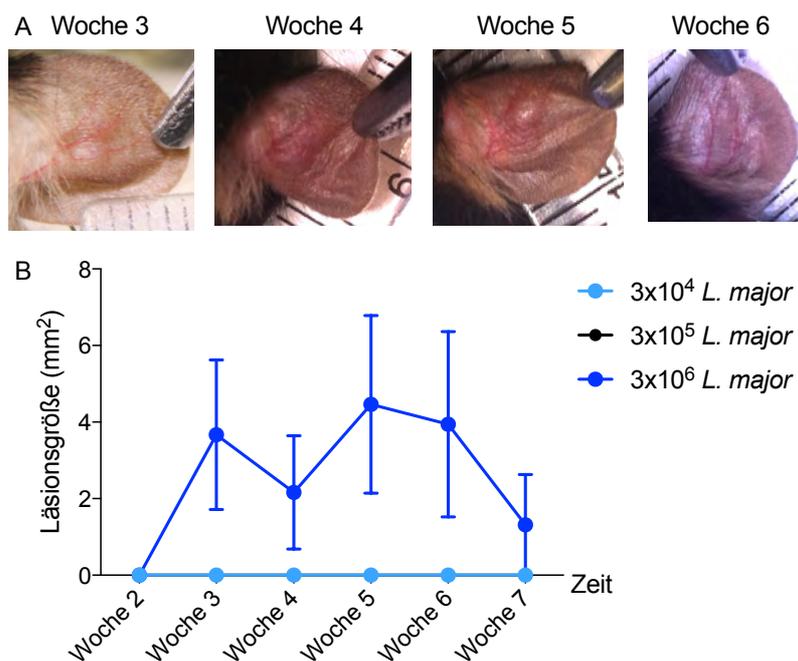
Das C57BL/6-Leishmanien-Mausmodell wurde eigens im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Hierfür wurden metazyklische *L. major*-Promastigoten subkutan dorsal in das äußere Ohr injiziert. Der Infektionsverlauf wurde regelmäßig über mehrere Wochen verfolgt und dokumentiert. Erste Schwellungen der Ohren traten ca. ab Woche 3 auf. Die Ohrschwellung wurde per Fotoanalyse mit der Fiji-Software ausgewertet.

Um die optimale Infektionsmenge von *L. major* zu bestimmen, wurden weibliche C57BL/6-Mäuse mit metazyklischen Promastigoten (Stamm 5ASKH) und drei verschiedenen Infektionsdosen ( $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^5$  und  $3 \times 10^6$  *L. major*) infiziert.

Bei den Infektionsdosen  $3 \times 10^4$  und  $3 \times 10^5$  *L. major*/Ohr konnte keine Ohrschwellung ermittelt werden (Abbildung 37 B). Bei einer Infektionsdosis von  $3 \times 10^6$  *L. major*/Ohr hingegen konnte

drei Wochen nach Infektion eine leichte Ohrschwellung detektiert werden, deren Größe bis Woche 4 zunahm, ab Woche 6 abnahm und zwischen Woche 7 - 8 nicht mehr nachweisbar war. Abbildung 37 A zeigt repräsentativ einen solchen Verlauf nach Infektion mit  $3 \times 10^6$  *L. major*/Ohr einer C57BL/6-Maus.

In den nachfolgenden Versuchen wurden die Mäuse mit einer Inokulationsdosis von  $3 \times 10^6$  *L. major*/Ohr infiziert.



**Abbildung 37: Bestimmung der optimalen Infektionsmenge von *L. major* im *in vivo* C57BL/6-Mausmodell.** Ohrschwellung einer C57BL/6-Maus nach *L. major*-Infektion von Woche 3 bis Woche 6 (A). Verlauf der *L. major*-induzierten Ohrschwellung ( $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^5$  und  $3 \times 10^6$  *L. major*-Promastigoten, B). n=3.

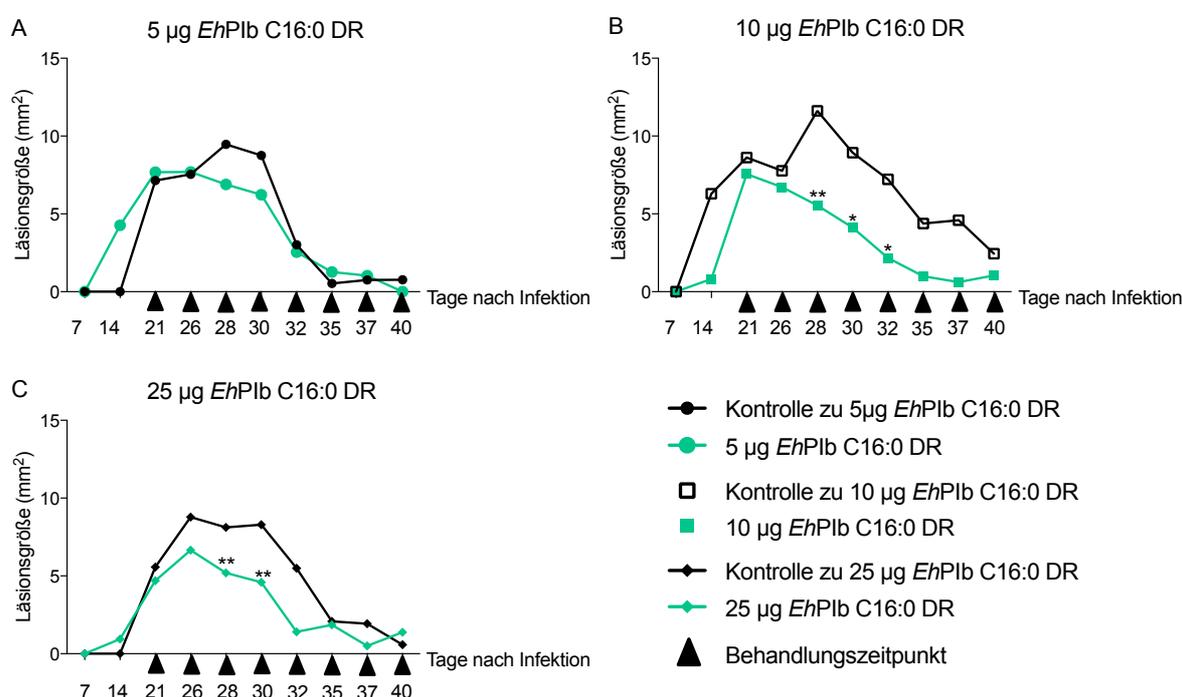
Zur Bestimmung des therapeutischen Einflusses des synthetischen *EhPI*-Analogons *EhPIb* C16:0 DR auf Leishmanien-induzierte Hautläsionen wurden weibliche C57BL/6-Mäuse mit  $3 \times 10^6$  *L. major*-Promastigoten (Stamm 5ASKH, passagiert in der Balb/c-Maus) infiziert. Die Tiere wurden ab dem Zeitpunkt einer Ohrschwellung drei Mal wöchentlich mit *EhPIb* C16:0 DR in Konzentrationen von 5 µg, 10 µg und 25 µg behandelt, wobei die Moleküllösung auf das Ohr gegeben und sanft einmassiert wurde.

Bei allen Tieren begannen die Ohren ab Woche 2-3 anzuschwellen. In Abbildung 38 A ist der Infektionsverlauf der Mäusen, die mit 5 µg *EhPIb* C16:0 DR behandelt wurden, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dargestellt. Die Behandlung mit 5 µg *EhPIb* C16:0 DR führte bereits zwei Tage nach Beginn der Behandlung zu einem Abschwellen des Ohres, wohingegen die Schwellungen der DMSO-behandelten Kontrolltiere weiterhin zunahm. Zwischen Tag 28

und Tag 30 war dieser Unterschied am deutlichsten zu sehen, jedoch nicht signifikant. Ab Tag 35 schwellten die Ohrschwellungen bei allen Tieren ab und waren ungefähr von gleicher Größe.

Abbildung 38 B zeigt den Infektionsverlauf von Mäusen, die mit 10 µg *EhPIb* C16:0 DR behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle. Bereits zwei Tage nach Behandlungsbeginn war eine Abnahme der Ohrschwellung festzustellen. Tiere, die mit 10 µg *EhPIb* C16:0 DR behandelt wurden, zeigten signifikant kleinere Ohrschwellungen zwischen Tag 28 und Tag 32 (Tag 28: \*\* $p \leq 0,01$ , Tag 30: \* $p \leq 0,05$ , Tag 32: \* $p \leq 0,05$ ) verglichen mit der Kontrolle. Ab dem 35. Tag bestand weiterhin noch ein Unterschied zwischen den *EhPIb* C16:0 DR-behandelten Tieren und den Kontrolltieren, dieser war allerdings nicht mehr signifikant.

Die Behandlung der Leishmanien-infizierten Mäuse mit 25 µg *EhPIb* C16:0 DR führte eine Woche nach Therapiebeginn zu einer signifikanten Reduktion der Ohrschwellung (Tag 28: \*\* $p \leq 0,01$ , Abbildung 38 C). Auch an Tag 30 waren die Ohrschwellungen weiterhin signifikant geringer als die der Kontrolltiere, während ab dem Tag 35 wieder alle Infektionsschwellungen gleich groß ausfielen.



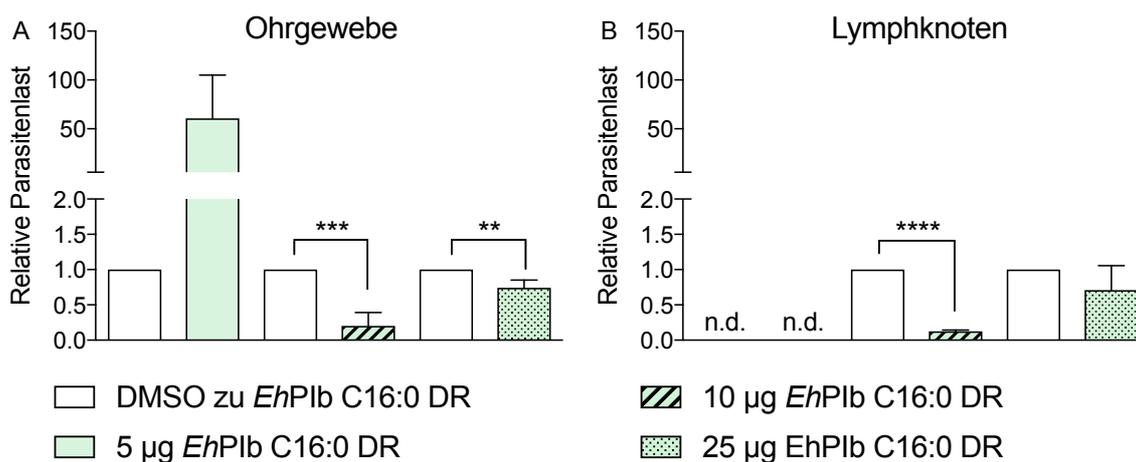
**Abbildung 38: Einfluss des synthetischen *EhPI*-Analogons *EhPIb* C16:0 DR auf *in vivo* *L. major*-infizierte C57BL/6-Mäuse.** Verlauf der *L. major*-induzierten Ohrschwellung mit Behandlung des synthetischen *EhPI*-Analogons *EhPIb* C16:0 DR in den Konzentrationen 5 µg (A), 10 µg (B) und 25 µg (C). Mittelwert ± Standardfehler, n=5 - 6, *unpaired Student's t test*, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

### 3.4.2.1 Bestimmung der Parasitenlast *L. major*-infizierter C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIb* C16:0 DR

Um den Einfluss einer Behandlung mit *EhPIb* C16:0 DR auf die Parasitenlast *in vivo* zu untersuchen, wurde die gDNA sowohl aus dem infizierten Ohr als auch aus dem Pharynx-Lymphknoten isoliert und mittels Taqman Sonden-PCR analysiert. *L. major*-infizierte Tiere, die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrolle.

Die Parasitenlast im Ohrgewebe *EhPIb* C16:0 DR-behandelter Tiere im Vergleich zur Kontrolle ist in Abbildung 39 A dargestellt. Die Behandlung mit 5 µg *EhPIb* C16:0 DR hatte keinen Einfluss auf die Menge an Leishmanien und ist um ein 50-faches höher als die Leishmanienlast in der Kontrolle. 10 µg *EhPIb* C16:0 DR hingegen induzierte eine hoch signifikante Reduktion der Leishmanienlast im Ohrgewebe ( $***p \leq 0,001$ ). Auch die Behandlung mit 25 µg *EhPIb* C16:0 DR senkte die Anzahl der Leishmanien deutlich ( $**p \leq 0,01$ ).

Im Lymphknoten konnte keine *L. major*-Aktin DNA und keine murine  $\beta$ -Aktin DNA der 5µg *EhPIb* C16:0 DR- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 39 B). Die Behandlung mit 10 µg *EhPIb* C16:0 DR führte zu einer hoch signifikanten Senkung der Parasitenlast verglichen zur Kontrolle ( $****p \leq 0,0001$ ). Es waren jedoch keine Unterschiede zwischen der Behandlung mit 25 µg *EhPIb* C16:0 DR und der Kontrolle nachweisbar.



**Abbildung 39: Bestimmung der Parasitenlast *L. major*-infizierter C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIb* C16:0 DR.** Die gDNA wurde aus dem Ohrgewebe sowie aus dem Lymphknoten *L. major*-infizierter C57BL/6-Mäuse isoliert und zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in der TaqMan Sonden-qPCR eingesetzt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ , *unpaired Student's t test*,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$   $****p \leq 0,0001$ .

### 3.4.2.2 Immunhistologische Lokalisation der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sowie Arg 1 und iNOS exprimierender Zellen in *L. major*-infizierten C57BL/6-Mäusen

Bisherige Ergebnisse zeigten, dass *EhLPPG* und einige synthetische *EhPI*-Analoge spezifisch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine induzieren können und wiederum in der Lage sind, die Expression anti-inflammatorischer Zytokine herunter zu regulieren. So führt beispielsweise *EhLPPG* auf mRNA-Level zu einer gesteigerten Akkumulierung von IL 1 $\beta$  und iNOS in *L. major*-infizierten BMDMs. Zudem wurde nach Stimulation humaner PBMCs mit den synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis sowie *EhPIa* C30:1 cis *in vitro* eine erhöhte Produktion von IL 2 und TNF  $\alpha$  *in vitro* gemessen, während die Behandlung beider Moleküle *in vivo* zu einer Reduktion der IL 4-, IL 10- und IL 13-Konzentration führte.

Um herauszufinden, welche Immunzellen und weiteren Expressionsfaktoren an einer Leishmanieninfektion beteiligt sind, wurden immunhistologische Färbungen mit *L. major*-infiziertem C57BL/6-Ohrgewebe durchgeführt. Die Immunhistologie ermöglicht es, Zellpopulationen und die lokale Expression verschiedener Faktoren im Gewebe zu identifizieren und zu lokalisieren.

In Abbildung 40 sind die immunhistologischen Färbungen aufeinanderfolgender Schnitte des Ohrgewebes *L. major*-infizierter C57BL/6-Mäuse, die entweder mit DMSO oder mit 10  $\mu$ g *EhPIb* C16:0 DR behandelt wurden, zu sehen.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) gibt einen Überblick über die verschiedenen Immunzellen im Gewebe. Der Zellkern wird blau-violett angefärbt, wohingegen Zellplasmaproteine rötlich dargestellt werden. Die Leishmanien erscheinen mit dieser Färbung leicht blau-violett.

Bereits die HE-Übersichtsaufnahmen veranschaulichen, dass trotz optischer Verheilung der Leishmanieninfektion noch eine deutliche Schwellung im Ohrquerschnitt DMSO-behandelter Mäuse zu sehen ist, während *EhPIb* C16:0 DR-behandelte Mäuse eine minimale Ohrschwellung aufweisen (Abbildung 40 A). Die Vergrößerungen der HE-Färbungen zeigen, dass mehr Leishmanien in den DMSO-behandelten Kontrollen vorzufinden sind als in den 10  $\mu$ g-*EhPIb* C16:0 DR-behandelten Ohrgeweben (Abbildung 40 B). Diese Erkenntnis wird durch die Leishmanien-Giemsa-Färbung bestätigt, die eine modifizierte Giemsa-Färbung ist, in der die Leishmanien dunkel-blau dargestellt sind. Auch hier befinden sich sichtbar mehr Leishmanien in den DMSO-Kontrollen als in den behandelten-Ohrgeweben (Abbildung 40 C). Die Leishmanien wurden darüber hinaus noch mit einer spezifischen HSP90-Antikörperfärbung markiert und infolgedessen visualisiert. Mit dieser

immunhistologischen Färbung wurden weniger Leishmanien in den DMSO-behandelten Gewebe angefärbt als im Gewebe, das mit 10 µg-*EhPIb* C16:0 DR behandelt wurde (Abbildung 40 F).

