

Geschlechtsspezifische Immunantworten bei der hepatischen Amöbiasis

Dissertation

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

vorgelegt von

Marie Groneberg

Hamburg, 2020

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

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

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

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Tim-Wolf Gilberger

Deutsches Elektronen-Synchrotron DESY
CSSB Centre for Structural Systems Biology
Notkestraße 85, Gebäude 15, 22607 Hamburg

Tag der Disputation: 23.04.2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | I |
| Zusammenfassung | IV |
| Abstract | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Zellen des angeborenen Immunsystems | 1 |
| 1.1.1 Monozyten und Makrophagen | 1 |
| 1.1.2 Neutrophile Granulozyten | 3 |
| 1.1.3 Das Chemokin CXCL1 | 3 |
| 1.2 Zellen des adaptiven Immunsystems | 3 |
| 1.2.1 T-Zellen | 4 |
| 1.2.1.1 Differenzierung der CD4 ⁺ T-Zellen | 4 |
| 1.2.1.2 T-Helferzellen-17 (Th17) | 5 |
| 1.2.1.3 Regulatorische T-Zellen (Tregs) | 5 |
| 1.3 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α | 6 |
| 1.3.1 Immunmodulation durch HIF-1 α | 7 |
| 1.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Immunsystem | 7 |
| 1.5 Amöbiasis | 8 |
| 1.5.1 <i>Entamoeba histolytica</i> (<i>E. histolytica</i>) | 8 |
| 1.5.2 Lebenszyklus von <i>E. histolytica</i> | 9 |
| 1.5.3 Krankheitsbild, Diagnose und Therapie | 9 |
| 1.5.4 Pathogenitätsfaktoren | 10 |
| 1.5.5 Amöbenleberabszess im Mausmodell | 10 |
| 1.5.5.1 Immunpathologie im ALA | 11 |
| 1.5.5.2 Regeneration im ALA | 12 |
| 1.5.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der <i>E. histolytica</i> Infektion | 13 |
| 1.6 Zielsetzung | 13 |
| 2 Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Material | 15 |
| 2.1.1 Laborequipment | 15 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterial | 16 |
| 2.1.3 Chemikalien | 16 |
| 2.1.4 Kits und Reagenzien | 17 |
| 2.1.5 Puffer und Medien | 18 |
| 2.1.6 Stimulantien für <i>in vitro</i> Versuche | 19 |
| 2.1.7 Antikörper | 19 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.1.8 | Oligonukleotide | 20 |
| 2.1.9 | Mauslinien..... | 21 |
| 2.1.10 | Software und Datenbanken | 21 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 22 |
| 2.2.1 | Isolierung genomischer DNA aus murinem OhrgefäÙe..... | 22 |
| 2.2.2 | RNA Isolierung aus murinem Lebergewebe | 22 |
| 2.2.3 | cDNA Synthese..... | 22 |
| 2.2.4 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)..... | 22 |
| 2.2.5 | Agarose-Gelelektrophorese | 23 |
| 2.2.6 | Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qPCR)..... | 23 |
| 2.3 | Biochemische Methoden..... | 24 |
| 2.3.1 | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)..... | 24 |
| 2.3.2 | LEGENDplex..... | 25 |
| 2.3.3 | Histologie und Immunhistologie | 25 |
| 2.4 | Zellbiologische Methoden | 26 |
| 2.4.1 | Kultivierung von <i>E. histolytica</i> | 26 |
| 2.4.2 | Herstellung von <i>E. histolytica</i> Lysat | 26 |
| 2.4.3 | Isolierung von Leukozyten aus humanem Spenderblut..... | 26 |
| 2.4.4 | Isolierung humaner CD14 ⁺ und CD16 ⁺ Monozyten aus PBMCs | 27 |
| 2.4.5 | Isolierung der PBMCs aus murinem Herzblut..... | 27 |
| 2.4.6 | Isolierung von Leukozyten aus murinem Lebergewebe..... | 27 |
| 2.4.7 | Isolierung von Leukozyten aus murinem MilzgefäÙe | 28 |
| 2.4.8 | Isolierung von murinen Knochenmarkszellen | 28 |
| 2.4.9 | Zellzahlbestimmung | 28 |
| 2.4.10 | Humaner <i>in vitro</i> Stimulationsassay..... | 28 |
| 2.4.11 | Muriner <i>in vitro</i> Stimulationsassay | 28 |
| 2.4.12 | Restimulation muriner Leberlymphozyten..... | 28 |
| 2.4.13 | Färbung der Zellen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie..... | 29 |
| 2.4.14 | Durchflusszytometrie | 29 |
| 2.5 | Mausversuche..... | 30 |
| 2.5.1 | <i>Cre-loxP</i> Zucht..... | 30 |
| 2.5.2 | Induktion des Amöbenleberabszesses | 30 |
| 2.5.3 | Immundepletion | 31 |
| 2.5.4 | Gonadektomie und Testosteronbehandlung..... | 31 |
| 2.5.5 | Bestimmung der Abszessvolumina..... | 31 |
| 2.6 | Statistik | 31 |
| 3 | Ergebnisse | 32 |

| | | |
|----------|--|---------------|
| 3.1 | Geschlechtsspezifische Unterschiede in der angeborenen Immunantwort: Die Rolle von Androgenen in der Rekrutierung von Monozyten | 32 |
| 3.1.1 | Geschlechtsspezifische Unterschiede in der phänotypischen Charakterisierung von murinen Monozyten und neutrophilen Granulozyten | 32 |
| 3.1.2 | CXCL1 Expression im Verlauf der <i>E. histolytica</i> Infektion | 34 |
| 3.1.3 | Auswirkungen der CXCL1 Depletion auf die Abszessentwicklung | 35 |
| 3.1.4 | Geschlechtsspezifische Unterschiede in der TNF, CCL2 und CXCL1 Produktion muriner Ly6C ^{hi} Monozyten | 36 |
| 3.1.5 | Einfluss von Androgenen auf Monozyten während der <i>E. histolytica</i> Infektion..... | 38 |
| 3.2 | Geschlechtsspezifische Unterschiede in der adaptiven Immunantwort: Die Rolle von HIF-1 α in der Differenzierung regulatorischer und Th17 Immunzellen..... | 41 |
| 3.2.1 | HIF-1 α , Th17 Zellen und Tregs in der <i>E. histolytica</i> Infektion..... | 42 |
| 3.2.2 | Geschlechtsspezifische Unterschiede der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs im Verlauf der <i>E. histolytica</i> Infektion..... | 44 |
| 3.2.3 | Auswirkungen des leberspezifischen HIF-1 α <i>Knockouts</i> auf die Abszessentwicklung sowie hepatischen Th17 Zellen, Tregs und BiTregs..... | 46 |
| 3.2.4 | mRNA Expressionsprofil regulatorischer Zytokine in der Leber im Verlauf der <i>E. histolytica</i> Infektion | 48 |
| 3.2.5 | Einfluss des leberspezifischen HIF-1 α <i>Knockouts</i> auf das Zytokinprofil während der <i>E. histolytica</i> Infektion | 49 |
| 4 | Diskussion..... | 52 |
| 4.1 | Geschlechtsspezifische Unterschiede in den klassischen Monozyten während der <i>E. histolytica</i> Infektion | 52 |
| 4.2 | Geschlechtsspezifische Unterschiede in den neutrophilen Granulozyten während der <i>E. histolytica</i> Infektion | 57 |
| 4.3 | Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Th17 Zellen, Tregs und BiTregs während der <i>E. histolytica</i> Infektion..... | 59 |
| 4.4 | Die Rolle von HIF-1 α in der Abszessentwicklung und Modulation der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs während der <i>E. histolytica</i> Infektion..... | 63 |
| | Literaturverzeichnis..... | VII |
| | Abbildungsverzeichnis | XXII |
| | Tabellenverzeichnis..... | XXIV |
| | Appendix | XXV |
| | Publikationen | XXVI |
| | Danksagung | XXVII |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | XXVIII |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ALA | Amöbenleberabszess |
| Alb | Albumin |
| APC | <i>Antigen Presenting Cell</i> ; Antigen-präsentierende Zelle |
| AR | Androgenrezeptor |
| ARE | <i>Androgen Response Element</i> |
| bp | Basenpaar |
| BNITM | Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin |
| CCL | CC-Chemokin Ligand |
| CCR | CC-Chemokin Rezeptor |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CT | <i>Cycle of Threshold</i> |
| CTLA-4 | <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4</i> |
| CX3CR | CX3C-Chemokinrezeptor |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DC | <i>Dendritic Cell</i> ; Dendritische Zelle |
| DHT | Dihydrotestosteron |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| <i>E. histolytica</i> | <i>Entamoeba histolytica</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| FACS | <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> ; fetales Kälberserum |
| FSC | <i>Forwardscatter</i> ; Vorwärtsstreulicht |
| FMO | <i>Fluorescence Minus One</i> |
| Foxp3 | Forkhead-Box-Protein 3 |
| GOI | <i>Gen Of Interest</i> |
| HIF | Hypoxie-induzierbarer-Faktor |
| HLA-DR | <i>Human Leukocyte Antigen –DR Isotyp</i> |
| HRE | <i>Hypoxia Response Element</i> |
| HRP | <i>HorseRadish Peroxidase</i> ; Meerrettich Peroxidase |
| ICOS | <i>Inducible T-Cell Costimulator</i> |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| iNOS | <i>inducible Nitric Oxide Synthetase</i> |
| i.p. | intraperitoneal |
| Kal | Kalibrator |

| | |
|-------------|---|
| KG | Körpergewicht |
| LAG3 | <i>Lymphocyte-Activation Gene 3</i> |
| <i>loxP</i> | <i>locus of x-over, P1</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| Ly6C | <i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i> |
| LTi | <i>Lymphoid-Tissue-inducer</i> Zellen |
| m | milli |
| M | molar |
| MACS | <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> |
| MD-2 | <i>Myeloid Differentiation factor 2</i> |
| MFI | <i>Median Fluorescence Intensity</i> |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| min | Minute/n |
| moDCs | <i>monocyte-derived Dendritic Cells</i> |
| n | Proben/-Tieranzahl |
| NET | <i>Neutrophil Extracellular Trap</i> |
| NK | Natürliche Killerzelle |
| NKT | Natürliche Killer T-Zelle |
| NO | <i>Nitric oxide</i> ; Stickstoffmonoxid |
| PBMCs | <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PHD | Prolyhydroxylase |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| PRR | <i>Pattern Recognition Receptors</i> |
| pVHL | von-Hippel Lindau Protein |
| qPCR | <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> |
| pH | <i>Pondus Hydrogenii</i> |
| ROR | <i>Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor</i> |
| ROS | <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| RT | <i>Raumtemperatur</i> |
| SA | Streptavidin |
| SARS-CoV | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus</i> |
| SCID | <i>Severe Combined Immunodeficiency</i> |
| SHBG | <i>Steroid Hormone Binding Globulin</i> |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SSC | <i>Sidewardscatter</i> ; <i>Seitwärtsstreulicht</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| Th | T-Helferzelle |

| | |
|--------------|--|
| TLR | <i>Toll-like</i> Rezeptor |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TGF- β | <i>Transforming Growth Factor beta</i> |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| Tsne | <i>T-distributed stochastic neighbor embedding</i> |
| UKE | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |
| α | <i>anti</i> |
| Δ | <i>Delta; Differenz</i> |

Zusammenfassung

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort können für unterschiedliche Krankheitsverläufe in Frauen und Männern verantwortlich sein. Männer sind anfälliger für Infektionskrankheiten, während chronische Krankheiten und Autoimmunerkrankungen häufiger bei Frauen auftreten. Die intestinale Infektion mit dem protozoischen Parasiten *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) ist ein Beispiel für eine Infektion mit geschlechtsspezifischem Krankheitsverlauf. Männer sind häufiger von einer schweren Verlaufsform in Form eines Amöbenleberabszesses (ALA) betroffen. Das Mausmodell für den Amöbenleberabszess spiegelt diesen Geschlechtsdimorphismus wider und zeigte, dass der Abszessentstehung eine Immunpathologie zugrunde liegt. Es konnte bereits demonstriert werden, dass inflammatorische Monozyten, Kupffer-Zellen, die IL-23/IL-17-Immunchse und das Zytokin TNF entscheidend zur Manifestierung des Amöbenleberabszesses beitragen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das Geschlechtshormon Testosteron entscheidend für die Abszessentstehung ist. In der vorliegenden Dissertation wurden geschlechtsspezifische Unterschiede der angeborenen und adaptiven Immunantwort während der *E. histolytica* Infektion analysiert.

Im ersten Abschnitt wurde dargestellt, dass *E. histolytica*-infizierte männliche Mäuse mehr neutrophile Granulozyten und Ly6C^{hi} Monozyten in Blut und Leber aufwiesen als weibliche Mäuse. Die Ly6C^{hi} Monozyten männlicher Mäuse waren zudem durch eine höhere Produktion von CXCL1 und TNF gekennzeichnet. Des Weiteren zeigten naive männliche Mäuse ein größeres Reservoir an CCR2⁺Ly6C^{hi} Monozyten im Knochenmark, wodurch sie für eine schnellere Migration der Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn prädestiniert sind. Zudem konnte CXCL1 eine entscheidende Rolle in der Immunpathologie zugeordnet werden. Während der *E. histolytica* Infektion induzierte Testosteron einen Anstieg der hepatischen Ly6C^{hi} Monozyten sowie deren CXCL1, CCL2 und TNF Produktion. Zudem bewirkte Testosteron einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Der Einfluss von Androgenen auf die CXCL1 Produktion konnte ebenfalls in humanen Monozyten *in vitro* bestätigt werden.

Im zweiten Abschnitt wurde belegt, dass die intrahepatische *E. histolytica* Infektion einen Anstieg der hepatischen ROR γ ^t Th17 Zellen, Foxp3⁺ Tregs und ROR γ ^tFoxp3⁺ BiTregs in Mäusen beider Geschlechter zur Folge hat. Die *E. histolytica* Infektion führte zudem zu einer Induktion von HIF-1 α in den Hepatozyten. Als Untereinheit eines Transkriptionsfaktors kann HIF-1 α eine Vielzahl immunregulatorischer Prozesse unter Hypoxie modulieren. Der Hepatozyten-spezifische HIF-1 α Knockout (*Hep-HIF-1 α ^{-/-}*) hatte konträre Auswirkungen auf die Abszessentwicklung in männlichen und weiblichen Mäusen während der *E. histolytica* Infektion.

Männliche *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse bildeten signifikant kleinere Abszesse im Vergleich zu Kontrollmäusen. Eine parallele Reduktion der *IL-6* Transkripte sowie der Th17 Zellpopulation ließ eine Beteiligung der Th17 Zellen an der Immunpathologie im ALA vermuten, die über HIF-1 α beeinflusst werden kann. Weibliche *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse entwickelten hingegen tendenziell größere Läsionen, die womöglich in der Reduktion hochsuppressiver Tregs begründet waren.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der angeborenen und adaptiven Immunantwort während der *E. histolytica* Infektion für einen schwereren Krankheitsverlauf in männlichen Individuen verantwortlich sind.

Abstract

Sex differences in the immune system can account for different disease susceptibilities in men and women. Men are more prone to infectious diseases, while chronic and autoimmune diseases occur more frequently in women. The intestinal infection with the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) is an example of an infection with a sex-specific course of the disease. Men are much more often affected by a severe form of the infection – the amoebic liver abscess (ALA). The mouse model for the amoebic liver abscess reflects this sexual dimorphism and revealed an underlying immunopathology. It has already been demonstrated that inflammatory monocytes, Kupffer cells, the IL-23/IL-17 immune axis and the cytokine TNF contribute decisively to the manifestation of the amoebic liver abscess. Additionally, it has been shown that the sex hormone testosterone is crucial for abscess development. In this thesis, sex-specific differences in the innate and adaptive immune response during *E. histolytica* infection were analyzed.

The first section revealed that male mice infected with *E. histolytica* had more neutrophils and Ly6C^{hi} monocytes in their blood and liver than female mice. The Ly6C^{hi} monocytes were also characterized by a higher production of CXCL1 and TNF. Furthermore, naive male mice showed a larger reservoir of CCR2⁺ Ly6C^{hi} monocytes in the bone marrow and are therefore predisposed for a faster migration of monocytes from the bone marrow into the bloodstream. In addition, it was demonstrated that CXCL1 plays a crucial role in the immunopathology. During *E. histolytica* infection testosterone induced an increase in hepatic Ly6C^{hi} monocytes and neutrophils as well as increased CXCL1, CCL2 and TNF production of Ly6C^{hi} monocytes. Finally, the influence of androgens on the CXCL1 production could be confirmed in human monocytes *in vitro*.

In the second part of this thesis, it was demonstrated that the intrahepatic *E. histolytica* infection caused an increase of hepatic ROR γ t⁺ Th17 cells, Foxp3⁺ Tregs and ROR γ t⁺Foxp3⁺ BiTregs. The *E. histolytica* infection also led to an increase of HIF-1 α in hepatocytes. HIF-1 α is part of a transcription factor that can modulate a large number of immunoregulatory processes during hypoxia. The hepatocyte-specific HIF-1 α knockout (*Hep-HIF-1 α ^{-/-}*) had contrary effects on the abscess development in male and female mice during *E. histolytica* infection. Male *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* developed significantly smaller abscesses compared to control mice. A parallel reduction of *IL-6* transcripts and the Th17 cell population suggested that the Th17 cells are involved in the immunopathology of the ALA and can be influenced by HIF-1 α . Female *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* mice on the other hand, tended to develop larger lesions, which may be due to a reduction of highly suppressive Tregs.

In summary, it was shown that sex-specific differences in the innate and adaptive immune response during *E. histolytica* infection account for a more severe disease progression in male individuals.

1 Einleitung

1.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Als Zellen des angeborenen Immunsystems schützen Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen (DCs), Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) den Körper vor Gewebeverletzungen und Infektionen. Sie erkennen körperfremde Strukturen über spezielle Rezeptoren – die *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) (Geissmann et al. 2010).

Aufgrund der vielen Fremdantigene aus dem Gastrointestinaltrakt, die die Leber über die Pfortader erreichen, ist diese mit sehr vielen Immunzellen angereichert. Damit diese kontinuierlichen Reize keine überschießende Immunantwort hervorrufen, muss die Leber eine gewisse Immuntoleranz besitzen (Tiegs und Lohse 2010). Besonders NK-Zellen und Kupffer-Zellen (residente Makrophagen der Leber) spielen eine entscheidende Rolle bei der initialen Immunabwehr in der Leber. Kupffer-Zellen schützen den Körper durch Phagozytose vor Mikroorganismen, degenerierten Zellen und Gewebetrümmern. Sie fungieren außerdem als Antigen-präsentierende Zellen (APC) und sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Hepatische NK-Zellen können Zielzellen direkt lysieren oder deren Apoptose einleiten. Sie produzieren außerdem große Mengen des Zytokins Interferon (IFN) γ , wodurch Makrophagen aktiviert werden (Liaskou et al. 2012). Im Gegensatz zu Kupffer-Zellen und NK-Zellen werden neutrophile Granulozyten und Monozyten erst im Falle einer Infektion ins Gewebe rekrutiert. Neutrophile Granulozyten tragen über ihre phagozytotische Aktivität und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Mediatoren wie *Reactive Oxygen Species* (ROS) zur Pathogenabwehr bei. Monozyten phagozytieren Fremdpartikel und Mikroorganismen, produzieren sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Zytokine und aktivieren als Antigen-präsentierende Zellen die adaptive Immunabwehr (Racanelli und Rehermann 2006; Liaskou et al. 2012).

1.1.1 Monozyten und Makrophagen

Monozyten sind im Blut zirkulierende Immunzellen, die durch Phagozytose toxischer Moleküle und Zytokinproduktion zur angeborenen Immunabwehr des Wirtes beitragen. Während einer Entzündung wandern sie in das infizierte Gewebe und differenzieren zu Makrophagen und dendritischen Zellen (Geissmann et al. 2010; Shi und Pamer 2011).

Im Menschen werden aufgrund ihrer Expression von *Cluster of Differentiation* 14 (CD14) sowie CD16 drei Monozytenpopulationen differenziert: die klassischen CD14⁺CD16⁻, die intermediären CD14⁺CD16⁺ und die nicht-klassischen CD14⁻CD16⁺ Monozyten. Mit 80-90 % stellen die CD14⁺CD16⁻ Zellen die größte Monozytenpopulation im peripheren Blut dar. Sie sind durch eine hohe C-C-Chemokinrezeptor-2 (CCR2) Expression, niedrige CX3C-Chemokinrezeptor-1 (CX₃CR1) Expression sowie hoher phagozytotischer Aktivität gekennzeichnet. CD14⁻CD16⁺ Monozyten weisen eine hohe CX₃CR1 und niedrige CCR2 Expression sowie geringe phagozytotische Aktivität auf (Auffray et al. 2009).

In Mäusen werden zwei Monozytenpopulationen unterschieden, die aufgrund ihrer Expression des Oberflächenmoleküls Ly6C (*Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1*) als Ly6C^{hi} (hohe Ly6C

Expression) und Ly6C^{lo} (geringe Ly6C Expression) Monozyten bezeichnet werden. CD11b⁺Ly6C^{hi}CCR2⁺ Monozyten zeigen den gleichen Phänotyp wie die humanen klassischen Monozyten und werden auch inflammatorische Monozyten genannt. CD11b⁺Ly6C^{lo}CX₃CR1⁺ Monozyten sind das murine Äquivalent zu den humanen nicht-klassischen Monozyten (Geissmann *et al.* 2010; Shi und Pamer 2011).

Die Klassifizierung der humanen sowie murinen Monozytenpopulationen ist hier sehr vereinfacht dargestellt. Monozyten sind durch eine hohe Diversität und Plastizität gekennzeichnet. Villani *et al.* identifizierten mit Hilfe einer Transkriptomstudie vier Monozytenpopulationen im Menschen (Villani *et al.* 2017). Hamers *et al.* unterschieden sogar acht Monozytenpopulationen aufgrund unterschiedlicher Markerexpression (Hamers *et al.* 2019). In Mäusen wurde neben Ly6C^{hi} und Ly6C^{lo} Monozyten in einigen Studien ebenfalls eine intermediäre Ly6C^{int} Population beschrieben (Wolf *et al.* 2019). Des Weiteren unterscheiden sich die murinen Monozyten, die als Vorläuferzellen für moDCs (*monocyte-derived* DCs) dienen von denen, die zu Makrophagen differenzieren (Menezes *et al.* 2016; Scott *et al.* 2016; Bonnardel *et al.* 2019). Schließlich können Ly6C^{hi} Monozyten in Ly6C^{lo} Monozyten transdifferenzieren (Peng *et al.* 2015).

Während einer Entzündung migrieren inflammatorische Monozyten aufgrund der Interaktion von CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) mit ihrem membrangebundenen CCR2 aus dem Knochenmark in das periphere Blutsystem. Über die Blutbahn gelangen Monozyten in das infizierte Gewebe. Durch die Produktion pro-inflammatorischer Moleküle wie ROS, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interleukin (IL)-1 β und IL-6 tragen sie primär zur Eliminierung von Pathogenen bei (Auffray *et al.* 2009). CCR2^{-/-} Mäuse, bei denen der Austritt der Ly6C^{hi} Monozyten aus dem Knochenmark gestört ist, zeigen ein verstärktes Krankheitsbild in *Listeria monocytogenes* oder *Toxoplasma gondii* Infektionen (Shi und Pamer 2011). Ly6C^{lo} Monozyten hingegen patrouillieren entlang der Blutgefäße und werden bei Bedarf ebenfalls ins Gewebe rekrutiert (Auffray *et al.* 2009; Shi und Pamer 2011).

Im Gewebe differenzieren Monozyten zu moDCs und Makrophagen. Innerhalb der Makrophagen werden die klassisch-aktivierten, inflammatorischen Makrophagen (M1) und die alternativ-aktivierten, immunsuppressiven Makrophagen (M2) unterschieden (Auffray *et al.* 2009; Menezes *et al.* 2016; Murray 2017). Innerhalb der M2 Makrophagen werden wiederum verschiedene Subpopulationen differenziert (Mantovani *et al.* 2004). Die Polarisierung der Makrophagen in einen M1 oder M2 Phänotyp ist lediglich eine vereinfachte Darstellung dieser heterogenen Zellpopulation. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist sehr komplex und unterliegt verschiedenen Einflüssen. Vereinfacht dargestellt differenzieren überwiegend Ly6C^{hi} Monozyten aufgrund eines inflammatorischen Milieus im Gewebe zu M1 Makrophagen. Durch die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-23, TNF, IL-1 β und IL-6 tragen sie entscheidend zur Pathogenabwehr bei (Laskin *et al.* 2011). Ly6C^{lo} Monozyten differenzieren wiederum in einem anti-inflammatorischen Milieu vermehrt zu M2 Makrophagen und regulieren die Entzündungs- und Wundheilungsprozesse durch Freisetzung anti-inflammatorischer und immunsuppressiver Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und *Transforming Growth Factor* (TGF)- β (Geissmann *et al.* 2010). Makrophagen zeigen einen hohen Grad an Plastizität. So können M1 Makrophagen im Laufe der Entzündung Charakteristika von M2 Makrophagen annehmen und Wundheilungsprozesse unterstützen (Biswas *et al.* 2012).

1.1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen mit 50-70 % die größte Leukozytenpopulation im humanen Blut und die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Krankheitserreger dar (Jaillon *et al.* 2020). Die kurzlebigen Zellen zirkulieren im Blut und migrieren während einer Infektion schnell zum Entzündungsort. Die wichtigste Funktion der neutrophilen Granulozyten ist die Phagozytose von Pathogenen. Zudem können sie antimikrobielle Moleküle aus ihren Granula-Vesikeln freisetzen, die Mikroorganismen abtöten. Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die NET (*Neutrophil Extracellular Trap*) Formation, bei der Strukturen aus Chromatin und Proteasen genutzt werden um Mikroorganismen einzufangen und abzutöten (Ley *et al.* 2018). Schließlich tragen neutrophile Granulozyten durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und ROS zur Pathogenabwehr bei (Nguyen *et al.* 2017). Im Menschen werden neutrophile Granulozyten über die Oberflächenmoleküle CD66b und CD15 identifiziert, während murine neutrophile Granulozyten CD11b und Ly6G exprimieren (Eruslanov *et al.* 2017). Innerhalb der neutrophilen Granulozyten werden zudem zwei Populationen unterschieden. Neutrophile Granulozyten mit einem N1-Phänotyp produzieren pro-inflammatorische Zytokine und sind effektiver in der Bekämpfung von Tumorzellen. Der N2-Phänotyp charakterisiert neutrophile Granulozyten, die anti-inflammatorische Zytokine produzieren und eine Tumorentwicklung fördern (Fridlender *et al.* 2009; Ohms *et al.* 2020).

1.1.3 Das Chemokin CXCL1

Chemokine und ihre entsprechenden Chemokinrezeptoren sind für Entzündungsreaktionen von wesentlicher Bedeutung, indem sie die Migration von Leukozyten in beschädigte oder infizierte Organe regulieren. Chemokine lassen sich aufgrund ihrer Cysteinreste am Amino-Terminus in vier Familien unterteilen: CC-, CXC-, CX3C- und C-Chemokine (Marra und Tacke 2014).

CXCL1 (auch GRO- α oder KC genannt) zählt zur Familie der CXC-Chemokine und wird von Hepatozyten, Kupffer-Zellen, Mastzellen, Makrophagen und Monozyten sezerniert (De Filippo *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013; Marra und Tacke 2014; Su *et al.* 2018). Durch die Bindung von CXCL1 mit dem spezifischen Rezeptor CXCR2 werden neutrophile Granulozyten und Monozyten in entzündetes oder verletztes Gewebe rekrutiert (Ritzman *et al.* 2010; De Filippo *et al.* 2013; Shieh *et al.* 2014; Wang *et al.* 2018). CXCL1 ist außerdem an der Angiogenese, der Arteriogenese, der Tumorentwicklung und der Wundheilung beteiligt (Devalaraja *et al.* 2000; Vries *et al.* 2015; Hsu *et al.* 2018).

1.2 Zellen des adaptiven Immunsystems

B- und T-Lymphozyten stellen die Immunzellen des adaptiven Immunsystems dar. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem reagieren sie mit erlernten, spezifischen Immunreaktionen. Im Knochenmark reifende B-Zellen produzieren spezifische Antikörper gegen fremde Antigene. Im Thymus reifende T-Zellen erkennen fremde Antigene durch eine Präsentation über MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*) exprimiert von APCs. T-Zellen sind eine sehr diverse Zellpopulation mit hoher Plastizität (Chaplin 2010).

1.2.1 T-Zellen

T-Zellen erkennen von APCs über MHC-Moleküle präsentierte Antigene über den T-Zell-Rezeptor (TCR). Aufgrund unterschiedlicher T-Zell-Rezeptor Strukturen lassen sich zwei Populationen der T-Zellen unterscheiden: die $\alpha\beta$ T-Zellen und die $\gamma\delta$ T-Zellen. Wichtig für beide Populationen ist eine zusätzliche Expression von CD3, die essentiell für die intrazelluläre Signalweiterleitung ist. Innerhalb der $\alpha\beta$ T-Zellen unterscheiden sich wiederum zwei Zellpopulationen. $CD4^+$ T-Zellen erkennen Antigene präsentiert über MHC-II Moleküle und besitzen Helferfunktionen. $CD8^+$ T-Zellen hingegen erkennen über MHC-I präsentierte Antigene und zeigen zytolytische Eigenschaften (Chaplin 2010).

1.2.1.1 Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen

Die Aktivierung einer T-Zelle ist von mehreren Signalen abhängig. Zunächst muss die $CD4^+$ T-Zelle über MHC-II Moleküle präsentierte Antigene mit ihrem T-Zell-Rezeptor binden. Zusätzlich benötigt die T-Zelle ein zweites Signal, welches über kostimulatorische Moleküle vermittelt wird (Smith-Garvin *et al.* 2009). Nach T-Zell-Rezeptor-Antigen Interaktion kann eine $CD4^+$ Zelle in verschiedene T-Zellpopulationen differenzieren: unter anderem in T-Helferzellen(Th)1, Th2, Th17, folliculäre T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen (Tregs) (Zhou *et al.* 2009). Das Zytokinmilieu trägt hierbei als drittes Signal entscheidend zur Differenzierung bei (Abb. 1) (Zhou *et al.* 2009).

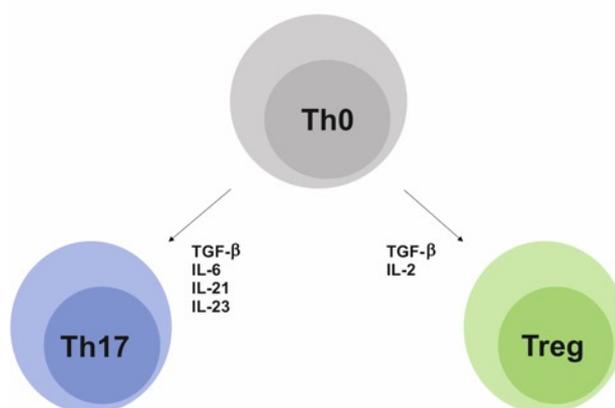


Abbildung 1: Schematische Darstellung der an der Th17 und regulatorischen T-Zelldifferenzierung beteiligten Zytokine. Eine naive T-Zelle kann nach T-Zell-Rezeptor-Antigen Interaktion in verschiedene T-Zellpopulationen differenzieren, unter anderem in regulatorische T-Zellen (Tregs) und Th17 Zellen. Hierbei trägt das Zytokinmilieu entscheidend zur Differenzierung bei. Während TGF- β und IL-6 oder IL-21 Th17 Zellen induzieren können, kann TGF- β gemeinsam mit IL-2 die Differenzierung der Tregs aktivieren. IL-23 ist darüber hinaus wichtig für die Stabilität und Funktionalität der Th17 Zellen (erstellt nach Zhou *et al.* 2009).