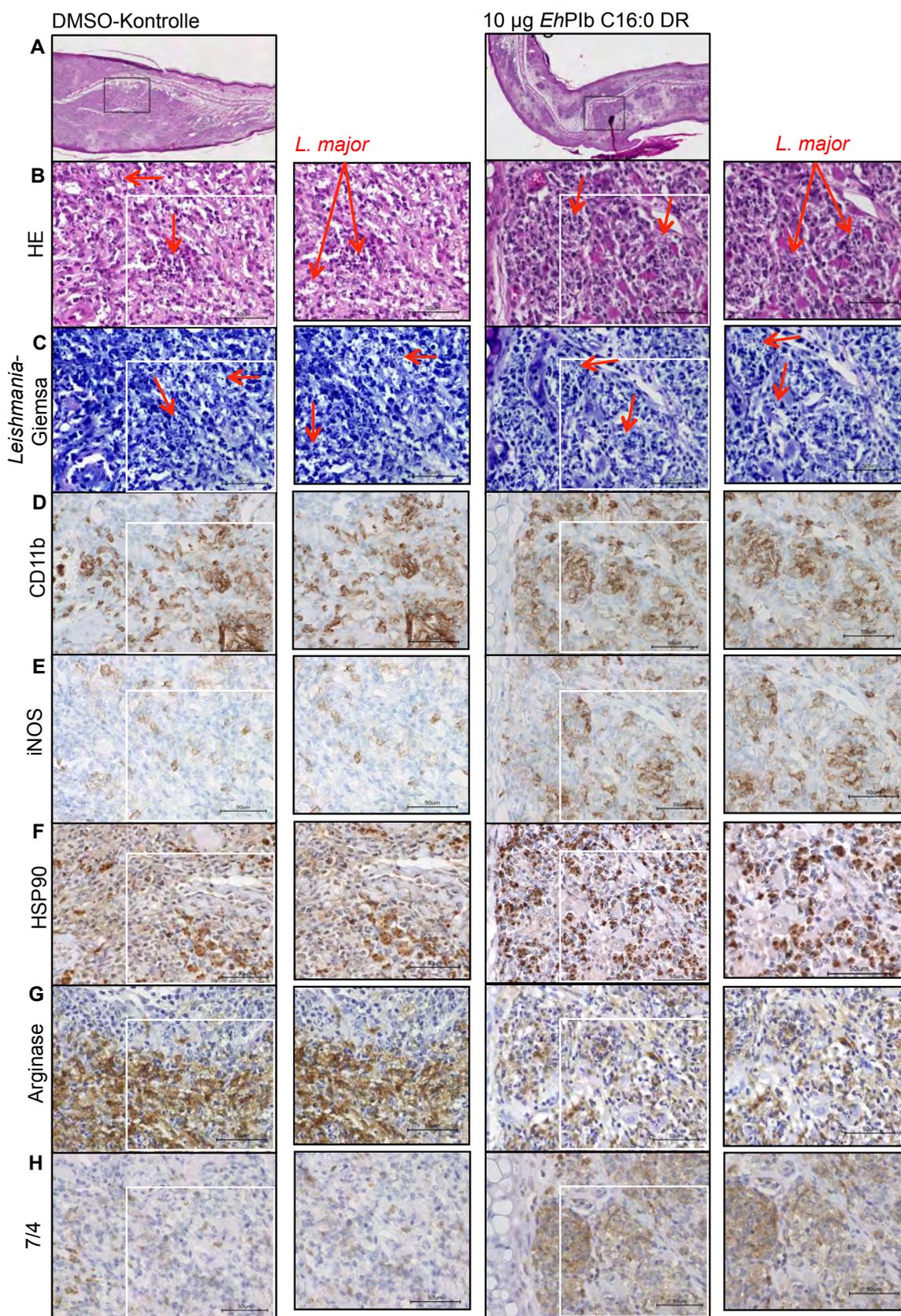
Monozyten und Makrophagen wurden durch die CD11b-Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Sowohl in DMSO-behandelten als auch in *EhPIb* C16:0 DR-behandelten Geweben sind beide Immunzelltypen vorzufinden und mengenmäßig nicht voneinander zu unterscheiden (Abbildung 40 D).

Das Molekül iNOS wurde ebenfalls mittels eines spezifischen Antikörpers innerhalb des Gewebes angefärbt. Das Gewebe, das mit 10 µg-*EhPIb* C16:0 DR behandelt wurde, weist eine höhere iNOS-Expression auf im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 40 E). Es kann festgestellt werden, dass CD11b<sup>+</sup>-Zellen an der Expression von iNOS beteiligt sind.

Mit Hilfe von Antikörpern, die gegen Arginase sind, wurde die lokale Expression dieses Moleküls nachgewiesen. Es ist auffällig mehr Arginase in dem DMSO-behandelten Gewebe als in *EhPIb* C16:0 DR-behandeltem Ohrgehörte zu sehen (Abbildung 40 G). Zudem ist festzustellen, dass CD11b<sup>+</sup>-Zellen neben iNOS auch Arginase exprimieren können.

Neutrophile Granulozyten wurden mit der spezifischen 7/4-Antikörperfärbung angefärbt. Im 10 µg *EhPIb* C16:0 DR-behandelten Ohrgehörte ist eine Ansammlung dieser Immunzellen zusehen, während in der dazugehörigen DMSO-Kontrolle deutlich weniger neutrophile Granulozyten angefärbt sind (Abbildung 40 H).

Abschließend kann festgestellt werden, dass nach optischer Verheilung der *L. major*-Infektion sowohl in *EhPIb* C16:0 DR behandeltem Gewebe als auch in den DMSO-Kontrollen trotzdem noch Leishmanien im Gewebe vorzufinden sind. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass CD11b<sup>+</sup>-Zellen iNOS und Arginase exprimieren, während 7/4<sup>+</sup>-Zellen kein iNOS sezernieren. Zudem ist deutlich mehr Arginase in DMSO-behandeltem Gewebe als in *EhPIb* C16:0 DR-behandeltem Gewebe zu finden.



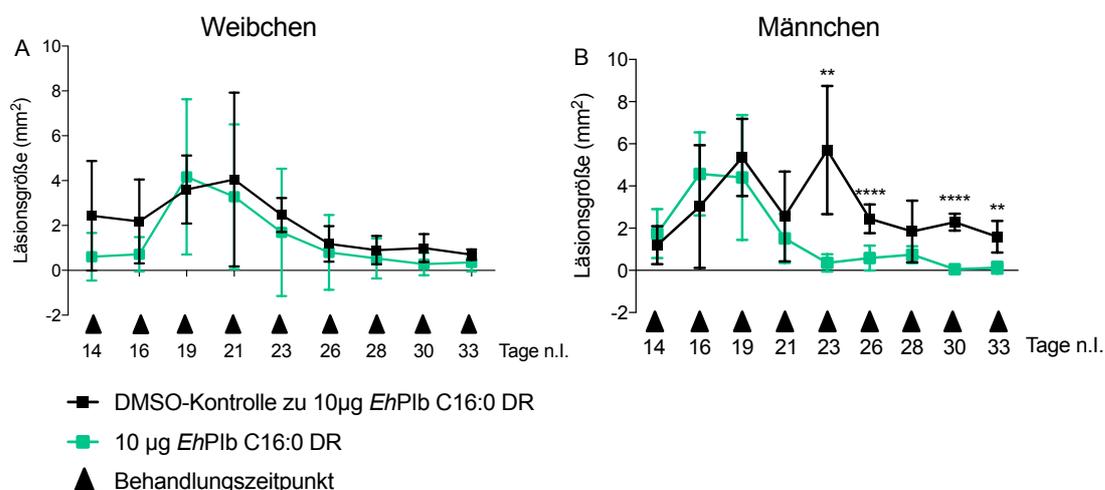
**Abbildung 40: Immunhistologische Lokalisation von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in *L. major*-infizierten C57BL/6-Mäusen sowie Arg 1 und iNOS exprimierende Zellen.** Aufeinanderfolgende Schnitte von in Paraffin eingebettetem Ohrgehör *L. major*-infizierter C57BL/6-Mäuse, die immunhistologisch gefärbt wurden. A: HE-Übersichtsfärbung. B: HE-Färbung. C: Leishmanien-Giemsa-Färbung (*L. major*). D: CD11b-Färbung (Monozyten & Makrophagen). E: iNOS-Färbung. F: anti-HSP90-Färbung (*L. major*). G: Arginase-Färbung. H: 7/4-Färbung (Neutrophile Granulozyten). Die roten Pfeile zeigen auf *L. major*. 40x-Vergrößerung.

### 3.4.2.3 Untersuchung auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied in *in vivo* *L. major*-infizierten C57BL/6-Mäusen während der Behandlung mit dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIb* C16:0 DR

Ein relevanter Risikofaktor bei Infektionskrankheiten kann das Geschlecht sein. Aufgrund ihrer genetischen Grundlage entwickeln Männer und Frauen eine unterschiedliche Immunantwort auf Infektionen, wodurch sich mögliche Krankheitssymptome im Patienten individuell manifestieren (Roberts, Walker et al. 2001). In der kutanen Leishmaniose gibt es einen solchen Geschlechterunterschied mit einer höheren Morbiditätsrate für Männer im Vergleich zu Frauen (Soares, Abad-Franch et al. 2014).

In einem weiteren *in vivo*-Versuch wurden C57BL/6-Weibchen und -Männchen mit metazyklischen *L. major*-Promastigoten (Stamm 5ASKH, passagiert in der C57BL/6-Maus) infiziert und mit einsetzender Ohrschwellung mit 10 µg *EhPIb* C16:0 DR behandelt, um zum einen den geschlechtsspezifischen Unterschied in der kutanen Leishmaniose zu überprüfen und zum anderen die therapeutischen Wirkung des synthetischen Analogons *EhPIb* C16:0 DR weiter zu untersuchen.

Der Versuch bestätigt den geschlechtsspezifischen Unterschied in der kutanen Leishmaniose, da die C57BL/6-Weibchen kleinere Schwellungen mit einer maximalen Größe von 4,1 mm<sup>2</sup> entwickeln, während eine Leishmanien-Infektion bei den Männchen dieser Rasse deutlich größere Schwellungen (5,7 mm<sup>2</sup>) induzierte (Abbildung 41). Darüber hinaus zeigte in diesem Versuch nur die Behandlung von C57BL/6-Männchen mit 10 µg *EhPIb* C16:0 DR eine therapeutische Wirkung auf den *L. major*-induzierten Infektionsverlauf. Die Ohrschwellung der C57BL/6-Weibchen wurde durch *EhPIb* C16:0 DR nicht beeinflusst.



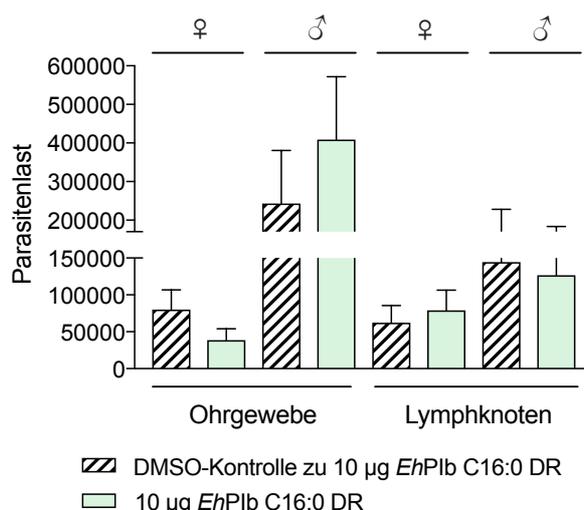
**Abbildung 41: Einfluss des synthetischen *EhPI*-Analogons *EhPIb* C16:0 DR auf *in vivo* *L. major*-infizierte C57BL/6-Weibchen und -Männchen.** Verlauf der *L. major*-induzierten Ohrschwellung von C57BL/6-Weibchen (A) und Männchen (B) mit Behandlung des synthetischen *EhPI*-Analogons *EhPIb* C16:0 DR (10 µg). Mittelwert ± Standardfehler, n=5 - 10, *unpaired Student's t test*, \*\*p≤0,01, \*\*\*\*p≤0,0001.

### 3.4.2.4 Bestimmung der Parasitenlast *L. major*-infizierter C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIb* C16:0 DR

Zur Bestimmung der Parasitenlast *L. major*-infizierter C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIb* C16:0 DR wurden die Leishmanien aus dem infizierten Ohrgewebe sowie aus dem Lymphknoten isoliert und eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Verdünnungen wurden in einem Dilutions-Assay verwendet (in Kooperation mit Rafael de Freitas e Silva, PhD). Nach vier Wochen wurden die Leishmanien ausgezählt, um die Parasitenlast zu bestimmen.

Nach Auswertung der Datenanalyse war festzustellen, dass die Parasitenlast in dem Ohrgewebe sowie Lymphknoten von C57BL/6-Weibchen und -Männchen deutlich geringer ist als die injizierte Infektionsmenge von  $3 \times 10^6$  *L. major*-Parasiten (Abbildung 42). In C57BL/6-Weibchen ist darüber hinaus eine geringere Menge an Leishmanien nachzuweisen als in den Männchen. Die Leishmanienlast der *EhPIb* C16:0 DR-behandelten Männchen war um ein 10-faches höher als die Leishmanienlast der C57BL/6-Weibchen im Ohrgewebe. Im Lymphknoten von *EhPIb* C16:0 DR- und DMSO-behandelten Männchen hingegen war die Menge an Leishmanien nur geringfügig höher als die der weiblichen Tiere.

Resümierend kann festgestellt werden, dass der therapeutische Einfluss, der anhand der gemessenen Ohrschwellung in diesem *in vivo* Versuch für C57BL/6-Männchen nachgewiesen wurde, durch die Bestimmung der Parasitenlast nicht verifiziert werden konnte.



**Abbildung 42:** Bestimmung der Parasitenlast *L. major*-infizierter C57BL/6-Weibchen (♀) und -Männchen (♂) nach Behandlung mit dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIb* C16:0 DR. Die Leishmanien wurden aus dem Ohrgewebe sowie aus den Lymphknoten *L. major*-infizierter C57BL/6-Mäuse isoliert und zur Bestimmung der Parasitenlast in einem Dilutions-Assay eingesetzt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, n=5.

### **3.5 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge in einem *M. tuberculosis*-Infektionsmodell mit murinen Knochenmarksmakrophagen**

Das immuntherapeutische Potential von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge wurde gegen *M. tuberculosis*-infizierte murine Zellen untersucht, indem die anti-bakterielle Aktivität von den genannten Molekülen in einem *in vitro* Infektionsmodell mit *M. tuberculosis* bestimmt wurde.

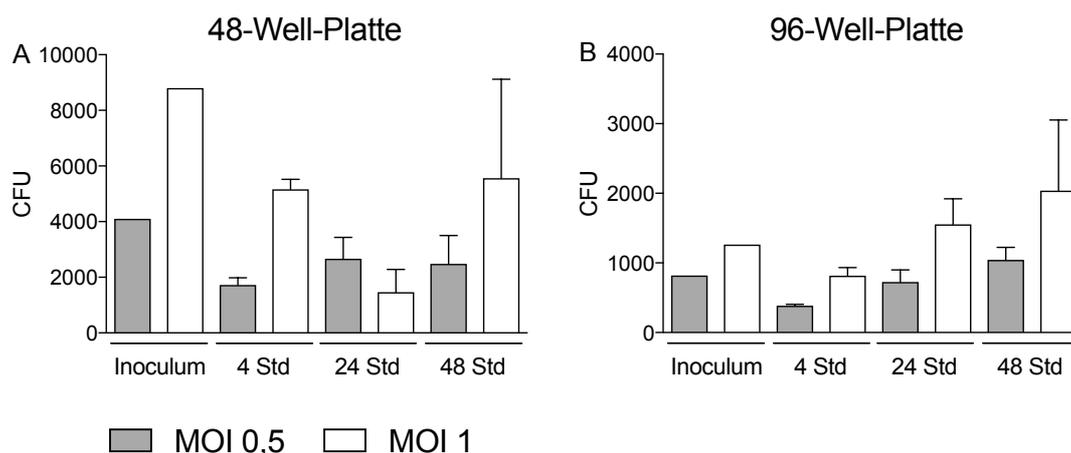
#### **3.5.1. Bestimmung der Infektionsrate und Inkubationszeit für den *in vitro***

##### ***M. tuberculosis*-Infektionsversuch mit murinen Knochenmarksmakrophagen**

Zur Bestimmung der anti-bakteriellen Aktivität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge wurde ein Mykobakterien-Infektionsmodell mit murinen Knochenmarksmakrophagen durchgeführt, das in der Arbeitsgruppe von Dr. Christoph Hölscher etabliert und für diesen Versuch adaptiert wurde. BMDMs wurden mit *M. tuberculosis* (Stamm H37Rv) infiziert. Nachfolgend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die Verdünnungen auf Kultivierungsplatten ausgestrichen und bebrütet. Nach vier Wochen wurden die gewachsenen Mykobakterien-Kolonien ausgezählt die CFU ermittelt.

Durch die Analyse der CFU konnte festgestellt werden, dass doppelt so viele Bakterien in den Proben mit einer MOI von 1 vorhanden waren, im Vergleich zu Proben, die mit der Hälfte der Bakterien (MOI 0,5) infiziert wurden (Abbildung 43).

In der 96-Well-Platte war die CFU sowohl mit eine MOI von 0,5 (383,3 CFU) als auch einer MOI von 1 (816,6 CFU) nach vierstündiger Inkubation zunächst reduziert und nahm dann mit fortschreitender Inkubationsdauer (MOI 0,5: 24 Std: 726,6 CFU, 48 Std: 1043,3 CFU; MOI 1: 4 Std: 1553,3 CFU, 48 Std: 2040 CFU) wieder zu (Abbildung 43). In der 48-Well-Platte wurde ein solch verlässlicher Infektionsverlauf nicht nachgewiesen werden, weshalb die weiteren Mykobakterien-Infektionsversuche in der 96-Well-Platte durchgeführt wurden. Aufgrund der Arbeitssicherheit wurde mit der geringeren MOI von 0,5 weitergearbeitet.



**Abbildung 43: Bestimmung der optimalen Infektionsrate und Inkubationszeit für den *in vitro* *M. tuberculosis*-Infektionsversuch mit murinen Knochenmarksmakrophagen.** BMDMs wurden in einer 48-Well-Platte und 96-Well-Platte ausgesät und mit *M. tuberculosis*-Bakterien (MOI 0,5 & 1) infiziert. Nach 4 Std, 24 Std und 48 Std, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und die Verdünnungen ausplattiert. Vier Wochen später wurden die gewachsenen Mykobakterien-Kolonien ausgezählt und die CFU berechnet.

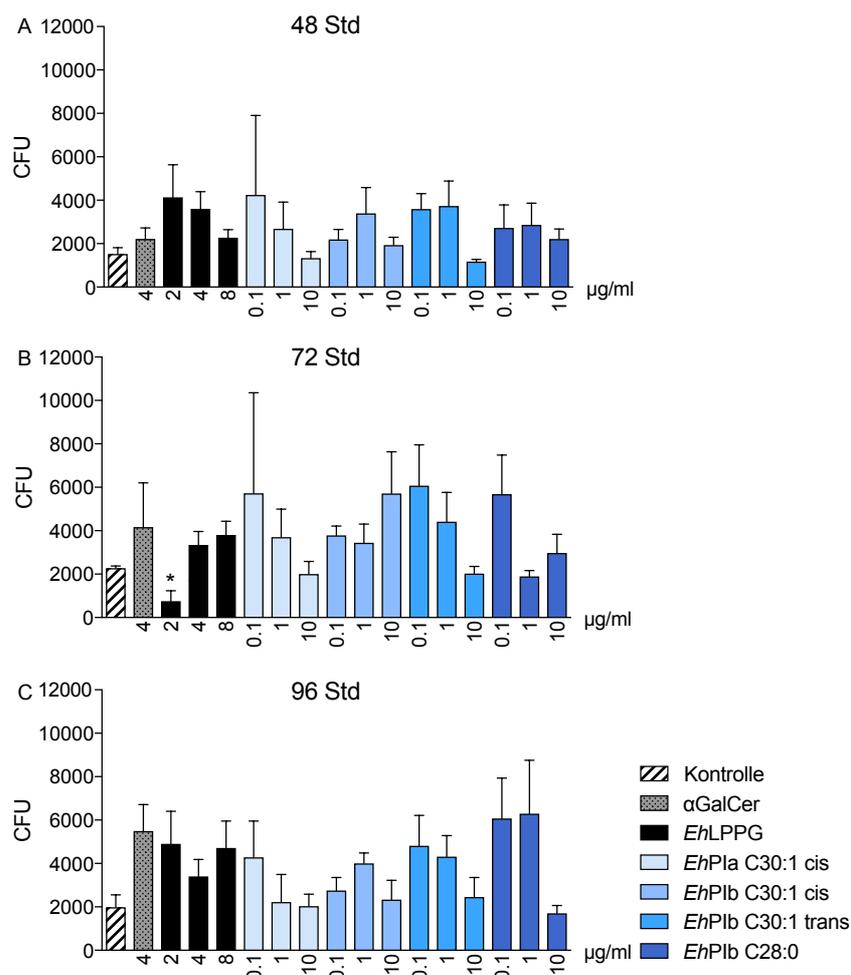
### 3.5.2 Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auf *in vitro*

#### *M. tuberculosis*-infizierte murine Knochenmarksmakrophagen

Um den therapeutischen Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auf *in vitro* *M. tuberculosis*-infizierte murine Knochenmarksmakrophagen zu untersuchen, wurde der Mykobakterium-Infektionsversuch mit murinen BMDMs durchgeführt. Hierfür wurden *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagen mit den Molekülen zusammen inkubiert, mit denen zu verschiedenen Zeitpunkten (24 Std, 48 Std, 72 Std oder 96 Std) eine Verdünnungsreihe erstellt wurde.

Abbildung 44 zeigt die errechnete CFU *M. tuberculosis*-infizierter BMDMs nach Behandlung mit  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 1.

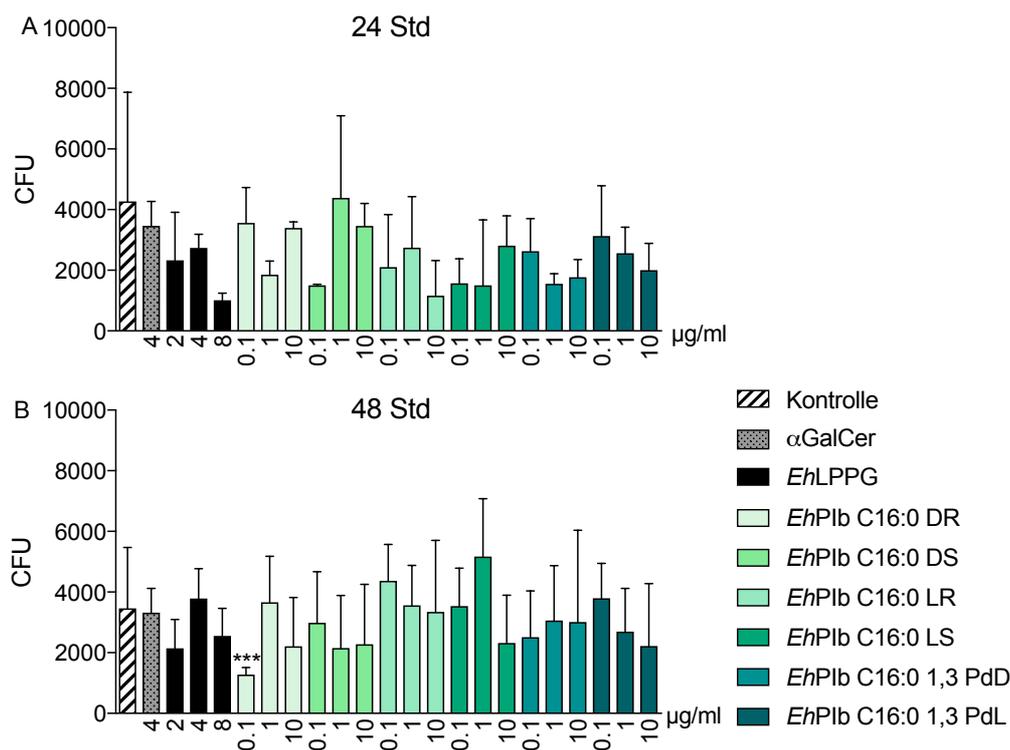
Die Behandlung mit  $\alpha$ GalCer (4  $\mu$ g/ml) oder mit den synthetischen *EhPI*-Analoga (0,1 - 10  $\mu$ g/ml) zeigte zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf die anti-bakterielle Aktivität. Nur die Behandlung mit *EhLPPG* führte mit einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml zu einer signifikant Senkung der CFU (755 CFU, \* $p \leq 0,05$ ) nach 72 Std, während die höheren Dosen keinen Effekt bewirkten (4  $\mu$ g/ml: 3348 CFU; 8  $\mu$ g/ml: 3808,3 CFU).



**Abbildung 44: Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge auf *in vitro* *M. tuberculosis*-infizierte murine Knochenmarksmakrophagen.**  $8 \times 10^4$  Makrophagen wurden mit  $4 \times 10^4$  *M. tuberculosis*-Bakterien (Stamm H37Rv) infiziert und anschließend mit  $\alpha$ GalCer (4 µg/ml), *EhLPPG* (2 - 8 µg/ml) oder den synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1 (0,1 - 10 µg/ml) zusammen inkubiert. Nach 48 Std, 72 Std und 96 Std wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und die Verdünnungen ausplattiert. Vier Wochen später wurden die gewachsenen Mykobakterien-Kolonien ausgezählt und die CFU berechnet. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, unpaired Student's *t* test, \* $p \leq 0,05$ .

Die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 2, deren Konformation in ihrem stereometrischen Zentrum verändert wurde, wurden ebenfalls in diesem Infektionsversuch auf ihren therapeutischen Einfluss gegenüber *M. tuberculosis*-infizierten BMDMs untersucht.

Wie in Abbildung 45 dargestellt, wurde das bakterielle Wachstum nicht durch die Behandlung mit  $\alpha$ GalCer (4 µg/ml), *EhLPPG* (2 - 8 µg/ml) oder den synthetischen *EhPI*-Analoge (*EhPIb* C16:0 DS; *EhPIb* C16:0 LR; *EhPIb* C16:0 LS; *EhPIb* C16:0 1,3 PdD; *EhPIb* C16:0 1,3 PdL; 0,1 - 10 µg/ml) beeinträchtigt. Als einziges synthetischen *EhPI*-Analogon hingegen induzierte *EhPIb* C16:0 DR mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml eine hoch signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums nach 48 Std (2216,6 CFU, \*\*\* $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 45: Einfluss von EhLPPG und den synthetischen EhPI-Analoga auf *in vitro* M. tuberculosis-infizierte murine Knochenmarksmakrophagen.**  $8 \times 10^4$  Makrophagen wurden in eine 96-Well-Platte ausgesät und mit  $4 \times 10^4$  M. tuberculosis-Bakterien (Stamm H37Rv) infiziert und anschließend mit αGalCer (4 µg/ml), EhLPPG (2 - 8 µg/ml) oder den synthetischen EhPI-Analoga der Gruppe2 (0,1 - 10 µg/ml) zusammen inkubiert. Nach 48 Std, 72 Std und 96 Std wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und die Verdünnungen ausplattiert. Vier Wochen später wurden die gewachsenen Mykobakterien-Kolonien ausgezählt und die CFU berechnet. Mittelwert ± Standardfehler, unpaired Student's t test, \*\*\*p ≤ 0,001.

## 4. Diskussion

Das membranständige Lipopeptidphosphoglykan von *E. histolytica* (*EhLPPG*) weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Molekül  $\alpha$ Galactosylceramid ( $\alpha$ GalCer), dem effektivsten Liganden invarianter Natürlicher Killerzellen T (iNKT-Zellen). Die iNKT-Stimulation mit  $\alpha$ GalCer führt nach kürzester Zeit zur Sekretion großer Mengen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine (Van Kaer 2005). Eine Herangehensweise in der Therapie ist, das eigene Immunsystem in der Bekämpfung der Infektion zu unterstützen. Ein möglicher Therapieansatz kann dabei die spezifische Aktivierung von iNKT-Zellen sein, da bereits eine protektive Wirkung mit  $\alpha$ GalCer und weiteren Glykolipiden bei verschiedenen Krankheiten erzielt werden konnte.

Die kutane Leishmaniose ist eine Infektionskrankheit, die durch Leishmanien-Spezies (vorwiegend *L. major*) verursacht wird und zu ulzerierenden Hautläsionen bis hin zu entstellender Narbenbildung führen kann. Für diese Erkrankung gibt es momentan keine zufriedenstellende Behandlungsweise. Die Auswahl an Medikamenten ist begrenzt und die Therapie für viele betroffene Patienten zu kostenintensiv. Zudem sind schwerwiegende Nebenwirkungen, wie Herzrhythmusprobleme und Nierenversagen, bei der systemischen Behandlung einer lokalen, selbstlimitierten Hautläsion nicht vertretbar. Die Parasiten ihrerseits haben zahlreiche Mechanismen entwickelt, das Immunsystem des Wirts gezielt zu manipulieren, um ihre Eliminierung durch diesen zu verhindern. Dieser Aspekt erschwert die erfolgreiche Behandlung der Leishmaniose. Die spezifische Re- und Aktivierung des Immunsystems stellt für diese Krankheit eine vielversprechende Therapieoption dar.

Lotter, Gonzalez-Roldan et al. (2009) zeigten, dass die Stimulation mit *EhLPPG* zur spezifischen Aktivierung von iNKT-Zellen führt. Da die Isolierung und Aufreinigung dieses nativen Moleküls allerdings nicht unter GMP-Bedingungen möglich ist, was essentiell für die Anwendung am Menschen ist, wurden synthetische *EhPI*-Analoga von *EhLPPG* hergestellt. Neben der Synthese dieser synthetischen Moleküle wurden zusätzlich noch Modifikationen zur Verbesserung der Immunzellaktivierung eingebaut.

In dieser Arbeit wurden daher zunächst die immunstimulatorischen Eigenschaften von *EhLPPG* und den davon abgeleiteten synthetischen *EhPI*-Analoga untersucht. Hierfür wurde das Zytokinprofil muriner und humaner iNKT-Zellen nach Stimulation mit diesen Molekülen charakterisiert. Für eine potentielle spätere Anwendung als Therapeutikum am Patienten wurden *in vitro* Toxizitätsstudien mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga durchgeführt.

Darüber hinaus wurde der immuntherapeutische Einfluss dieser Moleküle im Krankheitsbild der kutanen Leishmaniose *in vitro* und *in vivo* untersucht. Um die Bioverfügbarkeit der Moleküle zu verbessern, wurden zudem einige der synthetischen Moleküle in Liposomen formuliert.

Ferner sollten das immuntherapeutische Potential von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in anderen Krankheitsbildern untersucht werden. Da der Beginn einer Infektion mit Mykobakterien ähnlich verläuft wie bei einer Infektion mit Leishmanien und Mykobakterien darüber hinaus in der Lage sind, das Immunsystem zu manipulieren, wurde der Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auch im Infektionsgeschehen der Tuberkulose untersucht.

#### **4.1. Immunstimulatorische Eigenschaften von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga durch Analyse des induzierten Zytokinprofils muriner und humaner iNKT-Zellen**

Zur Bestimmung der immunstimulatorischen Eigenschaften von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga wurde das induzierte Zytokinprofil muriner und humaner iNKT-Zellen nach Behandlung der Zellen mit diesen Moleküle bestimmt. Hierfür wurde zunächst ein Zellzytokinexpressionsassay mit murinen Leber- sowie Milzlymphozyten etabliert und zudem ein Zellzytokinexpressionsassay mit humanen PBMCs durchgeführt, womit das Zytokinprofil charakterisiert wurde.

Die Ergebnisse zur Etablierung des Zellzytokinexpressionsassays zeigten, dass die IFN  $\gamma$ -Konzentration nach *EhLPPG*-Stimulation in den Leberlymphozyten nach 24 Std bereits deutlich höher war, als in der gleichen Anzahl Milzlymphozyten nach 72 Std. Auch die Stimulation mit  $\alpha$ GalCer induzierte bereits nach 24 Std in Leberlymphozyten die Produktion eines hohen Levels an IFN  $\gamma$ ., das auch mit zunehmender Inkubationszeit (48 Std, 72 Std) gehalten werden konnte. Die IFN  $\gamma$ -Konzentration in der gleichen Anzahl Milzlymphozyten fiel nach Inkubation mit  $\alpha$ GalCer nach 24 Std deutlich geringer aus, stieg jedoch mit längerer Inkubation (48 Std, 72 Std) ebenfalls an.

Da der Anteil an iNKT-Zellen in der Lymphozytenpopulation der murinen Leber deutlich höher liegt (um die 30%) als in der Lymphozytenpopulation der murinen Milz (2,5%) (Bendelac, Savage et al. 2007), wurden vermutlich prozentual mehr iNKT-Zellen durch das *EhLPPG* stimuliert, sodass IFN  $\gamma$  in höherer Konzentration produziert wurde. Allerdings zeigten die Ergebnisse auch, dass durch  $\alpha$ GalCer eine stärkere Zytokinexpression in beiden

Lymphozytenpopulationen hervorgerufen werden konnte. Dies lässt vermuten, dass  $\alpha$ GalCer ein stärkerer iNKT-Zellaktivator als *EhLPPG* ist. Fujii, Shimizu et al. (2002) wiesen nach, dass die Stimulation mit  $\alpha$ GalCer innerhalb der ersten 12 Std zu einer Sekretion großer Mengen an Zytokinen führt. Dies erklärt, warum nach 24-stündiger Stimulation mit  $\alpha$ GalCer eine erhöhte IFN  $\gamma$ -Konzentration im Zellzytokinexpressionsassay gemessen werden konnte. Zudem zeigten Fujii, Shimizu et al. (2002), dass insbesondere die  $\alpha$ GalCer-Präsentation dendritischer Zellen (im Vergleich zur Behandlung nur mit  $\alpha$ GalCer allein) iNKT-Zellen dazu veranlasst, IFN  $\gamma$  zu produzieren und die Produktion über einen längeren Zeitraum (>4 Tage) aufrechtzuerhalten. Dies lässt vermuten, dass  $\alpha$ GalCer optimal über die DCs präsentiert wird, sodass auch die iNKT-Zellen in den Milzlymphozyten stimuliert werden konnten und zur IFN  $\gamma$ -Produktion angeregt wurden.

Nach der Etablierung des murinen Zellzytokinexpressionsassays wurden die synthetischen *EhPI*-Analoge getestet und die IFN  $\gamma$ - sowie die IL 4-Konzentration ermittelt. Neben  $\alpha$ GalCer und *EhLPPG* induzierten die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 2 *EhPIb* C16:0 DS und *EhPIb* C16:0 1,3 PdD die Produktion von IFN  $\gamma$  und IL 4. Außerdem führte die Stimulation mit den synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1 *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 trans und *EhPIb* C28:0 zu einer erhöhten IFN  $\gamma$ -Konzentration, jedoch zu keiner Produktion von IL 4.

Aufgrund ihrer Struktur stimulieren die Moleküle die iNKT-Zellen in unterschiedlicher Intensität, wodurch verschiedene Zytokinprofile induziert werden. Bei der iNKT-Zellaktivierung spielt die Interaktion des invarianten T-Zellrezeptors mit dem CD1d-präsentierten Glykolipid eine wichtige Rolle, welche von der Stabilität und der Bindungsaffinität des Glykolipid-CD1d-Molekül-Komplexes abhängig ist (Cerundolo, Silk et al. 2009). Des Weiteren ist die Stimulationsfähigkeit der Glykolipide zusätzlich von der Präsentation ihrer polaren Kopfgruppe zum invarianten T-Zellrezeptor abhängig (Anderson, Teyton et al. 2013). CD1d-Moleküle besitzen eine Bindungsgrube mit zwei Kanälen (A' und F'), die für die optimale Präsentation von Lipidantigenen im Vergleich zu MHC-Molekülen tiefer und enger geschnitten ist (Tupin, Kinjo et al. 2007). In den A'- und F'-Kanälen werden die Alkyl- und Fettsäureketten der Glykolipide gebunden. Cerundolo and Kronenberg (2010) zeigten, dass eine kürzere Phytosphingosinkette bei der Bindung im F'-Kanal zu einer erhöhten IL 4-Sekretion führt. Die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 2 besitzen zwei kurze C16:0-Fettsäureketten, mit denen sie in der Lage sind die IL 4-Produktion in iNKT-Zellen zu stimulieren. Die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1 sind wiederum mit einer langen C30:1-Fettsäurekette und teilweise mit einer kurzen C16:0-Fettsäurekette

verknüpft. Folglich kann angenommen werden, dass die synthetischen Moleküle der Gruppe 1 möglicherweise mit der langen Fettsäurekette in den F'-Kanal binden und infolgedessen die iNKT-Zellen nicht zur IL 4-Produktion angeregt werden. Im Gegensatz dazu scheint die Bindung einer kurzen oder langen Lipidkette in einer der beiden Kanäle ausreichend zu sein, um die Sekretion von IFN  $\gamma$  zu induzieren. Die Stimulationsfähigkeit der Glykolipide ist zudem von der Länge der Fettsäurekette sowie ihrer Saturierung abhängig. Demnach führt eine kürzere Fettsäurekette zu einer stärkeren Dissoziation des Glykolipid-CD1d-Molekül-Komplexes (Yu and Porcelli 2005). Diese Annahme konnte in diesem Zellzytokinexpressionsassay nicht bestätigt werden, da die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 2 mit kürzeren Fettsäureketten iNKT-Zellen stärker aktivierten, da sie sowohl die IFN  $\gamma$  als auch die IL 4-Produktion dieser Zellen induzierten.