TGF- β ist sowohl für die Differenzierung von Tregs als auch von Th17 Zellen essentiell (Ivanov *et al.* 2006; Veldhoen *et al.* 2006; Mangan *et al.* 2006). Ist zudem IL-6 präsent, wird die Differenzierung zu Th17 Zellen induziert, während die Tregs inhibiert werden (Mangan *et al.* 2006; Bettelli *et al.* 2006; Korn *et al.* 2007; Gao *et al.* 2012). Weniger effizient ist die Differenzierung von Th17 Zellen durch TGF- β und IL-21 (Korn *et al.* 2007). IL-23 bewirkt zwar einen Anstieg von IL-17-produzierenden T-Zellen (Park *et al.* 2005), ist aber primär für die Stabilität und Funktionalität der Th17 Zellen und nicht deren Differenzierung bedeutsam (Langrish *et al.* 2005; Bettelli *et al.* 2006; Stritesky *et al.* 2008).

Gemeinsam mit IL-2 ist TGF- β essentiell für die periphere Induktion der Treg-Differenzierung (Setoguchi *et al.* 2005; Zheng *et al.* 2007).

1.2.1.2 T-Helferzellen-17 (Th17)

Th17 Zellen sind wichtige Zellen in der Immunabwehr gegen Pathogene. Namensgebend für die Th17 Zellen ist ihre Fähigkeit, große Mengen an IL-17 zu produzieren. Darüber hinaus werden sie über die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor*) und der Produktion von IL-21 und IL-22 charakterisiert (Liang *et al.* 2006; Ivanov *et al.* 2006). Mäuse mit einem IL-17 oder IL-17 Rezeptor *Knockout* haben eine geschwächte Immunabwehr gegen bakterielle, parasitäre und virale Infektionen (Ye *et al.* 2001; Anipindi *et al.* 2016; Moroda *et al.* 2017). Außerdem werden Th17 Zellen mit chronischen und Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Asthma und systemischer Lupus erythematoses in Verbindung gebracht (Dong 2008). IL-17-defiziente Mäuse zeigen abgeschwächte Krankheitsverläufe in rheumatoider Arthritis und experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (Nakae *et al.* 2003; Park *et al.* 2005). IL-17 induziert die Expression von Chemokinen wie CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1 und CXCL2 in murinen Fibroblasten und Lungenepithelzellen wodurch Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten rekrutiert werden (Park *et al.* 2005). Außerdem kann IL-17 in Makrophagen, Knochen- und Knorpelzellen IL-1 β , IL-6 und TNF induzieren und so die pro-inflammatorische Immunantwort verstärken (Onishi und Gaffen 2010). IL-17 wird von IL-23 reguliert. IL-23p19^{-/-} Mäuse zeigen eine gestörte Induktion von IL-17 und Th17 Zellen (Langrish *et al.* 2005; McGeachy *et al.* 2009; Noll *et al.* 2016).

1.2.1.3 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Tregs wirken suppressiv auf das Immunsystem und sind wichtig für die Immuntoleranz (Li *et al.* 2015). Man unterscheidet Tregs, die im Thymus entstehen – tTregs oder auch *natural* Tregs (nTregs) genannt – von den peripher induzierten pTregs oder iTregs. Tregs können die immunsuppressiven Zytokine IL-10, IL-35 und TGF- β sezernieren und exprimieren den Transkriptionsfaktor *Forkhead-Box-Protein 3* (Foxp3) sowie den IL-2 Rezeptor α (CD25) (Li *et al.* 2015). Die suppressive Wirkung der Tregs kann auf vier verschiedene Weisen erfolgen. Tregs können Effektorzellen über die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGF- β inhibieren. Des Weiteren können sie Zielzellen über Granzyme A und B lysieren oder durch einen überhöhten Zytokinverbrauch den Metabolismus von Effektorzellen stören. Letztlich können sie die Aktivierung von Effektorzellen verhindern, indem sie Antigen-präsentierende Zellen über koinhibitorische Moleküle wie *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4* (CTLA-4) und *Lymphocyte-Activation Gene 3* (LAG3) inhibieren. Defekte in Treg Funktionen werden mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie primär biliäre oder sklerosierende Cholangitis und autoimmuner Hepatitis in Verbindung gebracht (Liberal *et al.* 2015). *Scurfy*-Mäuse, die aufgrund eines mutationsbedingten Funktionsverlusts von Foxp3 keine Tregs besitzen, haben starke Autoimmunreaktionen im ganzen Körper und sterben innerhalb von 3-4 Wochen nach Geburt (Brunkow *et al.* 2001).

1.3 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α

Der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) ist der Hauptregulator zellulärer Reaktionen auf mangelnde Sauerstoffbedingungen und kann Einflüsse auf die Immunreaktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems nehmen. HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer sauerstoffabhängigen α -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (Semenza 2004). Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird HIF-1 α von Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert. Dies dient als Erkennungsmerkmal für das von-Hippel-Lindau Protein (pVHL), welches als Teil eines Elongin C Ubiquitinligasekomplexes HIF-1 α ubiquitiniert und für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert (Abb. 2 A) (Ohh *et al.* 2000). Unter hypoxischen (sauerstoffarmen) Bedingungen verlieren die PHDs ihre Aktivität und HIF-1 α akkumuliert. HIF-1 α transloziert in den Nukleus und dimerisiert mit der β -Untereinheit. Durch die Bindung an *Hypoxia Response Elements* (HRE) in den Promotorregionen von Zielgenen kann HIF-1 α die Transkription dieser direkt regulieren (Abb. 2 B) (Ohh *et al.* 2000; Semenza 2004).

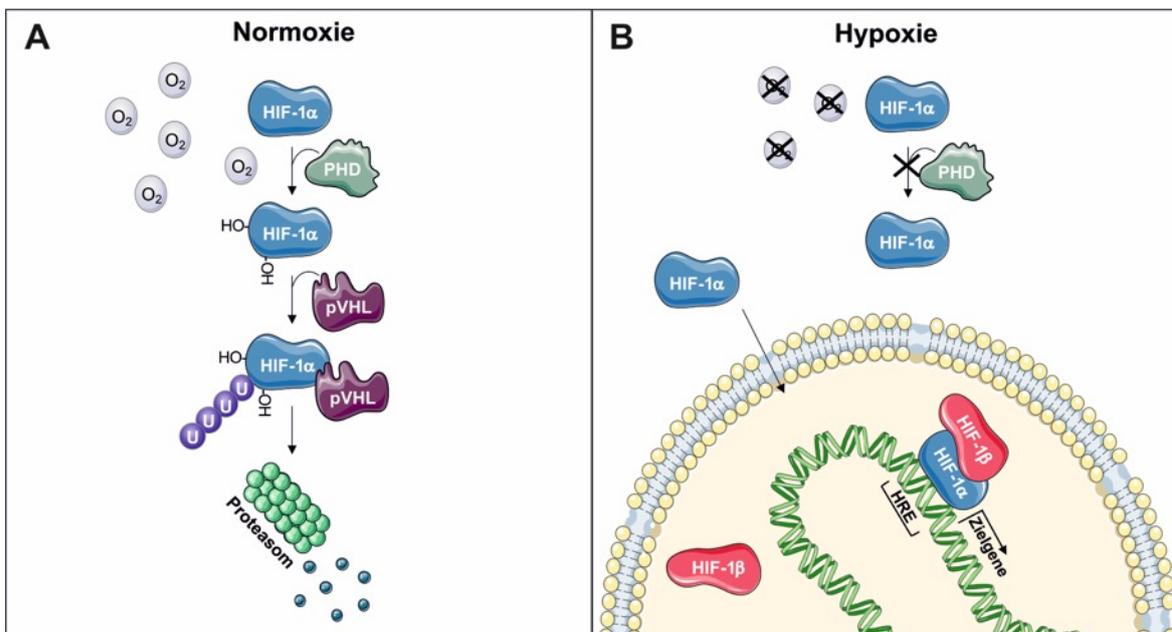


Abbildung 2: HIF-1 α unter Normoxie und Hypoxie. (A) Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird HIF-1 α von Prolylhydroxylasen (PHD) hydroxyliert. Diese Hydroxylierung wird von dem von-Hippel-Lindau Protein (pVHL) erkannt und HIF-1 α gebunden. Als Teil eines Elongin C Ubiquitinligasekomplexes ubiquitiniert pVHL HIF-1 α und markiert es für den proteasomalen Abbau. (B) Unter hypoxischen Bedingungen verlieren die PHDs ihre Aktivität und HIF-1 α bleibt stabil. HIF-1 α transloziert in den Nukleus und bindet die β -Untereinheit. Gemeinsam binden sie an *Hypoxia Response Elements* (HRE) in der Promotorregion von Zielgenen und steuern direkt deren Transkription (erstellt nach Ohh *et al.* 2000 und Semenza 2004; Grafik erstellt mit SMART von Servier[®]).

In entzündeten Geweben kommt es durch den hohen Sauerstoffverbrauch infiltrierender neutrophiler Granulozyten und Monozyten innerhalb von kurzer Zeit zur Hypoxie und einem Anstieg von HIF-1 α (Frede *et al.* 2006; Ben-Shoshan *et al.* 2008; Campbell *et al.* 2014). Neben Sauerstoffarmut können aber auch Lipopolysaccharide (LPS) (Frede *et al.* 2006; Peyssonnaud *et al.* 2007), IL-6 (Shi *et al.* 2011), IL-1 β (Frede *et al.* 2005; Feldhoff *et al.* 2017) und TGF- β (McMahon *et al.* 2006) HIF-1 α induzieren oder stabilisieren. HIF-1 α wird in verschiedenen Zellen des angeborenen und adaptiven

Immunsystems exprimiert: unter anderem in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, T- und B-Zellen (Palazon *et al.* 2014). Durch die direkte Beeinflussung von Genen für das Zellüberleben sowie Glykolyse und Angiogenese kann HIF-1 α den Verlauf verschiedener Krankheiten lenken (Semenza 2004; Taylor und Colgan 2017). In vielen Lebererkrankungen ist eine höhere Expression von HIF-1 α messbar: unter anderem in Alkohol-induzierter Hepatitis, Hepatitis C Virusinfektion, Leberkrebs und akutem Leberversagen (Ripoli *et al.* 2010; Nath *et al.* 2011; Nishiyama *et al.* 2012; Tak *et al.* 2017; Chen und Lou 2017). Abhängig von der Krankheit kann eine HIF-1 α Induktion protektiv oder schädlich sein. Während HIF-1 α bei akuten Lebererkrankungen überwiegend einen schützenden Effekt aufweist, wirkt HIF-1 α tendenziell schädlich in chronischen Entzündungen (Ju *et al.* 2016). Mehrere Phase II und Phase III klinische Studien untersuchen derzeit die Wirkung von HIF-1 α auf das Tumorwachstum in lymphatischen Krebserkrankungen, malignen Melanomen, Glioblastomen und Ovarialkarzinomen (Fallah und Rini 2019).

1.3.1 Immunmodulation durch HIF-1 α

In T-Zellen kann HIF-1 α durch die Bindung an HREs ROR γ t direkt aktivieren und die Differenzierung der Th17 Zellen induzieren (Dang *et al.* 2011; Shi *et al.* 2011). In der Literatur besteht Diskrepanz darüber, ob HIF-1 α die Differenzierung und suppressive Aktivität von Tregs stimuliert (Ben-Shoshan *et al.* 2008; Clambey *et al.* 2012; Lee *et al.* 2015; Westendorf *et al.* 2017) oder inhibiert (Dang *et al.* 2011; Shi *et al.* 2011; Feldhoff *et al.* 2017).

Durch eine Modulation des Zytokinmilieus kann HIF-1 α auch einen indirekten Einfluss auf die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung ausüben. Es konnte bereits beobachtet werden, dass pathophysiologische Sauerstoffbedingungen (1 % O₂) *in vitro* zu einer höheren Produktion von IL-2, IL-17 und IL-22 in T-Zellen (Gaber *et al.* 2013; Budda *et al.* 2016), IL-6 in Monozyten (Matsui *et al.* 1999) und TNF in Makrophagen (Cramer *et al.* 2003) führten. Experimente mit HIF-1 α -defizienten Immunzellen deckten die essentielle Rolle von HIF-1 α in dieser Zytokininduktion auf (Peyssonnaud *et al.* 2007; Budda *et al.* 2016; Mingyuan *et al.* 2018). Die Behandlung von Mäusen mit einem Prolylhydroxylase Inhibitor (bewirkt eine HIF-1 α Stabilisierung) führte zu einer Induktion intestinaler IL-22⁺ und IL-12p40⁺ Zellen sowie einer Reduktion von IFN γ ⁺, IL-12p70⁺, IL-17⁺ und IL-23⁺ Zellen während chemischer oder *Citrobacter rodentium*-induzierter Kolitis (Marks *et al.* 2017). Außerdem zeigten Mäuse, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden, höhere IL-6 Transkripte in der Lunge (Yan *et al.* 1995) und IL-2 Transkripte im Gehirn (Girard *et al.* 2008).

1.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Immunsystem

Männer und Frauen unterscheiden sich in ihren angeborenen und adaptiven Immunantworten. 80 % der Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis und systemischer Lupus erythematoses treten bei Frauen auf, während Männer ein höheres Risiko für maligne Krebserkrankungen und parasitäre Infektionen tragen. In Frauen lassen sich zudem stärkere Antikörperreaktionen auf Impfungen nachweisen. Dieser Geschlechtsdimorphismus kann auf

Unterschiede der Chromosomenstruktur, der reproduktiven Organe oder der Hormonlevel beruhen (Cai *et al.* 2016; Klein und Flanagan 2016; Sellau *et al.* 2019).

Geschlechtshormone sind lipophile Steroidhormone, die in den Gonaden oder der Nebennierenrinde aus Cholesterol synthetisiert werden. Sie lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Androgene, Östrogene und Gestagene. Innerhalb der Sexualhormone gibt es einen hohen Grad an Plastizität. Über enzymvermittelter Reaktionsschritte können Gestagene in Androgene und Androgene in Östrogene katalysiert werden (Sellau *et al.* 2019).

Die Androgene umfassen Testosteron, Dihydrotestosteron (DHT), Androstendion, Androstendiol und Dehydroepiandrosteron. Testosteron kann einerseits über die 5 α -Reduktase zu DHT oder über die Aromatase zu dem Östrogen Estradiol konvertiert werden. Testosteron und DHT binden an den Androgenrezeptor (AR). DHT zeigt hierbei eine 2 x höhere Affinität und 5 x niedrigere Dissoziationsrate zum AR und wird daher als das potenteste Androgen beschrieben. DHT kann außerdem nicht in Estradiol umgewandelt werden (Marchetti und Barth 2013; Cai *et al.* 2016; Davey und Grossmann 2016).

Der AR wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und B-Zellen (nur in der Entwicklungsphase) exprimiert (Gubbels Bupp und Jorgensen 2018). Androgene können entweder den klassischen AR oder nicht-klassische AR binden. Der klassische AR liegt im Zytoplasma und ist an Hitzeschockproteine gekoppelt. Nach Bindung des Androgens dissoziieren diese Hitzeschockproteine und der Androgen:Rezeptor Komplex kann in den Nukleus translozieren. Er wird phosphoryliert, bildet Homodimere und kann *Androgen Response Elements* (ARE) in den Promotorregionen von Zielgenen binden und gemeinsam mit Kofaktoren deren Transkription regulieren (Marchetti und Barth 2013; Cai *et al.* 2016). Über die nicht-klassischen ARs können zusätzlich innerhalb von wenigen Minuten DNA-bindungsunabhängige Signalwege induziert werden. Nicht klassische ARs können sowohl im Zytoplasma als auch in der Plasmamembran lokalisiert sein, wo sie mit G-Proteingekoppelten Rezeptoren assoziiert sind und Androgene direkt oder indirekt über *Steroid Hormone Binding Globulin* (SHBG) binden. Über DNA-bindungsabhängige und unabhängige Signalwege können ARs neben der Gonadenentwicklung und Ausprägung der Geschlechtsmerkmale somit die Transkription immunrelevanter Gene modulieren (Gubbels Bupp und Jorgensen 2018).

1.5 Amöbiasis

Die Amöbiasis wird von dem protozoischen Parasiten *Entamoeba histolytica* hervorgerufen (WHO/PAHO/UNESCO 1997). Infektionen treten hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen mit mangelnden Hygienebedingungen auf und führen jährlich zu etwa 55.000 Todesfällen (Lozano *et al.* 2012).

1.5.1 *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*)

Der protozoische Parasit *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) wurde erstmals 1875 von Fedor Lösch in Stuhlproben eines Patienten mit einer intestinalen Amöbeninfektion beschrieben (Guerrant 1986). Der Artenname *Entamoeba histolytica* wurde 1903 von Fritz Schaudinn aufgrund der

Fähigkeit des Parasiten Gewebe zu lysieren, eingeführt. *E. histolytica* lässt sich taxonomisch wie folgt einordnen: Stamm – Amoebozoa; Klasse – Entamoebida; Ordnung – Entamoebida; Familie – Entamoebidae; Gattung – *Entamoeba* (Guerrant 1986; Despommier *et al.* 2017).

1.5.2 Lebenszyklus von *E. histolytica*

Die Infektion beginnt mit der Aufnahme vierkerniger *E. histolytica* Zysten aus kontaminierten Nahrungsmitteln oder Trinkwasser (Abb. 3). Die säureresistenten Zysten gelangen über den Magen in den Dünndarm und exzystieren zu einkernigen Trophozoiten. Die sehr beweglichen Trophozoiten gelangen in den Dickdarm, vermehren sich über binäre Teilung und enzystieren zu vierkernigen Zysten. Die Trophozoiten können aber auch über Monate und Jahre im Darmlumen persistieren, ohne jegliche Symptome hervorzurufen (Guerrant 1986; Stanley 2003). Beide Stadien werden über den Stuhl ausgeschieden. Während die Trophozoiten außerhalb des menschlichen Körpers nicht überlebensfähig sind, können die Zysten in warmer, feuchter Umgebung über Wochen überleben, ohne an Infektiosität zu verlieren und neue Wirte infizieren (Despommier *et al.* 2017).

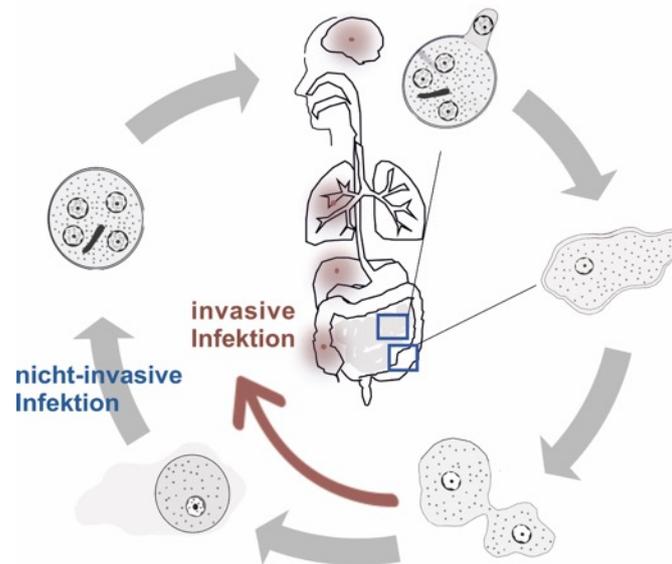


Abbildung 3: Lebenszyklus von *E. histolytica*. Durch kontaminierte Nahrungsmittel werden die vierkernigen *E. histolytica* Zysten aufgenommen. Im Dünndarm exzystieren sie zu einkernigen Trophozoiten. Die Trophozoiten wandern in den Dickdarm, vermehren sich durch binäre Teilung und enzystieren erneut. Beide Formen werden über den Stuhl abgegeben. In seltenen Fällen kommt es zur invasiven Infektion, bei der die Trophozoiten die Darmwand penetrieren. Folgen sind blutige Diarrhoe, Fieber und eitrige Kolitis. Der Parasit kann in unter 1 % der Fälle extraintestinale Infektionen hervorrufen, indem er über die Blutbahn in Organe wie Gehirn, Lunge und Leber gelangt (Wuerz *et al.* 2012).

1.5.3 Krankheitsbild, Diagnose und Therapie

80-99 % der *E. histolytica* Infektionen verlaufen nicht-invasiv und asymptomatisch. Der Parasit kann jedoch die Darmwand penetrieren und eine starke Schädigung des Gewebes hervorrufen – die Amöbenruhr. Folgen sind blutige Diarrhoe, Fieber und eitrige Kolitis. In unter 1 % der Fälle können die Trophozoiten in die Blutbahn gelangen und andere Organe wie Gehirn, Lunge und Leber befallen (Abb. 3). Der Amöbenleberabszess (ALA) ist hierbei die häufigste Form der extraintestinalen

Infektion. Die Abszesse sind von Fieber, Gewichtsverlust und Schmerzen im rechten Oberbauch begleitet (Guerrant 1986; Despommier *et al.* 2017). Trotz höherer Infektionszahlen in Frauen bilden Männer häufiger einen Amöbenleberabszess aus. Das Risiko steigt mit der Pubertät und ist im Alter zwischen 30 und 50 Jahren am höchsten (Blessmann *et al.* 2002).

Lange Zeit war die Diagnose durch mikroskopische Analysen von Stuhlproben geprägt, bei der jedoch *E. histolytica* nicht von der apathogenen Art *E. dispar* unterschieden werden konnte. ELISAs (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) und PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) stellen heute die neuen Standards in der Diagnostik dar. Während mittels ELISAs, die *E. histolytica* Antigene in Stuhlproben nachgewiesen werden, lassen sich mit PCR Analysen *E. histolytica* spezifische Gene in Stuhlproben identifizieren. Der Amöbenleberabszess kann neben den entsprechenden Symptomen und einer positiven *E. histolytica* Stuhlprobe durch Ultraschall oder Computertomografie diagnostiziert werden (Stanley 2003). Unbehandelt kann der Amöbenleberabszess zum Tod führen. Durch sehr gute Behandlungsmöglichkeiten liegt die Sterberate jedoch bei nur 1-3 % (Stanley 2003). Bei allen invasiven Formen der Amöbiasis wird das Antibiotikum Metronidazol verabreicht, welches die Trophozoiten im Gewebe tötet. Es folgt eine zusätzliche Therapie mit Paromomycin, um die Parasiten im Darmlumen zu eliminieren. Patienten mit einer intestinalen, asymptomatischen Infektion werden ebenfalls mit Paromomycin behandelt (Stanley 2003; Despommier *et al.* 2017).

1.5.4 Pathogenitätsfaktoren

Namensgebend für *E. histolytica* ist die Fähigkeit Gewebe zu lysieren und Zellverbände aufzulösen. Dieser Fähigkeit liegen verschiedene Pathogenitätsfaktoren des Parasiten zugrunde. Mittels einem Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifischen Lektins können die Trophozoiten an das Darmepithel adhären (Guo *et al.* 2007). Diesem Lektin ist eine besonders hohe Zytotoxizität zuzuschreiben, da Säugetierzellen ohne N-Acetyl-Galaktose oder N-Acetyl-Galaktosaminen resistent gegenüber der Adhärenz und Tötung durch *E. histolytica* Trophozoiten sind (Stanley 2003). Durch die Sezernierung porenbildender Peptide – den *Amoebapores* – ist *E. histolytica* weiterhin in der Lage, die Wirtszellmembran zu lysieren. Ebenso kann *E. histolytica* die Apoptose von Wirtszellen induzieren. Schließlich ermöglichen Cysteinpeptidasen des Parasiten eine Degradierung der extrazellulären Matrix und somit Lyse des Gewebes (Stanley 2003; Guo *et al.* 2007).

1.5.5 Amöbenleberabszess im Mausmodell

Neben den *E. histolytica* spezifischen Pathogenitätsfaktoren sind immunregulatorische Mechanismen des Wirts ausschlaggebend für den Verlauf der Infektion. Das Mausmodell für die hepatische *E. histolytica* Infektion ermöglicht eine Erforschung der immunologischen Mechanismen der Entwicklung und Regeneration des Amöbenleberabszesses. Mäuse weisen den gleichen Geschlechtsdimorphismus auf, der auch bei Menschen beobachtet wird: männliche Mäuse bilden große Abszesse, während weibliche Mäuse nur kleine Läsionen aufweisen. Im Gegensatz zum Menschen können Mäuse die Infektion regulieren und den Abszess vollständig ausheilen (Lotter *et al.* 2006).

1.5.5.1 Immunpathologie im ALA

Die murine *E. histolytica* Infektion ist mit einem starken Einstrom von Monozyten und neutrophilen Granulozyten assoziiert (Lotter 2005). Die simultane Depletion beider Zellpopulation mit einem α GR-1 Antikörper führte – im Gegensatz zu der ausschließlichen Depletion von neutrophilen Granulozyten mit einem α Ly6G Antikörper – zu signifikant kleineren Abszessen nach *E. histolytica* Infektion (Helk *et al.* 2013).

Nach Eindringen der *E. histolytica* Trophozoiten in die Leber produzieren Kupffer-Zellen pro-inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-23 und IL-17 und induzieren die Synthese des Chemokins CCL2 (Abb. 4) (Schumann *et al.* 2000; Shahrara *et al.* 2010; Noll *et al.* 2016). Zusätzlich können Hepatozyten in Entzündungsreaktionen CCL2 sezernieren (Eggert *et al.* 2016; Ziraldo *et al.* 2013). Inflammatorische Ly6C^{hi} Monozyten, die den CCR2 Rezeptor exprimieren, migrieren aufgrund des CCL2 Signals aus dem Knochenmark und gelangen über die Blutbahn in das infizierte Lebergewebe (Serbina und Pamer 2006; Marra und Tacke 2014). Durch das pro-inflammatorische Milieu differenzieren infiltrierende Ly6C^{hi} Monozyten im Gewebe zu M1 Makrophagen. M1 Makrophagen sezernieren wiederum entzündungsfördernde Moleküle wie IL-6, TNF, IL-1 β , iNOS (*inducible Nitric Oxidase Synthase*) und ROS (Kolios *et al.* 2006; Guo *et al.* 2007). Auf diese Weise wird einerseits die Amöbe abgetötet, andererseits das Gewebe des Wirts stark geschädigt, was schließlich eine Manifestierung des Amöbenleberabszesses bewirkt. TNF trägt eine entscheidende Rolle in der Gewebeschädigung während der *E. histolytica* Infektion. So produzieren Ly6C^{hi} Monozyten hohe Mengen an TNF und Mäuse, die mit einem neutralisierenden TNF Antikörper behandelt wurden, entwickeln nur kleine Abszesse (Helk *et al.* 2013). Die Depletion von Kupffer-Zellen mittels Clodronat führte ebenfalls zu signifikant kleineren Abszessen und verdeutlichte den Einfluss von Kupffer-Zellen in der Immunpathologie im ALA. Die Rolle von Ly6C^{hi} Monozyten und IL-17 in der Immunpathologie wurde zudem durch eine reduzierte Abszessentwicklung in CCR2^{-/-} Mäusen, bei denen der Austritt von Monozyten aus dem Knochenmark gestört ist (Helk *et al.* 2013), und IL-17A^{-/-} Mäusen bestätigt (Noll *et al.* 2016).

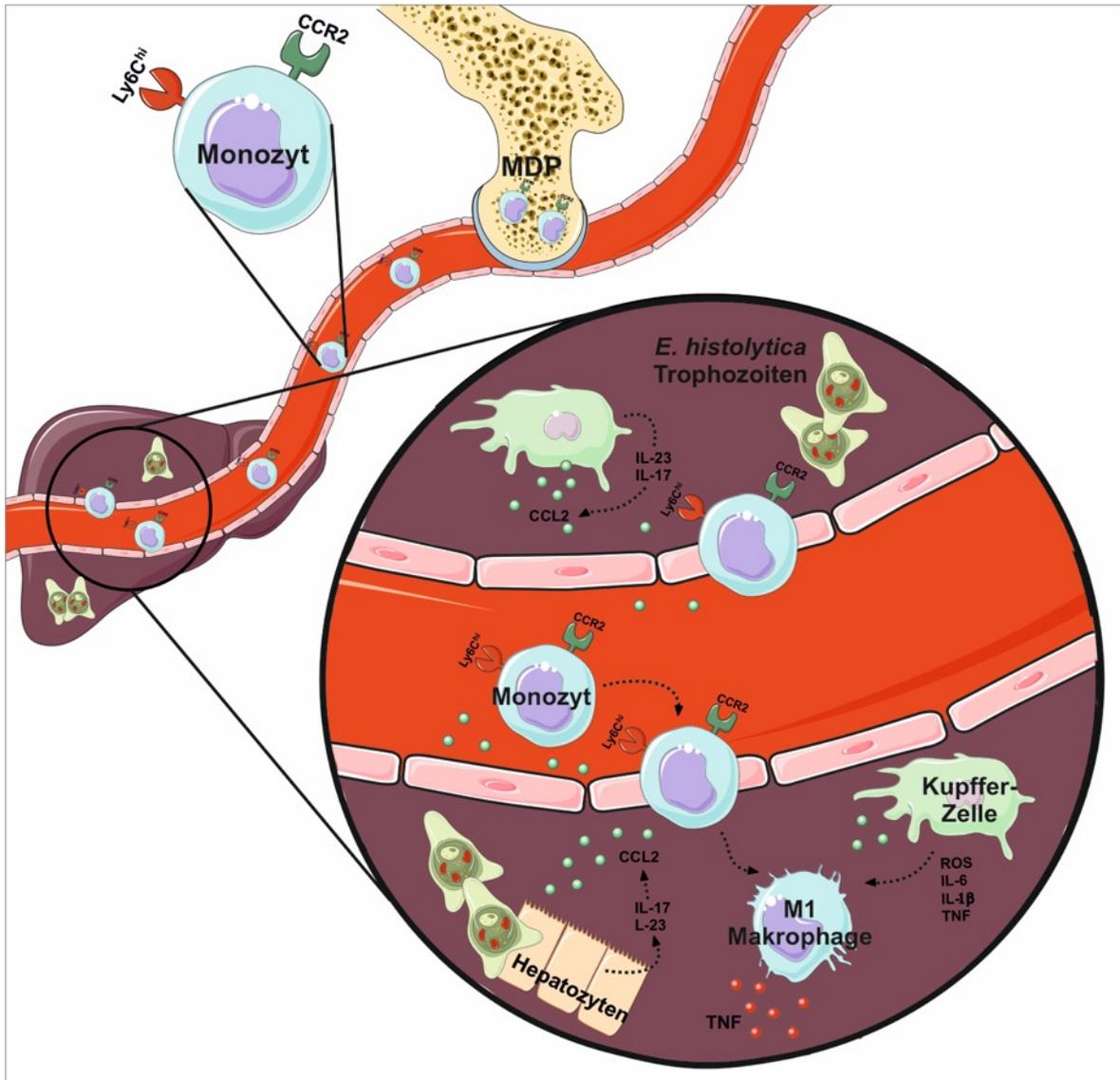


Abbildung 4: Immunpathologie in der *E. histolytica* Infektion. Als Antwort auf eindringende *E. histolytica* Trophozoiten produzieren Kupfer-Zellen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-23 und IL-17 und induzieren die Synthese von CCL2 in Kupfer-Zellen und Hepatozyten. Nach CCR2-CCL2-vermittelterm Austritt der Ly6C^{hi} Monozyten aus dem Knochenmark gelangen die Monozyten über die Blutbahn in die Leber. Aufgrund des inflammatorischen Milieus differenzieren sie zu M1 Makrophagen und produzieren pro-inflammatorische Zytokine wie TNF. Durch diese Zytokine wird einerseits die Amöbe abgetötet, andererseits sind sie die Ursache für die starke Gewebeschädigung und Manifestierung des Amöbenleberabszesse (Grafik erstellt mit SMART von Servier®).

1.5.5.2 Regeneration im ALA

Ly6C^{lo} Monozyten werden mittels Chemotaxis durch Bindung von CCL3, CCL4, CCL5 oder CCL8 an ihren CCR5 Rezeptor rekrutiert, patrouillieren entlang der Blutgefäßepithelien und dringen bei einer Infektion in das beschädigte Gewebe ein. Dort können sie unter Einfluss anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-13 zu alternativ aktivierten M2 Makrophagen differenzieren. Diese tragen insbesondere durch Expression von Arginase 1 zur Geweberegeneration im ALA bei (Tacke *et al.* 2007; Geissmann *et al.* 2010; Noll *et al.* 2016).

1.5.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der *E. histolytica* Infektion

Obwohl Frauen sich öfter mit *E. histolytica* infizieren und eine höhere Parasitenlast aufweisen, bilden Männer viermal häufiger einen Amöbenleberabszess aus. Das Risiko steigt mit Eintritt in die Pubertät und erreicht einen Höhepunkt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr. In diesem Alter liegt das Geschlechterverhältnis sogar bei 7:1 (Blessmann *et al.* 2002). In Männern, die sich asymptomatisch mit *E. histolytica* infiziert haben, sind im Vergleich zu Frauen höhere zirkulierende CCL2 Konzentrationen messbar (Bernin *et al.* 2014). Männer könnten demnach eine höhere Prädisposition für CCL2-vermittelte Immunpathologie haben.

Die murine *E. histolytica* Infektion zeigt die gleiche geschlechtsspezifische Abszessausbildung. Männliche Mäuse entwickeln deutlich größere Abszesse als weibliche Mäuse. Weibliche Mäuse sind außerdem in der Lage, den Abszess schneller auszuheilen (Lotter *et al.* 2006). Lotter *et al.* belegten, dass Testosteron entscheidend zur Abszessentstehung beiträgt. Kastrierte männliche Mäuse entwickelten kleinere Abszesse, während Testosteron-behandelte Mäuse größere Abszesse aufwiesen. Ovariectomie weiblicher Mäuse sowie die Behandlung mit Estradiol zeigten im Gegensatz keinen Einfluss auf die Abszessentwicklung (Lotter *et al.* 2013). CCL2 und TNF, die beide essentiell für die Immunpathologie im ALA sind, waren außerdem höher konzentriert in den Seren *E. histolytica*-infizierter männlicher Mäuse als in weiblichen Mäusen (Sellau *et al.* 2020).

Für die Resistenz in weiblichen Mäusen sind $\text{IFN}\gamma$ und NKT-Zellen (Natürliche Killer-T-Zellen) von essentieller Rolle. In der *E. histolytica* Infektion sind sowohl höhere $\text{IFN}\gamma$ Konzentrationen im Serum als auch höhere Anteile hepatischer NKT-Zellen in der weiblichen Maus messbar (Lotter *et al.* 2013; Lotter *et al.* 2006). Anti- $\text{IFN}\gamma$ -behandelte Mäuse und $\text{CD1d}^{-/-}$ Mäuse – in denen eine Aktivierung von NKT-Zellen nicht möglich ist – können die Abszessentwicklung schlechter kontrollieren (Lotter *et al.* 2009; Lotter *et al.* 2006). Die Behandlung mit dem NKT-Aktivator α Galactosylceramid hingegen resultierte in kleineren Abszessen (Lotter *et al.* 2009).

1.6 Zielsetzung

Die Infektion mit dem protozoischen Parasiten *E. histolytica* führt zu schwereren Krankheitsverläufen in männlichen Individuen (Blessmann *et al.* 2002; Lotter *et al.* 2006). Der Amöbenleberabszess stellt die häufigste Form der extraintestinalen Amöbiasis dar und liegt einer Immunpathologie zugrunde. Es konnte bereits demonstriert werden, dass inflammatorische Monozyten, Kupffer-Zellen, die IL-23/IL-17-Immunchse und das Zytokin TNF entscheidend zur Manifestierung des ALAs beitragen (Helk *et al.* 2013; Noll *et al.* 2016). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das Geschlechtshormon Testosteron entscheidend für die Abszessentstehung ist (Lotter *et al.* 2013). Die geschlechtsspezifischen Unterschiede der der Immunpathologie zugrunde liegenden Mechanismen wurden bisher jedoch nicht hinreichend aufgeklärt.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, geschlechtsspezifische Unterschiede in der angeborenen und adaptiven Immunantwort während der *E. histolytica* Infektion aufzudecken. Unter Zuhilfenahme des Mausmodells für den Amöbenleberabszess sollen die neutrophilen Granulozyten und Monozyten unter der *E. histolytica* Infektion geschlechtsspezifisch charakterisiert werden. Zudem

soll untersucht werden, inwieweit Androgene das pro-inflammatorische Potential der murinen Ly6C^{hi} Monozyten *in vivo* und humanen Monozyten *in vitro* beeinflussen können.

HIF-1 α ist Teil eines Transkriptionsfaktors, der in vielen Lebererkrankungen induziert wird. HIF-1 α kann viele immunregulatorische Prozesse modulieren, wie die Differenzierung der Th17 und regulatorischen T-Zellen. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wird die geschlechtsspezifische Rolle von HIF-1 α in der *E. histolytica* Infektion ermittelt. Zur Beantwortung der Frage wurden Mäuse mit einem Hepatozyten-spezifischen *Knockout* von HIF-1 α generiert, in denen die Abszessentwicklung untersucht wird. Zudem wird analysiert, inwieweit HIF-1 α das Zytokinmilieu und die T-Zelldifferenzierung während der *E. histolytica* Infektion in männlichen und weiblichen Mäusen beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborequipment

Tabelle 1: Auflistung des verwendeten Laborequipments

| Gerät | Modell | Hersteller |
|--------------------------------------|------------------------|---------------------|
| Biologische Sicherheits- werkbank | LaminAir® HB2448 | Heraeus instruments |
| CO ₂ Inkubator | MicroFlowM51426/5 | Astec |
| Durchflusszytometer | HERA cell 150i | Thermo Scientific |
| | LSR™ II | BD Biosciences |
| | LSR Fortessa™ | BD Biosciences |
| | Accuri C6 | BD Biosciences |
| ELISA Reader | MRXII | Dynex Technologies |
| Feinwaage | Kern410 | Kern & Sohn GmbH |
| Fluoreszenzmikroskop | BZ-9000 | Keyence |
| Gel-Dokumentationssystem | Gel Doc XR+ | Bio-Rad |
| Inkubator | D-6450 | Heraeus instruments |
| Kochfeld | Schott Ceran® Top Line | Rommelsbacher |
| Kühlschrank (4°C) | FKU 1800 | Liebherr |
| Labornetzgerät | EV2310 | Consort |
| Lichtmikroskop | Eclipse TS100 | Nikon |
| Magnetrührer | RCT basic | IKA |
| Mikrowelle | MW749 | CLAtronic® |
| Minizentrifuge | Rotilabo® | Roth |
| Mr. Frosty™ Gefrierbehälter | | Thermo Scientific |
| Nanodrop | Nanodrop 2000 | Thermo Scientific |
| Neubauer Zählkammer | Neubauer-Improved | Marienfeld Superior |
| pH-Meter | Lab 850 | SI Analytics |
| Pipetten | Pipet-Lite XLS | Rainin |
| Pipettierhilfe | Cell Mate II | Matrix |
| Schnellkochtopf | | |
| Immunhistologie | Sicomatic®-T | Silit |
| TY-Medium | Vitavit® comfort | Fissler |
| Schüttler | VXR basic Vibrax® | IKA |
| Thermocycler | peqstar | peqlab |
| ThermoMixer | Compact | Eppendorf |
| Tiefkühlschränke | | |
| -20°C | öko super | Liebherr |
| | RFX 51400 WA | Zanussi |

| | | |
|------------------|----------------|------------------|
| -80°C | C660 Premium | New Brunswick |
| Tischzentrifuge | 5424R | Eppendorf |
| Ultraschallbad | Sonorex super | Bandelin |
| Vortex-Schüttler | VF2 | IKA |
| Waage | Kern PCB | Kern & Sohn GmbH |
| Wasserbad | 1002 | GFL |
| Zentrifuge | 5810R | Eppendorf |
| | Varifuge 3.0 R | Heraeus sepatech |

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials

| Material | Hersteller |
|---|-------------------|
| 1mL EDTA-Probenröhrchen | KABE Labortechnik |
| 96-Well Mikrotiterplatte, U-Form (high binding) | Greiner |
| 96-Well Mikrotiterplatte, Polypropylen, V-Form | Sigma-Aldrich |
| 96-Well Mikrotiterplatte MaxiSorp® Flach-Form | Nunc |
| ALZET osmotische Pumpe, Model 2004 | Alzet |
| Autoclip® 9 mm | BD Biosciences |
| CellTrics, 30 µm | Sysmex |
| Einmalspritze | Braun |
| FACS-Röhrchen | Sarstedt |
| Falcons (15 mL, 50 mL) | Sarstedt |
| LightCycler®96 Mikrotiterplatte 96-Well, weiß | Roche |
| MACS® Separation Column LS | Miltenyi Biotec |
| MidiMACS™ Separator | Miltenyi Biotec |
| Reaktionsgefäß 0,5 mL Safe-Lock | Eppendorf |
| Reaktionsgefäß 1,5 mL | Sarstedt |
| Reaktionsgefäß 1,5 mL Safe-Lock | Eppendorf |
| S-Monovette® 9 mL AH | Sarstedt |
| S-Monovette® 1.2 mL LH | Sarstedt |
| TC Flasche (T 25, T 75), Standard | Sarstedt |
| Zellsieb, 70 µm | Sarstedt |

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|----------------------------------|---------------|
| (2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin | Sigma-Aldrich |
| Antisedan® | Orion Pharma |
| Cepetor® | CP-Pharma |

| | |
|------------------------------------|--------------------------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth |
| Ethidiumbromidlösung (0,025 %) | Roth |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Capricorn Scientific |
| Isofluran Forene® 100% (v/v) | Abbott GmbH & Co. KG |
| Istotone Kochsalzlösung, 0,9% | Braun |
| Ketamin Inresa | Inresa Arzneimittel GmbH |
| L-Glutamin | Merck |
| Penicillin-Streptomycin | Gibco |
| RNAse freies Wasser | Qiagen |
| RPMI 1640 (w/o L-Glutamin + Hepes) | Gibco |
| Testosteron | Sigma-Aldrich |
| Trypanblau 0,4% | Gibco |
| Tween® 20 | Roth |
| UltraPure™ Agarose | Invitrogen |

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

2.1.4 Kits und Reagenzien

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits und Reagenzien

| Kit / Reagenz | Hersteller |
|---|-------------------|
| Antibody Diluent | Dako |
| Biocoll® | Biochrom |
| CompBeads AntiRat, AntiHamster | BD Biosciences |
| DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium, steril | PAN Biotech |
| eBioscience™ Foxp3/Transriptionsfaktor Färbepufferset | Invitrogen |
| Eukitt® | Sigma-Aldrich |
| Fc-Block | BNITM |
| GeneRuler™ 100 bp DNA-Leiter | Thermo Scientific |
| Humaner CXCL1/GROalpha ELISA | R&D |
| Humaner MCP-1/CCL2 ELISA | BioLegend |
| LEGENDplex™, human Spezialanfertigung (5-plex: CXCL1, CXCL10, IL-1β, IL-1RA, TNF) | BioLegend |
| LEGENDplex™ murin Spezialanfertigung (3-plex: TNF, CCL2, CXCL1) | BioLegend |
| Maxima™ Erststrang-cDNA-Synthesekit für RT-qPCR | Thermo Scientific |
| Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix | Thermo Scientific |
| Pan Monocyte Isolation Kit, human | Miltenyi Biotec |
| Percoll® | GE Healthcare |
| Red HS Taq Mastermix | Biozym |
| TRIzol® Reagenz | Invitrogen |

| | |
|--------------------------------------|------------|
| UltraComp eBeads™ Compensation Beads | Invitrogen |
| Zombie UV™ Fixable Viability Kit | BioLegend |
| ZytoMed-Chem-Plus-HRP Polymer Kit | ZytoMed |

2.1.5 Puffer und Medien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien und deren Zusammensetzung

| Puffer / Medium | Zusammensetzung |
|-------------------------|--|
| Citratpuffer | 4,2 g Zitronensäure-Monohydrat 2 L dH ₂ O; pH 6 |
| cRPMI-Medium | 500 mL RPMI 1640 ohne Hepes 5 mL L-Glutamin 5 mL Penicillin/Streptomycin 50 mL FCS |
| ELISA Coating Buffer | 8,4 g NaHCO ₃ 3,56 g Na ₂ CO ₃ 1 L dH ₂ O; pH 9,5 |
| Erythrozyten-Lysepuffer | 90 % 0,16 M NH ₄ Cl 10 % 0,1 M Tris; pH 7,6 |
| FACS-Puffer | 100 mL PBS 1 µL FCS |
| Lysepuffer | 2 % SDS einer 10% Lösung (bei 65 °C abgekocht) 10 % 1M Tris 20 % 1M NaCl |
| MACS Puffer | 200 mL DPBS 1 g BSA (0,5 %) 800 µL 0,5 EDTA |
| PBS (20x) | 8 g KCl 8 g KH ₂ PO ₄ 46 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 320 g NaCl 2 L dH ₂ O |
| TAE Puffer (50x) | 68 g NaAc x 3 H ₂ O 484 g Tris 74,5 g Na ₂ -EDTA 2 L dH ₂ O; pH 7,9 |
| TY-Medium | 100 g Trypticase |

50 g Hefeextrakt
 50 g Glucose
 10 g NaCl
 3,8 g K₂HPO₄
 3 g KH₂PO₄
 5 g L-Cystein
 1 g Ascorbinsäure
 114 mg Fe-Ammoniumcitrat
 4,3 L dH₂O; pH 6,8

2.1.6 Stimulantien für *in vitro* Versuche

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Stimulantien für *in vitro* Versuche

| Stimulanz | Verwendete Konzentration | Hersteller |
|-----------------------------|--------------------------|---------------|
| Brefeldin A | 50 µg/mL | Sigma-Aldrich |
| Dihydrotestosteron (DHT) | 1 nM, 10 nM, 100 nM | Sigma-Aldrich |
| <i>E. histolytica</i> Lysat | | BNITM |
| murin | 1 mg/mL | |
| human | 0,1 mg/mL | |
| Ionomycin | 500 ng/mL | Sigma-Aldrich |
| LPS | | Sigma-Aldrich |
| murin | 5 µg/mL | |
| human | 0,1 µg/mL | |
| PMA | 50 ng/mL | Sigma-Aldrich |

2.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Antikörper

| Name | Klon | Fluorochrom | Hersteller | Verdünnung |
|-----------------------------|-----------|-------------|----------------|------------|
| Durchflusszytometrie | | | | |
| anti-mouse β-TCR | HS7-597 | FITC | BD Biosciences | 1:400 |
| anti-mouse CCL2 | 2H5 | PE | BioLegend | 1:50 |
| anti-mouse CCR2 | 475301 | AF700 | R&D | 1:200 |
| anti-mouse CCR2 | SA203G11 | PE-Cy7 | BioLegend | 1:200 |
| anti-mouse CD4 | RM4-5 | APC | BioLegend | 1:200 |
| anti-mouse CD4 | RM4-5 | BV510 | BioLegend | 1:500 |
| anti-mouse CD11b | M1/70 | BV510 | BioLegend | 1:400 |
| anti-mouse CD45 | 30-F11 | BV421 | BioLegend | 1:300 |
| anti-mouse CXCL1 | 1174A | APC | R&D | 1:50 |
| anti-mouse Foxp3 | FJK-16s | APC | Invitrogen | 1:100 |
| anti-mouse IL-10 | JES5-16E3 | PerCP-Cy5.5 | BioLegend | 1:100 |

| | | | | |
|---------------------------|--------------|--------------|----------------|-------|
| anti-mouse IL-17 | TC11-18H10.1 | AF700 | BioLegend | 1:50 |
| anti-mouse Ly6C | HK1.4 | FITC | BioLegend | 1:300 |
| anti-mouse Ly6C | HK1.4 | PE | BioLegend | 1:900 |
| anti-mouse Ly6C | HK1-4 | Per-CP-Cy5.5 | BioLegend | 1:300 |
| anti-mouse Ly6G | 1A8 | APC-Cy7 | BioLegend | 1:500 |
| anti-mouse Ly6G | 1A8 | AF700 | BioLegend | 1:400 |
| anti-mouse Ly6G | 1A8 | BV785 | BioLegend | 1:800 |
| anti-mouse ROR γ t | AFKJS-9 | PE | eBiosciences | 1:50 |
| anti-mouse TNF α | MP6-XT22 | BV421 | BioLegend | 1:200 |
| anti-human CD14 | M2E2 | AF-700 | BioLegend | 1:20 |
| anti-human CD16 | 3G8 | PerCP | BioLegend | 1:20 |
| anti-human HLA-DR | G46-6 | BUV395 | BD Biosciences | 1:20 |
| Immundepletion | | | | |
| anti-rlgG2A | 54447 | | R&D Systems | |
| anti-mCXCL1 | 48415 | | R&D Systems | |
| Immunhistochemie | | | | |
| anti-mouse HIF-1 α | orb161305 | | Biorbyt | 1:300 |

2.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

| Name | Sequenz (5'→3') | Produktgröße |
|---------------------------------|---|--------------|
| Genotypisierung | | |
| AlbCre | GAAGCAGAAGCTTAGGAAGATGG | |
| Mutante: | TGCAAACATCACATGCAC | |
| Wildtyp: | TTGGCCCCTTACCATAACTG | |
| HIF-1 α ^{fllox} | TGCATGTGTATGGGTGTTTTG GAAAAGTGTCTGTAAGTT | |
| qPCR | | |
| CXCL1 | ACTCAAGAATGGTCGCGAGG ACTTGGGGACACCTTTTAGCA | 89 bp |
| Foxp3 | GGTATTGAGGGTGGGTGTCA AGCTGCTGAGATGTGACTGT | 126 bp |
| GAPDH | ACCCTTAAGAGGGATGCTGC GGGACGAGGAAACACTCTCC | 82 bp |
| HIF-1 α | TCAGCATACAGTGGCACTCA AAGGGAGCCATCATGTTCCA | 213 bp |
| IL-2 | ATGAACTTGGACCTCTGCGG ATGTGTTGTCAGAGCCCTTT | 129 bp |
| IL-6 | TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC | 76 bp |

| | | |
|--------------|---|--------|
| IL-21 | TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC CCACAAGATGTAAAGGGGCA | 301 bp |
| IL-23 | GAGGTACCCGGACACAACAT ACCAGCGGGACATATGAATCT | 147 bp |
| ROR γ | AGACCTTGGCGGATCCTTTG AGAAGACCCACACCTCA | 93 bp |
| RPS9 | CCTCACAGGTGATAACC CCGCCTTGTCTCTTTGTC | 257 bp |
| TGF- β | CCGGAGTCCATACTCTCCAA TGGAGCAACATGTGGAACTC | 108 bp |
| | CGTCAAAAGACAGCCACTCA | |

Für alle Primer der Genotypisierung wurde eine *Annealing*-Temperatur von 63 °C verwendet, für die qPCR 58 °C.

2.1.9 Mauslinien

Alle Mausexperimente wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg genehmigt (Genehmigungsnummer 51/17 und N040/2020).

Tabelle 9: Auflistung der verwendete Mauslinien

| Stamm | Herkunft |
|---|---|
| C57BL/6J | BNITM Hauszucht |
| <i>AlbCre</i> | Medizinische Klinik und Poliklinik UKE, Dorothee Schwinge |
| <i>HIF-1α^{fllox}</i> | Jackson Laboratory |
| <i>Hep-HIF-1α^{-/-} (AlbCre x HIF-1α^{fllox})</i> | BNITM Hauszucht |

2.1.10 Software und Datenbanken

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Software und Datenbanken

| Software oder Datenbank | Hersteller oder Internetseite |
|--------------------------|-------------------------------|
| FACSDiva™ | BD Biosciences |
| FlowJo™ Version 10 | BD Biosciences |
| LEGENDplex™ Version 8.0 | BioLegend |
| LightCycler® 96 | Roche |
| Nanodrop™ 2000 | Thermo Scientific |
| Mac Office Version 16.39 | Microsoft |
| Prism 8.3 | GraphPad |
| Smart Servier | smart.servier.com |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus murinem Ohrgefuge

Für die Genotypisierung der *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse wurde die genomische DNA aus einer Ohrstanzte extrahiert. Die Ohrstanzte wurde für 30 min in 50 μ L Lysepuffer + 0,25 μ L Proteinase K (20 mg/mL) bei 75 $^{\circ}$ C im Heizblock inkubiert. Nach weiteren 20 min bei 95 $^{\circ}$ C wurde die Lösung mit 400 μ L Tris (10mM, pH 7,5) versetzt. Die isolierte genomische DNA wurde bei -20 $^{\circ}$ C aufbewahrt.

2.2.2 RNA Isolierung aus murinem Lebergewebe

Um die RNA aus murinem Lebergewebe zu isolieren, wurde der große Leberlappen entnommen und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Ca. 150 mg gefrorenes Lebergewebe wurde mit einem Stößel in 500 μ L TRIzol[®] homogenisiert. 100 μ L Chloroform wurde hinzugefügt und das Reaktionsgefäß kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur (RT) wurden die Proben bei 12.000 x g, 4 $^{\circ}$ C für 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Mischen mit 500 μ L Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei RT präzipitiert und bei 12.000 x g, 4 $^{\circ}$ C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 μ L 75 % Ethanol resuspendiert und bei 12.000 x g, 4 $^{\circ}$ C für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde das Pellet für 1 h bei 37 $^{\circ}$ C auf einem Heizblock an der Luft getrocknet. Schließlich wurde die RNA in 200 μ L Nuklease-freiem Wasser gelöst und die Konzentration am Nanodrop[®] 2000 bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 $^{\circ}$ C.

2.2.3 cDNA Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann einzelsträngige RNA in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Um aus der isolierten RNA cDNA zu synthetisieren, wurde das Maxima[™] Erststrang-cDNA-Synthesekit für RT-qPCR von Thermo Scientific nach Herstellerangaben angewendet. Es wurde jeweils 1 μ g RNA in cDNA umgeschrieben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT, erfolgte die Amplifikation bei 50 $^{\circ}$ C im Heizblock für 30 min, gefolgt von der Enzyminaktivierung für 5 min bei 85 $^{\circ}$ C. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 $^{\circ}$ C aufbewahrt.

2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ermöglicht die Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes und wurde für die Genotypisierung der *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse verwendet. Für die durchgeführten PCRs wurde der *Red HS Taq* Mastermix (Biozym) verwendet, der neben einer hitzebeständigen DNA-Polymerase, Desoxynukleotide (dNTPs) und den geeigneten Puffer enthält. Die zuvor isolierte genomische DNA wird im ersten Schritt der PCR denaturiert. Bei der folgenden Primerhybridisierung binden die Primer an ihre komplementäre Sequenz in der Ausgangs-DNA. Die Primer für die Amplifikation *AlbCre* und *HIF-1 α ^{fllox}*-spezifischer DNA-Abschnitte sind in Tab. 8 aufgelistet. Die DNA-Polymerase erkennt das freie 3'OH Ende der Primer und synthetisiert eine neuen Strang entlang der komplementären Ausgangs-DNA. Durch mehrere Zykluswiederholungen wird die DNA exponentiell vervielfältigt.

Pro Probe wurde 10 μL des *Red HS Taq* Mastermixes (Biozym), je 0,8 μL Primer, 6,4 μL bzw. 5,8 μL H_2O und 2 μL DNA eingesetzt. Die PCR wurde in 0,5 mL Safe-Lock Reaktionsgefäßen im Thermocycler (peqlab) mit dem Programm in Tabelle 11 durchgeführt.

Tabelle 11: PCR Programm für die *AlbCre* und *HIF-1 α^{flox}* Genotypisierung

| Phase | Temperatur | Dauer | |
|----------------------|------------|-------|-----------|
| Denaturierung | 94 °C | 5 min | 35 Zyklen |
| Denaturierung | 94 °C | 30 s | |
| Primerhybridisierung | 63 °C | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 30 s | |
| Finale Elongation | 72 °C | 5 min | |

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe des amplifizierten PCR Produkts konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden. 2 % Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Unmittelbar vor dem Gießen des Gels wurde die Lösung mit einem Tropfen 0,025 %iger Ethidiumbromidlösung pro 50 mL Agarose versetzt. Das Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1 x TAE Laufpuffer aufgefüllt. Der verwendete PCR *Red HS Taq* Mastermix enthält einen roten Gelbeladepuffer und ermöglicht ein direktes Auftragen des PCR Produktes (10 μL) in das Gel. Zur Größenbestimmung wurde zusätzlich eine 100 Basenpaar (bp) DNA-Leiter aufgetragen. Die Apparatur wurde an ein Labornetzgerät angeschlossen und der Gellauf bei 120 V für ca. 40 min durchgeführt. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld zur positiven Anode. Die netzähnliche Struktur des Agarosegels ermöglicht kleineren DNA-Abschnitten höhere Fließgeschwindigkeiten als längeren Abschnitten. Die Wanderstrecke korreliert daher mit der DNA-Größe. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und ermöglicht eine Visualisierung der DNA Banden mittels UV-Licht (254 nm).

Tabelle 12 zeigt die zu erwartenden Größen der *AlbCre* und *HIF-1 α^{flox}* Amplifikate.

Tabelle 12: Größe der *AlbCre* und *HIF-1 α^{flox}* Amplifikate

| | <i>HIF-1α^{flox}</i> | <i>AlbCre</i> |
|-------------|---|---------------|
| Wildtyp | 99 bp | 351 bp |
| Heterozygot | 99 bp + 120 bp | |
| Mutante | 120 bp | 390 bp |

2.2.6 Quantitative *Real-Time* PCR (qPCR)

Bei der quantitativen *Real-Time*-PCR (qPCR) wird die Zunahme an amplifizierter DNA in Echtzeit gemessen. Für alle qPCRs wurde der Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix von Thermo Scientific mit einer Primer-Endkonzentration von 0,3 μM und 50 ng cDNA verwendet. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Eine Zunahme des Fluoreszenzsignals ist daher proportional zur Menge an amplifizierter DNA. Als Referenzgenen wurden die in der Maus konstitutiv exprimierte Haushaltsgene *GAPDH* oder *RPS9* verwendet. Die

Amplifikation und Messung eines 10 μL Reaktionsansatzes erfolgte in einer 96-Well-Mikrotiterplatte im Lightcycler[®] 96 von Roche. Dabei wurde das in Tabelle 13 dargestellte Programm durchlaufen.

Tabelle 13: Verwendetes qPCR Programm

| Phase | Temperatur | Dauer | |
|---|------------|-------|-----------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 300 s | |
| Amplifikation | | | |
| Denaturierung | 95 °C | 10 s | 50 Zyklen |
| Primerhybridisierung (<i>Annealing</i>) | 58 °C | 10 s | |
| Elongation | 72 °C | 10 s | |
| Schmelzkurvenanalyse | | | |
| | 95 °C | 10 s | |
| | 65 °C | 60 s | |
| | 97 °C | 1 s | |
| Abkühlung | 37 °C | 30 s | |

Die optimale *Annealing* Temperatur für die Primerhybridisierung wurde zuvor mit einer Gradienten-PCR überprüft und konnte für alle verwendeten Primer auf 58 °C eingestellt werden. Für die quantitative Analyse wurde der *Cycle of Threshold* (C_T) der verschiedenen Proben ermittelt. Der C_T -Wert gibt den Zyklus an, bei dem ausreichend Ausgangsmaterial vervielfältigt wurde, um ein messbares Fluoreszenzsignal zu erhalten. Um die relative Expression des *Gen Of Interests* (GOI) zu ermitteln wird der C_T -Wert zunächst mit dem C_T -Wert des Haushaltsgens *GAPDH* bzw. *RPS9* normalisiert. Hierfür wird die Differenz der beiden C_T -Werte (ΔC_T) errechnet: $C_{T\ GOI} = C_{T\ GOI} - C_{T\ Ref}$. Naive Leberproben wurden als Kalibrator (Kal) verwendet um den $\Delta\Delta C_T$ zu berechnen: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ GOI} - \Delta C_{T\ Kal}$. Daraus lässt sich die relative Genexpression = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ bestimmen (Livak und Schmittgen 2001).

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das in Zellkulturüberständen vorhandene CCL2 bzw. CXCL1 wurde mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) nachgewiesen. Der Sandwich ELISA ermöglicht die Detektion eines Antigens zwischen zwei Lagen von Antikörpern.

Es wurde der humane MCP-1/CCL2 MAX Deluxe Set ELISA von BioLegend und der humane CXCL1/GRO α DuoSet ELISA von R&D nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde der primäre Antikörper über Nacht auf eine 96-Well Mikrotiterplatte (Maxisorp von Nunc für CCL2; high binding von Greiner für CXCL1) gebunden. Ungebundene Stellen wurden mit 1 % BSA in PBS für 1 h blockiert. Die Proben (1:50 verdünnt für CCL2; unverdünnt für CXCL1) und die Standardreihe wurden für 2 h auf die Platte gegeben. Während dieses Inkubationsschrittes band in den Proben vorhandenes CCL2 bzw. CXCL1 an den immobilisierten Antikörper auf der Platte. Nach dreimaligem Waschen mit PBS + 0,05 % Tween folgte eine einstündige Inkubation mit einem biotinylierten sekundären Antikörper gerichtet gegen CCL2 bzw. CXCL1. Anschließend wurde die Platte erneut

gewaschen und der sekundäre Antikörper von *Avidin-Horseradish* Peroxidase (HRP) für 30 min gebunden. Nach gründlichem Waschen wurde eine Substratlösung hinzugegeben. Die enzymatische Reaktion der Peroxidase mit der Substratlösung führte zu einer Blaufärbung der Probe. Diese Reaktion wurde im Dunkeln durchgeführt und nach ca. 20 min mit H₂SO₄ abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag nach gelb erfolgte. Die optische Dichte, die mit der Menge gebundenen Analyts korreliert, wurde im ELISA *Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.3.2 LEGENDplex

Der *Bead*-basierte Immunoassay LEGENDplex von BioLegend ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Zytokine in einer Probe. Er beruht auf dem Prinzip des Sandwich ELISAs. Fluoreszierende *Beads*, die sich in Größe und Fluoreszenzstärke unterscheiden, sind an spezifische Antikörper gekoppelt, die ein Analyt erkennen. Es wurde ein humaner LEGENDplex mit den Zytokinen CXCL1, CXCL10, IL-1 β , IL-1RA und TNF sowie ein muriner LEGENDplex mit den Zytokinen TNF, CCL2 und CXCL1 nach Herstellerangaben in einem Volumen von 10 μ L durchgeführt. Serumproben wurden 1:2 in Assay Puffer verdünnt, während Zellkulturüberstände unverdünnt eingesetzt wurden. Proben und *Beads* wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die *Beads* wurden durch einen sekundären biotinylierten Antikörper gebunden, der wiederum von Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) gebunden wurde. Die Stärke des Fluoreszenzsignals in PE korreliert daher mit der Menge an gebundenem Analyt und konnte mittels Durchflusszytometrie gemessen werden.