Die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1 unterscheiden sich generell in ihrer Anzahl und Länge der Fettsäureketten sowie deren Saturierung von den synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 2. Diese weisen wiederum zwei gleich lange Fettsäureketten auf und sind zudem in der Konformation des Phosphatidylinisitolrings und des Glycerins verändert. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Molekülgruppen auf verschiedene Weise wirken. Die Ergebnisse des murinen Zellzytokinexpressionsassays deuten darauf hin, dass sich die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 2 besser an die CD1d-Moleküle anlagern als die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1.

Das Zytokinprofil humaner PBMCs nach Stimulation mit *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge wurde mittels LEGENDplex™-Assay bestimmt. Die Stimulation mit  $\alpha$ GalCer führte zur Produktion aller pro- und anti-inflammatorischer Zytokine (IL 2, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL 17 A/F, IL 6, IL 4, IL 10, IL 13, IL 21), während *EhLPPG* sowohl deutlich geringere Zytokin-Konzentrationen induzierte, als auch einen größeren Einfluss auf die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL 2, TNF  $\alpha$ , IL 17, IL 6) als auf die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokine (IL 10) ausübte. Alle synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1 erhöhten allein die TNF  $\alpha$ -Sekretion. Nur *EhPIa* C30:1 cis führte zur Produktion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine (IL 2, TNF  $\alpha$ , IL 17A/F, IL 6).

Eine Stimulation mit  $\alpha$ GalCer führte zu keiner gerichteten Immunantwort, da stimulierte iNKT-Zellen im gleichen Maße sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine sezernierten. Cerundolo and Kronenberg (2010) beschrieben die Interaktion von invariantem T-Zellrezeptor der iNKT-Zellen mit dem  $\alpha$ GalCer-CD1d-Komplex als ein Schlüssel-Schloss-Prinzip. Hierbei wird angenommen, dass durch die räumliche Passgenauigkeit aller beteiligten Komponenten diese ihre Funktion ideal ausführen können, was in einer optimalen iNKT-

Zellaktivierung resultiert. Vorangegangene Untersuchungen der Lipidkettellänge von  $\alpha$ GalCer deuteten zudem daraufhin, dass humane PBMCs besser mit nur einer Lipidkette stimuliert werden können. Diese Annahme stimmte mit den Ergebnissen diesen Versuchs überein. Die Stimulation mit *EhPIa* C30:1 cis, dem einzigen synthetische *EhPI*-Analogon mit nur einer langen Fettsäurekette, induzierte nach  $\alpha$ GalCer und *EhLPPG* die Produktion der meisten Zytokine. CD1d-Moleküle werden in der Maus und im Menschen homolog exprimiert (Anderson, Teyton et al. 2013). Die Bindung der Glykolipide an den A'- und F'-Kanälen der CD1d-Bindungsgrube humaner PBMCs spielt daher eine ebenso entscheidende Rolle für die Stimulationsfähigkeit der Moleküle wie in dem murinen Zellzytokinexpressionsassay. Die Ergebnisse legen nahe, dass insbesondere eine lange Fettsäurekette nötig ist, um eine optimale CD1d-Präsentation zu gewährleisten, die dann zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch iNKT-Zellen führt.

Im Gegensatz dazu zeigten die synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 2 in diesem Assay keine stimulierende Wirkung auf humane PBMCs. Lediglich *EhPIb* C16:0 DR und *EhPIb* C16:0 1,3 PdL induzierten eine leicht erhöhte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL 21. Diese Ergebnisse deuten auf einen anderen Wirkmechanismus dieser *EhPI*-Analoga hin. Allerdings kann auch die Funktionalität des LEGENDplex™-Assays in diesem Fall in Frage gestellt werden, da neben den gemessenen Zytokinwerten der einzelnen synthetischen *EhPI*-Analoga auch die Zytokinmengen nach Stimulation der iNKT Zellen mit  $\alpha$ GalCer sehr gering ausfielen. Die Funktionalität des Moleküls  $\alpha$ GalCer wurde durch die erneute Testung einer frisch angesetzten Lösung  $\alpha$ GalCer verifiziert. Auch hier konnten nur geringe Zytokinexpressionen erzielt werden. Um eine Dysfunktion des genutzten LEGENDplex™-Kits auszuschließen, sollten die Versuche mit einem neuen LEGENDplex™-Kit einer anderen Charge wiederholt werden oder versucht werden, die Zytokinexpression auf andere Weise (z.B. ELISA) zu ermitteln.

Moleküle beider Gruppen zeigen jedoch immunstimulatorische Eigenschaften bei Verwendung muriner iNKT-Zellen. Zusammenfassend könnte man vermuten, dass sich die synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 1 prinzipiell besser eignen, um gezielt humane iNKT-Zellen zu aktivieren und sich aufgrund dessen möglicherweise für entsprechende therapeutische Fragestellungen eignen.

Das native *EhLPPG* besitzt im Gegensatz zu den synthetischen *EhPI*-Analoga zusätzlich einen extrazellulären Zuckerrest. Glykostrukturen werden ubiquitär auf der Zelloberfläche sowie innerhalb der Zelle von pro- und eukaryotischen Proteinen exprimiert. Moremen, Tiemeyer et al. (2012) beschrieben, dass Glykanstrukturen zum einen zur dreidimensionalen

Struktur der Proteine mitbeitragen und zum anderen ihre Stabilität erhöhen. Infolgedessen sind sie maßgeblich an der Funktionalität der Proteine beteiligt. Um die Zellaktivierung der synthetischen *EhPI*-Analoge zu verbessern, wurden zwei synthetische *EhPI*-Analoge (GlcN-*EhPIb* C30:1 cis und *EhGIPIb* C30:1 cis) in Anlehnung an das native *EhLPPG* zusätzlich glykosyliert und ihre immunstimulatorischen Eigenschaften ebenfalls in einem murinen Zellzytokinexpressionsassay mittels ELISA und LEGENDplex™-Assay bestimmt. GlcN-*EhPIb* C30:1 cis induzierte eine konzentrationsabhängige IFN  $\gamma$ -Produktion. Die sezernierte IFN  $\gamma$ -Menge nach Stimulation mit GlcN-*EhPIb* C30:1 cis war vergleichbar mit der  $\alpha$ GalCer-induzierten IFN  $\gamma$ -Konzentration. Zudem wurde eine höhere IFN  $\gamma$ -Konzentration durch die Stimulation mit GlcN-*EhPIb* C30:1 cis erzielt, als mit *EhLPPG*-Stimulation. GlcN-*EhPIb* C30:1 cis führte darüber hinaus nach 48 Std zur Induktion der IL 4-Produktion, die jedoch nach 72 Std wieder konzentrationsabhängig abnahm. Im Gegensatz dazu induzierte *EhGIPIb* C30:1 cis keine IFN  $\gamma$ -Produktion, zeigte allerdings eine konzentrationsabhängige Induktion der IL 4-Produktion nach 72 Std.

Im nachfolgenden LEGENDplex™-Assays führte die Stimulation mit GlcN-*EhPIb* C30:1 cis zur einer gesteigerten Konzentration proinflammatorischer Zytokine (IL 1 $\alpha$ , TNF  $\alpha$ , MCP1, IL 17A, IL 6 und GM-CSF), während *EhGIPIb* C30:1 cis keine nennenswerte Zytokinproduktion induzierte.

Die Ergebnisse des ELISAs und des LEGENDplex™-Assays deuten daraufhin, dass *EhPI*-Analoge mit einer zusätzlichen Glykosylierung zu einer stärkeren Aktivierung der iNKT-Zellen und weiterer Zellen führen. Die Glykosylierung der Moleküle könnte über die chemische Verstärkung der polaren Kopfgruppe zu einer intensiveren Aktivierung des invarianten T-Zellrezeptors führen. Dies wiederum resultiert in einer stärkeren iNKT-Zellaktivierung. Verschiedene Studien wiesen nach, dass der Glykolipid-CD1d-Komplex die Addition kleiner Moleküle am C6-Atom des Zuckers von  $\alpha$ GalCer toleriert (Cerundolo and Kronenberg 2010). In den gleichen Studien wurde jedoch auch festgestellt, dass andere, längere Substitutionen die iNKT-Zellaktivierung inhibieren und eine Glykosylierung der polaren Kopfgruppe für iNKT-Zellen zur Erkennung nicht essentiell ist. Anhand dieser Aussagen kann geschlussfolgert werden, dass GlcN-*EhPIb* C30:1 cis, das mit einem Glucosamin glykosyliert wurde, besser mit dem CD1d-Molekül interagiert hat und in der Lage war iNKT-Zellen zu stimulieren. Die Struktur von *EhGIPIb* C30:1 cis, das mit vier funktionellen Zuckergruppen (Galaktose, Mannose, Mannose, Glucosamin) versehen wurde, fügte sich vermutlich schlechter in das CD1d-Molekül bzw. T-Zellrezeptor ein, sodass die stimulierende Wirkung aufgehoben wurde.

Die Analyse des LEGENDplex™-Assays zeigte zudem auf, dass GlcN-*EhPIb* C30:1 cis vorwiegend die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL 1 $\alpha$ , TNF  $\alpha$ , MCP1, IL 17A, IL 6 und GM-CSF) induzierte, welche an der Eliminierung eines Pathogenes beteiligt sein können. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL 1 $\alpha$  und TNF  $\alpha$  sind an der Regulation der frühen Immunantwort beteiligt. IL 1 $\alpha$  aktiviert T-Zellen (Bendtzen and Svenson. 2007) und beispielsweise die Expression von IL 1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  und IL 6 in humanen Myofibroblasten des Herzens (Turner, Das et al. 2009), während TNF  $\alpha$  die Zytokinproduktion der Th1-Antwort koordiniert und notwendig in der protektiven Immunantwort gegen *M. tuberculosis* in Mäusen ist (Flynn, Goldstein et al. 1995). Des Weiteren ist MCP 1 eins der Hauptchemokine, dass die Migration sowie Infiltrierung von Monozyten und Makrophagen reguliert (Deshmane, Kremlev et al. 2009). Diese produzieren iNOS und töten u.a. auf diese Weise Pathogene ab. IL 17A aktiviert sowohl NF- $\kappa$ B-Kinasen, die die Expression von IL 6 induzieren und verstärkt die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO, NCBI, Gene ID: 3605, 2018). Der Wachstumsfaktor GM-CSF wird lokal produziert und rekrutiert zirkulierende Lymphozyten zur Inflammation und verstärkt ihre Funktionen in der protektiven Immunantwort (Shi, Liu et al. 2006).

Zusammenfassend bietet die Glykosylierung der *EhPI*-Analoge mit einem Zucker eine Möglichkeit die Aktivierung von Immunzellen zu verbessern. GlcN-*EhPIb* C30:1 cis ist ein vielversprechender Zelligand, der eine gezielte, schützende Th1-Immunantwort induziert, indem dieser die Immunzellen dazu anregt pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine zu sezernieren.

## **4.2 Evaluierung der Toxizität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge**

Therapeutische Wirkstoffe mit einer minimalen Toxizität zu entwickeln, ist eine der großen Herausforderungen in der Entwicklung neuer Medikamente gegen die Leishmaniose. Neue Medikamente sollten keine bis nur geringe Nebenwirkungen auslösen und könnten somit eine wirkliche Alternative zu den bestehenden, meist hoch toxischen Medikamenten darstellen (Singh and Sivakumar 2004). Die Behandlung mit dem iNKT-Zelligand  $\alpha$ GalCer führte bereits zur Auslösung einer protektiven Immunantwort in Autoimmun- und Tumorerkrankungen (Tupin, Kinjo et al. 2007, Van Kaer, Parekh et al. 2011). Allerdings wiesen Stanley, Zhou et al. (2008) nach, dass die Behandlung einer viszerale Leishmaniose mit  $\alpha$ GalCer zu einer Verschlimmerung der Krankheit führt.

In dieser Arbeit wurden zum einen die Zytotoxizität als auch die hämolytische Aktivität von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge in murinen und humanen Lymphozyten getestet. Die zytotoxischen Effekte von  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge nahmen in murinen Lymphozyten über die Zeit zu. Die höchste Toxizität wurde mit der Behandlung von *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis, *EhPIb* C16:0 DR und *EhPIb* C16:0 DS, jeweils in der höchsten Konzentration (10 $\mu$ g/ml) nach 48 Std gemessen. In humanen Lymphozyten führte die Inkubation mit  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge nur zu minimalen zytotoxischen Effekten, die nach 48 Std geringfügig zunahmen. Lediglich *EhPIb* C30:1 cis induzierte bereits nach 24 Std eine höhere Toxizität im Vergleich zu den anderen Molekülen. Insgesamt ist die messbare Zytotoxizität jedoch als gering einzustufen und darüber hinaus war festzustellen, dass murine Lymphozyten im Vergleich zu humanen PBMCs etwas sensibler reagierten. Schwankungen in der Temperatur, des CO<sub>2</sub>-Drucks und allgemeiner Zellstress könnten zur Apoptose einiger Zellen im Laufe des Versuchs geführt haben, da sich auch in den Kontrollen eine vergleichbar hohe Anzahl toter Zellen befanden. Ein Grund, weshalb die murinen Zellen sensibler auf die Kulturbedingungen reagiert haben könnten, könnte in den SPF-Haltungsbedingungen und damit einer gewissen immunologischen Untrainiertheit der Zellen in der Auseinandersetzung mit Fremdanigenen begründet sein. Die humanen PBMCs wurden hingegen aus frischem Spenderblut isoliert und waren daher möglicherweise an Schwankungen und äußere Einflüsse besser angepasst, als die murinen Zellen.

Moleküle mit hydrophoben sowie hydrophilen Strukturen sind in der Lage, als Detergenzien zu fungieren, wobei sie oftmals Mizellen formen und durch Integration dieser Molekülkomplexe biologische Membranen rupturieren (Bhairi 2001). Daher könnte angenommen werden, dass  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoge mit ihrer polaren Kopfgruppe und der hydrophoben Fettsäurekette als potentielle Detergenzien Schäden an der Zellmembranen hervorrufen könnten. Lichtenberg, Ahlyayauch et al. (2013) stellten zudem die These auf, dass die Integration von Phospholipiden und Mizellenformenden Amphiphilen die Permeabilität, die Struktur sowie die Stabilität von Zellmembranen beeinflusst. Aufgrund der geringen Zytotoxizität der getesteten Moleküle kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich die Moleküle nicht in die Membranen der Zellen eingelagert haben oder ihre Integration zu keinem bedeutenden Schaden an der Zelle führte. Als einziges Molekül wies *EhPIb* C30:1 cis eine geringe Zytotoxizität in murinen und humanen Zellen, die vermutlich aufgrund einer nicht ganz fehlerfreien Synthese dieses Moleküls zurückzuführen sein könnte (mündliche Überlieferung mit Toshihiko Aiba).

Auch die durch das  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoge induzierte Hämolyse lag bei unter 1 %. Die Ergebnisse von  $\alpha$ GalCer stimmen mit der Literatur überein, da Igisu, Hamasaki et al. (1988) bereits zeigten, dass  $\alpha$ GalCer keine hämolytische Aktivität aufweist. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten war außerdem anzunehmen, dass *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoge eine ähnliche niedrige hämolytische Aktivität besitzen, was durch die erhaltenen Ergebnisse bestätigt wurde. Da *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoge nur eine geringe Zytotoxizität und eine niedrige Hämolyse induzieren, würden sich die getesteten Moleküle zur Anwendung als Therapeutikum eignen.

### **4.3 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge gegen die kutanen Leishmaniose *in vitro* und *in vivo***

Bei einer *L. major*-Infektion sind Makrophagen die Wirtszellen, in denen die Leishmanien persistierten und proliferieren und zugleich die Haupteffektorzellen zur Eliminierung dieser Parasiten führen. In Abhängigkeit der Leishmanien-Spezies und dem Immunsystem des Wirtes können Makrophagen auf dem klassischen oder dem alternativen Weg aktiviert werden (Liu and Uzonna 2012). Die Sekretion von IFN  $\gamma$  der Th1-Zellen führt zur klassischen Aktivierung von Makrophagen (M1), die infolgedessen weitere pro-inflammatorische Zytokine wie IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  und IL 12 produzieren. Die Produktion von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffspezies wird induziert, die ebenfalls an der Eliminierung der Leishmanien beteiligt sind. Die alternative Aktivierung der Makrophagen (M2) wird durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL 4 und IL 13 vermittelt. Makrophagen induzieren die Sekretion des Enzyms Arginase, wodurch die Umsetzung des toxischen Stickstoffmonoxid verhindert und ein Überleben der Leishmanien begünstigt wird (Abbildung 3, (Liu and Uzonna 2012)). Aufgrund dessen haben Leishmanien zahlreiche Mechanismen entwickelt, die alternative Aktivierung der Makrophagen zu unterstützen. Am Ende entscheidet die Interaktion zwischen Wirt und Parasit über den Infektionsverlauf und die Schwere der Krankheit (Kaye and Scott 2011).

Dass *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoge in der Lage sind, Immunzellen zu aktivieren und diese gezielt zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine anzuregen, konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden. Da die pro-inflammatorischen Zytokine die Differenzierung zum klassischen Makrophagentyp M1 unterstützen, die an der Eliminierung der Leishmanien maßgeblich beteiligt sind, wurde im nächsten Schritt der

immuntherapeutische Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auf murine und humane *L. major*-infizierte Makrophagen *in vitro* untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Behandlung von murinen *L. major*-infizierten Makrophagen mit  $\alpha$ GalCer und *EhLPPG* sowie den getesteten synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis, *EhPIb* C16:0 DR, *EhPIb* C16:0 DS sowie *EhPIb* C16:0 LR die Parasitenlast signifikant reduzierten. Darüber hinaus führten die Moleküle  $\alpha$ GalCer, *EhLPPG*, *EhPIa* C30:1 cis sowie *EhPIb* C30:1 cis und alle sechs synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 2 zu einer Reduktion der Leishmanienlast in humanen *L. major*-infizierten Makrophagen.