2.3.3 Histologie und Immunhistologie

Mit Hilfe histologischer Untersuchungen lassen sich verschiedene Zelltypen in Gewebeschnitten mikroskopisch charakterisieren. Während in der Histologie der Nachweis mit Färbelösungen erfolgt, werden in der Immunhistologie spezifische Antikörper verwendet. Für sowohl Histologie als auch Immunhistologie wurde der infizierte Leberlappen für mindestens 24 h bei RT in 4 % Formaldehydlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung wurden die Proben in 0,2 μ m Schichtdicke geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Die Schnitte wurden mittels Xylois (2 x 5 min) und absteigender Alkoholreihe (2-3 min) deparaffiniert und rehydratisiert. Für die Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung, die zum Nachweis zellulärer Strukturen angewendet wird, folgte eine 10-minütige Färbung mit Hämalaun nach Meyer. Nach einer 10-minütigen Bläuung unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte für 5 min in Eosin gefärbt. Die H&E Färbung lässt Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rötlich erscheinen. Für den immunhistologischen Nachweis von HIF-1 α ⁺ Zellen wurden die Schnitte für 3 min in Citratpuffer im Schnellkochtopf gekocht. Diese Antigendemaskierung ist nötig, um Antikörperbindungen nach dem Fixierungsprozess in Formalin wieder zu ermöglichen. Um eine Hintergrundfärbung durch endogene Peroxidase auszuschließen, wurde der Schnitt für 10 min mit 3 % H₂O₂ geblockt. Unspezifische Bindungen des 2. Antikörpers wurden durch einen 5-minütigen Proteinblock verhindert. Der α HIF-1 α Primärantikörper (biorbyt, Klon orb161305) wurde 1:300 in *Antibody Diluent* (Dako) auf den Schnitt gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für 30 min. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde das Präparat 3 x für 3 min mit Spülpuffer gewaschen. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde den ersten

beiden Waschschritten jeweils 0,05 % Tween hinzugefügt. Für die Entwicklung unter mikroskopischer Beobachtung wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet, was in einer bräunlichen Färbung resultiert. Die Färbung wurde mittels dH₂O abgestoppt. Eine Kerngegenfärbung für 1 min erfolgte mit Hämalaun nach Meyer, gefolgt von einer Bläuung für 10 min unter Leitungswasser. Durch eine kurze aufsteigende Alkoholreihe sowie 3 x 5 min Xylol wurden die Schnitte dehydriert und anschließend mit Eukitt® eingedeckt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von *E. histolytica*

1967 konnten *E. histolytica* Trophozoiten aus einer Darmbiopsie eines mexikanischen Patienten mit Amöbenruhr isoliert werden. Aus diesem Kulturisolat – HM-1:MSS genannt – konnten zwei unterschiedliche Zelllinien generiert werden. Die Zelllinie B unterschied sich von der Zelllinie A in der Fähigkeit, im Mausmodell Amöbenleberabszesse zu induzieren (Biller *et al.* 2009). Aus diesen Zelllinien wurden Klone und Subklone hergestellt. In dieser Arbeit wurde für alle Experimente der hochpathogene Sub-Klon B2-5 verwendet (Meyer *et al.* 2016). *E. histolytica* Trophozoiten wurden in TYI-S-33 Medium unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C in T 25 Zellkulturflaschen kultiviert (Diamond *et al.* 1978). Alle 2-3 Tage wurden die Konfluenz der Zellen beurteilt, die Trophozoiten durch leichtes Schütteln abgelöst und eine angemessene Zellzahl (1-10%) in eine neue T 25 Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

2.4.2 Herstellung von *E. histolytica* Lysat

Zur Lysatherstellung wurden die *E. histolytica* Trophozoiten am Vortag in mehrere T 75 Zellkulturflaschen ausgesät, sodass sie am Folgetag einen einschichtigen Zellrasen bildeten. Das Medium wurde bis auf 10 mL abgegossen und die Trophozoiten in dem Restvolumen durch Schütteln gelöst. Die Zelllösung wurde in ein 50 mL-Röhrchen überführt und bei 300 x g, 4 °C für 5 min sedimentiert. Anschließend wurde zweimal in PBS gewaschen und die Lösung in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch viermaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration wurde am Nanodrop 2000 bestimmt. Das Lysat wurde auf mehrere Reaktionsgefäße aufgeteilt, erneut schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Isolierung von Leukozyten aus humanem Spenderblut

Um die mononukleären Zellen des peripheren Bluts (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) zu isolieren, wurde gesunden Probanden Blut in 9 mL Heparinröhrchen abgenommen. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (Genehmigungsnummer PV5252). Das Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und mit der Trennlösung Biocoll 2:1 überschichtet. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 450 x g, 21 °C ohne Bremse bildete sich ein Dichtegradient mit folgenden Phasen: gelbliche Plasmaphase, trübe Leukozyten- und Thrombozytenphase, klare Biocollphase und rote Erythrozytenphase (von oben nach unten). Der Leukozytenring wurde abgenommen und in einem neuen 50 mL-Röhrchen gesammelt. Das Pellet wurde zweimal mit PBS

bei 300 x g, 4 °C für 5 min gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.9).

2.4.4 Isolierung humaner CD14⁺ und CD16⁺ Monozyten aus PBMCs

Aus den PBMCs konnten mittels negativer Selektion über magnetische *Beads* – MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) – die CD14⁺ und CD16⁺ Monozyten isoliert werden.

Die Isolierung erfolgte mit dem Pan Monocyte Isolation Kit sowie dem MidiMACS™ Magneten mit LS Säulen (Miltenyi Biotec). Das Kit beinhaltet einen Mix aus Biotin-konjugierten Antikörpern und Anti-Biotin *Microbeads* und ermöglicht die Markierung von T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, DCs und Basophilen. Pro 1 x 10⁷ Zellen wurde das Pellet in 40 µL MACS Puffer, 10 µL *FcR Blocking Reagent* sowie 10 µL *Biotin-Antibody Cocktail* aufgenommen und 5 min bei 4 °C inkubiert. Es wurde 30 µL MACS Puffer und 20 µL Anti-Biotin *Microbeads* hinzugegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Säule wurde an den Magneten platziert und zunächst mit 3 mL MACS Puffer equilibriert. Anschließend wurden die Zellen auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Die negative, ungebundene Fraktion enthielt die Monozyten. Die Säule wurde dreimal mit 3 mL MACS Puffer gespült, die Zellen sedimentiert und gezählt (siehe Abschnitt 2.4.9).

2.4.5 Isolierung der PBMCs aus murinem Herzblut

Das mittels Herzpunktion gewonnene Blut wurde in EDTA Röhrchen aufgefangen, um eine Koagulation zu verhindern. Die Proben wurden bei 850 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das klare Plasma wurde mit einer Pipette abgenommen und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde 300 µL Blut in 10 mL PBS bei 300 x g, 4 °C für 5 min gewaschen und der Überstand mit einer Stabpipette abgenommen. Das Pellet wurde in 5 mL Erylysepuffer resuspendiert, nach 5 min mit PBS abgestoppt und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit PBS gewaschen und die Erylyse wiederholt. Nach einem weiteren Waschschrift konnten die Zellen für die FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) Färbung (siehe Abschnitt 2.4.13) weiterverarbeitet werden.

2.4.6 Isolierung von Leukozyten aus murinem Lebergewebe

Die Isolierung der murinen Leberleukozyten erfolgte mittels Percoll - Dichtegradienten. Zunächst wurde der große Leberlappen mit der Kolbenstange einer 5 mL Einmalspritze über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 mL-Röhrchen zerrieben. Nach einem Waschschrift in PBS bei 300 x g, 4 °C für 8 min wurde das Zellpellet in 5 mL 80 % Percoll in RPMI resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Röhrchen überführt und mit 40 % Percoll in RPMI überschichtet. Im Anschluss wurden die Proben bei 800 x g, 21 °C für 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Leukozytenring wurde abgenommen und in ein neues 15 mL-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden in kaltem PBS aufgenommen und bei 300 x g, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Um die vorhandenen Erythrozyten zu lysieren, wurde das Pellet in Erylyse-Puffer resuspendiert. Die Zellyse wurde nach 5 min mit PBS abgestoppt und erneut bei 300 x g, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS, wurden die Zellen gezählt (siehe Abschnitt 2.4.9).

2.4.7 Isolierung von Leukozyten aus murinem Milzgewebe

Die Milz wurde mit der Kolbenstange einer 5 mL Einmalspritze über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 mL-Röhrchen zerrieben. Nach einem Waschschrift in PBS bei 300 x g, 4 °C für 5 min wurde das Zellpellet für 5 min in Erylyse-Puffer resuspendiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.9).

2.4.8 Isolierung von murinen Knochenmarkszellen

Femur und Tibia der Maus wurden von Muskelfleisch entfernt und die Knochen in 70 % Isopropanol sterilisiert. Die Knochenenden wurden mit einer Schere aufgeschnitten und der Knochen mit RPMI-Medium über eine 10 mL Einmalspritze mit feiner Injektionskanüle gespült. Die gesamte Flüssigkeit wurde in einem 50 mL-Röhrchen gesammelt und auf Eis gelagert. Nach 10 min wurde der Überstand abgenommen – kleinere Knochenbestandteile blieben so am Boden des Röhrchens – und bei 300 x g, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium gelöst und die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.9).

2.4.9 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 m²) bestimmt. Hierfür wurde zunächst eine angebrachte Verdünnung der Zellsuspension in 0,4 % Trypanblau hergestellt, wovon 10 µL in die Zählkammer pipettiert wurden. Unter dem Lichtmikroskop wurden anschließend die lebendigen Zellen, die den Farbstoff nicht aufnehmen, in vier Großquadranten gezählt. Die Zellzahl pro mL ließ sich mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

2.4.10 Humaner *in vitro* Stimulationsassay

Der humane Stimulationsassay wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit Rundboden durchgeführt. Je 1 x 10⁵ humane Monozyten wurden in komplettiertem RPMI-Medium ausgesät und mit 1 µg/mL *E. histolytica* Lysat, 0,1 µg/mL LPS und 1-100 nM DHT (Tab. 6) bei 37 °C, 5 % CO₂ stimuliert. Nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.11 Muriner *in vitro* Stimulationsassay

Der murine Stimulationsassay wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit Rundboden durchgeführt. Je 2 x 10⁶ Splenozyten wurden in komplettiertem RPMI-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um den Proteintransport zu inhibieren und eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu ermöglichen, wurde nach 1 h 50 µg/mL Brefeldin A hinzugegeben. Nach weiteren 3 h wurde die Mikrotiterplatte bei 450 x g, 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet für die FACS Analyse gefärbt.

2.4.12 Restimulation muriner Leberlymphozyten

Um eine intrazelluläre Zytokinproduktion nachzuweisen, mussten die aufgereinigten Leberlymphozyten zunächst mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin restimuliert werden. Die Restimulation wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit Rundboden durchgeführt. Je

1 x 10⁶ murine Leberlymphozyten wurden in komplettiertem RPMI-Medium ausgesät und mit 50 ng/mL PMA und 500 ng/mL Ionomycin stimuliert. PMA aktiviert die Proteinase C und Ionomycin begünstigt einen Calciumeinfluss. Durch die Restimulation mit PMA und Ionomycin werden bereits aktivierte Zellen in ihrer Zytokinproduktion stimuliert. Um den Proteintransport zu inhibieren und eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu ermöglichen, wurde nach 1 h 50 µg/mL Brefeldin A hinzugegeben. Nach weiteren 3-5 h wurde die Mikrotiterplatte bei 450 x g, 4 °C für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet für die FACS Analyse gefärbt.

2.4.13 Färbung der Zellen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie

Um die Expression von extra- und intrazellulären Proteinen mittels Durchflusszytometrie zu analysieren, wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern in FACS-Röhrchen gefärbt.

Eine Färbung der Zellen mit Zombie UVTM (1:1000 in 100 µL PBS) bei RT für 20 min ermöglichte einen Ausschluss von toten Zellen bei der Analyse. Zombie UVTM ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die beschädigte Membran toter Zellen durchdringt, während lebendige Zellen mit intakter Zellmembran nur minimal angefärbt werden. Nach 20 min wurde 1 mL FACS Puffer hinzugegeben, die Proben bei 300 x g, 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde ein weiteres Mal in FACS-Puffer gewaschen. Die Oberflächenfärbung muriner Zellen erfolgte im Fc-Block um unspezifische Bindungen der Fc-Domäne des Antikörpers mit murinen Fc-Rezeptoren zu verhindern. Die Färbung humaner Zellen wurde in FACS-Puffer durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Antikörper-Mastermix (siehe Tab. 7 für alle verwendeten Antikörper) in 50 µL Volumen bei 4 °C für 30 min gefärbt und mit 1 mL FACS Puffer abgestoppt. Nach einer Zentrifugation erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung mit dem *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* in einem Volumen von 100 µL bei 4 °C. Nach 30 min wurde 1 mL *Perm/Wash* Puffer hinzugegeben und das Pellet zweimal in dieser Lösung gewaschen. Sollten auch intrazelluläre Proteine und Transkriptionsfaktoren gefärbt werden, folgte eine Inkubation für 30 min bei 4 °C mit einem entsprechenden Antikörper-Mastermix in 50 µL *Perm/Wash* Puffer. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurde das Pellet für die Messung über einen 30 µm CellTrics gefiltert und in 100 µL *Perm/Wash* Puffer aufgenommen. Bei jeder Färbung diente eine Probe, die nur mit Zombie UV gefärbt wurde, als Kontrolle. FMO (*Fluorescence Minus One*) Kontrollen, bei denen lediglich ein Antikörper im Mastermix fehlte, ermöglichten zudem eine leichtere Unterscheidung von positiven und negativen Zellen.

2.4.14 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellen hinsichtlich ihrer extrazellulären und intrazellulären Moleküle. In dieser Arbeit wurden die Proben sowohl am LSR II (BD Biosciences) als auch am Fortessa (BD Biosciences) gemessen.

Bei der Messung passiert eine Einzellsuspension eine dünne Mikrokanalküvette und wird von verschiedenen Lasern angestrahlt. Während der LSR II einen blauen (488 nm), einen roten (640 nm), einen violetten (405 nm) und einen UV Laser (355 nm) besitzt, ist der Fortessa mit einem zusätzlichen gelb/grünen Laser (560 nm) ausgestattet. Hat eine Zelle einen Fluorochrom-

gekoppelten Antikörper gebunden, wird dieser Fluoreszenzfarbstoff von dem Laser mit der passenden Wellenlänge angeregt und emittiert Licht einer höheren Wellenlänge. Dieses Licht wird von verschiedenen Detektoren erkannt und in ein elektronisches Signal umgeschrieben, welches am Computer ausgewertet wird. Neben dem spezifischen Fluorochrom-abhängigen Signal unterscheiden sich die Zellen auch aufgrund ihrer Morphologie im Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC). Je größer eine Zelle, desto höher ist ihr FSC, während der SSC mit der Granularität der Zelle steigt. Die Daten wurden mit der Software FACS Diva™ und FlowJo™ analysiert.

2.5 Mausversuche

2.5.1 Cre-loxP Zucht

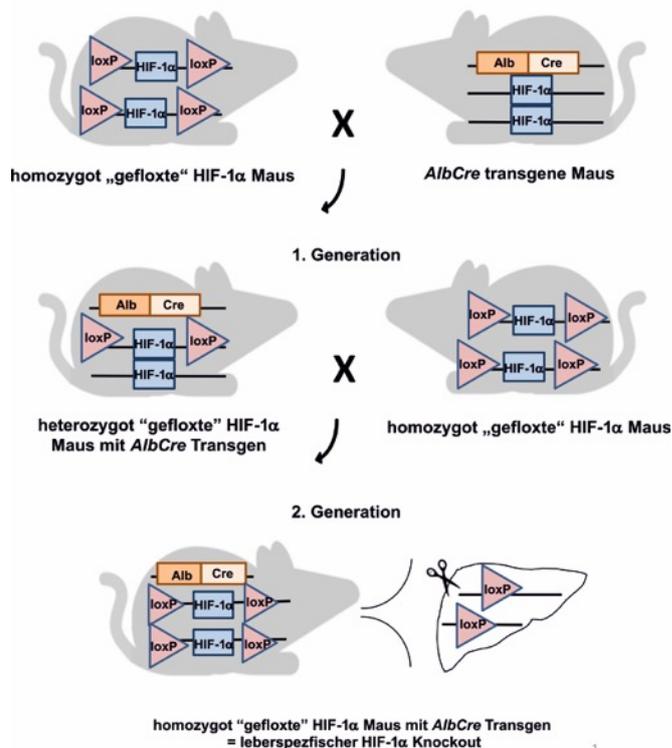


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Cre-loxP Systems zur Zucht der Hep-HIF-1 α ^{-/-} Mäuse. Für die Zucht der Mäuse mit leberspezifischem HIF-1 α *Knockout* (*Hep-HIF-1 α ^{-/-}*) wurden HIF-1 α ^{fllox} Mäuse mit AlbCre Mäusen verpaart. Nachkommen der 2. Generationen waren homozygot für HIF-1 α ^{fllox} und positiv für die AlbCre Mutante, wodurch kein HIF-1 α in der Leber exprimiert wird.

Um Hepatozyten-spezifische HIF-1 α *Knockout* Mäuse zu erhalten, wurde das Cre-loxP System in der Zucht angewendet. Die Cre-Rekombinase erkennt den spezifischen DNA Abschnitt loxP (*locus of x-over*, P1) und schneidet den Gen-Abschnitt zwischen zwei loxP Stellen heraus (Kim *et al.* 2018). Der Einsatz eines Albumin-(Alb) Promotors

vor der Cre-Rekombinase ermöglicht die spezifische Expression in der Leber. Weibliche AlbCre Mäuse wurden mit einer männlichen HIF-1 α ^{fllox} Maus verpaart. Bei der HIF-1 α ^{fllox} Maus ist das Gen HIF-1 α von zwei loxP Abschnitten umgeben (*floxed* genannt). Nach frühestens zwei Generationen ist sowohl AlbCre als auch HIF-1 α ^{fllox} homozygot im Genom integriert und HIF-1 α in der Leber deletiert (Abb. 5).

2.5.2 Induktion des Amöbenleberabszesses

Um die Abszessentwicklung im Mausmodell zu untersuchen wurden 8 – 12 Wochen alte weibliche und männliche C57BL/6J Mäuse intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Zunächst wurden die Mäuse mit einer Lösung aus 1 μ L/g Körpergewicht (KG) Cepetor® (Stock: 1 mg/mL) und 1,5 μ L/g KG Ketamin (Stock: 50 mg/mL) in isotoner Kochsalzlösung durch intraperitoneale Applikation narkotisiert und mittels Wärmeplatte vor dem Auskühlen bewahrt. Die

Bauchhöhle wurde geöffnet und 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten in einem Volumen von 20 μ L in nicht-komplettiertem TY-Medium in den linken kaudalen Leberlappen injiziert. Das Peritoneum und die Muskularisschicht wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen und mit Wundklammern fixiert. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte frühestens nach 30 min mit 0,5 μ L/g KG Antisedan® (Stock: 5 mg/mL) intramuskulär.

2.5.3 Immundepletion

Einen Tag vor und einen Tag nach *E. histolytica* Infektion wurde den Mäusen 85 μ g eines α CXCL1 Antikörpers (R&D, Klon 48415) in NaCl intraperitoneal appliziert. Kontrollmäuse wurden mit 85 μ g der IgG2A (R&D, Klon 54447) Isotypkontrolle behandelt.

2.5.4 Gonadektomie und Testosteronbehandlung

Die Gonadektomie 8 Wochen alter männlicher Mäuse wurde von Frau Dr. Julie Sellau und Herrn Stefan Hoenow (Arbeitsgruppe Molekulare Infektionsimmunologie von Prof. Dr. Hannelore Lotter, BNITM) durchgeführt. Zur Schmerzlinderung wurde den Mäusen 7 Tage lang 5 mg/kg KG Carprofen intramuskulär verabreicht. Zwei Wochen nach Gonadektomie wurde den Mäusen unter Isofluran-Narkose eine osmotische Pumpe (ALZET) mit 5 mg/mL Testosteron in 45 % 2-(Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin subkutan implantiert. Kontrolltieren wurde eine ALZET-Pumpe mit Trägerlösung implantiert. Die osmotische Pumpe ermöglicht eine systemische und konstante Verabreichung (0,25 μ L pro Stunde) von Testosteron bis zu vier Wochen nach Implantation. Nach weiteren zwei Wochen nach der ALZET-Pumpen Implantation wurden die Mäuse mit *E. histolytica* infiziert.

2.5.5 Bestimmung der Abszessvolumina

An Tag 3 nach *E. histolytica* Infektion wurden die Mäuse euthanasiert und der infizierte Leberlappen entnommen. Die Größe des Abszesses ließ sich mit einem Lineal ausmessen und fotografisch dokumentieren. Um die Tiefe des Abszesses zu ermitteln, erfolgte zudem ein Schnitt durch das betroffene Gewebe. Mit Hilfe der Software ImageJ und dem Lineal als Maßstab konnte das Abszessvolumen errechnet werden. Aufgrund der sehr festen Struktur des Abszesses war es außerdem möglich den Abszess auszuschneiden und mit einer Feinwaage zu wiegen. Unterschiede in der Abszessgröße konnten somit noch feiner bestimmt werden.

2.6 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde GraphPad Prism 8 verwendet. Für normalverteilte Daten wurde der *unpaired* bzw. *paired* T-test verwendet, während bei nicht normalverteilten Daten der Mann-Whitney Test durchgeführt wurde. Statistische Signifikanzen sind wie folgt definiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Fehlerbalken geben immer den Standardfehler (*standard error of means*, SEM) an.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit behandelt die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der angeborenen und adaptiven Immunantwort während der *E. histolytica* Infektion. Sie ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Abschnitt wird der Einfluss von Androgenen auf Monozyten – zentrale Zellen des angeborenen Immunsystems – analysiert. Im zweiten Abschnitt wird die Rolle von HIF-1 α in der Differenzierung der Th17 und regulatorischen T-Zellen als Aspekt der adaptiven Immunantwort auf geschlechtsspezifische Unterschiede geprüft.

3.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der angeborenen Immunantwort: Die Rolle von Androgenen in der Rekrutierung von Monozyten

Dem Amöbenleberabszess liegt eine Immunpathologie zugrunde, die im Mausmodell primär durch inflammatorische Ly6C^{hi} Monozyten vermittelt wird (Helk *et al.* 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass das männliche Geschlechtshormon Testosteron die Pathologie der Abszessentstehung beeinflusst (Lotter *et al.* 2006; Lotter *et al.* 2013). In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Androgenen und dem pro-inflammatorischen Charakter der Monozyten während der *E. histolytica* Infektion besteht. Mit Hilfe des Mausmodells für den Amöbenleberabszess wurden die Monozyten männlicher und weiblicher Mäuse phänotypisch charakterisiert. Neben den bereits bekannten, maßgeblich an der Immunpathologie beteiligten Zytokinen CCL2 und TNF wurde die Rolle von CXCL1 auf die Abszessentwicklung untersucht. Zudem wurde analysiert, ob Androgene die Zytokinproduktion von Ly6C^{hi} Monozyten *in vivo* und humanen Monozyten *in vitro* beeinflussen.

3.1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der phänotypischen Charakterisierung von murinen Monozyten und neutrophilen Granulozyten

Die intrahepatische Infektion mit *E. histolytica* führt zu einer deutlich schwereren Leberschädigung in männlichen im Vergleich zu weiblichen Individuen (Lotter *et al.* 2006; Bernin *et al.* 2014). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Pathologie durch den massiven Einstrom von Ly6C^{hi} Monozyten und neutrophilen Granulozyten vermittelt wird. Um diese beiden Zellpopulationen geschlechtsspezifisch zu analysieren, wurden männliche und weibliche Mäuse mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die Leberlymphozyten an Tag 3 nach Infektion aufgereinigt. Die CD11b⁺Ly6C⁺ Zellen in Blut und Leber naiver und infizierter Mäuse wurden mittels Durchflusszytometrie charakterisiert.

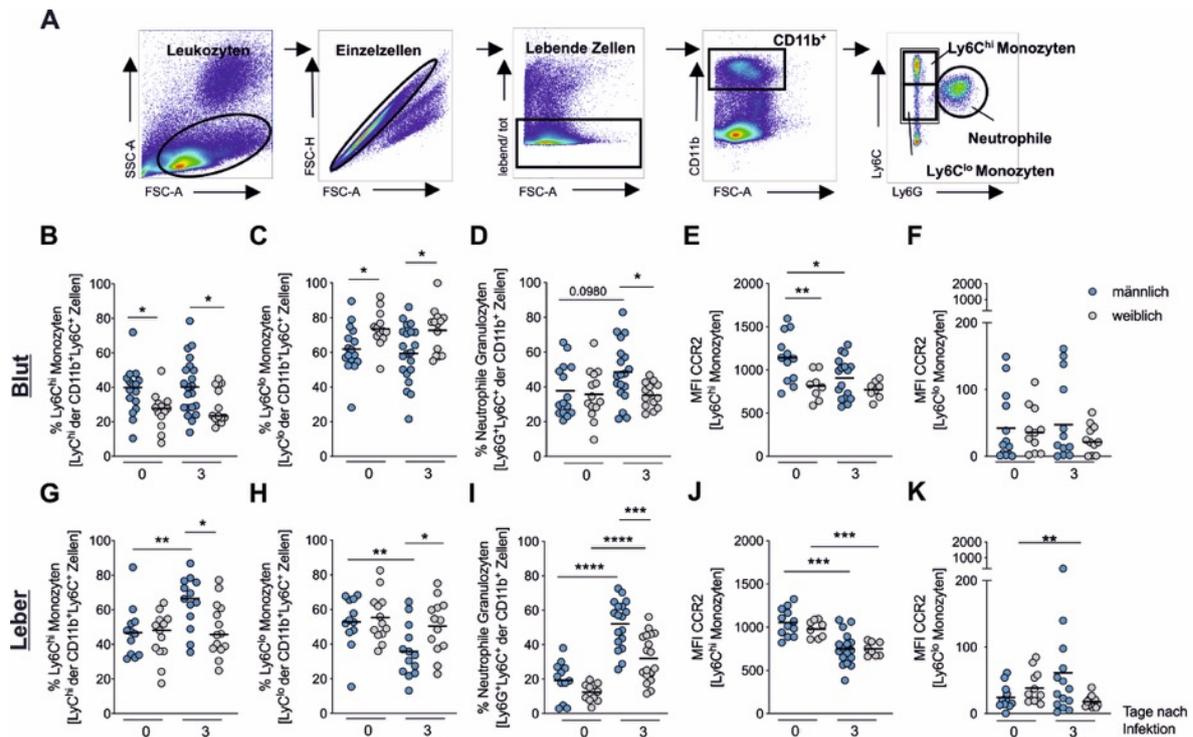


Abbildung 6: Geschlechtsspezifische Unterschiede der CD11b⁺Ly6C⁺ Zellen in Blut und Leber während der murinen *E. histolytica* Infektion. Männliche und weibliche C57BL/6J Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und Blut und Leber an Tag 3 nach Infektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Gating-Strategie zur Identifizierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Ly6C^{hi} Monozyten (B,G), Ly6C^{lo} Monozyten (C,H), neutrophile Granulozyten (D,I) sowie die CCR2 Expression (MFI) der Ly6C^{hi} (E,J) und Ly6C^{lo} (F,K) Monozyten des Blutes und der Leber naiver und infizierter Mäuse (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=11-19). (Mann-Whitney U Test; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).

Der prozentuale Anteil der in der Blutbahn zirkulierenden Ly6C^{hi} Monozyten innerhalb der CD11b⁺Ly6C⁺ Zellen war sowohl in naiven als auch in infizierten männlichen Mäusen höher als in den weiblichen Mäusen (Abb. 6 B) ($p < 0,05$). Weibliche Mäuse wiesen hingegen eine größere Ly6C^{lo} Monozytenpopulation auf ($p < 0,05$) (Abb. 6 C). Die *E. histolytica* Infektion induzierte einen signifikanten Anstieg der Ly6C^{hi} Monozyten sowie einen Abfall der Ly6C^{lo} Monozyten in der Leber männlicher Mäuse ($p < 0,01$), während die Monozyten weiblicher Mäuse nicht beeinflusst wurden (Abb. 6 G, H). Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten war in infizierten männlichen Mäusen in Blut ($p < 0,05$) und Leber ($p < 0,001$) höher als in weiblichen Mäusen (Abb. 6 D, I). Die Infektion bewirkte einen Anstieg der hepatischen neutrophilen Granulozyten in Mäusen beider Geschlechter ($p < 0,0001$). Ly6C^{hi} Monozyten im Blut naiver männlicher Mäuse waren zudem durch eine höhere Expression des CCR2 Rezeptors im Vergleich zu weiblichen Mäusen charakterisiert ($p < 0,01$) (Abb. 6 E). Die Infektion führte zu einem signifikanten Abfall der CCR2 Expression auf hepatischen Ly6C^{hi} Monozyten in Mäusen beider Geschlechter und auf zirkulierenden Ly6C^{hi} Monozyten männlicher Mäuse (Abb. 6 E, J). Die CCR2 Expression der Ly6C^{lo} Monozyten war mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von unter 50 ($\text{Median}_{\text{MFI CCR2}}=36,5$) vernachlässigbar (Abb. 6 F, J). CCR2 ist essentiell für die Migration von Ly6C^{hi} Monozyten aus dem Knochenmark in das periphere Blut und die Ausbildung des Amöbenleberabszesses (Serbina und Pamer 2006; Helk *et al.* 2013). Es wurde daher untersucht, ob der im Blut gegebene geschlechtsspezifische Unterschied in der CCR2 Expression bereits im Knochenmark veranlagt ist.

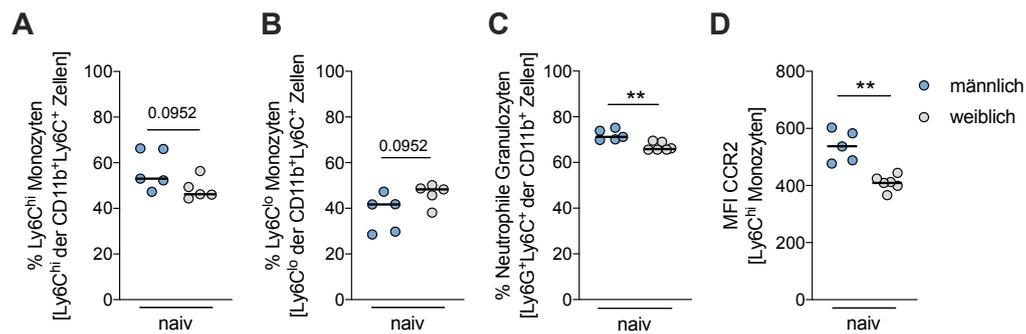


Abbildung 7: Geschlechtsspezifische Unterschiede der CD11b⁺Ly6C⁺ Zellen im Knochenmark naiver C57BL/6J Mäuse. Analyse der Ly6C^{hi} (A) und Ly6C^{lo} (B) Monozyten, neutrophilen Granulozyten (C) sowie CCR2 Expression (MFI) der Ly6C^{hi} Monozyten (D) des Knochenmarks naiver männlicher und weiblicher C57BL/6J Mäuse mittels Durchflusszytometrie (dargestellt ist ein Experiment von zwei durchgeführten, unabhängigen Experimenten; n=5). (Mann-Whitney U Test; **p < 0,01).

Es ließ sich ein Trend für prozentual mehr Ly6C^{hi} Monozyten in männlichen und Ly6C^{lo} Monozyten in weiblichen Mäusen wiederfinden (Abb. 7 A, B). Neutrophile Granulozyten zeigten bereits im Knochenmark einen signifikant höheren prozentualen Anteil in männlichen Mäusen ($p < 0,01$) (Abb. 7 C). Ebenso war die Expression von CCR2 auf Ly6C^{hi} Monozyten des Knochenmarks in der männlichen Maus signifikant höher ($p < 0,01$) (Abb. 7 D).