Lotter, Gonzalez-Roldan et al. (2009) wiesen bereits nach, dass *EhLPPG* und die *EhPI*-Anker iNKT-Zellen sowohl über die Produktion von IL 12 nach Bindung an Toll-like Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen als auch über die Präsentation von CD1d-Molekülen aktivieren und zur Zytokinproduktion anregen können. Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass die synthetischen *EhPI*-Analoga TLR-tragende Immunzellen nach dem gleichen Mechanismus aktivieren können.

Aufgrund der unterschiedlich starken anti-Leishmanien Aktivität der synthetischen *EhPI*-Analoga kann angenommen werden, dass die Rezeptor-Affinität der Moleküle maßgeblich durch die Molekülstruktur bestimmt wird. *EhPIb* C30:1 trans und *EhPIb* C28:0 zeigen keine immuntherapeutischen Einfluss auf *L. major*-infizierte Makrophagen. Dies kann daran liegen, dass diese Moleküle die Makrophagen nicht effizient aktivieren können, da die Moleküle aufgrund ihrer Struktur nicht ideal mit den TLR interagieren können oder in den A'- und F'-Kanal des CD1d-Moleküls passen. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass der immuntherapeutische Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga lediglich in einer Monokultur aus Makrophagen getestet wurde. Daher ist es unbedingt notwendig, die Wirkung dieser Glykolipide in der kutanen Leishmaniose in Kombination mit verschiedenen Immunzellen zu untersuchen.

Um den Wirkmechanismus des *EhLPPGs* und den der synthetischen *EhPI*-Analoga aufzuklären, wurde die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen nach der Behandlung muriner *L. major*-infizierter Makrophagen mit diesen Glykolipiden bestimmt.

Die Analyse der Zytokinexpression zeigten, dass die iNOS-Produktion in *L. major*-infizierten Makrophagen nach Behandlung mit dem nativen Molekül *EhLPPG* hochreguliert ist. In der protektiven Immunantwort des Wirts spielt iNOS eine zentrale Rolle und wird in großen Mengen produziert. Es setzt das Substrat L-Arginin in das toxische NO um, das in der Lage ist, die Leishmanien abzutöten (Liu and Uzonna 2012). iNOS-defiziente Mäuse

beispielsweise sind hoch suszeptibel für *L. major*-Infektionen, da sie keine schützende Th1-Immunantwort mehr aufzubauen können (Mougneau, Bihl et al. 2011). Li, Severn et al. (1992) wiesen nach, dass das LPG der Leishmanien die Protein Kinase C des Wirts, welche an der Produktion von NO und weiterer pro-inflammatorischer Zytokine beteiligt ist, inhibieren kann, um so ihr Überleben zu sichern. Des Weiteren blockiert *M. tuberculosis* die Rekrutierung von iNOS in den Phagosomen, indem es die Interaktion des Enzyms mit dem Gerüstprotein EBP50 verhindert (Davis, Vergne et al. 2007).

Die Expression von IL 1 $\beta$  wird sowohl von *EhLPPG* als auch von *EhPIa C30:1 cis* in den *L. major*-infizierten Makrophagen induziert. IL 1 $\beta$  wird durch das NLRP3-Inflammasomen produziert, welches neben der iNOS-Produktion eine wichtige Komponente in der protektiven Immunantwort darstellt. Inflammasomen identifizieren pathogene Bestandteile im Zytosol, woraufhin sie inflammatorische Caspasen aktivieren pro-inflammatorische Zytokine zu sezernieren und damit die Eliminierung der Pathogene einleiten (Broz and Dixit 2016). Möglicherweise können *EhLPPG* und *EhPIa C30:1 cis* Inflammasomen über eine Bindung an die TLRs aktivieren. Lima-Junior, Costa et al. (2013) wiesen nach, dass das NLRP3-Inflammasom in Leishmanien-Infektionen aktiviert wird. Nach der Aktivierung induziert das NLRP3-Inflammasom die Spaltung der Pro-Form von IL 1 $\beta$ , welches an der Produktion von iNOS beteiligt ist. Scott and Novais (2016) stellten fest, dass eine kurzzeitige Behandlung mit IL 1 $\beta$  zu Beginn einer *L. major*-Infektion in C57BL/6-Mäusen zu einer protektiven Wirkung führt. Zudem wurde in *L. amazonensis*-infizierten Mäusen eine Exazerbation der Krankheit hervorgerufen, als die Produktion von IL 1 $\beta$  unterbunden wurde (Scott and Novais 2016).

*EhLPPG* und *EhPIa C30:1 cis* führten darüber hinaus zu einer erhöhten Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL 12 und TNF  $\alpha$  und der anti-inflammatorischen Zytokine IL 10 und TGF  $\beta$ . Wesentlich stärker wurden die anti-inflammatorischen Zytokine IL 4, IL 13 und Arg1 allerdings nach  $\alpha$ GalCer-Behandlung exprimiert.

Die Profile der Zytokinexpression zeigen, dass *EhLPPG* und *EhPIa C30:1 cis* die Induktion einer protektiven Immunantwort unterstützen und sich unter diesem Aspekt für die Anwendung zur Behandlung der kutanen Leishmaniose eignen. Beide Glykolipide stimulieren die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL 12, IL 1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ ), die das Abtöten der Leishmanien fördern. *EhLPPG* induziert zudem die Expression von iNOS, während *EhPIa C30:1 cis* die Eliminierung der Parasiten auf einer iNOS-unabhängigen Weise (z.B. ROS, Autophagie) unterstützt. Allerdings spiegelt die Zytokinexpression nur einen kleinen Teil des Wirkungsmechanismus wieder, weshalb weitere Untersuchungen notwendig sind. Die vermehrte Induktion anti-inflammatorischer Zytokine nach Behandlung mit  $\alpha$ GalCer

hingegen zeigt, dass sich das Molekül nicht zum Einsatz als Therapeutikum gegen Leishmaniose eignet. Die anti-inflammatorischen Zytokine würden den alternativen Aktivierungsweg der Makrophagen unterstützen, der ein Überleben der Leishmanien begünstigen würde. Griewank, Lorenz et al. (2014) beschrieben bereits, dass eine Applikation mit  $\alpha$ GalCer zu einer Exazerbation der Leishmanien-Infektion in C57BL/6-Mäusen führt.

In den bisherigen Abschnitten dieser Arbeit wurde *in vitro* gezeigt, dass *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoge Immunzellen stimulieren können und auch eine therapeutische Wirkung erzielen, indem sie die Leishmanienlast in infizierten Makrophagen signifikant reduzieren. Zur weiteren Aufklärung des therapeutischen Einflusses der synthetischen *EhPI*-Analoge *in vivo* wurden die effektivsten synthetischen *EhPI*-Analoge in zwei *in vivo* Leishmanien-Infektionsmodellen mit Balb/c- sowie mit C57BL/6-Mäusen untersucht.

Die Behandlung *L. major*-infizierter Balb/c-Mäuse mit 5  $\mu$ g *EhPIa* C30:1 cis oder 5  $\mu$ g *EhPIb* C30:1 cis führte zu einer signifikant verzögerten Schwellung des Fußballens im Vergleich zur Kontrolle. Damit besaßen beide synthetischen *EhPI*-Analoge einen therapeutischen Einfluss auf die Leishmanien-infizierten Mäuse, womit die *in vitro* erzielten Ergebnisse dieser Glykolipide bestätigt werden konnten.

Die Auswertung der qPCR mit TaqMan Sonden hingegen zeigte keinen Unterschied in der Parasitenlast zwischen behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe. Ein Grund dafür liegt womöglich darin, dass die behandelten Mäuse und die Kontrolltiere zu einem Zeitpunkt aus dem Versuch genommen wurden, zu dem die Fußschwellung von diesen, für Leishmanieninfektion hoch suszeptiblen Tieren, nicht mehr zu kontrollieren waren. Um einen Einfluss der Behandlung mit den Molekülen auch für die Parasitenlast nachweisen zu können, sollten zukünftig zu einem früheren Zeitpunkt des Infektionsverlaufs die Parasitenlast bestimmt werden.

Der Verlauf einer Leishmanien-Infektion ist davon abhängig, ob der Wirt eine schützende Th1-Immunantwort auslöst oder eine Th2-Immunantwort entwickelt, die das Überleben des Parasiten begünstigt. Wie bereits oben erwähnt, ist die Th1-Immunantwort mit einer starken IFN  $\gamma$ -Produktion von Th1-CD4<sup>+</sup>-Zellen verbunden, die klassisch aktivierte Makrophagen zur Produktion von iNOS und ROS anregen und die Parasiten eliminieren. Sie führt zu einer Resistenz gegenüber Leishmanien, während die Th2-Immunantwort durch die Produktion von IL 4 und IL 10 durch Th2-CD4<sup>+</sup>-Zellen den Organismus anfälliger für Leishmanien-Infektionen macht (Okwor, Xu et al. 2015). Der Balb/c-Mausstamm ist für *L. major*-Infektionen hoch suszeptibel. Die Tiere entwickeln während einer Leishmanien-Infektion eine

Th2-Immunantwort, da ihre DCs nur sehr geringe Mengen an IL 12 sezernieren und aufgrund dessen nicht in der Lage sind eine effektive Th1-Immunantwort auszulösen (Okwor, Xu et al. 2015) (Sacks and Noben-Trauth 2002). Dieser Sachverhalt konnte durch die Entwicklung einer unkontrollierten Fußschwellung der Tiere im Laufe des Versuchs bestätigt werden. Die Behandlung mit den zutestenden Molekülen führte nur zu einer Verzögerung der Fußschwellung, konnte die Infektion aber aufgrund des genetischen Hintergrunds der Balb/c-Maus nicht ausheilen.

In den *in vitro* Versuche konnte bisher festgestellt werden, dass die synthetischen *EhPI*-Analoga die Immunzellen dazu anregen pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren. Die Analyse der Zytokinproduktion in diesem *in vivo* Infektionsversuch zeigte hingegen, dass die Behandlung mit den synthetischen *EhPI*-Analoga *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis zu einer Reduktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL 4, IL 10 und IL 13 führt. Die Zytokine IL 4, IL 10 und IL 13 sind essentiell für die Auslösung einer Th2-Immunantwort, welche das Überleben der Leishmanien begünstigt (Sacks and Noben-Trauth 2002). Die Behandlung der Moleküle in einem intakten Organismus löst zwar überraschenderweise keine direkten Aktivierung einer pro-inflammatorischen Immunantwort aus, führt aber parallel zu einer Reduktion der nicht-protektiven Th2-Immunantwort und beeinflusst demnach die Balance hin zu einer protektiven Th1-Immunantwort. Obwohl Makrophagen die Haupteffektorzellen während einer Leishmanien-Infektion sind, migrieren zusätzlich andere Immunzellen (DCs, Monozyten, neutrophile Granulozyten) zum Infektionsort, die neben den Makrophagen maßgeblich an der Auslösung einer gerichteten Immunantwort beteiligt sind. Die Interaktion in einer Mischkultur ist wesentlich komplexer als die Monokultur, weshalb die Behandlung mit den Molekülen möglicherweise andere Mechanismen aktiviert und die Th2-Immunantwort herunterreguliert wird. Ein weiterer Einflussfaktor in dem *in vivo* Infektionsmodell für die kutane Leishmaniose könnte zudem die Interaktion der Immunzellen mit dem Hautmikrobiom darstellen. Die Haut wird von verschiedenen bakteriellen und fungalen Kommensalen besiedelt. Diese kommensale Mikrobiota schützt die Haut vor Infektionen und hält ihre Immunhomöostase aufrecht, indem sie in der ständigen reziproken Interaktion mit den epithelialen Immunzellen steht (Pasparakis, Haase et al. 2014). So wiesen Naik, Bouladoux et al. (2012) nach, dass die epidermale Mikrobiota in *L. major*-Infektionen essentiell für die Auslösung einer effektiven T-Zellantwort ist, welche an einer protektiven Immunantwort beteiligt ist.

Der C57BL/6-Mausstamm entwickelt während einer Leishmanien-Infektion eine schützende Th1-Immunantwort, wodurch der Stamm generell als resistent gegenüber den Parasiten gilt

(Sacks and Noben-Trauth 2002). Die kutane Leishmaniose ist in der C57BL/6-Maus selbstheilend und ähnelt daher dem Krankheitsbild des Menschen wesentlich mehr als der Infektionsverlauf in der Balb/c-Maus. Aufgrund dessen wurde der therapeutische Einfluss des synthetischen *EhPI*-Analogons *EhPIb* C16:0 DR in einem *in vivo* Leishmanien-Infektionsmodell mit C57BL/6-Mäusen untersucht.

Die Behandlung mit 10 µg und 25 µg *EhPIb* C16:0 DR führte zu geringeren Schwellungen der *L. major*-infizierten C57BL/6-Mausohren verglichen mit der Kontrolle. Zudem waren die Ohrschwellung der *EhPIb* C16:0 DR-behandelten Tiere schneller wieder abgeklungen. Auch in diesem Modell konnten also die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Wie in der Literatur beschrieben, war die *L. major*-Infektion in den C57BL/6-Mäuse selbstlimitierend. Die Kontrolltiere waren ebenfalls in der Lage die Leishmanien-Infektion zu kontrollieren und auszuheilen. Allerdings führte die Behandlung mit dem synthetischen *EhPI*-Analogon *EhPIb* C16:0 DR zu geringeren Ohrschwellungen und einer schnelleren Resolution der Infektion. Die Analyse der Ohrgewebe und Lymphknoten zeigte zudem, dass die Parasitenlast der *EhPIb* C16:0 DR-behandelten Ohren signifikant gesenkt war.

Wie für das *in vivo* Leishmanien-Infektionsmodell mit Balb/c-Mäusen bereits vermutet, ist das Immunsystem ein komplexes Netzwerk verschiedenster Immunzellen, die miteinander interagieren, aber auch mit weiteren Mikroorganismen wie die Hautmikrobiota kommunizieren, um eine Infektion zu bekämpfen. Es kann angenommen werden, dass *EhPIb* C16:0 DR das Immunsystem der C57BL/6-Mäuse dabei unterstützt, die Leishmanien zu eliminieren. Die Behandlung mit *EhPIb* C16:0 DR führte neben der Aktivierung der Makrophagen vermutlich auch zur Aktivierung weiterer Immunzellen, wodurch die geringeren Ohrschwellung und die schnellere Heilung der Infektion zu erklären wären.

Die immunhistologischen Färbungen einiger Ohrgewebe zeigten, dass CD11b<sup>+</sup>-Zellen iNOS und Arginase exprimieren, während nur wenige 7/4<sup>+</sup>-Zellen vorzufinden waren, die kein iNOS sezernieren. Zudem ist deutlich mehr Arginase in DMSO-behandeltem Gewebe als in *EhPIb* C16:0 DR-behandeltem Gewebe lokalisiert.

Die Zusammensetzung der Immunzellen am Infektionsort unterscheidet sich im Laufe einer Leishmanien-Infektion. Während Monozyten (CD11b<sup>+</sup>-Zellen) in der frühen Phase der Infektion vermehrt vorkommen und die Parasiten durch die ROS kontrollieren, sind Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>-Zellen), die zunächst über Zytokine aktiviert werden müssen, in der späteren Infektionsphase die dominierenden Immunzellen am Infektionsort (Scott and Novais 2016). Da die Tiere erst nach dem Abschwollen der Ohrinfektion euthanasiert wurden und anschließend die immunhistologischen Färbungen mit den Ohrschnitten durchgeführt wurden,

ist anzunehmen, dass es sich bei den CD11b<sup>+</sup>-Zellen in den Färbungen um Makrophagen handelt. In Abhängigkeit der dominierenden Immunantwort entwickeln sich die Makrophagen entweder zum Typ M1 oder zum Typ M2. Makrophagen des Typs M1 sezernieren vermehrt iNOS sezernieren, welches das Substrat L-Arginin zu NO umsetzt. Dies wird vom Organismus zur Parasiteneliminierung eingesetzt, während Makrophagen des Typs M2 auf die Produktion von Arginase spezialisiert sind. Arginase hydrolysiert L-Arginin zu Ornithin, welches ein Grundbaustein der Polyaminbiosynthese darstellt und dadurch das Überleben des Parasiten begünstigt.

Die immunhistologischen Färbungen zeigen, dass die CD11b<sup>+</sup>-Zellen iNOS und Arginase exprimieren. Daher sind vermutlich sowohl Makrophagen des Typs M1 und Makrophagen des Typs M2 am Infektionsort vorzufinden, wobei eine der beiden Makrophagentypen überwiegt. In DMSO-behandeltem Gewebe ist vermehrt Arginase vorzufinden, was darauf hindeutet, dass sich überwiegend Makrophagen des Typs M2 in diesem Gewebe befinden. Dies würde mit den Ergebnissen der Ohrschwellung einhergehen, da die DMSO-behandelten Mäuse die Leishmanien-Infektion schlechter kontrollieren konnten, vermutlich durch die vermehrte Differenzierung der Makrophagen zum Typs M2. Da genetisch bedingt in der C57BL/6-Maus allerdings als Reaktion auf einer Leishmanien-Infektion die Th1-Immunantwort ausgelöst wird, befinden sich auch Makrophagen des Typs M1 in den Geweben, wodurch die synchrone Expression von Arginase und iNOS erklärt werden könnte. In den *EhPIb* C16:0 DR-behandelten Gewebe befanden sich zudem vermehrt iNOS-produzierende CD11b<sup>+</sup>-Zellen. Dies deutet auf eine dominante Th1-Antwort hin und würde erklären, weshalb die behandelten Tiere geringere Ohrschwellungen entwickelten und diese auch schneller abgeschwollen waren im Vergleich zur den Kontrolltieren. Neutrophile Granulozyten werden in der frühen Phase einer Leishmanien-Infektion zum Inflammationsort rekrutiert (Scott and Novais 2016), was den Nachweis der geringen Mengen an 7/4-Zellen im Gewebeschnitt erklärt. Zudem produzieren neutrophile Granulozyten kein iNOS, sondern töten die Parasiten vielmehr durch die Bildung neutrophiler extrazellulärer Traps (NETs) (Scott and Novais 2016).