Zusammenfassend demonstrierten die durchflusszytometrischen Analysen eine höhere CCR2 Expression der Ly6C^{hi} Monozyten in Knochenmark und Blut naiver männlicher Mäuse sowie prozentual mehr Ly6C^{hi} Monozyten und neutrophile Granulozyten in Blut und Leber infizierter männlicher Mäuse im Vergleich zu weiblichen Mäusen.

3.1.2 CXCL1 Expression im Verlauf der *E. histolytica* Infektion

Neben CCL2 können Monozyten auch über das Chemokin CXCL1 in beschädigte und infizierte Gewebe rekrutiert werden (Vries *et al.* 2015). Um die Rolle von CXCL1 in der *E. histolytica* Infektion zu untersuchen, wurde zunächst geprüft, ob die Infektion einen Anstieg von CXCL1 zur Folge hat. Die Konzentrationen von CXCL1 sowie CXCL10, IL-1 β , IL-1RA und TNF (siehe Appendix A) wurden im Serum vietnamesischer ALA Patienten und endemischer Kontrollen mittels *Bead*-basiertem Immunoassay (LEGENDplex) bestimmt. Lediglich bei CXCL1 konnten geschlechtsspezifische Unterschiede bestimmt werden: die Konzentrationen waren im Serum männlicher Kontrollprobanden signifikant höher als im Serum weiblicher Individuen ($p < 0,05$) (Abb. 8 A). Die CXCL1 Konzentration war in Patienten mit einem Amöbenleberabszess stark erhöht. Während die Konzentration in männlichen ALA-Patienten fast dreimal höher war (Median_{Kontrolle}=164,53 pg/mL; Median_{ALA}=456,0 pg/mL), zeigten Seren weiblicher ALA-Patienten bis zu zehnfach erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu den Seren endemischer Kontrollen (Median_{Kontrolle}= 41,28 pg/mL; Median_{Patient}=397,44 pg/mL).

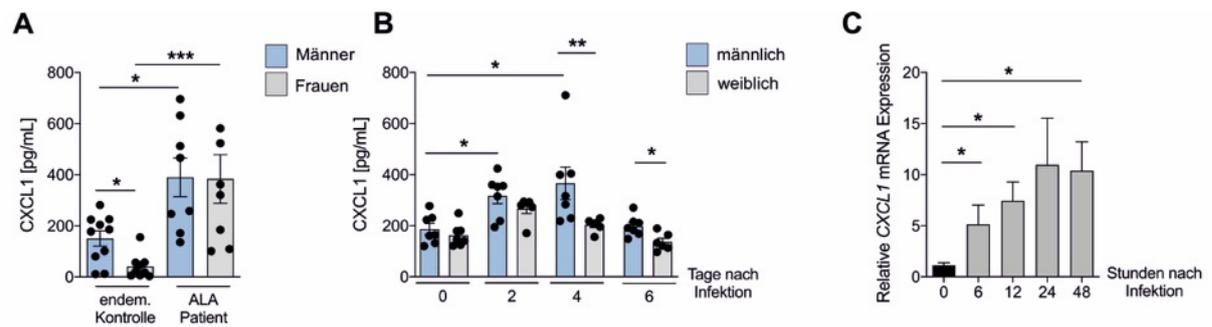


Abbildung 8: CXCL1 Expression im Verlauf der *E. histolytica* Infektion. (A) CXCL1 Konzentration im Serum gesunder Kontrollprobanden (n=9 Frauen, 10 Männer) und Patienten mit einem Amöbenleberabszess (ALA; n=8). **(B)** CXCL1 Konzentration im Plasma männlicher und weiblicher C57BL/6J Mäuse im Verlauf der *E. histolytica* Infektion (n=6-7). **(C)** CXCL1 mRNA Expression in murinem Lebergewebe im Verlauf der *E. histolytica* Infektion in Relation zur RPS9 mRNA Expression (n=4-5; männlich). (Mittelwerte \pm Standardfehler; Mann-Whitney U Test; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Um die Rolle von CXCL1 bei der Entstehung des Amöbenleberabszesses zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob vergleichbare Ergebnisse im Mausmodell für den Amöbenleberabszess erzielt werden können. Männliche und weibliche C57BL/6J Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. An Tag 0, 2, 4 und 6 nach Infektion wurde die CXCL1 Konzentration im Plasma mittels *Bead*-basiertem Immunoassay (LEGENDplex) bestimmt. Mit ca. 200 pg/mL in männlichen und weiblichen Mäusen waren die CXCL1 Konzentrationen vergleichbar mit denen im Menschen (Abb. 8 B). Naive Tiere zeigten im Vergleich zu den humanen Daten keinen geschlechtsspezifischen Unterschied. Die Infektion führte innerhalb von zwei Tagen zu einem signifikanten Anstieg der CXCL1 Konzentration in männlichen Mäusen ($p < 0,05$), während die CXCL1 Konzentrationen im Plasma weiblicher Mäuse unverändert blieben. An Tag 4 und 6 nach Infektion war CXCL1 daher signifikant höher konzentriert im Plasma männlicher Individuen im Vergleich zu den weiblichen Mäusen ($p < 0,01$ und $p < 0,05$). Mittels qPCR wurde überprüft, ob es im Verlauf der *E. histolytica* Infektion auch einen Anstieg der CXCL1 Expression in der Leber gibt. Es war ein rapider Anstieg der CXCL1 mRNA innerhalb von nur 6 h ($p < 0,05$) messbar, gefolgt von einer weiteren sukzessiven Steigung in den ersten zwei Tagen nach Infektion (Abb. 8 C).

Zusammenfassend zeigte sich ein Anstieg der CXCL1 Konzentration während der *E. histolytica* Infektion in humanen Probanden und männlichen Mäusen. CXCL1 war außerdem in männlichen Kontrollprobanden und infizierten männlichen Mäusen höher konzentriert im Vergleich zu weiblichen Individuen.

3.1.3 Auswirkungen der CXCL1 Depletion auf die Abszessentwicklung

Die deutlich höhere Serumkonzentration von CXCL1 in den ALA-Patienten und die Parallelen im Mausmodell ließen vermuten, dass CXCL1 eine entscheidende Rolle im *E. histolytica* Infektionsverlauf zuzuschreiben ist. Um dies zu überprüfen, wurde die Abszessentstehung unter Depletion von CXCL1 in männlichen Mäusen untersucht: 8 Wochen alten C57BL/6J Mäusen wurde einen Tag vor *E. histolytica* Infektion sowie einen Tag danach ein α CXCL1-Antikörper oder Isotyp-IgG2A intraperitoneal (i.p.) appliziert. An Tag 3 nach Infektion wurde die Abszessgröße fotografisch und mittels der Software ImageJ ausgewertet. CXCL1-depletierte Mäuse entwickelten signifikant kleinere Abszesse als Isotyp-behandelte Mäuse ($p < 0,05$) (Abb. 9 A). Während die Depletion den

Anteil an Ly6C^{hi} Monozyten reduzierte ($p < 0,05$) (Abb. 9 B), blieb der Anteil an neutrophilen Granulozyten unverändert (Abb. 9 C).

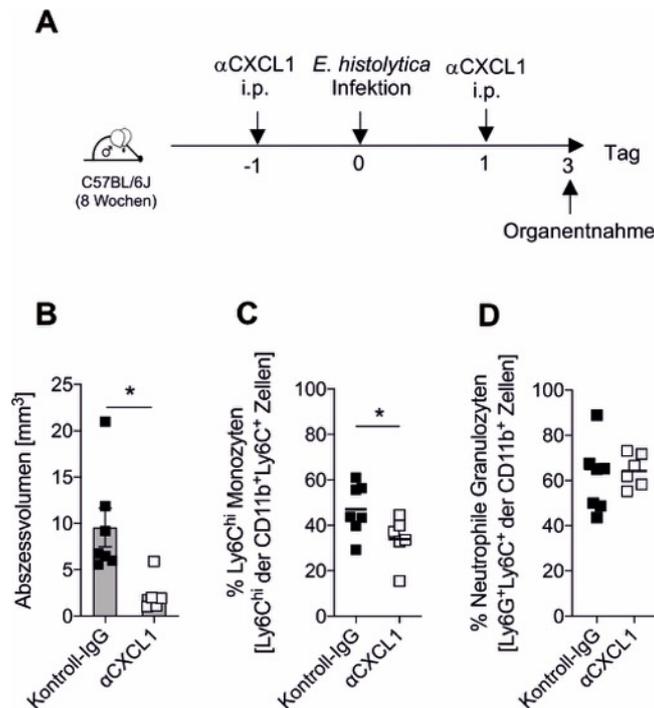


Abbildung 9: Auswirkungen der CXCL1-Depletion auf die Abszessentwicklung. (A) Schematischer Versuchsaufbau: 8 Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Einen Tag vor und nach der Infektion wurde intraperitoneal (i.p.) 85 μ g eines α CXCL1-Antikörpers (R&D, Klon 48415) appliziert. An Tag 3 nach Infektion wurde das Abszessvolumen bestimmt (B) und die Ly6C^{hi} Monozyten (C) sowie neutrophilen Granulozyten (D) der Leber mittels Durchflusszytometrie analysiert. Kontrollmäuse wurden mit 85 μ g Isotyp-IgG2A (R&D, Klon 54447) behandelt (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=5-7). (Mittelwerte \pm Standardfehler; Student's T-Test; * $p < 0,05$).

Es lässt sich festhalten, dass die CXCL1-Depletion einen protektiven Einfluss auf die Abszessentwicklung hatte und von einer Reduzierung an Ly6C^{hi} Monozyten begleitet war.

3.1.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der TNF, CCL2 und CXCL1 Produktion muriner Ly6C^{hi} Monozyten

Um das pro-inflammatorische Potential von Ly6C^{hi} Monozyten geschlechtsspezifisch zu charakterisieren, wurden die Splenozyten männlicher und weiblicher Mäuse für 4 h mit *E. histolytica* Lysat (*E. his*) stimuliert. Die intrazelluläre Expression von TNF, CCL2 und CXCL1 der Ly6C^{hi} Monozyten (Ly6C^{lo} Monozyten und neutrophile Granulozyten siehe Appendix B) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der höhere Anteil an Ly6C^{hi} Monozyten in männlichen Mäusen konnte auch *in vitro* bestätigt werden ($p < 0,01$) (Abb. 10 A). Die *in vitro* Stimulation führte außerdem zu einer Induktion der Ly6C^{hi} Monozyten in Mäusen beider Geschlechter. Die Stimulation bewirkte lediglich einen Anstieg von TNF⁺Ly6C^{hi} Monozyten in männlichen Mäusen ($p < 0,05$) (Abb. 10 B), während keine Veränderung der CCL2 oder CXCL1 Produktion messbar war (Abb. 10 C, D).

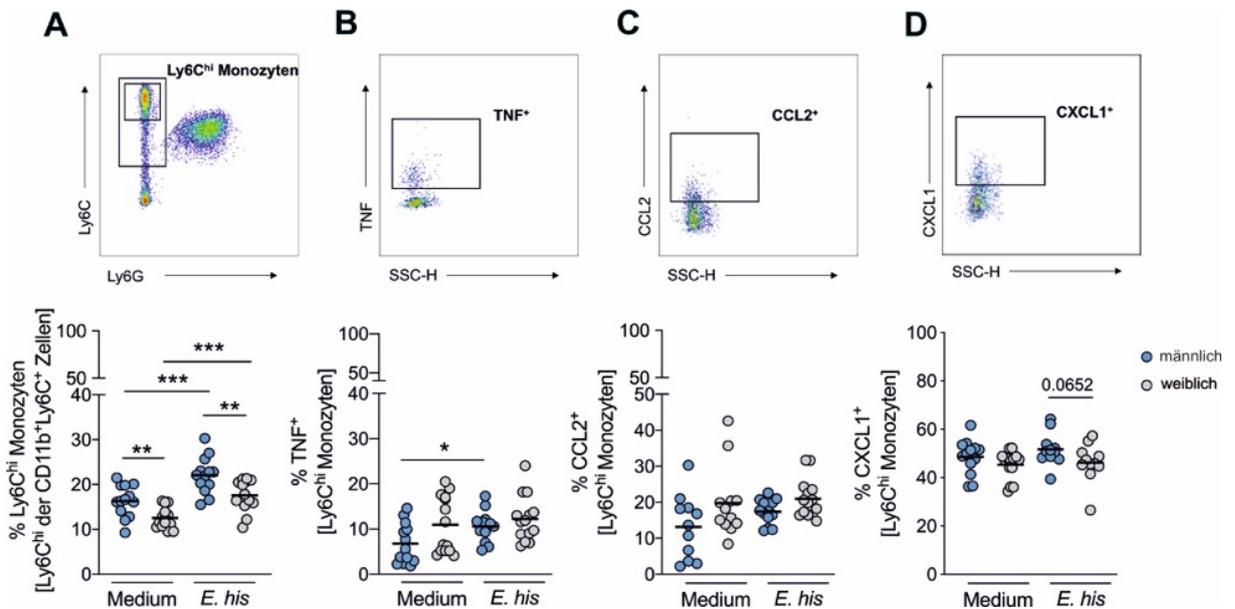


Abbildung 10: Geschlechtsspezifische Unterschiede *in vitro* stimulierter muriner Splenozyten. Splenozyten aus männlichen und weiblichen C57BL/6J Mäusen wurden isoliert und für 4 h mit *E. histolytica* Lysat (1mg/mL) stimuliert. Ly6C^{hi} Monozyten (A) und deren intrazelluläre Produktion von TNF (B), CCL2 (C) und CXCL1 (D) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=13-14). (Mann-Whitney U Test; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Aus diesem Grund wurde die intrazelluläre Zytokinproduktion der Ly6C^{hi} Monozyten im Infektionsmodell *ex vivo* untersucht. Hierfür wurden die Leberlymphozyten naiver und infizierter Mäuse isoliert und mit PMA (50 ng/mL) und Ionomycin (500 ng/mL) für 4 h restimuliert. Um eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu erreichen, wurde nach 1 h 50 µg/mL Brefeldin A hinzugefügt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ly6C^{hi} Monozyten stellen die Hauptquelle für TNF, CCL2 und CXCL1 in der Infektion dar (Abb. 11 A-C). Im naiven Tier produzierten die Ly6C^{hi} Monozyten von männlichen und weiblichen Mäusen gleiche Mengen an TNF und CCL2 (Abb. 11 D, E). Die Ly6C^{hi} Monozyten naiver als auch infizierter männlicher Mäuse produzierten signifikant mehr CXCL1 im Vergleich zu weiblichen Mäusen (p < 0,01 und p < 0,05) (Abb. 11 F).

Die *E. histolytica* Infektion induzierte die Produktion aller drei Zytokine in männlichen und TNF und CXCL1 in weiblichen Mäusen. Der starke Anstieg der TNF⁺ Zellen in männlichen Mäusen führte zudem zu einem starken geschlechtsspezifischen Unterschied in der infizierten Maus (p < 0,001).

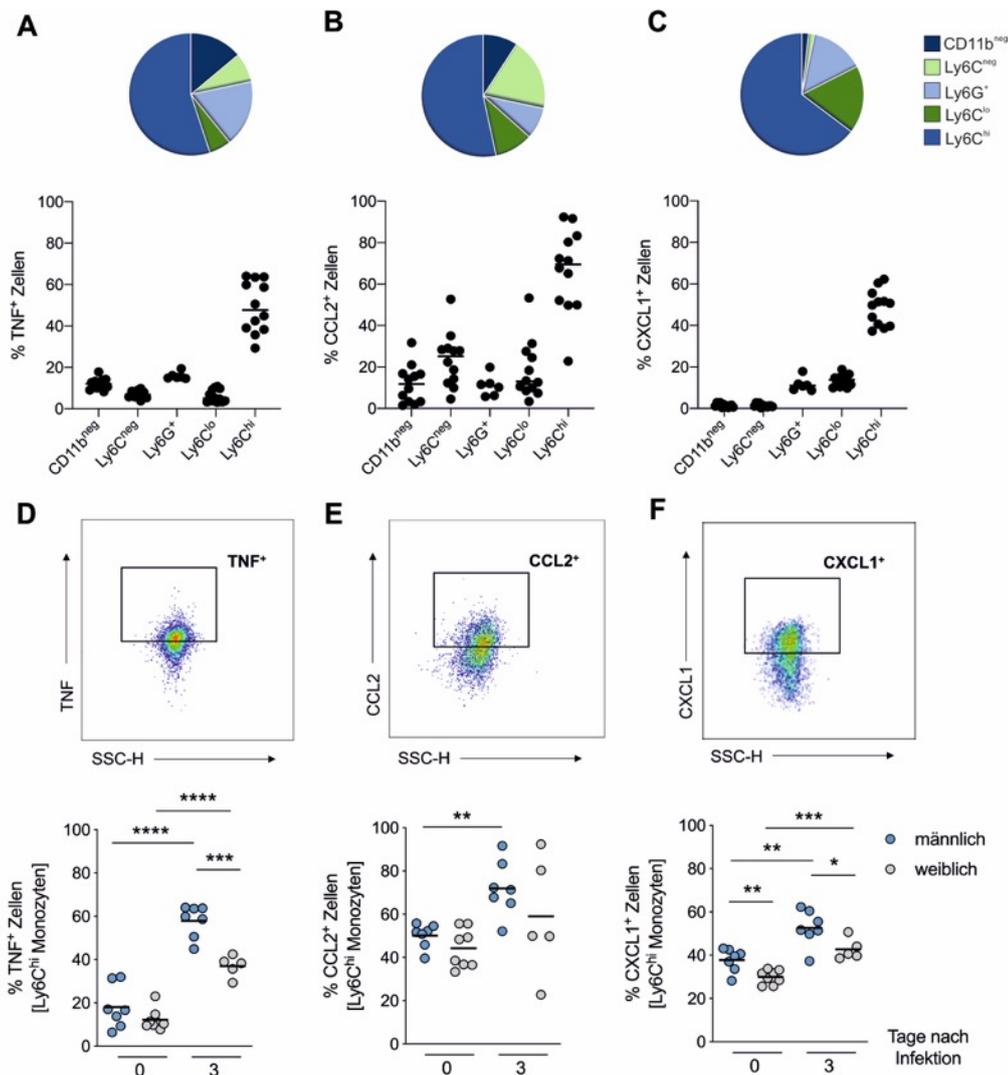


Abbildung 11: Geschlechtsspezifische Unterschiede in der TNF, CCL2 und CXCL1 Produktion muriner Leberlymphozyten während der *E. histolytica* Infektion. Leberlymphozyten naiver sowie mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infizierter C57BL/6J Mäuse wurden aufgereinigt und für 4 h mit 50 ng/mL PMA und 500 ng/mL Ionomycin restimuliert. Um eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu erhalten, wurde nach 1 h 50 μ g/mL Brefeldin A hinzugefügt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Intrazelluläre TNF (A), CCL2 (B) und CXCL1 (C) Produktion hepatischer CD11b^{neg}, Ly6C^{neg}, Ly6G⁺, Ly6C^{lo} und Ly6C^{hi} Zellpopulationen infizierter Mäuse (n=6-13, männlich und weiblich). Gating-Strategie sowie prozentualer Anteil TNF (D), CCL2 (E) und CXCL1 (F) produzierender Ly6C^{hi} Monozyten in der Leber naiver und infizierter Mäuse (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=5-8). (Student's T-Test; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).

Zusammenfassend zeigte sich ein Anstieg der intrazellulären TNF, CCL2 und CXCL1 Produktion hepatischer Ly6C^{hi} Monozyten während der *E. histolytica* Infektion sowie höhere Anteile an TNF⁺ und CXCL1⁺ Zellen in der männlichen infizierten Maus im Vergleich zu weiblichen Mäusen.

3.1.5 Einfluss von Androgenen auf Monozyten während der *E. histolytica* Infektion

Sowohl Ly6C^{hi} Monozyten als auch den Zytokinen TNF, CCL2 und CXCL1 konnte eine Beteiligung an der Immunpathologie unter der *E. histolytica* Infektion nachgewiesen werden. Die höhere Expression all dieser Faktoren in der männlichen Maus und die pathologische Rolle von Testosteron auf die Abszessentwicklung ließen einen Einfluss von Androgenen auf Monozyten vermuten. Um die

Kausalität der immunologischen und hormonellen Parameter zu untersuchen, wurden 8 Wochen alte männliche Mäuse kastriert und nach zwei Wochen mittels einer subkutan implantierten osmotischen Pumpe, die physiologische Testosteronmengen freisetzt, hormonell substituiert. Kontrolltiere erhielten eine Trägerlösung. Weitere zwei Wochen später folgte die intrahepatische Infektion mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten. An Tag 3 nach Infektion wurden die Leberlymphozyten aufgereinigt und für 4 h mit 50 ng/mL PMA, und 500 ng/mL Ionomycin restimuliert. Um eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu erreichen, wurde nach 1 h 50 µg/mL Brefeldin A hinzugefügt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Der Einfluss von Androgenen konnte bestätigt werden: Testosteron-behandelte Mäuse zeigten einen erhöhten Anteil an Ly6C^{hi} Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Kontrolltieren ($p < 0,05$) (Abb. 12 B, C). Außerdem produzierten nach Testosteronbehandlung signifikant mehr Monozyten TNF, CCL2 und CXCL1 (Abb. 12 E-G). Lediglich die CCR2 Expression der Ly6C^{hi} Monozyten sank mit Testosteronbehandlung ($p < 0,01$) (Abb. 12. D).

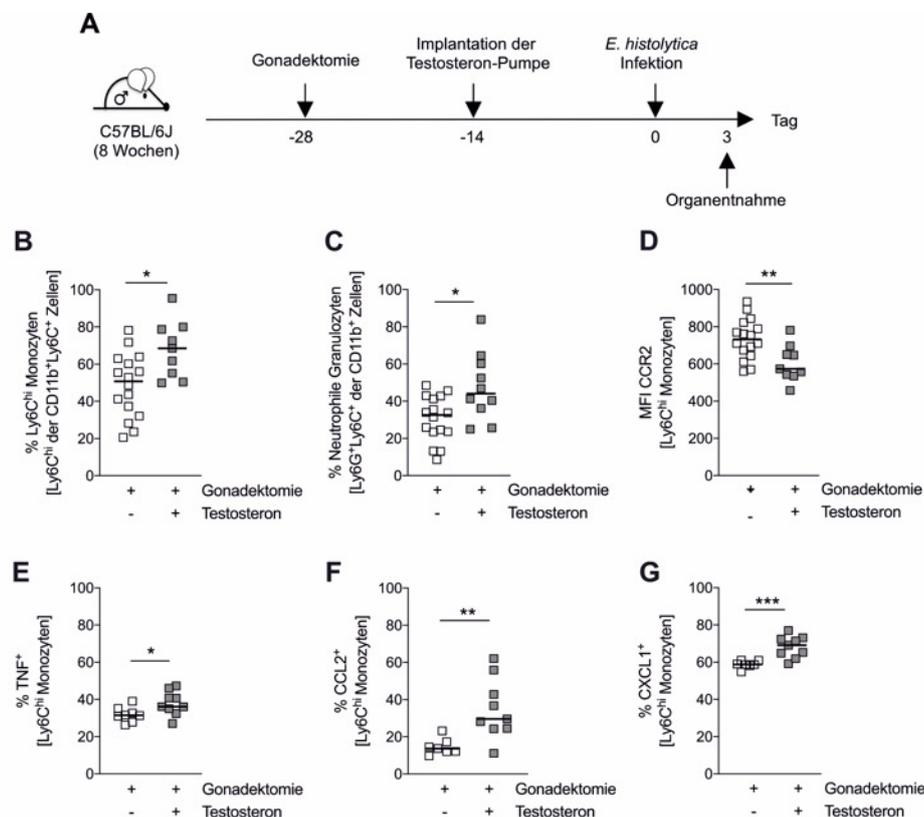


Abbildung 12: Einfluss von Testosteron auf hepatische Ly6C^{hi} Monozyten und neutrophile Granulozyten in der *E. histolytica* Infektion. (A) Schematischer Versuchsaufbau: 8 Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse wurden kastriert und ihnen nach zwei Wochen eine osmotische Pumpe mit Testosteron oder Trägerlösung subkutan implantiert. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Mäuse intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. 3 Tage nach Infektion wurden die Leberlymphozyten isoliert und die Ly6C^{hi} Monozyten (B), neutrophile Granulozyten (C) sowie die CCR2 Expression der Ly6C^{hi} Monozyten (D) mittels Durchflusszytometrie analysiert (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=10-16). Für die FACS Analyse der intrazellulären TNF (E), CCL2 (F) und CXCL1 (G) Expression der Ly6C^{hi} Monozyten wurden die Leberlymphozyten für 4 h mit PMA (50 ng/mL) und Ionomycin (500 ng/mL) restimuliert; nach 1 h erfolgte die Zugabe von 50 µg/mL Brefeldin A (n=7-9). (Mann-Whitney U Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Schließlich wurde untersucht, ob Androgene auch humane Monozyten beeinflussen können. PBMCs aus dem Spenderblut gesunder männlicher und weiblicher Probanden wurden aufgereinigt und die CD14⁺ und CD16⁺ Monozyten mittels negativer Selektion über magnetische *Beads* isoliert. Die Aufreinigung wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft und nur die Proben in die Analyse inkludiert, bei denen über 90 % der Zellen das humane MHC-II Molekül HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen, Isotyp DR*) sowie CD14 oder CD16 exprimierten (Abb. 13 A). Die Monozyten wurden mit 1 mg/mL *E. histolytica* Lysat (*E. his*) und 0,1 µg/mL LPS sowie 1-100 nM Dihydrotestosteron (DHT) stimuliert und nach 24 h die CXCL1 Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Für die Stimulation wurde DHT verwendet, da es – im Gegensatz zu Testosteron – nicht in Estradiol katalysiert werden kann und demnach eindeutige Ergebnisse liefert (Marchetti und Barth 2013). Vorversuche zeigten, dass eine Stimulation mit LPS die CXCL1 Produktion so stark induzierte (Median_{LPS} = 1925 pg/mL), dass eine weitere Stimulation mit DHT keinen großen Anstieg erzielte (Median_{LPS+DHT} = 2057 pg/mL) (Abb. 13 B). Die milde Stimulation mit *E. histolytica* Lysat (Median_{*E. his*} = 224 pg/mL) hingegen ließ einen starken, addierenden Effekt von DHT erkennen: Während die Zugabe von 1 nM DHT die CXCL1 Konzentration fast verdreifachte (Median_{*E. his*+1 nM DHT} = 612 pg/mL), wurde sie durch 10 nM DHT sogar 4,5-fach erhöht (Median_{*E. his*+10 nM DHT} = 1014 pg/mL). Die Zugabe von 100 nM DHT erhöhte die Konzentration nicht weiter, weshalb weitere Versuche mit 10 nM DHT durchgeführt wurden. Obwohl DHT in Methanol gelöst wurde, konnte die Zytotoxizität mittels Zombie UV™ Färbung und FACS Analyse ausgeschlossen werden (Abb. 13 C).

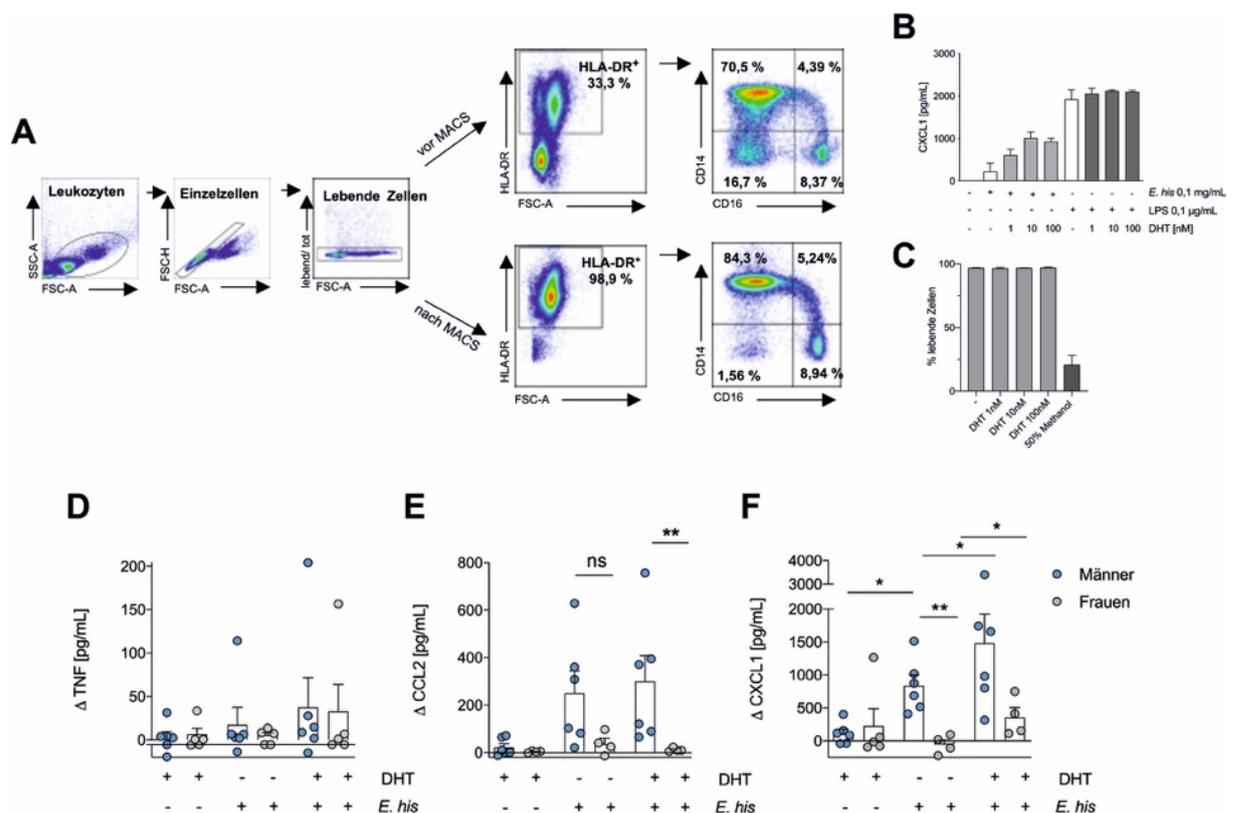


Abbildung 13: Einfluss von Dihydrotestosteron auf die Zytokinproduktion *in vitro* stimulierter humaner Monozyten. Humane PBMCs gesunder weiblicher und männlicher Probanden wurden aufgereinigt und die CD14⁺ und CD16⁺ Monozyten mittels negativer Selektion über magnetische *Beads* isoliert (MACS). Die Monozyten wurden mit 1 mg/mL *E. histolytica* (*E. his*) Lysat, 0,1 µg/mL LPS und 1-100 nM Dihydrotestosteron (DHT) stimuliert und der Zellüberstand nach 24 h analysiert. **(A)**

Überprüfung der Aufreinigung der CD14⁺ und CD16⁺ Monozyten mittels Durchflusszytometrie. **(B)** Vergleich der *E. histolytica* Lysat und LPS Stimulation auf die CXCL1 Konzentration (ELISA) sowie DHT Titration (n=2 unabhängige Experimente). **(C)** Kontrolle der Zytotoxizität von DHT mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zu Methanol (n=2 unabhängige Experimente). Die TNF **(D)**, CCL2 **(E)** und CXCL1 **(F)** Konzentrationen im Überstand *E. his* (0,1 mg/mL) und DHT (10nM) stimulierter Monozyten wurden mittels *Bead*-basiertem Immunoassay (LEGENDplex) (TNF, CXCL1) oder ELISA (CCL2) bestimmt. Dargestellt sind die Konzentrationen abzüglich der Werte für die unstimulierte Probe (fusionierte Daten von drei unabhängigen Experimenten; n=4-6). (Mittelwerte \pm Standardfehler, Student's T-Test; *p < 0,05; **p < 0,01).

CD14⁺ und CD16⁺ Monozyten männlicher und weiblicher Probanden wurden mit 0,1 mg/mL *E. his* Lysat und 10 nM DHT für 24 h stimuliert und die Konzentration von TNF, CCL2 und CXCL1 im Überstand mittels *Bead*-basiertem Immunoassay (LEGENDplex) (TNF, CXCL1) oder ELISA (CCL2) analysiert. Da die Probanden bereits in der Mediumkontrolle starke Unterschiede aufwiesen, wurden die Daten auf die Werte für die unstimulierte Probe normalisiert. Während die TNF Konzentration unverändert blieb (Abb. 13 D), zeigte sich ein Trend für eine höhere CCL2 Konzentration in den Überständen *E. his*- und DHT-stimulierter Monozyten männlicher Probanden im Vergleich zu denen weiblicher Probanden (p = 0,0667) (Abb. 13 E). Der größte Einfluss war auf die CXCL1 Produktion zu verzeichnen (Abb. 13 F). Mit *E. his* Stimulation stieg die CXCL1 Konzentration im Überstand der Monozyten männlicher Probanden (p < 0,5) und führte zu signifikant höheren Werten im Vergleich zu den unveränderten Konzentrationen in den Überständen stimulierter Monozyten weiblicher Probanden (p < 0,01). Bei der simultanen Stimulation mit *E. his* und DHT bewirkte DHT einen zusätzlichen Anstieg der CXCL1 Produktion durch Monozyten, unabhängig vom Geschlecht der Probanden.

Es konnte demonstriert werden, dass Androgene sowohl im Mausmodell für die *E. histolytica* Infektion als auch im humanen *in vitro* Stimulationsversuch den pro-inflammatorischen Charakter von Monozyten beeinflussen können.

3.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der adaptiven Immunantwort: Die Rolle von HIF-1 α in der Differenzierung regulatorischer und Th17 Immunzellen

Während einer Entzündung kommt es durch den hohen Sauerstoffverbrauch infiltrierender Immunzellen zu einer Hypoxie im Gewebe und einem Anstieg des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (Frede *et al.* 2006; Ben-Shoshan *et al.* 2008; Campbell *et al.* 2014). HIF-1 α kann direkt die Expression von Zielgenen induzieren und zelluläre Prozesse wie Erythropoese, Angiogenese und Glykolyse modulieren (Semenza 2004; Taylor und Colgan 2017). Ein prominentes Beispiel ist die Regulierung der Th17 und Treg Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen (Dang *et al.* 2011).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei der murinen *E. histolytica* Infektion IL-17 induziert wird. Der IL-17 sowie IL-23p19 *Knockout*, bei der die IL-17 Induktion gestört ist, führte außerdem zu kleineren Abszessen (Noll *et al.* 2016). IL-17 ist daher wichtig für die Abszessentstehung. Die Rolle von IL-17-produzierenden Th17 Zellen in der murinen *E. histolytica* Infektion wurde bisher noch nicht charakterisiert. Ebenso wurden noch keine Daten zu regulatorischen T-Zellen in der murinen *E. histolytica* Infektion erhoben.

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss von HIF-1 α auf die Differenzierung von regulatorischen und Th17 Immunzellen in der *E. histolytica* Infektion untersucht.

C57BL/6J Mäuse wurden mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und HIF-1 α auf mRNA und Proteinebene analysiert. Tregs und Th17 Zellen wurden geschlechtsspezifisch charakterisiert und das Zytokinmilieu in der Leber während der Infektion bestimmt. Schließlich wurden Mäuse mit einem leberspezifischen HIF-1 α *Knockout* gezüchtet, in denen die Abszessentwicklung, das Zytokinmilieu sowie der Einfluss auf die Tregs und Th17 Zellen geschlechtsspezifisch untersucht wurde.

3.2.1 HIF-1 α , Th17 Zellen und Tregs in der *E. histolytica* Infektion

Um HIF-1 α ⁺ Zellen, Th17 Zellen und Tregs in der *E. histolytica* Infektion zu charakterisieren, wurden männliche Mäuse intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. Das mRNA Expressionsprofil der Leber von HIF-1 α , *Foxp3* und *ROR γ* (die Isoformen ROR γ t und ROR γ werden beide aus dem Gen *ROR γ* translatiert) wurde in den ersten 5 Tagen nach Infektion mittels qPCR analysiert. Innerhalb von nur 6 h wurde HIF-1 α signifikant induziert (p 0,01) (Abb. 14 A). Zu dem gleichen Zeitpunkt war außerdem eine kurzzeitige Reduktion von *ROR γ* messbar (p < 0,0001), gefolgt von einem sukzessiven Anstieg, der nach 72 h signifikant höher war als im naiven Tier (p < 0,05) (Abb. 14 B). *Foxp3* zeigte eine konträre Regulierung zu *ROR γ* – eine rapide Induktion innerhalb von 6 h nach Infektion, die nach 12 h wieder auf dem Niveau naiver Tiere war (Abb. 14 C). In den darauffolgenden Stunden stieg *Foxp3* wieder an und war nach 120 h erneut höher exprimiert als im naiven Tier.

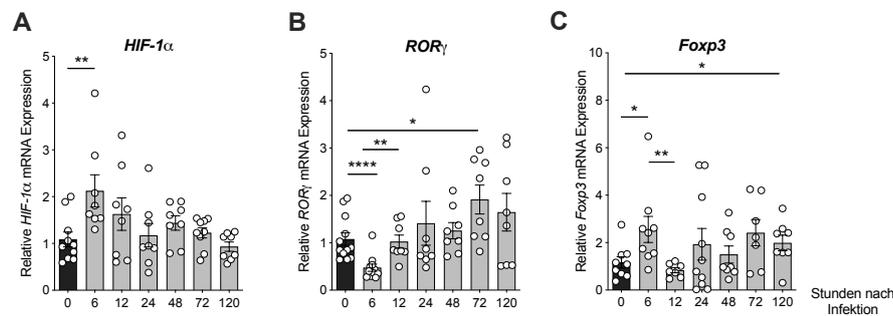


Abbildung 14: HIF-1 α , ROR γ und Foxp3 mRNA Expression der Leber während der murinen *E. histolytica* Infektion. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. HIF-1 α (A), ROR γ (B) und Foxp3 (C) mRNA Expression der Leber im Verlauf der Infektion in Relation zur GAPDH mRNA Expression (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=8-9). (Mittelwerte \pm Standardfehler; Mann-Whitney U Test; *p < 0,05; **p < 0,01; **** < 0,0001).

Um die Expression von HIF-1 α auf Proteinebene im Verlauf der *E. histolytica* Infektion zu untersuchen, wurden positive Zellen in Paraffin-eingebetteten Leberschnitten immunhistologisch mit einem α HIF-1 α Antikörper nachgewiesen. Die parallele Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) ermöglichte die Identifizierung zellulärer Strukturen. Die H&E Färbung stellt Zellplasmen rötlich und Zellkerne bläulich dar (Abb. 15 A). Während an Tag 1 nach Infektion mehrere einzelne Immuninfiltrate in der Leber zu erkennen sind, erfolgte an Tag 3 nach Infektion ein Zusammenschluss zu einem großen Abszess. An Tag 5 nach Infektion waren deutlich weniger Immunzellen im Inneren des Abszesses angefärbt, der auch in seiner Größe reduziert war. HIF-1 α ⁺

Zellen waren bereits am 1. Tag nach Infektion nachweisbar und formierten sich entlang des Abszesses. Eine Vergrößerung des Abszessrandes der Leberschnitte an Tag 3 nach Infektion ermöglichte die Identifizierung von HIF-1 α ⁺ Zellen als Hepatozyten (Abb. 15 B). Die *E. histolytica* Infektion führt demnach zu einem hypoxischen Milieu und einem Anstieg von HIF-1 α besonders in den Leberepithelzellen.

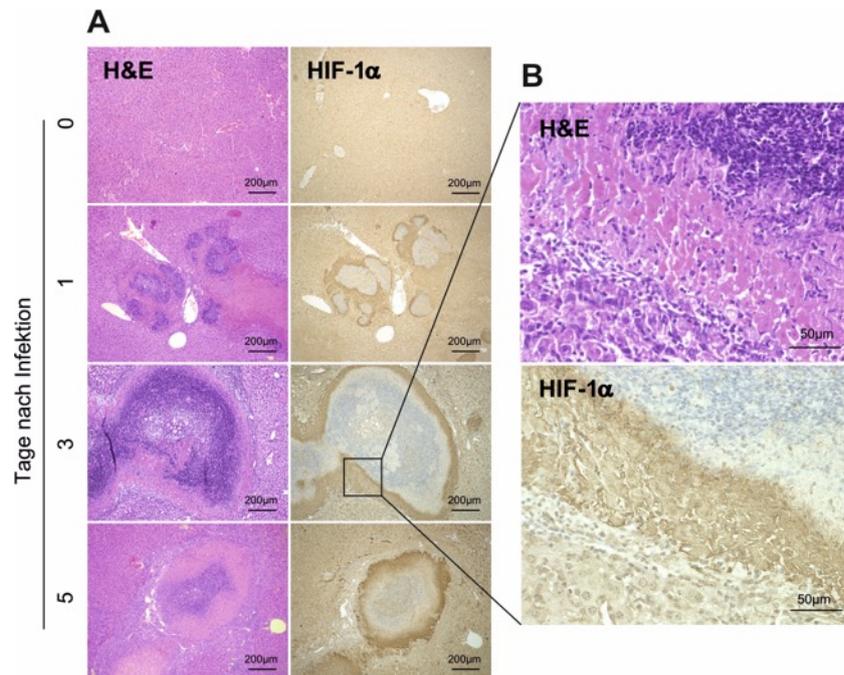


Abbildung 15: Immunhistologie der HIF-1 α ⁺ Zellen im murinen Amöbenleberabszess. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. **(A)** Hämatoxylin & Eosin (H&E) Färbung in Paraffin-eingebetteter Leberschnitte zum Nachweis zellulärer Strukturen sowie immunhistologischer Nachweis von HIF-1 α ⁺ Zellen mit einem α HIF-1 α Antikörper (Biorbyt, orb161305) im Amöbenleberabszess. **(B)** Vergrößerte Aufnahme der HIF-1 α ⁺ Zellen an Tag 3 nach Infektion (gezeigt ist je ein repräsentatives Bild von mindestens drei durchgeführten Färbungen).

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Th17 Zellen und Tregs der Leber im Verlauf der *E. histolytica* Infektion charakterisiert. Innerhalb der CD45⁺CD4⁺ β -TCR⁺ Zellen wurden die Tregs und Th17 Zellen durch die Expression ihres spezifischen Transkriptionsfaktors unterschieden – Foxp3 für Tregs und ROR γ t für Th17 Zellen (Abb. 16 A). Drei Tage nach Infektion stiegen die Th17 Zellen in der Leber signifikant an ($p < 0,05$), bereits zwei Tage später waren sie jedoch wieder auf dem Niveau naiver Tiere (Abb. 16 C). Noch stärker war die Induktion der Tregs nach drei Tagen, die an Tag 5 weiterhin erhöht war ($p < 0,0001$) (Abb. 16 D). Die erhobenen FACS Daten wurden einer Tsne (*T-distributed stochastic neighbor embedding*) Analyse unterzogen. Diese Art der Analyse ermöglicht die Visualisierung mehrdimensionaler Daten. Hierbei werden Zellen ähnlicher Morphologie und Markerexpression gruppiert. Die Analyse ergab, dass eine Population der Tregs ebenfalls ROR γ t exprimierte (Abb. 16 B) – im Folgenden als BiTregs bezeichnet. Diese Foxp3⁺ROR γ t⁺ Zellen zeichneten sich durch eine vergleichbare Expression von ROR γ t zu den Th17 Zellen (Abb. 16 F), jedoch eine sehr viel höhere Foxp3 Expression im Vergleich zu den Tregs aus ($p < 0,0001$) (Abb. 16 G). Die BiTregs zeigten des weiteren Parallelen zu der Th17 Zelldynamik. Sie stiegen

ebenfalls innerhalb von drei Tagen signifikant an ($p < 0,05$), gefolgt von einem Abfall an Tag 5 (Abb. 16 E).

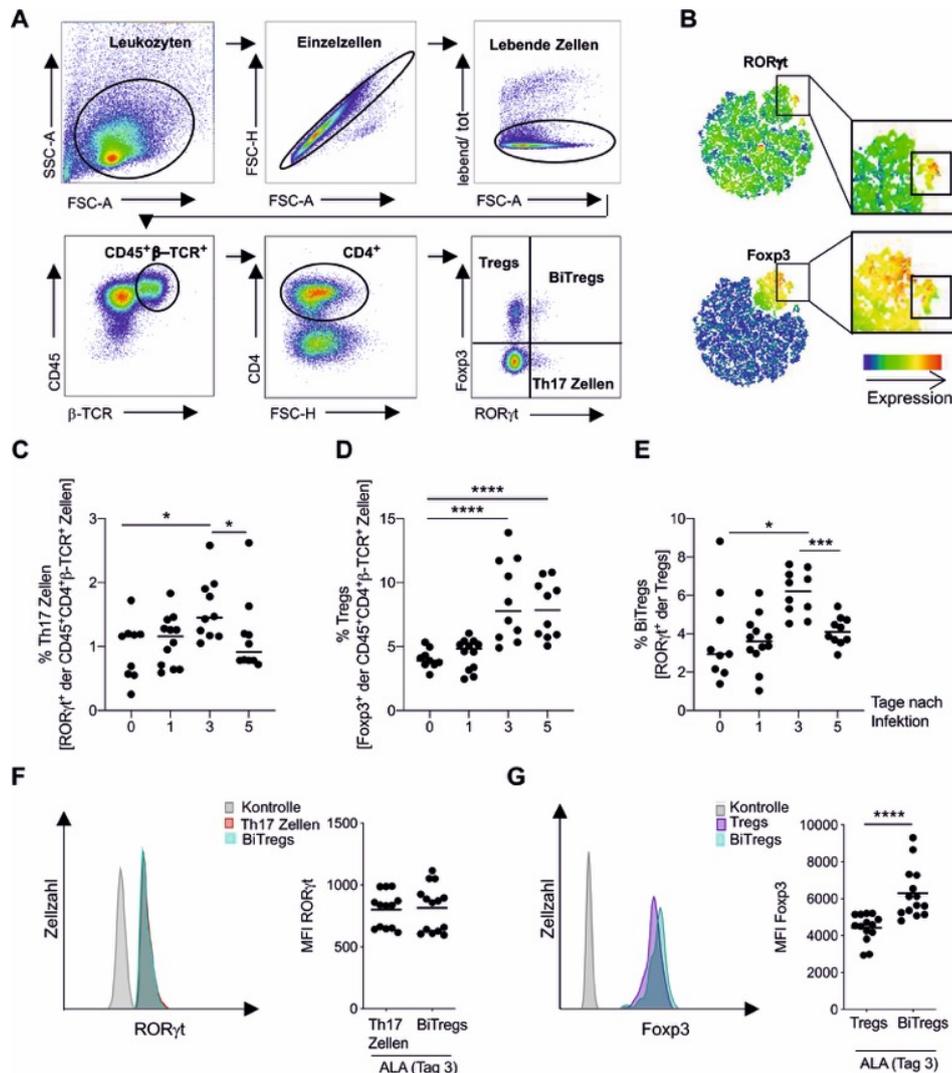


Abbildung 16: Analyse der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs im Verlauf der murinen *E. histolytica* Infektion mittels Durchflusszytometrie. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die Leberlymphozyten im Verlauf der Infektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Gating-Strategie zur Identifizierung von ROR γ t⁺ Th17 Zellen, Foxp3⁺ Tregs und Foxp3⁺ROR γ t⁺ BiTregs. **(B)** Tsne Analyse der ROR γ t und Foxp3 Expression der Leberlymphozyten an Tag 3 nach Infektion. Prozentualer Anteil der Th17 Zellen **(C)**, Tregs **(D)** und BiTregs **(E)** der CD45⁺CD4⁺β-TCR⁺ Zellen der Leber im Verlauf der Infektion. Histogramm und MFI der ROR γ t Expression **(F)** der Th17 Zellen und BiTregs sowie der Foxp3 Expression **(G)** der Tregs und BiTregs an Tag 3 nach Infektion (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=9-12). (Mann-Whitney U Test; *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).

Zusammenfassend zeigte sich ein Anstieg der HIF-1 α Expression in den Hepatozyten sowie eine Induktion der hepatischen Th17 Zellen, Tregs und BiTregs während der *E. histolytica* Infektion.

3.2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs im Verlauf der *E. histolytica* Infektion

Um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs zu untersuchen, wurde die Analyse mit naiven und infizierten männlichen und weiblichen Mäusen wiederholt. Bei Mäusen beider Geschlechter bewirkte die Infektion eine Induktion der Th17 Zellen und BiTregs. Sowohl in naiven als auch in infizierten Mäusen war der prozentuale Anteil der Th17

Zellen jedoch größer in männlichen Mäusen (Abb. 17 A). Ebenso war der prozentuale Anteil der BiTregs in männlichen naiven Mäusen größer als in weiblichen Mäusen (Abb. 17 C). Die Th17 Zellen und BiTregs zeigten zwar eine erhöhte Expression von ROR γ t unter der *E. histolytica* Infektion ($p < 0,0001$), jedoch keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in der MFI (Abb. 17 D-F). Während naive männliche Mäuse einen höheren prozentualen Anteil an Tregs aufwiesen als weibliche Mäuse ($p < 0,001$), war dieser Unterschied bei der Infektion nicht mehr zu beobachten. Bei Mäusen beider Geschlechter kam es zu einer starken Induktion der Tregs (Abb. 17 B). Die Tregs weiblicher Mäuse zeigten jedoch eine erhöhte Expression von Foxp3 im Vergleich zu männlichen Mäusen (Abb. 17 G, H). Der Unterschied war besonders stark in der Infektion ($p < 0,001$), aber bereits im naiven Tier signifikant ($p < 0,05$) trotz geringerer Tregs in den weiblichen Mäusen. Diese erhöhte Foxp3 MFI war auch auf den BiTregs der weiblichen Mäuse zu verzeichnen (Abb. 17 I).

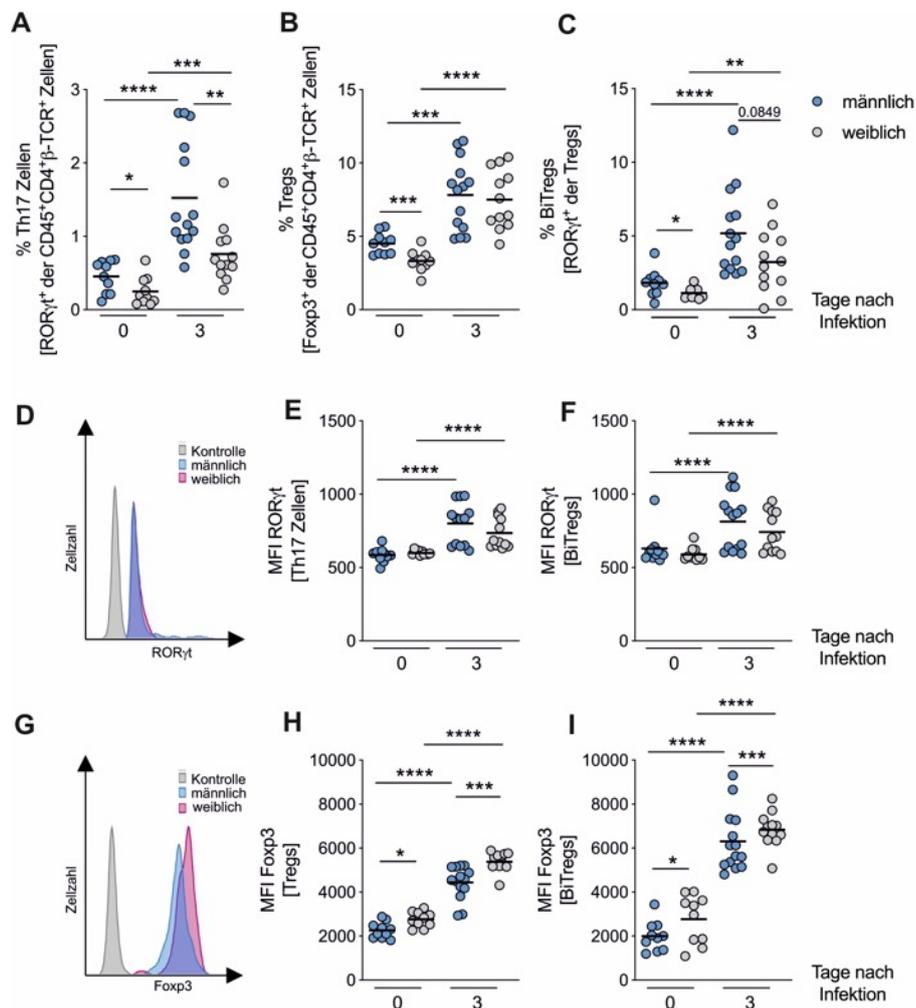


Abbildung 17: Geschlechtsspezifische Analyse der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs im Verlauf der murinen *E. histolytica* Infektion mittels Durchflusszytometrie. Männliche und weibliche C57BL/6J Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die Leberlymphozyten an Tag 3 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Prozentualer Anteil der Th17 Zellen (A), Tregs (B) und BiTregs (C) der $\text{CD45}^+\text{CD4}^+\beta\text{-TCR}^+$ Zellen der Leber naiver und infizierter Mäuse. Histogramm (D) und MFI der ROR γ t Expression in Th17 Zellen (E) und BiTregs (F) sowie Histogramm (G) und MFI der Foxp3 Expression von Tregs (H) und BiTregs (I) naiver und infizierter Mäuse (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; $n=10-14$). (Mann-Whitney U Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Die geschlechtsspezifische Analyse veranschaulichte, dass der prozentuale Anteil an hepatischen Th17 Zellen und BiTregs in männlichen Mäusen höher war als in weiblichen Mäusen. Foxp3 war zudem in Tregs und BiTregs weiblicher Mäuse höher exprimiert als in denen männlicher Mäuse.

3.2.3 Auswirkungen des leberspezifischen HIF-1 α *Knockouts* auf die Abszessentwicklung sowie hepatischen Th17 Zellen, Tregs und BiTregs

Um die Rolle von HIF-1 α in der *E. histolytica* Infektion zu analysieren, wurden Mäuse mit einem leberspezifischen HIF-1 α *Knockout* (*Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse) nach dem *Cre/loxP* System generiert (Abb. 18 A). Eine genaue Beschreibung der Zucht findet sich in Abschnitt 2.5.1. Männliche und weibliche *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* und *AlbCre* Kontrollmäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* infiziert und der *Knockout* auf mRNA Ebene in männlichen Mäusen mittels qPCR bestätigt (Abb. 18 B). An Tag 3 nach Infektion wurde der Abszess ausgeschnitten und das Gewicht mit einer Feinwaage bestimmt. *AlbCre* Mäuse zeigten die gleiche geschlechtsspezifische Abszessausbildung, wie er von C57BL/6J Mäusen bekannt ist: weibliche Mäuse entwickelten nur sehr kleine Abszesse, männliche große ($p < 0,0001$) (Abb. 18 C). Der HIF-1 α *Knockout* hatte einen konträren Einfluss auf die Abszessentwicklung in der männlichen und weiblichen Maus. Während der *Knockout* in männlichen Mäusen an Tag 3 nach Infektion zu kleineren Abszessen führte ($p < 0,001$), zeigten die weiblichen Mäuse tendenziell größere Läsionen ($p = 0,0744$). Diese gegenteilige Beeinflussung führte zu gleichgroßen Abszessen in männlichen und weiblichen *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäusen.

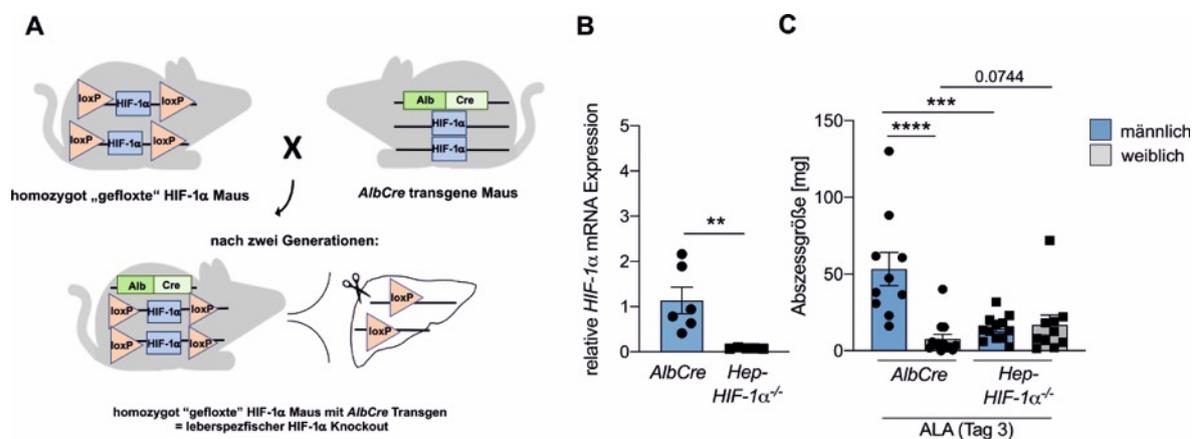


Abbildung 18: Einfluss des leberspezifischen HIF-1 α *Knockouts* auf die Abszessentwicklung. (A) Schematische Darstellung der Zucht von Mäusen mit einem leberspezifischen HIF-1 α *Knockout* (*Hep-HIF-1 α ^{-/-}*). Weibliche und männliche *AlbCre* und *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. (B) Verifizierung des HIF-1 α *Knockouts* mittels qPCRs ($n=5-6$, männlich). (C) An Tag 3 nach Infektion wurde der Abszess aus dem infizierten Leberlappen ausgeschnitten und das Gewicht mit einer Feinwaage bestimmt (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; $n=10-13$). (Mittelwerte \pm Standardfehler; Mann-Whitney U Test; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Um zu untersuchen, ob der Einfluss von hepatischem HIF-1 α auf die Abszessentwicklung im Zusammenhang mit einer Induktion von Th17 Zellen, Tregs und BiTregs steht, wurden diese Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie an Tag 3 nach Infektion in *AlbCre* und *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäusen untersucht (Abb. 19 A, B). Sowohl männliche als auch weibliche *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der Th17 Zellen und BiTregs, wodurch der Geschlechtsdimorphismus in diesen Zellpopulationen gänzlich aufgehoben wurde (Abb. 19 C, E).

Zudem bewirkte der *Knockout* eine Reduktion von Tregs im weiblichen Tier ($p < 0,05$), während in männlichen Mäusen keine Veränderung beobachtet wurde (Abb. 19 D). Die Höhe der ROR γ t und Foxp3 Expression wurde (bis auf einen Trend zu höherer Foxp3 MFI in Männchen, $p < 0,0526$) durch den *Knockout* nicht beeinflusst (Abb. 19 F-I).

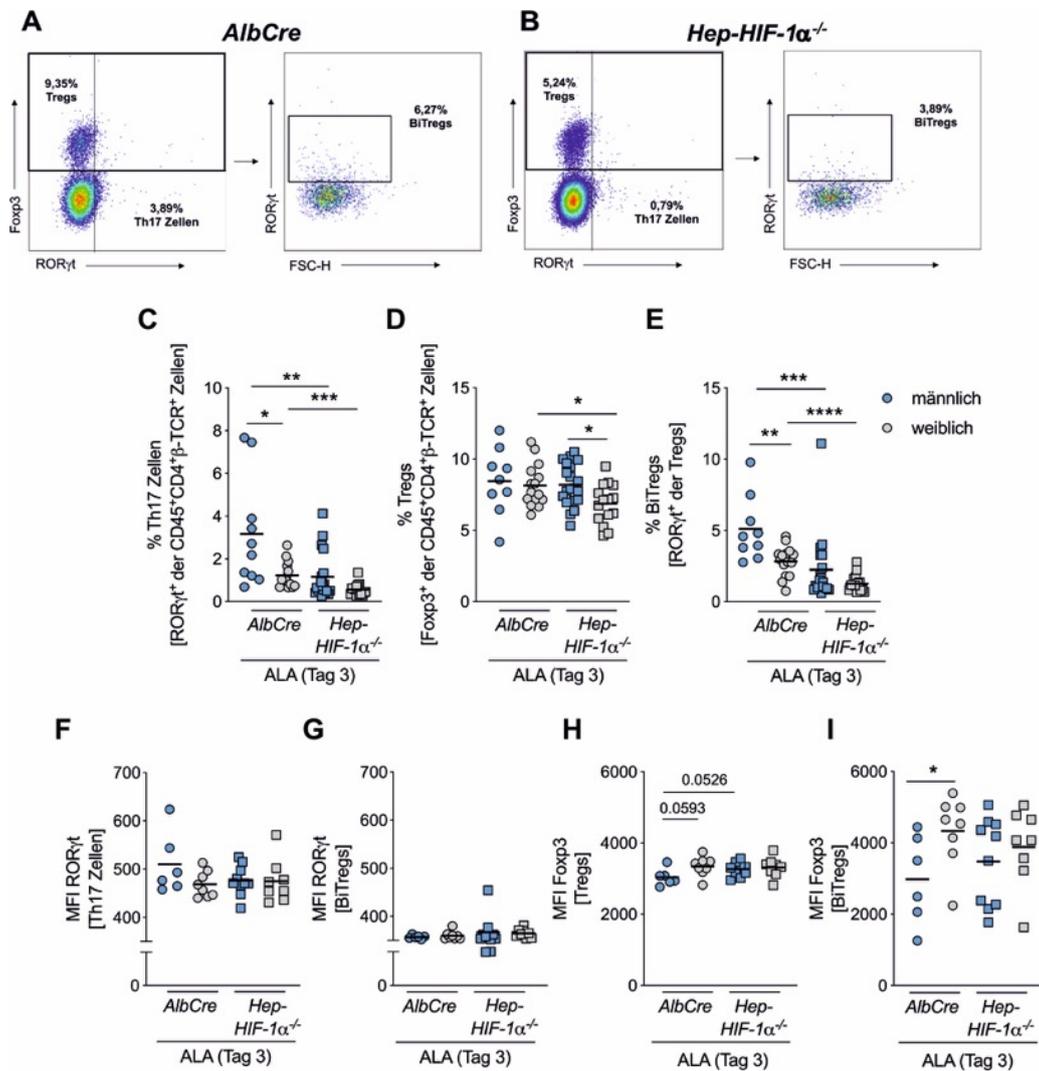


Abbildung 19: Einfluss des leberspezifischen HIF-1 α Knockouts auf die Th17 Zellen, Tregs und BiTregs in der murinen *E. histolytica* Infektion. Männliche und weibliche *AlbCre* und *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und die Leberlymphozyten an Tag 3 nach Infektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Beispielhafte Dotplots der hepatischen Th17 Zellen, Tregs und BiTregs aus *AlbCre* (**A**) und *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* (**B**) Mäusen. Prozentualer Anteil der Th17 Zellen (**C**), Tregs (**D**) und BiTregs (**E**) der CD45⁺CD4⁺ β -TCR⁺ Zellen der Leber (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=10-19). ROR γ t MFI der Th17 Zellen (**F**) und BiTregs (**G**) sowie Foxp3 MFI der Tregs (**H**) und BiTregs (**I**) (dargestellt ist ein Experiment von zwei durchgeführten, unabhängigen Experimenten n=6-10). (Mann-Whitney U Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Zusammenfassend demonstrierte die Untersuchung des leberspezifischen HIF-1 α *Knockouts* einen protektiven Einfluss in männlichen Mäusen, während weibliche Mäuse tendenziell größere Abszesse entwickelten. Der *Knockout* bewirkte zudem reduzierte Anteile an hepatischen Th17 Zellen und BiTregs in Mäusen beider Geschlechter und Tregs nur in weiblichen Mäusen. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Abszessentwicklung sowie Th17 Zellen und BiTregs wurden durch den HIF-1 α *Knockout* aufgelöst.