Wie bei vielen anderen Erkrankungen gibt es auch bei der kutanen Leishmaniose einen Geschlechterunterschied mit einer höheren Morbiditätsrate für Männer im Vergleich zu Frauen (Soares, Abad-Franch et al. 2014). Unter diesem Aspekt wurde der immuntherapeutische Einfluss des synthetischen *EhPI*-Analogons *EhPIb* C16:0 DR in einem *in vivo* Leishmanien-Infektionsmodell mit weiblichen und männlichen C57BL/6-Mäusen

untersucht. Die Messungen der Ohrschwellungen zeigten, dass die C57BL/6-Weibchen kleinere Schwellungen als die Männchen entwickelten.

Die Ergebnisse dieses *in vivo* Infektionsmodells bestätigen den geschlechtsspezifischen Unterschied der kutanen Leishmaniose. Geschlechtshormone wie Östrogen, Androgene und Progesteron sind in der Lage die Immunantwort zu modulieren, weshalb es zu unterschiedlichen Verläufen einer Krankheit bei Männern und Frauen kommt. Welche genauen Mechanismen in der kutanen Leishmaniose für den geschlechtsspezifischen Unterschied verantwortlich sind, ist bisher noch nicht geklärt. Allerdings exprimieren Makrophagen und Lymphozyten Rezeptoren, an denen Geschlechtshormone spezifisch binden können (Snider, Lezama-Davila et al. 2009). Daher wird die Immunantwort und damit einhergehend der Krankheitsverlauf der kutanen Leishmaniose durch die Bindung dieser Hormone an die Immunzellen verändert. Androgene und Progesteron wirken immunsupprimierend, während Östrogen ein pro-inflammatorischer Mediator ist (Snider, Lezama-Davila et al. 2009). So reduziert Testosteron beispielsweise die Sekretion von IFN  $\gamma$ , während Östrogen diese verstärkt (Lotter, Helk et al. 2013). Eine verstärkte IFN  $\gamma$ -Produktion würde eine protektive Th1-Immunantwort unterstützen, welche in der Eliminierung der Leishmanien resultiert und die kleineren Ohrschwellungen der weiblichen C57BL/6-Mäuse erklären würde. Das Testosteron der männlichen C57BL/6-Mäuse hingegen, führt zu einer verminderten IFN  $\gamma$ -Produktion, weshalb in den Männchen vermutlich eine geringere Th1-Immunantwort im Vergleich zu den Weibchen ausgelöst wurde. Dies resultierte dann vermutlich in der vergleichsweise größeren Ohrschwellung der männlichen Tiere.

Darüber hinaus zeigte in diesem Versuch nur die Behandlung mit 10  $\mu\text{g}$  *EhPIb* C16:0 DR eine therapeutische Wirkung auf die *L. major*-infizierten C57BL/6-Männchen. Die Ohrschwellung der C57BL/6-Weibchen wurde durch *EhPIb* C16:0 DR nicht beeinflusst.

In der bisherigen Arbeit wurde nachgewiesen, dass *EhLPPG* und die synthetischen *EhPI*-Analoga Immunzellen aktivieren und damit eine protektive Immunantwort unterstützen, die Parasiten abzutöten. Da angenommen wird, dass *EhPIb* C16:0 DR, die Immunzellen aktiviert und die Th1-Antwort des Wirtes unterstützt, was bei den männlichen Tieren auch der Fall gewesen zu sein scheint. Es ist fraglich, wieso *EhPIb* C16:0 DR in diesem Versuch keinen therapeutischen Effekt in den weiblichen C57BL/6-Mäusen induzierte. Mehrere Studien berichten, dass Frauen mehr NKT-Zellen besitzen als Männer (Kee, Park et al. 2012) (Montoya, Pollard et al. 2007). Die Vermutung liegt daher nahe, dass die C57BL/6-Weibchen intensiver auf die Behandlung mit *EhPIb* C16:0 DR reagieren als die C57BL/6-Männchen. Eine Erklärung, wieso die Behandlung mit *EhPIb* C16:0 DR keinen Effekt erzielte, könnte

sein, dass die C57BL/6-Weibchen bereits vor dem Behandlungsbeginn eine starke Immunantwort entwickelt hatten und die Behandlung mit *EhPIb* C16:0 DR keinen additiven Effekt auf die Immunantwort mehr ausüben konnte.

Die Integration hoch toxischer Wirkstoffe in Liposomen stellt eine vielversprechende Methode dar, mögliche Nebenwirkungen der Wirkstoffe zu verringern und gleichzeitig ihre Pharmakokinetik zu optimieren. Ein exemplarisches Beispiel hierfür sind Liposomen, in denen der Wirkstoff Amphotericin B formuliert wurde (Ambisome®). Amphotericin B, das in seiner reinen Form verabreicht wird, verursacht schwere Nebenwirkungen im Patienten, während die Integration in Liposomen zu einer geringen Toxizität führt (Adler-Moore and Proffitt 2002).

Um die Bioverfügbarkeit der synthetischen *EhPI*-Analoge zu verbessern, wurden auf dieser Grundlage die effektivsten synthetischen *EhPI*-Analoge in zwei verschiedenen Arten von Liposomen integriert. *EhPIa* C30:1 cis führte zu einer Aktivierung der Immunzellen, die daraufhin gezielt pro-inflammatorische Zytokine sezerniert haben. Im weiteren Verlauf wurde nach Behandlung mit *EhPIa* C30:1 cis die Parasitenlast gesenkt. Aufgrund dessen wurde *EhPIa* C30:1 cis in die erste Art der Liposomen formuliert, die nach dem Vorbild der Ambisome® synthetisiert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass neben *EhPIa* C30:1 cis in seiner reinen Form auch in Liposomen-formuliertes *EhPIa* C30:1 cis mit 1 % oder 10 % *EhPIa* C30:1 cis die Parasitenlast in *L. major*-infizierten humanen Zellen signifikant senkte. Liposomen, in denen 10 % *EhPIa* C30:1 cis integriert waren, führten zur stärksten Reduktion der Parasitenlast im Vergleich zur Kontrolle. Zudem wurde anhand der Fluoreszenzstärke nachgewiesen, dass die humanen Zellen Liposomen-formuliertes 10 % *EhPIa* C30:1 cis bevorzugt aufnehmen im Vergleich mit der Kontrolle aus leeren Liposomen.

Die *in vitro* Ergebnisse zeigten, dass die immuntherapeutische Wirkung und somit vermutlich auch die Bioverfügbarkeit von *EhPIa* C30:1 cis durch die Integration in Liposomen verbessert wurde. Wortmann, Zapor et al. (2010) wiesen bereits nach, dass sich Ambisome® zur Behandlung der kutanen Leishmaniose eignen. Von Liposomen ist schon bekannt, dass diese bevorzugt von Makrophagen internalisiert werden (Gutierrez, Seabra et al. 2016). Durch die Formulierung von *EhPIa* C30:1 cis in Liposomen kann der Wirkstoff vermutlich gezielter zum Wirkungsort (Makrophagen) transportiert werden, wo er die Kaskade für die Parasiteneliminierung initiiert, als *EhPIa* C30:1 cis in seiner reinen Form.

Die synthetischen *EhPI*-Analoge wurden zudem in eine zweite Art von Liposomen integriert, die sich in ihrer Zusammensetzung der liposomalen Bestandteile und ihrer Größe von der

ersten Art an Liposomen unterscheidet. *EhPIa* C30:1 cis, *EhPIb* C30:1 cis und *EhPIb* C16:0 DR zeigten bisher sowohl eine stimulatorische Wirkung auf Immunzellen als auch einen immuntherapeutischen Einfluss auf *L. major*-infizierte Makrophagen, weshalb sie in diese Liposomen integriert wurden.

Die Behandlung mit Liposomen-formulierten *EhPIa* C30:1 cis und Liposomen-formulierten *EhPIb* C16:0 DR reduzierte sowohl den prozentualen Anteil infizierter Makrophagen als auch die Anzahl an Leishmanien im Verhältnis zur Anzahl der Makrophagen.

Die therapeutische Wirkung von *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C16:0 DR konnte durch die Formulierung in die Liposomen verbessert werden, wie auch schon bei den vorangegangenen Versuchen mit den Liposomen der ersten Art. Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die Interaktion der Glykolipide mit den Makrophagen durch ihre Formulierung in Liposomen optimiert werden kann und die Moleküle dadurch spezifischer wirken können. Außerdem verbessert eine hohe Molekülkonzentration in den Liposomen die Wirkung der Glykolipide. Bei der Formulierung von jeweils 50 % *EhPIa* C30:1 cis oder *EhPIb* C16:0 DR in die Liposomen, konnte eine Reduktion der Parasitenlast nachgewiesen werden, während eine Formulierung von nur 20 % *EhPIb* C30:1 cis in die Liposomen keinen therapeutischen Einfluss zeigte.

Die Analyse der Liposomen-behandelten *L. major*-infizierten Zellen erfolgte mittels HCS-System am Konfokalmikroskop Opera Phenix™. Das HCS-System erlaubt die Durchführung eines Ziel-basierten Assays, der nicht nur eine einzelne Komponente eines Parasiten oder einer Zelle (z.B. DNA) nachweist, sondern den gesamten Organismus (Siqueira-Neto, Moon et al. 2012). Der Assay ermöglicht zudem eine gezielte Selektion von Parasiten und Zellen, wodurch spezifische Zusammenhänge zwischen diesen erstellt werden können (z.B. leicht oder stark infizierte Zellen) und Rückschlüsse auf die anti-Leishmanien Aktivität der Wirkstoffe erlaubt. Das HCS-System ist eine vielversprechende Methode, Wirkstoffe schnell und effizient zu untersuchen und stellt aufgrund der Ergebnisse möglicherweise eine Alternative zu der in dieser Arbeit durchgeführten qPCR mit TaqMan Sonden dar. Die qPCR mit TaqMan Sonden liefert zwar sehr spezifische Ergebnisse, ist jedoch sehr kostenintensiv und zeitaufwendig.

Die Analyse der Überstände der Liposomen-behandelten *L. major*-infizierten Zellen mittels LEGENDplex™ zeigte, dass Liposomen-formuliertes *EhPIa* C30:1 cis und Liposomen-formuliertes *EhPIb* C16:0 DR die TNF  $\alpha$ -, CCL2- und CCL3-Produktion verglichen mit den leeren Liposomen signifikant herunterregulieren. Wie bereits oben erwähnt, fungiert TNF  $\alpha$  als Ko-Faktor in der Makrophagenaktivierung und spielt damit eine zentrale Rolle in der

Koordination der Th1-Zytokinproduktion. Vorangegangene Studien weisen TNF  $\alpha$  eine duale Funktion zu. Einerseits sind TNF  $\alpha$ -defiziente Mäuse empfänglicher für *L. major*-Infektionen und andererseits führt TNF  $\alpha$  in großen Mengen allerdings zu einer Exazerbation der kutanen Leishmaniose mit der Entwicklung chronischer Hautläsionen (Scott and Novais 2016). Die TNF  $\alpha$ -Produktion ist möglicherweise in den ersten Stunden nach Infektion und Behandlung hochreguliert und wird, wenn die protektive Immunantwort in Gang gesetzt wurde, herunterreguliert, damit es zu keiner konträren Wirkung kommt. Die untersuchten Überstände wurden nach 24 Std abgenommen und anschließend gemessen. Möglicherweise konnte zu diesem Zeitpunkt nur noch die Reduktion der TNF  $\alpha$ -Produktion bestimmt werden konnte. Um diese Annahme zu verifizieren, müsste der Versuch wiederholt werden und die Zytokinproduktion in engermaschiegeren Abständen bis zum Zeitpunkt 24 Std untersucht werden.

#### **4.4 Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga auf ein *in vitro M. tuberculosis*-Infektionsmodell**

Tuberkulose zählt zu den am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten der Welt. Wie in der Leishmaniose sind Makrophagen in einer Infektion mit *M. tuberculosis* die Haupteffektorzellen (Orme, Robinson et al. 2015). Zum einen sind sie für die Eliminierung der Mykobakterien zuständig, zum anderen stellen sie die Zielzellen für die Bakterien dar, in denen sie persistieren und proliferieren. Der Krankheitsverlauf mit *M. tuberculosis* ist dabei von der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen abhängig. iNKT-defiziente Mäuse sind beispielsweise suszeptibler für Infektionen mit Mykobakterien (Sada-Ovalle, Skold et al. 2010). Der iNKT-Zellligand  $\alpha$ GalCer wurde bereits in Kombination mit dem Antibiotikum Isoniazid in *M. tuberculosis*-Infektionen getestet und führte zur Kontrolle des bakteriellen Wachstums (Sada-Ovalle, Chiba et al. 2008). Da beide Krankheiten einen ähnlichen Infektionsverlauf besitzen, indem Makrophagen eine wichtige Rolle spielen, wurde das immuntherapeutische Potential von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoga in einem *in vitro M. tuberculosis*-Infektionsmodell mit murinen Makrophagen untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass  $\alpha$ GalCer und die synthetischen *EhPI*-Analoga der Gruppe 1 die Bakterienlast in *M. tuberculosis*-infizierte Zellen nicht senken konnten, während das native Molekül *EhLPPG* eine Senkung der Bakterienlast nach 72 Std induzierte. Als einziges

synthetisches *EhPI*-Analogon der Gruppe 2 reduzierte *EhPIb* C16:0 DR das bakterielle Wachstum in *M. tuberculosis*-infizierte Zellen.

Aufgrund ihrer Molekülstruktur aktivieren *EhLPPG* und *EhPIb* C16:0 DR die murinen Makrophagen am effektivsten und unterstützen so die Immunzellen bei der Entwicklung einer protektiven Immunantwort. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL 12, TNF  $\alpha$  und IFN  $\gamma$  sind bei der Entwicklung solch einer Th1-Immunantwort maßgeblich beteiligt (Ernst 2012) (Orme, Robinson et al. 2015). Vermutlich erlauben die chemischen Strukturen von *EhLPPG* und *EhPIb* C16:0 DR im Gegensatz zu den anderen untersuchten Molekülen eine optimale Interaktion mit den Immunzellrezeptoren und den CD1d-Molekülen, womit die Immunantwort unterstützt wurde und in der Senkung der Bakterienlast resultierte. Während *EhPIb* C16:0 DR das bakterielle Wachstum bereits nach 48 Std senkte, induzierte *EhLPPG* erst nach 72 Std eine Reduktion der Bakterienlast. Dies könnte ebenfalls auf die Molekülstruktur zurückzuführen sein, da *EhPIb* C16:0 DR nur aus dem GPI-Anker besteht und damit wesentlich kleiner ist als das native *EhLPPG*, bei dem der GPI-Anker mit einer zusätzlichen Zuckerkette verbunden ist. Möglicherweise ist aufgrund dessen die Prozessierung des *EhLPPGs* im späten Endosom aufwendiger und zeitintensiver, sodass die Aktivierung weiterer Immunzellen durch das native Molekül im Vergleich zum *EhPIb* C16:0 DR insgesamt langsamer abläuft.

Überraschenderweise senkten 2  $\mu\text{g/ml}$  *EhLPPG* und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  *EhPIb* C16:0 DR, die geringsten eingesetzten Wirkstoffdosen beider Moleküle, die Bakterienlast am stärksten. Die synthetischen *EhPI*-Analoge der Gruppe 1 *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis reduzierten zwar das bakterielle Wachstum nicht signifikant, aber induzierten eine konzentrationsabhängige Senkung mit der stärksten Reduktion der Bakterienlast bei der Gabe von 10  $\mu\text{g}$  *EhPIa* C30:1 cis oder *EhPIb* C30:1 cis. Möglicherweise interagieren *EhLPPG* und *EhPIb* C16:0 DR mit den Rezeptoren so spezifisch, dass die Glykolipide bereits schon in den geringsten Wirkstoffdosen die Immunzellen effektiv aktivieren können. Dagegen scheint die Interaktion von *EhPIa* C30:1 cis und *EhPIb* C30:1 cis mit den *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagen nicht optimal zu verlaufen, sodass hohe Wirkstoffdosen nötig sind, um die Immunzellen zu aktivieren.

*EhLPPG* und *EhPIb* C16:0 DR stellen damit die vielversprechendsten Moleküle dieser Arbeit für die weitere Testung gegen Tuberkulose dar. Wie bereits in den *in vitro* Leishmanien-Infektionsmodellen wurde der therapeutische Einfluss von *EhLPPG* und den synthetischen *EhPI*-Analoge in einer Monokultur aus *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagen untersucht. Daher sollte die beobachteten induzierten Effekte der Moleküle im nächsten Schritt *in vitro* in

einer Mischkultur aus verschiedenen Immunzellen getestet und anschließend im *in vivo* Tiermodell untersucht werden. Zudem sollten in einem weiteren Versuch die Moleküle in Kombination mit bestehenden Therapeutika eingesetzt werden und auf einen möglichen additiven Effekt hin untersucht werden.

#### 4.5 Fazit und Ausblick

Erkrankungen wie die Leishmaniose und die Tuberkulose weisen eine sehr spezifische Wirt-Pathogen-Beziehung auf, die durch eine kontinuierliche Interaktion und wechselseitige Anpassung beider Komponenten geprägt ist. Die Anpassungsfähigkeit der Leishmanien und Mykobakterien an das Immunsystem des Wirts ist schnell und effektiv. Im Laufe der Evolution haben sie zahlreiche Manipulationsmechanismen entwickelt, um ihr Überleben im Wirt zu begünstigen. Die Plastizität der Pathogene und die zunehmende Entwicklung von Medikamenten-resistenzen Spezies erschweren eine erfolgreiche Behandlung dieser Krankheiten zusätzlich, weshalb eine kontinuierliche Entwicklung neuer Medikamente notwendig ist. Der bisherige Fokus der Therapien lag in der direkten Eliminierung der Pathogene und in der Unterbrechung ihrer Übertragung.