3.2.4 mRNA Expressionsprofil regulatorischer Zytokine in der Leber im Verlauf der *E. histolytica* Infektion

Über die Bindung an *Hypoxia Response Elements* in den Promotorregionen von Zielgenen kann HIF-1 die Expression dieser direkt steuern (Semenza 2009). Eine Möglichkeit, wie der Anstieg von HIF-1 α in den Hepatozyten während der *E. histolytica* Infektion die Th17 und Treg Zelldifferenzierung indirekt beeinflussen könnte, ist über eine Modulation des Zytokinmilieus. TGF- β , IL-6, IL-21 und IL-23 sind wichtige Zytokine für die Th17 Zelldifferenzierung, während TGF- β und IL-2 die Differenzierung zu Tregs induzieren (Zhou *et al.* 2009). Zunächst wurde das mRNA Expressionsprofil dieser regulatorischen Zytokine im Verlauf der Infektion in der Leber männlicher C57BL/6J Mäuse mittels qPCR untersucht.

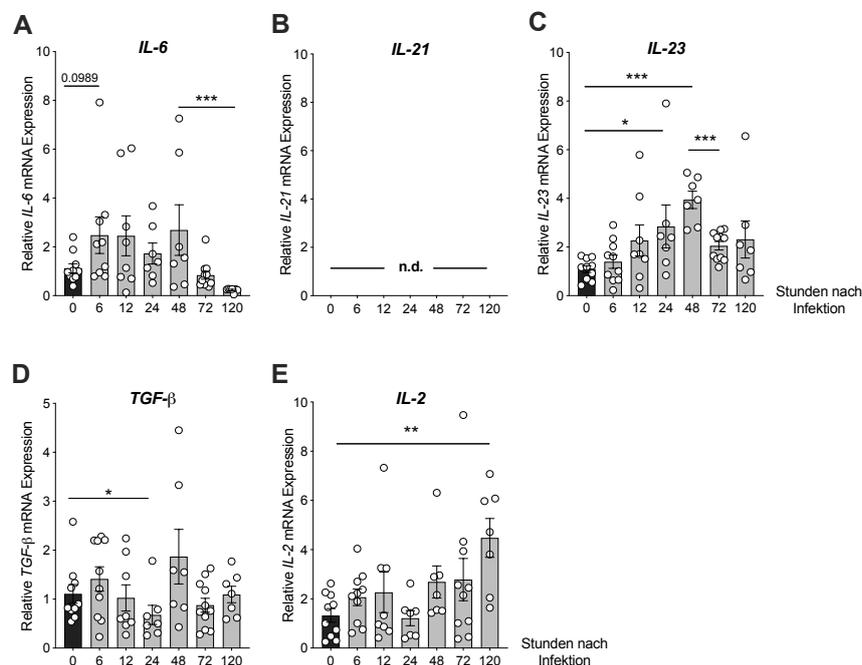


Abbildung 20: mRNA Expressionsprofil regulatorischer Zytokine in der Leber *E. histolytica*-infizierter C57BL/6J Mäuse. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und das mRNA Expressionsprofil von *IL-6* (A), *IL-21* (B), *IL-23* (C), *TGF- β* (D) und *IL-2* (E) der Leber mittels qPCR in Relation zur *GAPDH* mRNA Expression bestimmt (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=7-12). (Mittelwerte \pm Standardfehler; Mann-Whitney U Test; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

IL-6 wurde auf mRNA Ebene in der Leber während der *E. histolytica* Infektion nur leicht induziert ($p < 0,0989$) (Abb. 20 A). Von 48 h auf 120 h nach Infektion konnte ein starker Abfall von *IL-6* gemessen werden ($p < 0,001$). *IL-21*, ein weiteres Zytokin mit dem Th17 Zellen induziert werden können, war weder bei naiven noch infizierten Mäusen in der Leber nachweisbar (Abb. 20 B). Die Infektion bewirkte einen sukzessiven Anstieg von *IL-23* in den ersten zwei Tagen, der nach 24 h statistische Signifikanz erreichte ($p < 0,05$) (Abb. 20 C). 48^oh nach Infektion war die *IL-23* mRNA Expression auf ihrem Maximalwert, gefolgt von einem rapiden Abfall innerhalb weiterer 12 h ($p < 0,001$) – vergleichbar mit dem Abfall der *IL-6* mRNA Expression. Das Zytokin *TGF- β* , welches sowohl an der Treg als auch Th17 Differenzierung beteiligt ist, zeigte keinen Anstieg während der Infektion lediglich einen Abfall nach 24 h ($p < 0,05$) (Abb. 20 D). Die Expression von *IL-2* stieg

ebenfalls sukzessive im Verlauf an, war im Vergleich zur *IL-23* Expression jedoch erst nach 120 h signifikant ($p < 0,01$) (Abb. 20 E).

Die Analyse des Zytokinmilieus ergab einen Anstieg der *IL-23* und *IL-2* mRNA im Verlauf der *E. histolytica* Infektion.

3.2.5 Einfluss des leberspezifischen HIF-1 α Knockouts auf das Zytokinprofil während der *E. histolytica* Infektion

Um eine mögliche Beeinflussung des Zytokinmilieus in der Leber durch den HIF1 α *Knockout* zu überprüfen, wurden männliche und weibliche *AlbCre* und *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. An Tag 3 nach Infektion wurde die RNA der Leber isoliert und die Genexpression mittels qPCR überprüft. Männliche *AlbCre* Mäuse zeigten eine stärkere *IL-6* Expression im Vergleich zu weiblichen Mäusen ($p < 0,01$) (Abb. 21 A). In der *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Maus war die *IL-6* mRNA Expression signifikant verringert ($p < 0,01$) und unterschied sich nicht mehr von dem der weiblichen Mäuse. Auch *IL-23* war in infizierten männlichen *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäusen höher exprimiert als in weiblichen Mäusen ($p < 0,05$) (Abb. 21 B). In *AlbCre* Mäusen war dieser geschlechtsspezifische Unterschied in der *IL-23* mRNA aufgrund hoher Schwankungen nicht signifikant ($p = 0,0524$). Der *Knockout* hatte keinen Einfluss auf die Expression der *IL-23* mRNA. Die *IL-2* Expression war sowohl in der männlichen als auch weiblichen Maus im HIF-1 α *Knockout* reduziert ($p < 0,001$ und $p = 0,0503$) (Abb. 21 D). Die Reduktion war stärker in der männlichen Maus, wodurch die *IL-2* Expression in der Leber weiblicher *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse signifikant höher war im Vergleich zu den männlichen Mäusen ($p < 0,05$). Während *ROR γ* auf mRNA Ebene vom HIF-1 α *Knockout* nicht beeinflusst war, war die *Foxp3* mRNA in weiblichen Mäusen reduziert ($p < 0,05$) (Abb. 21 C, E).

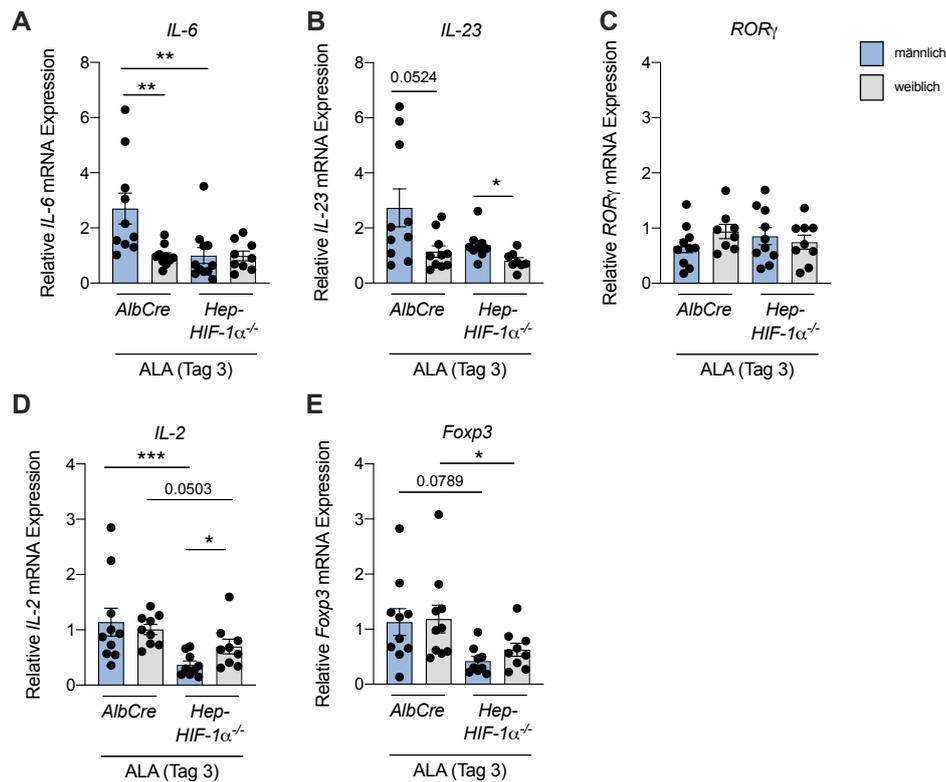


Abbildung 21: Geschlechtsspezifische Unterschiede im mRNA Expressionsprofil regulatorischer Zytokine in der Leber *E. histolytica*-infizierter *Hep-HIF-1α^{-/-}* Mäuse. Männliche und weibliche *AlbCre* und *Hep-HIF-1α^{-/-}* Mäuse wurden intrahepatisch mit 2×10^5 *E. histolytica* Trophozoiten infiziert und das mRNA Expressionsprofil von *IL-6* (A), *IL-23* (B), *ROR_γ* (C), *IL-2* (D) und *Foxp3* (E) der Leber an Tag 3 nach Infektion mittels qPCR in Relation zur *GAPDH* mRNA Expression bestimmt (n=6-8). (Mittelwerte ± Standardfehler; Mann-Whitney U Test; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Um zu überprüfen, ob auch die intrazelluläre Zytokinproduktion der CD4⁺ Zellen vom HIF-1α *Knockout* beeinflusst wurde, wurden die Leberlymphozyten *E. histolytica*-infizierter *AlbCre* und *Hep-HIF-1α^{-/-}* Mäuse für 6 h mit 50 ng/mL PMA und 500 ng/mL Ionomycin restimuliert. Um eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu ermöglichen, wurde nach 1 h 50 µg/mL Brefeldin A hinzugefügt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aufgrund veränderter Expressionen durch die Restimulation war eine genaue Charakterisierung der Th17 und Tregs über ROR_γt und Foxp3 nicht möglich. Während die Th17 Zellen im HIF-1α *Knockout* in Mäusen beider Geschlechter reduziert waren (siehe Abschnitt 3.2.3), konnte eine Abnahme der IL-17⁺ Zellen unter dem HIF-1α *Knockout* nur in männlichen Mäusen gemessen werden (p < 0,05) (Abb. 22 A). Weibliche *AlbCre* und *Hep-HIF-1α^{-/-}* Mäuse produzierten gleiche Mengen IL-17, wodurch im HIF-1α *Knockout* im Vergleich zu den männlichen Mäusen signifikant mehr IL-17 von weiblichen Mäusen produziert wurde (p < 0,05). Obwohl eine Reduktion der Tregs durch den HIF-1α *Knockout* nur in weiblichen Mäusen beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.3), waren IL-10⁺ Zellen sowohl in Lebern männlicher als auch weiblicher *Hep-HIF-1α^{-/-}* Mäuse reduziert im Vergleich zu den *AlbCre* Kontrollmäusen (p < 0,05) (Abb. 22 B).

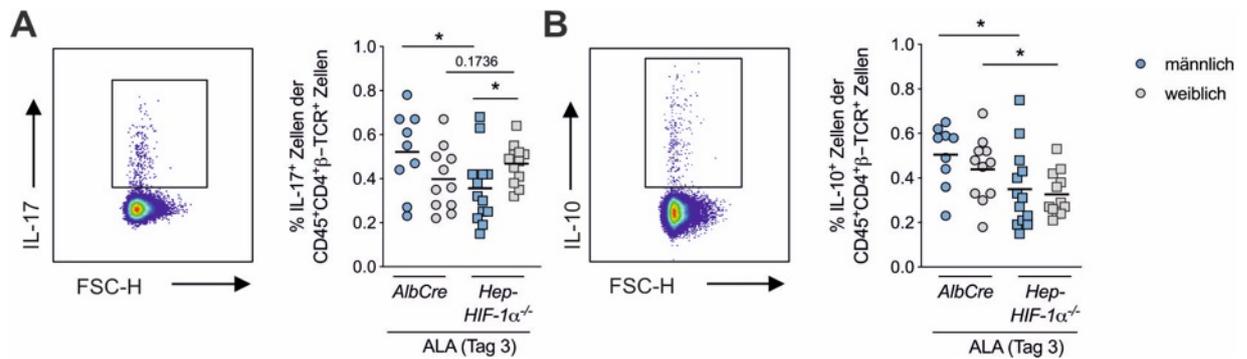


Abbildung 22: Geschlechtsspezifische Unterschiede der intrazellulären IL-17 und IL-10 Produktion hepatischer CD4⁺ T-Zellen *E. histolytica*-infizierter *Hep-HIF-1α*^{-/-} Mäuse. Männliche und weibliche *AlbCre* und *Hep-HIF-1α*^{-/-} Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert. An Tag 3 nach Infektion wurden die Leberlymphozyten aufgereinigt, für 6 h mit 50 ng/mL PMA und 500 ng/mL Ionomycin restimuliert. Nach 1 h erfolgte die Zugabe von 50 µg/mL Brefeldin A. Die intrazelluläre Produktion von IL-17 und IL-10 wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gating-Strategie und prozentualer Anteil der IL-17⁺ Zellen (**A**) und IL-10⁺ Zellen (**B**) der CD45⁺CD4⁺β-TCR⁺ Zellen (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=9-13). (Mann-Whitney U Test; *p < 0,05).

Zusammenfassend führte der HIF-1α *Knockout* in männlichen Mäusen zu einer Reduktion der *IL-6* und *IL-2* mRNA und in weiblichen Mäusen zu einer Reduktion der *Foxp3* mRNA. Zudem produzierten weniger CD4⁺ T-Zellen aus männlichen *Hep-HIF-1α*^{-/-} Mäusen IL-17 und aus *Hep-HIF-1α*^{-/-} Mäusen beider Geschlechter IL-10 im Vergleich zu Kontrolltieren.

4 Diskussion

Männer und Frauen unterscheiden sich maßgeblich in ihren angeborenen und adaptiven Immunantworten. Während Männer ein höheres Risiko für parasitäre Infektionskrankheiten und maligne Krebserkrankungen zeigen, treten Autoimmunerkrankungen häufiger in Frauen auf (Cai *et al.* 2016; Klein und Flanagan 2016; Sellau *et al.* 2020). Um einzelne Krankheiten besser therapieren zu können, ist es von fundamentaler Bedeutung, die molekularen, hormonellen und immunologischen Mechanismen aufzuklären, die diesem Geschlechtsdimorphismus zugrunde liegen.

Die intestinale Infektion mit dem protozoischen Parasiten *E. histolytica* ist ein Beispiel für eine Infektion mit geschlechtsspezifischem Krankheitsverlauf. Männer sind viel häufiger von einer schweren Verlaufsform in Form eines Amöbenleberabszesses betroffen. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell spiegelt diese geschlechtsspezifische Verteilung wider. Nach intrahepatischer *E. histolytica* Infektion bilden männliche Mäuse deutlich größere Abszesse als weibliche Mäuse (Lotter *et al.* 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der angeborenen und adaptiven Immunantwort während der *E. histolytica* Infektion untersucht. Als Aspekt der angeborenen Immunantwort wurden die Monozyten und neutrophilen Granulozyten geschlechtsspezifisch mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Hierbei wurde außerdem die Rolle von CXCL1 in der Abszessentstehung untersucht. Letztlich wurde geprüft, welchen Einfluss die Testosteron-Substitution auf die Monozyten und neutrophilen Granulozyten in der *E. histolytica* Infektion ausübt. Als Aspekt der adaptiven Immunantwort bezüglich einer *E. histolytica* Infektion wurde die Modulation der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung durch HIF-1 α in der Leber analysiert. Die Tregs, Th17 Zellen und das Zytokinmilieu wurde in C57BL6/J Mäusen untersucht. Anschließend wurde die Rolle von HIF-1 α in der Abszessentstehung und T-Zelldifferenzierung durch Mäuse mit einem Hepatozyten-spezifischen HIF-1 α *Knockout* aufgeklärt.

4.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den klassischen Monozyten während der *E. histolytica* Infektion

Inflammatorische Ly6C^{hi} Monozyten tragen durch die Phagozytose toxischer Moleküle und durch die Produktion pro-inflammatorischer Moleküle wie ROS, TNF, IL-1 β und IL-6 primär zur Pathogenabwehr bei. Während das Fehlen von Monozyten in vielen Infektionen ein verstärktes Krankheitsbild zur Folge hat (Auffray *et al.* 2009; Shi und Pamer 2011), tragen sie in der *E. histolytica* Infektion maßgeblich zur Manifestierung des Amöbenleberabszesses bei. CCR2^{-/-} Mäuse, bei denen die Rekrutierung inflammatorischer Monozyten gestört ist, bilden nach *E. histolytica* Infektion nur kleine Abszesse aus, während der adoptive Transfer von CCR2⁺ Monozyten in die CCR2^{-/-} Maus größere Läsionen zur Folge hatte (Helk *et al.* 2013). Neben den CCR2⁺ Ly6C^{hi} Monozyten sind außerdem Kupffer-Zellen und das Zytokin TNF entscheidende Parameter für die Immunpathologie im ALA (Helk *et al.* 2013). Die Testosteron-Substitution von Mäusen veranschaulichte zudem, dass das Geschlechtshormon Testosteron die Abszessentwicklung maßgeblich begünstigt (Lotter *et al.*

2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die inflammatorischen Monozyten geschlechtsspezifisch charakterisiert und untersucht, ob Androgene den pro-inflammatorischen Charakter der Monozyten beeinflussen können.

Die durchflusszytometrischen Analysen demonstrierten, dass bereits naive männliche Mäuse mehr Ly6C^{hi} Monozyten im Blut aufwiesen als weibliche Mäuse (Abb. 6 B). Kay *et al.* konnten ebenfalls einen höheren prozentualen Anteil an Monozyten in den Milzen naiver männlicher Mäuse nachweisen (Kay *et al.* 2015). Während sich naive männliche und weibliche Mäuse in den Anteilen hepatischer Ly6C^{hi} Monozyten nicht unterschieden, führte die *E. histolytica* Infektion zu einem signifikanten Anstieg der Ly6C^{hi} Monozyten in der Leber männlicher Mäuse (Abb. 6 G). Diese geschlechtsspezifische Induktion konnte auch in Mäusen mit Zymosan-induzierter Peritonitis beobachtet werden, in denen in männlichen Mäusen mehr Monozyten ins Blut und in die Bauchhöhle migrierten im Vergleich zu weiblichen Mäusen (Kay *et al.* 2015). Die Ergebnisse wurden ebenfalls durch SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus*) infizierte Mäuse bestätigt, in denen die Infektion eine höhere Akkumulation inflammatorischer Monozyten in den Lungen männlicher Mäuse bewirkte (Channappanavar *et al.* 2017). Wie auch in der *E. histolytica* Infektion waren die männlichen Mäuse von der SARS-CoV Infektion schlimmer betroffen und die Depletion inflammatorischer Monozyten schützte vor der letalen Infektion. Es gibt kontroverse Ergebnisse zu der Frage, ob sich die gleiche geschlechtsspezifische Verteilung im Menschen wiederfindet. Während eine Studie belegt, dass in Männern prozentual mehr klassische Monozyten und in Frauen mehr nicht-klassische Monozyten zirkulieren (Jiang *et al.* 2014), konnten an anderer Stelle mehr nicht-klassische Monozyten in Männern (Hearps *et al.* 2012) verzeichnet oder sogar keine unterschiedliche Verteilung festgestellt werden (Sellau *et al.* 2020). In letzterer Studie waren die klassischen Monozyten aus Männern durch eine höhere CCR2 Expression charakterisiert. Dieser Geschlechtsdimorphismus zeigte sich auch in den Ly6C^{hi} Monozyten aus Blut und Knochenmark naiver Mäuse (Abb. 6 E, 7 D). Männliche Mäuse besitzen demnach ein größeres Reservoir an CCR2⁺Ly6C^{hi} Monozyten im Knochenmark. CCL2 war außerdem im Serum *E. histolytica*-infizierter männlicher Mäuse und im Serum asymptomatisch *E. histolytica*-infizierter Männer höher konzentriert als in weiblichen Individuen (Bernin *et al.* 2014; Sellau *et al.* 2020). Durch die höhere CCR2 Expression auf den klassischen Monozyten und die höhere CCL2 Konzentration im Serum scheinen männliche Individuen daher für eine schnellere Rekrutierung von Monozyten prädestiniert zu sein. Diese Annahme wird durch eine Transkriptom-Analyse unterstützt, in der klassische Monozyten aus Männern nach LPS Stimulation eine höhere Anzahl an Genen exprimierten, die mit Migrationsprozessen assoziiert werden (Sellau *et al.* 2020). CCR2 spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Ly6C^{hi} Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen. So migrierten in CCR2^{-/-} Mäuse weniger Ly6C^{hi} Monozyten in die Milz nach *Listeria monocytogenes* Infektion (Serbina und Pamer 2006) oder in die Leber nach *E. histolytica* Infektion (Helk *et al.* 2013). In der *Listeria monocytogenes* Infektion war die geringere Infiltration von Monozyten in die Milz durch einen Verbleib im Knochenmark zu erklären (Serbina und Pamer 2006). Die Studie von Serbina und Pamer veranschaulichte darüber hinaus, dass CCR2 essentiell für den Austritt der Monozyten aus dem Knochenmark ist. Durch die intraperitoneale Applikation von Mercaptoessigsäure wurde in Mäusen eine lokale Entzündung hervorgerufen und 2,5 Tage später fluoreszenzmarkierte Monozyten aus

CCR2^{-/-} oder Wildtyp-Mäusen injiziert. Die adoptiv transferierten Zellen aus CCR2^{-/-} und Wildtyp-Mäusen migrierten in demselben Maße in den Peritonealraum. Gleiche Ergebnisse lieferte der adoptive Transfer von fluoreszenzmarkierten Knochenmarkszellen aus CCR2^{-/-} und Kontrollmäusen in *Listeria monocytogenes*-infizierte Mäuse: die Ly6C^{hi} Monozyten migrierten unabhängig von ihrer CCR2 Expression gleichermaßen in die Milz (Serbina und Pamer 2006). Diese Untersuchungen belegten, dass CCR2 essentiell für den Austritt der Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn ist, die Rekrutierung der Monozyten in das infizierte Gewebe jedoch von weiteren Chemokinen oder anderen Mechanismen abhängig sein muss.

Eine weitere Möglichkeit über die Monozyten in das infizierte Gewebe rekrutiert werden können, ist über die Interaktion des Chemokins CXCL1 mit dem spezifischen Rezeptor CXCR2. *In vitro* Migrations-Versuche (Shieh *et al.* 2014) und *in vivo* Maus- und Rattenmodelle für Herz- und Gefäßerkrankungen (Vries *et al.* 2015; Wang *et al.* 2018) belegten, dass endogenes CXCL1 die Migration von CXCR2⁺ Monozyten induzieren kann. Die Rolle von CXCL1 in der *E. histolytica* Infektion wurde bislang nicht untersucht. Eine Analyse der Seren einer vietnamesischen ALA-Kohorte belegte, dass CXCL1 in ALA-Patienten höher konzentriert war als in den Kontrollprobanden (Abb. 8 A). Gesunde männliche Probanden zeigten zudem eine höhere CXCL1 Konzentration als weibliche Probanden. Die Induktion von CXCL1 konnte auch in der murinen Infektion bestätigt werden (Abb. 8 B, C). Wie auch schon viele weitere pro-inflammatorische Zytokine wie TNF, CCL2, IL-17, IL-23, IL-6 und IL-1 β (Sellau *et al.* 2020) war CXCL1 höher in den Seren infizierter männlicher Mäuse im Vergleich zu weiblichen Mäusen. Die Depletion von CXCL1 führte zu kleineren Abszessen nach *E. histolytica* Infektion (Abb. 9 B). In der Literatur wird CXCL1 primär als Chemokin für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beschrieben (De Filippo *et al.* 2013; Su *et al.* 2018; Wang *et al.* 2018). Die neutrophilen Granulozyten unterschieden sich jedoch nicht in CXCL1-depletierten und Isotyp-behandelten Mäusen (Abb. 9 D). Der prozentuale Anteil der hepatischen Ly6C^{hi} Monozyten war nach CXCL1-Depletion jedoch signifikant verringert (Abb. 9 C). Somit ist zu schlussfolgern, dass die Induktion von CXCL1 in der *E. histolytica* Infektion zu einer Rekrutierung von Ly6C^{hi} Monozyten führt und dadurch entscheidend zur Immunpathologie in der Abszessentwicklung beiträgt.

Schließlich wurde das pro-inflammatorische Potential der Monozyten geschlechtsspezifisch analysiert. Neben CXCL1 wurden auch TNF und CCL2 untersucht, da diese beiden Zytokine ebenfalls maßgeblich an der Monozyten-vermittelten Immunpathologie im ALA beteiligt sind (Helk *et al.* 2013). Da die *in vitro* Stimulation kaum Einfluss auf die Zytokinproduktion hatte, wurde diese in *E. histolytica*-infizierten Mäusen *ex vivo* untersucht (Abb. 11). Ly6C^{hi} Monozyten stellten die Hauptquelle für alle drei Zytokine in der Leber dar. Die *E. histolytica* Infektion führte zu einer signifikanten Induktion von hepatischen TNF⁺, CXCL1⁺ und CCL2⁺ Ly6C^{hi} Monozyten besonders in männlichen Mäusen. Die Population der CCR2⁺ Ly6C^{hi} Monozyten ist demnach nicht nur in männlichen Mäusen größer, sondern zeigt *nach E. histolytica* Infektion auch einen stärkeren pro-inflammatorischen Charakter im Vergleich zu weiblichen Mäusen. Eine höhere Produktion dieser drei Zytokine in männlichen Individuen lässt sich auch mit anderen Befunden belegen. In männlichen Patienten führte eine West-Nil-Virusinfektion zu höheren CCL2 Serumkonzentrationen und milderem

Symptomen im Vergleich zu Frauen, in denen keine Änderung der CCL2 Konzentration zu verzeichnen war (Hoffman *et al.* 2019). CCL2, TNF und CXCL1 waren zudem höher exprimiert in den Lungen männlicher Mäuse nach SARS-CoV Infektion (Channappanavar *et al.* 2017). Darüber hinaus war TNF in verschiedenen Gehirnbereichen männlicher Mäuse nach *Plasmodium berghei* Infektion höher exprimiert als in weiblichen Mäusen (Legorreta-Herrera *et al.* 2018). Des Weiteren sezernierten Monozyten aus gesunden männlichen Probanden, die mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden, mehr TNF als die Monozyten weiblicher Probanden (Bouman *et al.* 2004).

Das Geschlechtshormon Testosteron trägt ebenfalls entscheidend zur Immunpathologie in der murinen *E. histolytica* Infektion bei (Lotter *et al.* 2013) und ist im Serum männlicher Individuen höher konzentriert (Lotter *et al.* 2013; Handelsman *et al.* 2015; Clark *et al.* 2019). Da sowohl der prozentuale Anteil an Ly6C^{hi} Monozyten als auch deren TNF, CCL2 und CXCL1 Produktion in männlichen Mäusen höher war, wurde untersucht, ob Testosteron einen Einfluss auf das pro-inflammatorische Potential der Monozyten hat. Testosteron-substituierte und *E. histolytica*-infizierte Mäuse zeigten eine erhöhte Infiltration an Ly6C^{hi} Monozyten in der Leber und eine erhöhte TNF, CCL2 und CXCL1 Expression (Abb. 12). Die Testosteronbehandlung von gesunden Männern im Rahmen einer randomisierten kontrollierten Studie führte ebenfalls zu einem Anstieg an zirkulierenden Monozyten (Gagliano-Juca *et al.* 2020). Der direkte Zusammenhang zwischen Testosteron und einer veränderten TNF Produktion wurde bereits vielfach untersucht. Die DHT Behandlung von weiblichen Mäusen nach LPS Inhalation induzierte TNF in den Bronchien, während TNF in kastrierten männlichen Mäusen niedriger konzentriert war (Card *et al.* 2006). Androgen-Rezeptor *Knockout* Mäuse zeigten außerdem eine verbesserte Wundheilung, die mit einer reduzierten Infiltration klassischer Monozyten und reduzierten TNF Expression assoziiert war (Lai *et al.* 2009). In kastrierten Mäusen und mit dem Anti-Androgen Flutamid-behandelten Mäusen wurde zudem eine reduzierte TNF Expression im durch Schnittwunden verletzten Hautgewebe gemessen (Ashcroft und Mills 2002). Schließlich resultierte die Testosteronbehandlung von Ratten in einer erhöhten TNF Expression in Harnröhrenwunden (Hofer *et al.* 2015). Weniger ist bisher bekannt über die Induktion von CCL2 und CXCL1 durch Androgene. Testosteron induzierte zum einen die CCL2 mRNA Expression in viszeralem adipösem Gewebe von Frauen *in vitro* (Crisosto *et al.* 2017). Des Weiteren bewirkte DHT eine Induktion von CCL2 auf mRNA und Proteinebene in humanen Prostatakrebszellen (Kim *et al.* 2013). In einem Mausmodell für Prostatitis zeigten neutrophile Granulozyten außerdem erhöhte CXCL1 Transkripte in Testosteron-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen (Scalerandi *et al.* 2018). In der Lunge von Influenza A-Virus-infizierten, kastrierten Mäusen waren zudem nach Testosteronbehandlung höhere CXCL1 Konzentrationen messbar (Vom Steeg *et al.* 2020). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Testosteron das pro-inflammatorische Potential von Ly6C^{hi} Monozyten, gemessen an ihrer CCL2, TNF und CXCL1 Produktion, induzieren kann.