Eine vielversprechendere Herangehensweise stellt mittlerweile die Aktivierung spezifischer Immunzellen des Wirtsimmunsystems dar, um eine Infektion zu beheben. Dafür werden immer öfter Moleküle als Immuntherapeutikum eingesetzt, die gezielt eine Immunantwort induzieren können. Das Lipopeptidphosphoglykan aus *E. histolytica* (*EhLPPG*) und davon abgeleitete, synthetische *EhPI*-Analoga sind solch immunmodulatorische Moleküle. In dieser Arbeit konnten erste immunstimulatorische Eigenschaften dieser Glykolipide nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten die Moleküle einen immuntherapeutischen Einfluss in *in vitro* und *in vivo* Leishmanien-Infektionsmodellen, indem sie durch die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine die Parasitenlast in *L. major*-infizierten Makrophagen signifikant senkten. Des Weiteren führte die Behandlung einiger Moleküle durch die Herunterregulation anti-inflammatorischer Zytokine zu einer Verzögerung der *L. major*-induzierten Fußschwellung in Balb/c-Mäusen. In einem weiteren Leishmanien-Infektionsmodell führten die Moleküle zu geringeren *L. major*-induzierten Ohrschwellungen von C57BL/6-Mäusen, die auch schneller verheilt waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *EhLPPG* und bestimmte synthetische *EhPI*-Analoga das Potential haben, als Immuntherapeutikum in der Behandlung der durch *L. major*-induzierten die kutanen Leishmaniose eingesetzt zu werden und sollte für diesen Zweck

weiter untersucht werden. Ziel weiterer Untersuchungen sollte die Aufklärung des Wirkmechanismus dieser Moleküle sein. Darüber hinaus sollte der Einfluss dieser Moleküle auf weitere Leishmanien-Spezies getestet werden, da sich die Infektionsmechanismen verschiedener Spezies unterscheiden. Auch eine Eignung der Moleküle in der Behandlung der mukokutanen und viszeralen Leishmaniose sollte überprüft werden sowie der Einsatz einer Kombination der Moleküle mit bestehenden Therapeutika.

## 5. Eigene Publikationen

Choy, S. L., H. Bernin, T. Aiba, E. Bifeld, S. C. Lender, M. Muhlenfordt, J. Noll, J. Eick, C. Marggraff, H. Niss, N. G. Roldan, S. Tanaka, M. Kitamura, K. Fukase, J. Clos, E. Tannich, Y. Fujimoto and H. Lotter (2017). "Synthetic analogs of an *Entamoeba histolytica* glycolipid designed to combat intracellular *Leishmania* infection." *Sci Rep* **7**(1): 9472.

Aiba, T., S. Suehara, S.L. Choy, Y. Maekawa, H. Lotter, T. Murai, S. Inuki, K. Fukase and Y. Fujimoto (2017). „Employing BINOL-phosphoroselenoyl chloride for selective inositol phosphorylation and chemical synthesis of glycosylinositolphospholipid from *Entamoeba histolytica*.“ *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 1-6.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbas**, A.K., A.H. Lichtman and S. Pillai (2010). Cellular and molecular immunology, 6th edn. Saunders, Philadelphia, PA.
- Adler-Moore**, J. and R. T. Proffitt (2002). "AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience." *J Antimicrob Chemother* **49 Suppl 1**: 21-30.
- Aiba**, T., S. Suehara, S.L. Choy, Y. Maekawa, H. Lotter, T. Murai, S. Inuki, K. Fukase and Y. Fujimoto (2017). „Employing BINOL-phosphoroselenoyl chloride for selective inositol phosphorylation and chemical synthesis of glycosylinositolphospholipid from *Entamoeba histolytica*.“ *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 1-6.
- Anderson**, B. L., L. Teyton, A. Bendelac and P. B. Savage (2013). "Stimulation of natural killer T cells by glycolipids." *Molecules* **18**(12): 15662-15688.
- Balasegaram**, M., K. Ritmeijer, M. A. Lima, S. Burza, G. Ortiz Genovese, B. Milani, S. Gaspani, J. Potet and F. Chappuis (2012). "Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis." *Expert Opin Emerg Drugs* **17**(4): 493-510.
- Becker**, I., N. Salaiza, M. Aguirre, J. Delgado, N. Carrillo-Carrasco, L. G. Kobeh, A. Ruiz, R. Cervantes, A. P. Torres, N. Cabrera, A. Gonzalez, C. Maldonado and A. Isibasi (2003). "Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2." *Mol Biochem Parasitol* **130**(2): 65-74.
- Behar**, S. M., M. Divangahi and H. G. Remold (2010). "Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy?" *Nat Rev Microbiol* **8**(9): 668-674.
- Ben Salah**, A., N. Ben Messaoud, E. Guedri, A. Zaatour, N. Ben Alaya, J. Bettaieb, A. Gharbi, N. Belhadj Hamida, A. Boukthir, S. Chlif, K. Abdelhamid, Z. El Ahmadi, H. Louzir, M. Mokni, G. Morizot, P. Buffet, P. L. Smith, K. M. Kopydlowski, M. Kreishman-Deitrick, K. S. Smith, C. J. Nielsen, D. R. Ullman, J. A. Norwood, G. D. Thorne, W. F. McCarthy, R. C. Adams, R. M. Rice, D. Tang, J. Berman, J. Ransom, A. J. Magill and M. Grogl (2013). "Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis." *N Engl J Med* **368**(6): 524-532.
- Bendelac**, A., P. B. Savage and L. Teyton (2007). "The biology of NKT cells." *Annu Rev Immunol* **25**: 297-336.
- Bernin**, H.S. (2014). Doktorarbeit: Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials eines Lipopeptidphosphoglykans aus *Entamoeba histolytica*.
- Biller**, L., H. Schmidt, E. Krause, C. Gelhaus, J. Matthiesen, G. Handal, H. Lotter, O. Janssen, E. Tannich and I. Bruchhaus (2009). "Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties." *Proteomics* **9**(17): 4107-4120.
- Blum**, J., P. Buffet, L. Visser, G. Harms, M. S. Bailey, E. Caumes, J. Clerinx, P. P. van Thiel, G. Morizot, C. Hatz, T. P. Dorlo and D. N. Lockwood (2014). "LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014." *J Travel Med* **21**(2): 116-129.
- Brodin**, P., Y. Poquet, F. Levillain, I. Peguillet, G. Larrouy-Maumus, M. Gilleron, F. Ewann, T. Christophe, D. Fenistein, J. Jang, M. S. Jang, S. J. Park, J. Rauzier, J. P. Carralot, R. Shrimpton, A. Genovesio, J. A. Gonzalo-Asensio, G. Puzo, C. Martin, R. Brosch, G. R. Stewart, B. Gicquel and O. Neyrolles (2010). "High content phenotypic cell-based visual screen identifies Mycobacterium tuberculosis acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling." *PLoS Pathog* **6**(9): e1001100.
- Broz**, P. and V. M. Dixit (2016). "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling." *Nat Rev Immunol* **16**(7): 407-420.
- Cerundolo**, V. and M. Kronenberg (2010). "The role of invariant NKT cells at the interface of innate and adaptive immunity." *Semin Immunol* **22**(2): 59-60.

- Cerundolo**, V., J. D. Silk, S. H. Masri and M. Salio (2009). "Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies." *Nat Rev Immunol* **9**(1): 28-38.
- Chandra**, D. and S. Naik (2008). "Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism." *Clin Exp Immunol* **154**(2): 224-234.
- Choy**, S. L., H. Bernin, T. Aiba, E. Bifeld, S. C. Lender, M. Muhlenpfordt, J. Noll, J. Eick, C. Marggraff, H. Niss, N. G. Roldan, S. Tanaka, M. Kitamura, K. Fukase, J. Clos, E. Tannich, Y. Fujimoto and H. Lotter (2017). "Synthetic analogs of an Entamoeba histolytica glycolipid designed to combat intracellular Leishmania infection." *Sci Rep* **7**(1): 9472.
- Crough**, T., D. M. Purdie, M. Okai, A. Maksoud, M. Nieda and A. J. Nicol (2004). "Modulation of human Valpha24(+)Vbeta11(+) NKT cells by age, malignancy and conventional anticancer therapies." *Br J Cancer* **91**(11): 1880-1886.
- Daniel**, T. M. (2006). "The history of tuberculosis." *Respir Med* **100**(11): 1862-1870.
- Davis**, A. S., I. Vergne, S. S. Master, G. B. Kyei, J. Chua and V. Deretic (2007). "Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes." *PLoS Pathog* **3**(12): e186.
- de Assis**, R. R., I. C. Ibraim, P. M. Nogueira, R. P. Soares and S. J. Turco (2012). "Glycoconjugates in New World species of Leishmania: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts." *Biochim Biophys Acta* **1820**(9): 1354-1365.
- Deshmane**, S. L., S. Kremlev, S. Amini and B. E. Sawaya (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." *J Interferon Cytokine Res* **29**(6): 313-326.
- Diamond**, L. S., D. R. Harlow and C. C. Cunnick (1978). "A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**(4): 431-432.
- Divangahi**, M., S. M. Behar and H. Remold (2013). "Dying to live: how the death modality of the infected macrophage affects immunity to tuberculosis." *Adv Exp Med Biol* **783**: 103-120.
- Dorlo**, T. P., M. Balasegaram, J. H. Beijnen and P. J. de Vries (2012). "Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis." *J Antimicrob Chemother* **67**(11): 2576-2597.
- Ernst**, J. D. (2012). "The immunological life cycle of tuberculosis." *Nat Rev Immunol* **12**(8): 581-591.
- Flynn**, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak and B. R. Bloom (1995). "Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice." *Immunity* **2**(6): 561-572.
- Forestier**, C. L., Q. Gao and G. J. Boons (2014). "Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?" *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 193.
- Fujii**, S., K. Shimizu, M. Kronenberg and R. M. Steinman (2002). "Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs." *Nat Immunol* **3**(9): 867-874.
- Fulton**, J. D. and L. P. Joyner (1949). "Studies on protozoa; the metabolism of Leishman-Donovan bodies and flagellates of Leishmania donovani." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **43**(3): 273-286, pl.
- Gangneux**, J. P., A. Sulahian, Y. J. Garin, R. Farinotti and F. Derouin (1996). "Therapy of visceral leishmaniasis due to Leishmania infantum: experimental assessment of efficacy of AmBisome." *Antimicrob Agents Chemother* **40**(5): 1214-1218.
- Gilead Sciences**, Inc., „AmBisome - (amphotericin B) liposome for injection,“ San Dimas,

2012.

**Godfrey**, D. I. and S. P. Berzins (2007). "Control points in NKT-cell development." Nat Rev Immunol **7**(7): 505-518.

**Gonzalez-Aseguinolaza**, G., C. de Oliveira, M. Tomaska, S. Hong, O. Bruna-Romero, T. Nakayama, M. Taniguchi, A. Bendelac, L. Van Kaer, Y. Koezuka and M. Tsuji (2000). "alpha -galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8461-8466.

**Gregory**, D. J., R. Sladek, M. Olivier and G. Matlashewski (2008). "Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression." Infect Immun **76**(3): 1186-1192.

**Griewank**, K. G., B. Lorenz, M. R. Fischer, L. Boon, S. Lopez Kostka and E. von Stebut (2014). "Immune modulating effects of NKT cells in a physiologically low dose *Leishmania major* infection model after alphaGalCer analog PBS57 stimulation." PLoS Negl Trop Dis **8**(6): e2917.

**Gutierrez**, V., A. B. Seabra, R. M. Reguera, J. Khandare and M. Calderon (2016). "New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis." Chem Soc Rev **45**(1): 152-168.

**Harding**, C. V. and W. H. Boom (2010). "Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors." Nat Rev Microbiol **8**(4): 296-307.

**Igisu**, H., N. Hamasaki, A. Ito and W. Ou (1988). "Inhibition of cytochrome c oxidase and hemolysis caused by lysosphingolipids." Lipids **23**(4): 345-348.

**Jing**, Y., S. Gravenstein, N. R. Chaganty, N. Chen, K. H. Lyerly, S. Joyce and Y. Deng (2007). "Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood." Exp Gerontol **42**(8): 719-732.

**Joyee**, A. G., H. Qiu, S. Wang, Y. Fan, L. Bilenki and X. Yang (2007). "Distinct NKT cell subsets are induced by different *Chlamydia* species leading to differential adaptive immunity and host resistance to the infections." J Immunol **178**(2): 1048-1058.

**Juno**, J. A., Y. Keynan and K. R. Fowke (2012). "Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection." PLoS Pathog **8**(8): e1002838.

**Kawai**, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-384.

Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-615.

**Kee**, S. J., Y. W. Park, Y. N. Cho, H. M. Jin, M. J. Kim, S. J. Lee, T. J. Kim, S. S. Lee, Y. S. Kwon, H. C. Jang, N. Kim, M. G. Shin, J. H. Shin, S. P. Suh and D. W. Ryang (2012). "Age- and gender-related differences in circulating natural killer T cells and their subset levels in healthy Korean adults." Hum Immunol **73**(10): 1011-1016.

**Kenna**, T., L. Golden-Mason, S. A. Porcelli, Y. Koezuka, J. E. Hegarty, C. O'Farrelly and D. G. Doherty (2003). "NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells." J Immunol **171**(4): 1775-1779.

**Kindt**, T., Osborne, B.A. and Goldsby, R.A. (2007). *Kuby Immunology*, 6th edn.

**Kinjo**, Y., E. Tupin, D. Wu, M. Fujio, R. Garcia-Navarro, M. R. Benhnia, D. M. Zajonc, G. Ben-Menachem, G. D. Ainge, G. F. Painter, A. Khurana, K. Hoebe, S. M. Behar, B. Beutler, I. A. Wilson, M. Tsuji, T. J. Sellati, C. H. Wong and M. Kronenberg (2006). "Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria." Nat Immunol **7**(9): 978-986.

**Kopf**, M., M. F. Bachmann and B. J. Marsland (2010). "Averting inflammation by targeting the cytokine environment." Nat Rev Drug Discov **9**(9): 703-718.

- Kropf**, P., J. M. Fuentes, E. Fahrnich, L. Arpa, S. Herath, V. Weber, G. Soler, A. Celada, M. Modolell and I. Muller (2005). "Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo." *FASEB J* **19**(8): 1000-1002.
- Lender**, S.C. (2015). Masterarbeit: Immunstimulatorische Eigenschaften des *Entamoeba histolytica* Lipopeptidphosphoglykans und davon abgeleiteten synthetischen Analoga.
- Li**, Y., A. Severn, M. V. Rogers, R. M. Palmer, S. Moncada and F. Y. Liew (1992). "Catalase inhibits nitric oxide synthesis and the killing of intracellular *Leishmania major* in murine macrophages." *Eur J Immunol* **22**(2): 441-446.
- Lichtenberg**, D., H. Ahyayauch and F. M. Goni (2013). "The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers." *Biophys J* **105**(2): 289-299.
- Lima-Junior**, D. S., D. L. Costa, V. Carregaro, L. D. Cunha, A. L. Silva, T. W. Mineo, F. R. Gutierrez, M. Bellio, K. R. Bortoluci, R. A. Flavell, M. T. Bozza, J. S. Silva and D. S. Zamboni (2013). "Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*." *Nat Med* **19**(7): 909-915.
- Liu**, D. and J. E. Uzonna (2012). "The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response." *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 83.
- Lotter**, H., N. Gonzalez-Roldan, B. Lindner, F. Winau, A. Isibasi, M. Moreno-Lafont, A. J. Ulmer, O. Holst, E. Tannich and T. Jacobs (2009). "Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess." *PLoS Pathog* **5**(5): e1000434.
- Lotter**, H., E. Helk, H. Bernin, T. Jacobs, C. Prehn, J. Adamski, N. Gonzalez-Roldan, O. Holst and E. Tannich (2013). "Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFNgamma secretion in natural killer T cells." *PLoS One* **8**(2): e55694.
- Marinets**, A., T. Zhang, N. Guillen, P. Gounon, B. Bohle, U. Vollmann, O. Scheiner, G. Wiedermann, S. L. Stanley and M. Duchene (1997). "Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*." *J Exp Med* **186**(9): 1557-1565.
- Markle**, W. H. and K. Makhoul (2004). "Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment." *Am Fam Physician* **69**(6): 1455-1460.
- Montoya**, C. J., D. Pollard, J. Martinson, K. Kumari, C. Wasserfall, C. B. Mulder, M. T. Rugeles, M. A. Atkinson, A. L. Landay and S. B. Wilson (2007). "Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11." *Immunology* **122**(1): 1-14.
- Moody-Haupt**, S., J. H. Patterson, D. Mirelman and M. J. McConville (2000). "The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans." *J Mol Biol* **297**(2): 409-420.
- Moremen**, K. W., M. Tiemeyer and A. V. Nairn (2012). "Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(7): 448-462.
- Mougneau**, E., F. Bihl and N. Glaichenhaus (2011). "Cell biology and immunology of *Leishmania*." *Immunol Rev* **240**(1): 286-296.
- Mühlenpfordt**, M. (2016). Masterarbeit: Evaluation of protective, immunological and cytotoxic properties of synthetic immune-stimulatory molecules for the treatment of intracellular *Leishmania major* infection.
- Murray**, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies and N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." *Lancet* **366**(9496): 1561-1577.
- Naik**, S., N. Bouladoux, C. Wilhelm, M. J. Molloy, R. Salcedo, W. Kastenmuller, C. Deming, M. Quinones, L. Koo, S. Conlan, S. Spencer, J. A. Hall, A. Dzutsev, H. Kong, D. J. Campbell, G. Trinchieri, J. A. Segre and Y. Belkaid (2012). "Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals." *Science* **337**(6098): 1115-1119.

- Nicoletti, S., K. Seifert and I. H. Gilbert (2009).** "N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-amphotericin B (HPMA-AmB) copolymer conjugates as antileishmanial agents." *Int J Antimicrob Agents* **33**(5): 441-448.
- Nowak, N., H. Lotter, E. Tannich and I. Bruchhaus (2004).** "Resistance of *Entamoeba histolytica* to the cysteine proteinase inhibitor E64 is associated with secretion of pro-enzymes and reduced pathogenicity." *J Biol Chem* **279**(37): 38260-38266.
- Okwor, I., G. Xu, H. Tang, Y. Liang, Y. X. Fu and J. E. Uzonna (2015).** "Deficiency of CD40 Reveals an Important Role for LIGHT in Anti-*Leishmania* Immunity." *J Immunol* **195**(1): 194-202.
- Orme, I. M., R. T. Robinson and A. M. Cooper (2015).** "The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung." *Nat Immunol* **16**(1): 57-63.
- Pasparakis, M., I. Haase and F. O. Nestle (2014).** "Mechanisms regulating skin immunity and inflammation." *Nat Rev Immunol* **14**(5): 289-301.
- Ribeiro-Gomes, F. L., A. C. Otero, N. A. Gomes, M. C. Moniz-De-Souza, L. Cysne-Finkelstein, A. C. Arnholdt, V. L. Calich, S. G. Coutinho, M. F. Lopes and G. A. DosReis (2004).** "Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection." *J Immunol* **172**(7): 4454-4462.
- Roberts, C. W., W. Walker and J. Alexander (2001).** "Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites." *Clin Microbiol Rev* **14**(3): 476-488.
- Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002).** "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." *Nat Rev Immunol* **2**(11): 845-858.
- Sada-Ovalle, I., A. Chiba, A. Gonzales, M. B. Brenner and S. M. Behar (2008).** "Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria." *PLoS Pathog* **4**(12): e1000239.
- Sada-Ovalle, I., M. Skold, T. Tian, G. S. Besra and S. M. Behar (2010).** "Alpha-galactosylceramide as a therapeutic agent for pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection." *Am J Respir Crit Care Med* **182**(6): 841-847.
- Sandberg, J. K., N. Bhardwaj and D. F. Nixon (2003).** "Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment." *Eur J Immunol* **33**(3): 588-596.
- Saubermann, L. J., P. Beck, Y. P. De Jong, R. S. Pitman, M. S. Ryan, H. S. Kim, M. Exley, S. Snapper, S. P. Balk, S. J. Hagen, O. Kanauchi, K. Motoki, T. Sakai, C. Terhorst, Y. Koezuka, D. K. Podolsky and R. S. Blumberg (2000).** "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice." *Gastroenterology* **119**(1): 119-128.
- Scott, P. and F. O. Novais (2016).** "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis." *Nat Rev Immunol* **16**(9): 581-592.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995).** "The MAPK signaling cascade." *FASEB J* **9**(9): 726-735.
- Shi, Y., C. H. Liu, A. I. Roberts, J. Das, G. Xu, G. Ren, Y. Zhang, L. Zhang, Z. R. Yuan, H. S. Tan, G. Das and S. Devadas (2006).** "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know." *Cell Res* **16**(2): 126-133.
- Shio, M. T., K. Hassani, A. Isnard, B. Ralph, I. Contreras, M. A. Gomez, I. Abu-Dayyeh and M. Olivier (2012).** "Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion." *J Trop Med* **2012**: 819512.
- Singh, S. and R. Sivakumar (2004).** "Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis." *J Infect Chemother* **10**(6): 307-315.
- Siqueira-Neto, J. L., S. Moon, J. Jang, G. Yang, C. Lee, H. K. Moon, E. Chatelain, A. Genovesio, J. Cechetto and L. H. Freitas-Junior (2012).** "An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(6): e1671.

- Snider**, H., C. Lezama-Davila, J. Alexander and A. R. Satoskar (2009). "Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis." *Neuroimmunomodulation* **16**(2): 106-113.
- Soares**, L., F. Abad-Franch and G. Ferraz (2014). "Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in central Amazonia: a comparison of sex-biased incidence among rural settlers and field biologists." *Trop Med Int Health* **19**(8): 988-995.
- Soto**, J., B. A. Arana, J. Toledo, N. Rizzo, J. C. Vega, A. Diaz, M. Luz, P. Gutierrez, M. Arboleda, J. D. Berman, K. Junge, J. Engel and H. Sindermann (2004). "Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis." *Clin Infect Dis* **38**(9): 1266-1272.
- Stanley**, A. C., Y. Zhou, F. H. Amante, L. M. Randall, A. Haque, D. G. Pellicci, G. R. Hill, M. J. Smyth, D. I. Godfrey and C. R. Engwerda (2008). "Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis." *PLoS Pathog* **4**(2): e1000028.
- Stewart, G. R., B. D. Robertson and D. B. Young (2003). "Tuberculosis: a problem with persistence." *Nat Rev Microbiol* **1**(2): 97-105.
- Stich**, A., A. Ponte-Sucre and U. Holzgrabe (2013). "Do we need new drugs against human African trypanosomiasis?" *Lancet Infect Dis* **13**(9): 733-734.
- Sullivan**, B. A. and M. Kronenberg (2005). "Activation or anergy: NKT cells are stunned by alpha-galactosylceramide." *J Clin Invest* **115**(9): 2328-2329.
- Sundar**, S. and J. Chakravarty (2015). "An update on pharmacotherapy for leishmaniasis." *Expert Opin Pharmacother* **16**(2): 237-252.
- Tupin**, E., Y. Kinjo and M. Kronenberg (2007). "The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms." *Nat Rev Microbiol* **5**(6): 405-417.
- Turner**, N. A., A. Das, P. Warburton, D. J. O'Regan, S. G. Ball and K. E. Porter (2009). "Interleukin-1alpha stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(3): H1117-1127.
- Van Kaer**, L. (2005). "alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles." *Nat Rev Immunol* **5**(1): 31-42.
- Van Kaer**, L., V. V. Parekh and L. Wu (2011). "Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity." *Cell Tissue Res* **343**(1): 43-55.
- WHO Tuberculosis Report 2017**
- WHO Information, Stand Juli 2018**
- WHO/PAHA/UNESCO** (1997). Report: A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol bull* **18**, 13-14.
- Wortmann**, G., M. Zapor, R. Ressler, S. Fraser, J. Hartzell, J. Pierson, A. Weintrob and A. Magill (2010). "Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis." *Am J Trop Med Hyg* **83**(5): 1028-1033.
- Xin**, L., K. Li and L. Soong (2008). "Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes." *Mol Immunol* **45**(12): 3371-3382.
- Yu**, K. O. and S. A. Porcelli (2005). "The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy." *Immunol Lett* **100**(1): 42-55.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biphasische Lebenszyklus der Leishmanien in der weiblichen Sandmücke sowie im Säugetierwirt. ....	6
Abbildung 2: Geographische Verbreitung der kutanen Leishmaniose, 2015.....	7
Abbildung 3: Aktivierungswege von Makrophagen nach Infektion mit Leishmanien. ....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung von in Liposomen-formuliertem Amphotericin B (Gutierrez et al. 2016).....	13
Abbildung 5: Geschätzte Anzahl an Tuberkulose-erkrankter Menschen weltweit im Jahr 2016 (WHO TB-Report 2017).....	14
Abbildung 6: <i>M. tuberculosis</i> -Infektion im Menschen. ....	16
Abbildung 7: Lokalisation des <i>E. histolytica</i> -membranständigen Lipopeptidphosphoglykans aus <i>E. histolytica</i> ( <i>EhLPPG</i> ) sowie die chemische Struktur von <i>EhLPPG</i> und $\alpha$ GalCer. ....	17
Abbildung 8: <i>EhLPPG</i> -induzierte Aktivierungswege von iNKT-Zellen. ....	18
Abbildung 9: Chemische Struktur der synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga. ....	21
Abbildung 10: Biocoll Gradient humaner Blutproben nach der Zentrifugation.....	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung des murinen Zellzytokinexpressionassays. ....	39
Abbildung 12: Schematische Darstellung des <i>L. major</i> -Fuß-Infektionsmodells in Balb/c-Mäusen.....	58
Abbildung 13: Schematische Darstellung des <i>L. major</i> -Ohr-Infektionsmodells in C57BL/6-Mäusen.....	59
Abbildung 14: Bestimmung der optimalen Zellzahl und Inkubationszeit muriner Leber- sowie Milzlymphozyten zur Etablierung eines Zellzytokinexpressionassays.....	62
Abbildung 15: Bestimmung der induzierten IFN $\gamma$ -Konzentration muriner Leberlymphozyten nach Stimulation mit <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga. ....	64
Abbildung 16: Bestimmung der induzierten IL 4-Konzentration muriner Leberlymphozyten nach Stimulation mit <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga. ....	65
Abbildung 17: Induziertes Zytokinprofil humaner PBMCs nach Stimulation mit <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga.....	66
Abbildung 18: Induziertes Zytokinprofil humaner PBMCs nach Stimulation mit den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga.....	67
Abbildung 19: Induzierte IFN $\gamma$ - und IL 4-Produktion muriner Lymphozyten nach Stimulation mit den glykosylierten <i>EhPI</i> -Analoga GLcN- <i>EhPI</i> b C30:1 cis und <i>EhGIPI</i> b C30:1 cis. ....	69

Abbildung 20: Induziertes Zytokinprofil muriner Leberlymphozyten nach Stimulation mit <i>EhLPPG</i> und den glykosylierten <i>EhPI</i> -Analoga <i>GLcN-EhPIb C30:1 cis</i> und <i>EhGIPIb C30:1 cis</i> .....	71
Abbildung 21: Zytotoxizität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in murinen Milzlymphozyten.....	73
Abbildung 22: Zytotoxizität von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga in humanen PBMCs.....	75
Abbildung 23: Bestimmung der hämolytischen Aktivität von $\alpha$ GalCer, <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga.....	77
Abbildung 24: Einfluss von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga auf <i>in vitro</i> <i>L. major</i> -infizierte murine Knochenmarksmakrophagen. ....	79
Abbildung 25: mRNA-Expressionsprofil <i>L. major</i> -infizierter muriner Makrophagen nach Behandlung von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga. ....	81
Abbildung 26: Einfluss von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga auf <i>in vitro</i> <i>L. major</i> -infizierte humane Makrophagen (THP1-Zellen). ....	83
Abbildung 27: Einfluss von Liposomen-formuliertem <i>EhPIa C30:1 cis</i> auf <i>L. major</i> -infizierte humane Makrophagen (THP1-Zellen).....	84
Abbildung 28: Lokalisation des Liposomen-formulierten 10 % <i>EhPIa C30:1 cis</i> in humanen Makrophagen (THP1-Zellen). ....	85
Abbildung 29: Fluoreszenzaufnahmen und mittlere Fluoreszenzintensität leerer Liposomen und Liposomen-formuliertem 10 % <i>EhPIa C30:1 cis</i> von <i>L. major</i> -infizierten THP1-Makrophagen. ....	86
Abbildung 30: Bildanalyse mittels konfokalen Mikroskop Opera Phenix™.....	88
Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahmen mit dem Opera Phenix™.....	89
Abbildung 32: Einfluss von Liposomen-formulierten <i>EhPI</i> -Analoga auf <i>L. major</i> -infizierte murine Makrophagen, ausgewertet mittels Opera Phenix™.....	90
Abbildung 33: Induziertes Zytokinprofil <i>L. major</i> -infizierter muriner BMDMs nach Behandlung mit <i>EhPIa C30:1 cis</i> -Liposomen und <i>EhPIb C16:0 DR</i> -Liposomen.....	92
Abbildung 34: Einfluss der synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga <i>EhPIa C30:1 cis</i> und <i>EhPIb C30:1 cis</i> auf <i>in vivo</i> <i>L. major</i> -infizierte Balb/c-Mäuse. ....	94
Abbildung 35: Bestimmung der Parasitenlast <i>L. major</i> -infizierter Balb/c-Mäuse nach Behandlung mit den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga <i>EhPIa C30:1 cis</i> oder <i>EhPIb C30:1 cis</i> . ....	95

Abbildung 36: Induziertes Zytokinprofil <i>L. major</i> -infizierter Balb/c-Mäuse nach Behandlung mit den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga <i>EhPIa</i> C30:1 cis oder <i>EhPIb</i> C30:1 cis.....	96
Abbildung 37: Bestimmung der optimalen Infektionsmenge von <i>L. major</i> im <i>in vivo</i> C57BL/6-Mausmodell.....	97
Abbildung 38: Einfluss des synthetischen <i>EhPI</i> -Analogons <i>EhPIb</i> C16:0 DR auf <i>in vivo</i> <i>L. major</i> -infizierte C57BL/6-Mäuse.....	98
Abbildung 39: Bestimmung der Parasitenlast <i>L. major</i> -infizierter C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit dem synthetischen <i>EhPI</i> -Analogon <i>EhPIb</i> C16:0 DR. ....	99
Abbildung 40: Immunhistologische Lokalisation von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in <i>L. major</i> -infizierten C57BL/6-Mäusen sowie Arg 1 und iNOS exprimierende Zellen.....	102
Abbildung 41: Einfluss des synthetischen <i>EhPI</i> -Analogons <i>EhPIb</i> C16:0 DR auf <i>in vivo</i> <i>L. major</i> -infizierte C57BL/6-Weibchen und -Männchen.....	103
Abbildung 42: Bestimmung der Parasitenlast <i>L. major</i> -infizierter C57BL/6-Weibchen (♀) und -Männchen (♂) nach Behandlung mit dem synthetischen <i>EhPI</i> -Analogon <i>EhPIb</i> C16:0 DR.....	104
Abbildung 43: Bestimmung der optimalen Infektionsrate und Inkubationszeit für den <i>in vitro</i> <i>M. tuberculosis</i> -Infektionsversuch mit murinen Knochenmarksmakrophagen.....	106
Abbildung 44: Einfluss von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga auf <i>in vitro</i> <i>M. tuberculosis</i> -infizierte murine Knochenmarksmakrophagen.....	107
Abbildung 45: Einfluss von <i>EhLPPG</i> und den synthetischen <i>EhPI</i> -Analoga auf <i>in vitro</i> <i>M. tuberculosis</i> -infizierte murine Knochenmarksmakrophagen.....	108

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Angabe des Herstellers.....	23
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers...	24
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Reaktionskits mit Angabe des Herstellers. ....	25
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Enzyme mit Angabe des Herstellers. ....	25
Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten Antikörper mit Verwendung und Herstellern. ....	26
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer und deren Sequenz für die qPCR in Kombination mit SYBR Green®.....	26
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer und deren Sequenz für die qPCR in Kombination mit TaqMan Sonden. ....	27
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Stimulanzen, deren Stammkonzentration und Hersteller. ....	30
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Liposomen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW, Hamburg). ....	31
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Liposomen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr (HIPS, Saarland). ....	31
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Geräte mit Modelltyp und Herstellerangabe.....	31
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Software mit Herstellerangabe.....	32
Tabelle 13: Reaktionsmix (1x) und Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese.....	53
Tabelle 14: 20 µl Reaktionsansatz (1x) zur Durchführung der qPCR mit TaqMan Sonden zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in murinen Makrophagen und Gewebe.....	55
Tabelle 15: qPCR-Programm zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in murinen Makrophagen. ....	55
Tabelle 16: 20 µl Reaktionsansatz (1x) zur Durchführung der qPCR mit TaqMan Sonden zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in humanen Makrophagen.....	56
Tabelle 17: qPCR-Programm zur Bestimmung der relativen Parasitenlast in humanen Makrophagen. ....	56

## Danksagung

Drei Jahre Doktorarbeit sind schneller vergangen als anfangs erwartet. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen recht herzlich bedanken, die mich bei dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei **Prof. Dr. Hanna Lotter** bedanken, dass ich in Ihrer Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit anfertigen und mich mit diesem interessanten Thema auseinandersetzen durfte. Vielen Dank für deine engagierte Betreuung und deine wissenschaftlichen Hilfestellungen dabei!

**Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger** danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank auch an **Prof. Dr. Julia Kehr** und **Jun.-Prof. Wim Walter, PhD** für Ihren Beisitz in meiner Prüfungskommission.

Zudem möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern dieser Arbeit für die gute Zusammenarbeit bedanken:

- ❖ **Dr. Christoph Hölscher** danke ich, dass ich ein halbes Jahr in seiner Arbeitsgruppe im Forschungszentrum Borstel arbeiten durfte. Es war eine lehrreiche und lustige Zeit bei euch! Danke!
- ❖ Unseren Kooperationspartnern **Prof. Yukari Fujimoto** und **Prof. Koichi Fukase** aus Japan sowie **Prof. Dr. Chris Meier** aus Hamburg danke ich für die Synthese der synthetischen *EhPI*-Analoge und Bereitstellung dieser Moleküle für die Verwendung in dieser Arbeit.
- ❖ **Prof. Dr. Jörg Andrä** und **Prof. Dr. Claus-Michael Lehr** danke ich für die Herstellung der Liposomen in ihren Arbeitsgruppen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch **allen Kollegen** meiner Arbeitsgruppe „Molekulare Infektionsimmunologie“ für die gute Arbeitsatmosphäre und eure hilfreichen Tipps bei Problemen im Labor! Die gemeinsame Mittagspause war sehr unterhaltsam und erholsam. Es war eine schöne Zeit mit euch zusammenzuarbeiten!

Ganz besonders möchte ich mich bei **Corinna Lender** für so viele Dinge bedanken, die ich hier nicht alle nennen kann. Das herzliche Lachen zusammen hat aber oft geholfen, die Probleme nur noch halb so schlimm zusehen ☺

**Steffi**, dir danke ich für deine Hilfe bei der schicken Darstellung einiger Schemata in dieser Arbeit!

Über aus dankbar bin ich auch dir, **Vero**, für die aufmunternde Gespräche unter Doktoranden und die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit! Nach dem Bachelor- und Masterstudium sind wir fast am gemeinsamen Ziel angekommen!

Abschließend gebührt mein größter Dank **meiner Familie!** Liebe Momschy, lieber Piet, liebe Siew Mei und liebe Siew Yuen, ihr habt mich immer motiviert und an mich geglaubt. Ich bin euch so unglaublich dankbar für eure Unterstützung und euren Rückhalt!

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Hamburg, 31.07.2018

---

Siew Ling Choy