Die Testosteron-Substitution kastrierter männlicher Mäuse hatte eine Reduktion der CCR2 Expression auf den Ly6C^{hi} Monozyten zur Folge (Abb. 12 D). Der Zusammenhang zwischen CCR2, Androgenen und dem Androgenrezeptor ist noch nicht hinreichend geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Liu *et al.* belegten, dass die Gonadektomie männlicher Mäuse die AR mRNA

Expression im Musculus longissimus, im Herzen, in der Milchdrüse und in der Lunge induzierte (Liu *et al.* 2019). Zudem ist der AR in den PBMCs kastrierter Mäuse höher exprimiert (Sellau *et al.* 2020). Die AR Induktion nach Kastration könnte hierbei ein Mechanismus sein, um dem Testosterontzug entgegenzuwirken. Die Testosteronbehandlung von *E. histolytica*-infizierten Mäusen senkte wiederum die AR Expression in den PBMCs (Sellau *et al.* 2020) und führte zur Reduktion der CCR2 Expression auf den Ly6C^{hi} Monozyten (Abb. 12 D). Izumi *et al.* demonstrierten anhand *in vitro* Versuche mit humanen Prostatakrebszellen, dass die CCL2-CCR2 Achse negativ durch den Androgenrezeptor reguliert wird. Die Blockade des ARs mittels *small inhibitory RNA* (siRNA) induzierte die CCL2 Sekretion in den Überstand. Das Ergebnis konnte auch *in vivo* bestätigt werden: In den Prostata Tumoren von Mäusen mit einer Prostataepithelzellen-spezifischen Depletion des ARs konnten immunhistologisch mehr CCL2⁺ Zellen nachgewiesen werden (Izumi *et al.* 2013). Im Gegensatz zu dem *in vitro* Versuch von Izumi *et al.*, führte der gleiche Versuchsaufbau bei Kim *et al.* jedoch zu einer reduzierten CCL2 Sekretion (Kim *et al.* 2013). Darüber hinaus zeigten AR^{-/-} Mäuse eine niedrigere Expression von CCR2 im Knochenmark. Mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Assays konnte außerdem festgestellt werden, dass der AR in der Anwesenheit von DHT die CCR2 Promotoraktivität induzieren kann (Lai *et al.* 2009). Die in dieser Arbeit und von Sellau *et al.* dargestellten Ergebnisse der reduzierten CCR2 und AR Expression nach Gonadektomie stimmen mit den Befunden aus Kim *et al.* und Lai *et al.* überein und sprechen für eine positive Regulation der CCR2 Expression durch den Androgenrezeptor. Zwar bewirkte die Testosteronbehandlung eine CCR2 Reduktion doch ist hierbei zu beachten, dass die AR Expression bereits vor der Testosteron-Substitution durch die Kastration manipuliert wurde.

Zuletzt wurde überprüft, ob eine Beeinflussung der Monozyten durch Androgene auch im Menschen möglich ist. Die *in vitro* Stimulation mit *E. histolytica* Lysat und dem Androgen DHT bewirkte einen CXCL1 Konzentrationsanstieg im Überstand stimulierter Monozyten aus Frauen und Männern (Abb. 13). Diese Ergebnisse konnten durch eine Transgenderstudie ergänzt werden. Die PBMCs von Frauen, die intramuskuläre Testosteroninjektionen über einen Zeitraum von 219 Tagen bekommen haben, sezernierten gegen Ende der Behandlung signifikant höhere CXCL1 und TNF Konzentrationen nach *ex vivo* LPS Stimulation. CD14 ist essentiell für die LPS-vermittelte Signaltransduktion über den TLR4 (*Toll-like* Rezeptor 4) / MD-2 (*Myeloid Differentiation factor 2*) Rezeptorkomplex, weshalb lediglich CD14⁺ Zellen durch LPS stimuliert werden (Zanoni *et al.* 2011). Die größte CD14⁺ Zellpopulation im humanen Blut sind klassische Monozyten (Auffray *et al.* 2009). Die gemessenen Zytokin Konzentrationen im Überstand sind daher überwiegend auf diese Zellpopulation zurückzuführen. Die Zytokin Konzentrationen korrelierten jeweils mit den Testosteron- und DHT Konzentrationen im Serum (Sellau *et al.* 2020). Die Testosteronbehandlung von Männern mit Androgendefizienz führte hingegen zu einer Reduktion der TNF Serumkonzentration (Malkin *et al.* 2004). Die kürzere Behandlungsdauer von nur einem Monat könnte jedoch die Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Testosteron wird in der Regel eine immunsuppressive Wirkung auf das Immunsystem zugeschrieben (Furman *et al.* 2014; Gubbels Bupp und Jorgensen 2018; Tuku *et al.* 2020). In T-Zellen kann Testosteron die Zellreifung und Proliferation hemmen und einen Th2-Phänotyp begünstigen (Henze

et al. 2020). In B-Zellen kann Testosteron die Lymphopoese und Produktion der Immunglobuline IgG1 und IgM unterdrücken (Kanda et al. 1996; Sakiani et al. 2013). Zusammenfassend belegen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse und diskutierten Studien jedoch, dass Testosteron auch immunstimulatorisch wirken kann. Dies scheint besonders Zellen der angeborenen Immunantwort wie Monozyten zu betreffen. In der *E. histolytica* Infektion induziert Testosteron das pro-inflammatorische Potential der Ly6C^{hi} Monozyten und trägt dadurch entscheidend zur Immunpathologie im ALA bei. Männliche Mäuse besitzen zudem ein größeres Reservoir an CCR2⁺Ly6C^{hi} Monozyten im Knochenmark. Durch eine höhere CCL2 Serumkonzentration nach *E. histolytica* Infektion sind sie daher prädestiniert für eine schnellere Migration der Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn. In der Leber sezernieren Kupfferzellen als Antwort auf eindringende Trophozoiten u.a. TNF, wodurch die CXCL1 Produktion in Hepatozyten induziert werden kann (Lo et al. 2014; Su et al. 2018). Dieser Anstieg der CXCL1 Konzentration könnte der Mechanismus sein, über den die Rekrutierung der Monozyten aus der Blutbahn in das infizierte Lebergewebe vermittelt wird. Die in die Leber einwandernden Monozyten produzieren wiederum CCL2 und CXCL1 und bewirken eine weitere Rekrutierung an Knochenmarks- und Blutsmonozyten. Durch die zusätzliche Expression von TNF tragen sie maßgeblich zur Immunpathologie und Gewebeschädigung im ALA bei.

4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den neutrophilen Granulozyten während der *E. histolytica* Infektion

In den ersten drei Tagen der *E. histolytica* Infektion kommt es zu einem erheblichen Einstrom von neutrophilen Granulozyten in den Abszessbereich (Helk et al. 2013). Neutrophile Granulozyten scheinen jedoch nicht essentiell für die Immunpathologie im ALA zu sein, da eine Depletion dieser Zellen im Mausmodell lediglich eine leichte Reduktion der Abszessbildung in männlichen Mäusen zur Folge hatte (Helk et al. 2013). In einer Studie von Seydel et al. konnte den neutrophilen Granulozyten wiederum eine wichtige Funktion in der *E. histolytica* Infektion zugeordnet werden (Seydel et al. 1997). In dieser Studie wurde die Abszessentstehung in SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) Mäusen untersucht. SCID Mäuse besitzen weder funktionsfähige B- noch T-Lymphozyten (Cossu 2010). Die Depletion von neutrophilen Granulozyten in SCID Mäusen bewirkte die Entwicklung größerer Abszesse im Vergleich zu SCID Kontrollmäusen (Seydel et al. 1997). Die Autoren schlussfolgerten daher, dass neutrophile Granulozyten an der Kontrolle der *E. histolytica* Infektion beteiligt sind. Es gilt hierbei jedoch zu bedenken, dass die Abszessentstehung in SCID Mäuse unter Ausschluss der adaptiven Immunantwort untersucht wird. Ein Fehlen der Interaktion zwischen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems wäre eine mögliche Erklärung wieso die Depletion neutrophiler Granulozyten in SCID Mäusen größere Abszesse (Seydel et al. 1997) und in Wildtyp-Mäusen kleinere Abszesse (Helk et al. 2013) zur Folge hatte. Zudem besitzen SCID Mäuse keine NKT Zellen, die essentiell für die Kontrolle der *E. histolytica* Infektion sind (Lotter et al. 2009). Da die neutrophilen Granulozyten eine so prominente Zellpopulation zu Beginn der Infektion darstellen, ist es von besonderem Interesse die Rolle dieser Zellen aufzuklären.

Sowohl im Knochenmark als auch im Blut war der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten in männlichen Mäusen höher als in weiblichen Mäusen (Abb. 6, 7). Kay *et al.* konnten ebenfalls nachweisen, dass naive männliche Mäuse höhere Anteile an neutrophilen Granulozyten in der Milz besitzen als weibliche Mäuse (Kay *et al.* 2015). Die *E. histolytica* Infektion bewirkte einen signifikanten Anstieg der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten in Mäusen beider Geschlechter, die Zellpopulation war in Blut und Leber männlicher Mäuse jedoch größer als in weiblichen Mäusen (Abb. 6). In männlichen Mäusen migrierten zudem mehr neutrophile Granulozyten in die Lunge nach SARS-CoV Infektion (Channappanavar *et al.* 2017), in den Peritonealraum während Zymosan-induzierter Peritonitis (Kay *et al.* 2015) und in die Milz im Mausmodell für Lupus erythematoses (Trigunaite *et al.* 2013).

Neutrophile Granulozyten sind von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung und Funktionalität von Monozyten. So reduzierte die Depletion oder der *Knockout* von neutrophilen Granulozyten die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten in Mausmodellen für Virus-induzierte Enzephalitis und der Luftsackinflammation (*Air Pouch model*) (Zhou *et al.* 2003; Shiohara *et al.* 2004; Soehnlein *et al.* 2008). Zudem produzierten die Monozyten von Patienten mit einem Defizit an neutrophilen Granulozyten nach LPS Stimulation geringere Mengen pro-inflammatorischer Zytokine im Vergleich zu Kontrollprobanden (Mokart *et al.* 2008).

Die Testosteronbehandlung kastrierter Mäuse führte zu einem signifikanten Anstieg der hepatischen neutrophilen Granulozyten während der *E. histolytica* Infektion (Abb. 12 C). Dieser Einfluss von Testosteron auf die Population der neutrophilen Granulozyten ließ sich in einer Reihe von Forschungsarbeiten bestätigen. Die Gonadektomie bewirkte eine Reduktion der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten in naiven Mäusen (Chuang *et al.* 2009) sowie in einem Mausmodell für Lupus erythematoses (Trigunaite *et al.* 2013). Eine Androgen-Substitution führte in beiden Arbeiten zu einer Normalisierung des Anteils neutrophiler Granulozyten. Darüber hinaus war die Aktivität von neutrophilen Granulozyten, gemessen an ihrer ROS Produktion, in kastrierten Mäusen mit Verbrennungsverletzungen oder hämorrhagischem Schock (Deitch *et al.* 2006) und in zwei Melanoma-Mausmodellen reduziert (Markman *et al.* 2020). In den Melanoma-Mausmodellen konnte dies ebenfalls durch eine Testosteronbehandlung revidiert werden. Die Testosteronbehandlung von Ratten führte zu einer höheren Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während einer bakteriellen Prostataentzündung und korrelierte mit der Testosteronserumkonzentration (Scalerandi *et al.* 2018). Testosteron induzierte hier einen anti-inflammatorischen N2-Phänotyp, indem die neutrophilen Granulozyten hohe Mengen der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β produzierten und in ihrer phagozytotischen Aktivität gestört waren (Scalerandi *et al.* 2018). Dass neutrophile Granulozyten an der Wundheilung beteiligt sein können, wurde auch schon von Wang *et al.* in einem Mausmodell für sterile thermale hepatische Verletzungen nachgewiesen (Wang *et al.* 2017). Der Zusammenhang von Testosteron und neutrophilen Granulozyten konnte ebenfalls im Menschen herausgestellt werden. In Prostatakrebspatienten reduzierte eine Androgen Deprivation die Population der neutrophilen Granulozyten (Markman *et al.* 2020). Zudem zeigten Frauen mit Hyperandrogenämie eine vergrößerte Population der neutrophilen Granulozyten (Alexiou *et al.* 2017).

Zusammenfassend kommt es in der *E. histolytica* Infektion zu einem erheblichen Einstrom an neutrophilen Granulozyten in die Leber insbesondere in männlichen Mäusen. Da diese Zellpopulation durch Testosteron erhöht wird, stellen sie eine besonders interessante Zellpopulation für zukünftige Forschungen der geschlechtsspezifischen Immunantworten dar. Die Depletion von Neutrophilen allein führte nur zu einer leichten Reduktion der Abszessgröße. Die neutrophilen Granulozyten unterstützen demnach die Rekrutierung und Funktionalität der inflammatorischen Monozyten, sind aber keine primären Mediatoren der Immunpathologie. Da Testosteron einen N2-Phänotyp begünstigen kann und männliche Mäuse deutlich mehr neutrophile Granulozyten aufweisen, wäre es jedoch auch möglich, dass sie an der Wundheilung beteiligt sind. Eine genaue Analyse der neutrophilen Granulozyten hinsichtlich einem N1- oder N2-Phänotyp würde die Rolle von neutrophilen Granulozyten in der *E. histolytica* Infektion besser aufklären können.

4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Th17 Zellen, Tregs und BiTregs während der *E. histolytica* Infektion

Dem Zytokin IL-17 konnte bereits eine entscheidende Rolle in der Abszessentstehung zugeordnet werden. IL-17 wird im ALA induziert und IL-23p19^{-/-} Mäuse, bei denen die IL-17 Induktion gestört ist, entwickeln lediglich sehr kleine Abszesse nach intrahepatischer *E. histolytica* Infektion (Noll *et al.* 2016). Die Rolle von IL17-produzierenden Th17 Zellen in der *E. histolytica* Infektion wurde bisher noch nicht untersucht. Ebenso wenig ist über die Rolle von Tregs im ALA bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden Zellpopulationen erstmalig geschlechtsspezifisch in der *E. histolytica* Infektion charakterisiert.

Th17 Zellen helfen dem Körper in der Immunabwehr gegen Pathogene. Die Analyse des hepatischen mRNA Profils im Verlauf der *E. histolytica* Infektion zeigte eine Reduktion der *ROR γ* mRNA innerhalb von 6 h. Der Reduktion folgte ein sukzessiver Anstieg, sodass die *ROR γ* Expression nach 72 h höher war als in naiven Mäusen (Abb. 14 B). Die initiale Reduktion der *ROR γ* mRNA könnte auf zwei Tatsachen zurückzuführen sein. Erstens wird sowohl *ROR γ* _T als auch die ubiquitäre zweite Isoform *ROR γ* von dem *ROR γ* Gen transkribiert (Ivanov *et al.* 2006). Zweitens wird *ROR γ* _T neben Th17 Zellen auch in CD4⁺CD8⁺ Zellen und *Lymphoid-Tissue-inducer* (LTi)-Zellen exprimiert (Ivanov *et al.* 2006). Der mRNA Verlauf des gesamten Lebergewebes ist daher nicht auf eine spezifische Zellpopulation zurückzuführen. Die *E. histolytica* Infektion bewirkte einen signifikanten Anstieg der hepatischen Th17 Zellen in Mäusen beider Geschlechter innerhalb von drei Tagen (Abb. 16 C). Der Anstieg der *ROR γ* Genexpression nach 72 h wurde daher vermutlich durch die Th17 Zellen bedingt. Sowohl in naiven als auch infizierten Mäusen war der prozentuale Anteil der Th17 Zellen in männlichen Mäusen größer als in weiblichen Mäusen (Abb. 17 A). Zudem zeigten männliche Mäuse während der *E. histolytica* Infektion höhere IL-17 Konzentrationen im Plasma (Sellau *et al.* 2020). Die größere Th17 Zellpopulation in der männlichen Maus könnte durch die Produktion von IL-17 die pro-inflammatorische Immunantwort fördern und so zur Immunpathologie im ALA beitragen. Es wäre möglich, dass Androgene für eine höhere Th17 Zellpopulation und IL-17 Produktion in männlichen Mäusen verantwortlich sind. Diese Annahme wird jedoch durch erste *in vitro* und *in vivo* Versuche widerlegt. Die *in vitro* Testosteron-Behandlung von T-Zellen demonstrierte, dass Testosteron die Th1

und Th17 Zelldifferenzierung inhibieren kann (Massa *et al.* 2017). Darüber hinaus reduzierte die Testosteron-Substitution die IL-17A-produzierenden Th17 Zellen in der Lunge von mit Hausstaub-behandelten Mäusen (Fuseini *et al.* 2018). Um den Einfluss von Androgenen auf die Th17 Zellen im ALA auszuschließen, müssten zukünftige Experimente die Zellpopulation in Testosteron-behandelten *E. histolytica*-infizierten Mäusen untersuchen.

Aufgrund der vielen Fremdantigene aus dem Magen-Darm-Trakt, die die Leber über die Pfortader erreichen, ist sie mit sehr vielen Immunzellen angereichert. Damit diese kontinuierlichen Reize keine überschießende Immunantwort hervorrufen, muss die Leber eine gewisse Immuntoleranz besitzen. Die Immunsuppression in der Leber wird maßgeblich von Tregs mitbestimmt (Tiegs und Lohse 2010). Während der *E. histolytica* Infektion wurde die *Foxp3* mRNA innerhalb von 6 h in der Leber induziert (Abb. 14 C). *Foxp3* kann neben Tregs ebenfalls in CD8⁺- und NKT-Zellsubpopulationen oder Epithelzellen exprimiert werden (Devaud *et al.* 2014), wodurch womöglich der frühe Anstieg zu erklären ist. Die höhere *Foxp3* Genexpression 120 h nach *E. histolytica* Infektion (Abb. 14 C) wurde vermutlich durch Tregs bedingt, da diese auch auf Proteinebene in der Leber an Tag 3 und 5 induziert wurden (Abb. 16 D). Der Anteil hepatischer Tregs innerhalb der CD4⁺CD45⁺β-TCR⁺ Zellen war in naiven männlichen Mäusen größer als in weiblichen Mäusen (Abb. 17 B). Männliche Mäuse zeigten ebenfalls einen höheren Anteil an Tregs in der naiven Milz (Elderman *et al.* 2016) und in der Milz und Leber während experimenteller autoimmuner Hepatitis (Lapierre *et al.* 2010). Darüber hinaus konnte der Einfluss von Androgenen auf die *Foxp3* Expression nachgewiesen werden. DHT induzierte die *Foxp3* Expression in humanen T-Zellen von Frauen *in vitro* (Walecki *et al.* 2015). Die Testosteron-Substitution in Ratten mit experimenteller autoimmuner Orchitis führte ebenfalls zu einer erhöhten Treg Population. Die Behandlung mit Flutamid reduzierte wiederum die Treg Population (Fijak *et al.* 2011). Zudem bewirkte eine einzelne Testosteron-Injektion in weiblichen Ratten zwei Tage nach Geburt einen Anstieg der Tregs im peripheren Blut (Leposavic *et al.* 2009). Schließlich konnte auch ein funktionales ARE in der Promotorregion des humanen *Foxp3* Gens identifiziert werden, wodurch eine direkte Regulation durch Androgene möglich ist (Walecki *et al.* 2015). Während naive männliche Mäuse zwar höhere Anteile an hepatischen Tregs aufwiesen, waren die Tregs weiblicher Mäuse durch eine höhere *Foxp3* Expression gekennzeichnet (Abb. 17 H). Die *E. histolytica* Infektion führte zu einem signifikanten Anstieg der Tregs innerhalb von drei Tagen in Mäusen beider Geschlechter (Abb. 17 B). Während der prozentuale Anteil der Tregs in männlichen und weiblichen Mäusen vergleichbar war, war der geschlechtsspezifische Unterschied in der Höhe der *Foxp3* Expression noch stärker ausgeprägt (Abb. 17 H). Chauhan *et al.* demonstrierten, dass murine Tregs mit höherer *Foxp3* Expression durch eine hohe suppressive Aktivität und Produktion von TGF-β und IL-10 gekennzeichnet waren (Chauhan *et al.* 2009). Zudem zeigten die peripheren Tregs von Patienten mit der rheumatischen Erkrankung Spondylitis ankylosans eine geringere *Foxp3* Expression im Vergleich zu Kontrollpatienten. Die Tregs dieser Patienten konnten die Proliferation von T-Effektorzellen *in vitro* nur eingeschränkt supprimieren (Guo *et al.* 2016). Es wäre demnach möglich, dass die Tregs weiblicher Mäuse durch ihre höhere *Foxp3* Expression suppressiver wirken als die der männlichen Mäuse und so der Immunpathologie im ALA stärker entgegenwirken können.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurde eine Population identifiziert, die sowohl Foxp3 als auch ROR γ t exprimiert und als BiTregs bezeichnet wird. Die Rolle von Foxp3⁺ROR γ t⁺ BiTregs ist bisher noch nicht grundlegend erforscht. Eine Induktion von BiTregs wurde in Patienten mit Morbus Chron (Hovhannisyanyan *et al.* 2011) und Darmkrebs (Blatner *et al.* 2012) sowie in Mausmodellen für Lupus erythematodes (Kluger *et al.* 2017) und nephrotoxischer Nephritis (Kluger *et al.* 2016) beobachtet. BiTregs waren aber auch in dem peripheren Blut gesunder Probanden nachweisbar (Voo *et al.* 2009; Ayyoub *et al.* 2009). In *E. histolytica*-infizierten Mäusen konnte ein Anstieg der hepatischen BiTregs an Tag 3 nach Infektion gemessen werden, der an Tag 5 wieder signifikant verringert war (Abb. 16 E). Die Parallelen zur Th17 Zelldynamik konnten auch in dem Mausmodell für nephrotoxische Nephritis gezogen werden. Die Th17 Zellen und BiTregs stiegen innerhalb von vier Tagen in Nieren und Milz an, gefolgt von einer rapiden Abnahme an den Folgetagen (Kluger *et al.* 2016). BiTregs können sowohl pro-inflammatorisch als auch immunsuppressiv wirken. Sie können IL-10 sezernieren und somit die Proliferation aktivierter T-Zellen *in vitro* supprimieren (Lochner *et al.* 2008; Kluger *et al.* 2016). Gleichzeitig können BiTregs IL-17 produzieren und somit pro-inflammatorische Immunantworten fördern (Osorio *et al.* 2008; Voo *et al.* 2009; Ayyoub *et al.* 2009; Kluger *et al.* 2016). Sowohl der Transfer von exogenen Tregs als auch BiTregs schützte Mäuse vor nephrotoxischer Nephritis. In dem gleichen Modell resultierte der *Knockout* von ROR γ t in BiTregs in einem abgeschwächten Krankheitsverlauf. Die ROR γ t Expression der BiTregs zeigte sich hier demnach schädlich, was die bifunktionelle Rolle der Zellpopulation hervorhebt (Kluger *et al.* 2016). Neben der Foxp3 und ROR γ t Expression sowie IL-35, IL-10 und IL-17 Sekretion zeigten BiTregs auch andere Treg und Th17 typischen Charakteristika, wie beispielsweise die Expression von IL-23R, CD161, CCR6 und IFN γ (Ayyoub *et al.* 2009; Hovhannisyanyan *et al.* 2011; Yang *et al.* 2016). Daher wurde zunächst vermutet, dass es sich um eine Zellpopulation handelt, die von einem Treg-Phänotyp zu einer Th17 Zelle transdifferenziert oder andersherum (Zhou *et al.* 2009; Hovhannisyanyan *et al.* 2011; Komatsu *et al.* 2014). BiTregs zeigten jedoch auch Charakteristika, die sie als distinkte Population definieren: eine höhere Expression von CD103, CTLA-4 und ICOS (*Inducible T-cell COStimulator*) im Vergleich zu Tregs oder Th17 Zellen (Kluger *et al.* 2016; Yang *et al.* 2016). In der *E. histolytica* Infektion war die Expression von Foxp3 auf den BiTregs höher als auf den Tregs (Abb. 16 G). Eine höhere Foxp3 Expression wird mit einer höheren suppressiven Aktivität assoziiert (Chauhan *et al.* 2009; Guo *et al.* 2016). Zusammen mit einer höheren Expression von ICOS und CD103 – zwei weiteren Markern, die hochpotente und suppressive Zellen beschreiben (Lehmann *et al.* 2002; Strauss *et al.* 2008; Braun *et al.* 2015; Chen *et al.* 2018) – könnten BiTregs eine Zellpopulation mit hochregulatorischer Funktion sein. Die besonders suppressive Rolle von BiTregs konnte bereits *in vivo* bestätigt werden. Der adoptive Transfer von naiven CD4⁺ T-Zellen in RAG2^{-/-} Mäuse, bei denen die T- und B-Zellentwicklung gestört ist, führt normalerweise zu einer Darmentzündung. Der Ko-Transfer von Tregs wirkte protektiv, sodass in den Mäusen nur milde Symptome hervorgerufen wurden. Noch effektiver war jedoch der Schutz durch den Ko-Transfer von BiTregs, nach dem die Mäuse keinerlei Entzündungssymptome aufwiesen (Yang *et al.* 2016). Kluger *et al.* zeigten in einem *in vitro* Versuch, dass die suppressive Wirkung der BiTregs auf eine andere Weise erfolgt als durch Tregs. Während Tregs in Ko-Kulturen mit T-Effektorzellen hohe Mengen an

IL-2 verbrauchten und so den Metabolismus der T-Effektorzellen inhibierten, produzierten BiTregs höhere Mengen des immunsuppressiven Zytokins IL-10 (Kluger *et al.* 2016).

Während Th17 Zellen durch TGF- β und IL-6 oder TGF- β und IL-21 induziert werden können, wird die Treg Differenzierung durch TGF- β und IL-2 aktiviert (Zhou *et al.* 2009). IL-23 ist darüber hinaus wichtig für die Stabilität und Funktionalität der Th17 Zellen (Bettelli *et al.* 2006; Stritesky *et al.* 2008). Die *E. histolytica* Infektion führte zu einem signifikanten Anstieg der *IL-23* und *IL-2* mRNA (Abb. 20 C, E). Während IL-21 nicht messbar war, konnte auch für die *IL-6* und *TGF- β* mRNA kein Anstieg gemessen werden (Abb. 20). Sellau *et al.* belegten, dass IL-23 und IL-6 nach *E. histolytica* Infektion jedoch im Plasma erhöht waren. Die Konzentrationen waren zudem im Plasma männlicher Mäuse höher als im Plasma weiblicher Mäuse (Sellau *et al.* 2020). Erhöhte IL-6 Serumkonzentrationen waren auch in vietnamesischen ALA-Patienten im Vergleich zu asymptomatisch infizierten Patienten messbar (Bernin *et al.* 2014). In *AlbCre* Kontrollmäusen ließ sich zudem eine höhere *IL-6* mRNA Expression in der Leber *E. histolytica*-infizierter männlicher Mäuse nachweisen (Abb. 21 A). IL-6 war auch während der SARS-CoV Infektion in den Lungen männlicher Mäuse höher exprimiert als in weiblichen Mäusen (Channappanavar *et al.* 2017). Des Weiteren zeigten Naugler *et al.*, dass nach chemisch-induziertem Leberschaden IL-6 im Serum männlicher Mäuse höher konzentriert war als in weiblichen Mäusen. Die höheren IL-6 Konzentrationen korrelierten mit einem schweren Krankheitsverlauf in Leberzellkarzinomen, der durch den IL-6 *Knockout* gehemmt wurde (Naugler *et al.* 2007). Die höheren *IL-6* Transkripte in männlichen *AlbCre* Mäusen sowie höhere Plasmakonzentrationen an IL-6 und IL-23 in der männlichen Maus (Sellau *et al.* 2020) könnten eine Erklärung für die größere Th17 Zellpopulation in der Leber *E. histolytica*-infizierter männlicher Mäuse sein. Neben der Induktion der Th17 Zelldifferenzierung kann IL-6 die Differenzierung der Tregs inhibieren (Bettelli *et al.* 2006; Mangan *et al.* 2006). Ein möglicher Grund für den Verlust des Geschlechtsdimorphismus in der Treg Population unter der *E. histolytica* Infektion (Abb. 17 B), könnten gesteigerte IL-6 Konzentrationen in der männlichen Maus sein. Hohe IL-6 Konzentrationen könnten die Induktion der Tregs hierbei zum Teil inhibieren.

Parallel zu dem *Foxp3* Anstieg während der *E. histolytica* Infektion (Abb. 16 D) wurde auch die *IL-2* mRNA 120 h nach Infektion induziert (Abb. 20 E) und spricht für eine Induktion der Tregs über IL-2. Während der Infektion waren die *IL-2* Transkripte in den *AlbCre* Mäusen beider Geschlechter vergleichbar (Abb. 21 D). In der Literatur lässt sich zudem keine Studie finden, die eine unterschiedliche Expression von IL-2 in männlichen und weiblichen Individuen vermuten lässt. Der Einfluss von Androgenen auf die IL-2 Expression konnte bereits in zwei Studien ausgeschlossen werden. Die *in vitro* Behandlung von murinen T-Zellen mit DHT hatte keinen Einfluss auf die IL-2 Produktion (Araneo *et al.* 1991). Ebenso hatte die DHT-Substitution von kastrierten Mäusen keine Unterschiede in der IL-2 Sekretion von Splenozyten zur Folge (Angele *et al.* 2001).

Zusammenfassend bewirkte die *E. histolytica* Infektion einen Anstieg der Th17 Zellen, BiTregs und Tregs in Mäusen beider Geschlechter. Die Ergebnisse dieser Arbeit und Sellau *et al.* (2020) demonstrierten, dass *E. histolytica*-infizierte männliche Mäuse höhere hepatische IL-6 Transkripte und Serumkonzentrationen aufweisen. Dies könnte die Ursache für eine größere hepatische Th17

Zellpopulation in männlichen Mäusen sein. Durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine könnten sie entscheidend zur Immunpathologie im ALA beitragen. Andererseits könnten hochsuppressive Tregs, charakterisiert durch eine hohe Foxp3 Expression, ein regulatorischer Mechanismus weiblicher Mäuse sein, um der Immunpathologie im ALA entgegenzuwirken. Die BiTregs waren in der Leber männlicher Mäuse stärker vertreten und zeigten während der *E. histolytica* Infektion die gleiche Zelldynamik wie Th17 Zellen, was einen pro-inflammatorischen Charakter dieser Zellpopulation vermuten lässt. BiTregs waren jedoch auch durch eine hohe Foxp3 Expression charakterisiert, die mit einer suppressiven Funktion assoziiert wird. BiTregs könnten demnach eine bifunktionelle Rolle einnehmen und sowohl IL-17 als auch IL-10 produzieren. Die genaue Funktion der BiTregs in der *E. histolytica* Infektion gilt es noch herauszufinden. Es wäre möglich, dass sich die Rolle der BiTregs im Laufe der Infektion wandelt oder dass BiTregs männlicher Mäuse primär einen pro-inflammatorischen Phänotyp und BiTregs weiblicher Mäuse einen anti-inflammatorischen Phänotyp aufweisen. Zudem müssten zukünftige Experimente die Rolle der Th17 Zellen und Tregs prüfen, indem durch spezifische Depletion der direkte Einfluss auf die Abszessentstehung und Wundheilung untersucht wird.

4.4 Die Rolle von HIF-1 α in der Abszessentwicklung und Modulation der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs während der *E. histolytica* Infektion

HIF-1 α ist Teil eines Transkriptionsfaktors, der in vielen Entzündungsreaktionen induziert wird und die T-Zelldifferenzierung maßgeblich regulieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Induktion von hepatischem HIF-1 α während der *E. histolytica* Infektion die T-Zelldifferenzierung und Abszessentwicklung beeinflusst. Um diese Frage zu beantworten, wurden Mäuse mit einem Hepatozyten-spezifischen *Knockout* (*Hep-HIF-1 α ^{-/-}*) generiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass der Anstieg der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs in der *E. histolytica* Infektion durch Hepatozyten-spezifisches HIF-1 α moduliert werden kann. Die murine *E. histolytica* Infektion bewirkte einen Anstieg der HIF-1 α Expression vor allem in den Hepatozyten (Abb. 14, 15). HIF-1 α wurde ebenfalls in murinen intestinalen Epithelzellen während chemisch-induzierter Kolitis (Cummins *et al.* 2008) und in murinen Hepatozyten nach chronischem oder moderatem Alkoholverzehr (Nishiyama *et al.* 2012; Roychowdhury *et al.* 2014) induziert. Der Hepatozyten-spezifische *Knockout* führte in der *E. histolytica* Infektion zu unterschiedlichen Abszessentwicklungen in männlichen und weiblichen Mäusen (Abb. 18). Während männliche *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse signifikant kleinere Abszesse bildeten, wiesen weibliche *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse tendenziell größere Läsionen im Vergleich zu *AlbCre* Kontrollmäusen auf. Der Zell-spezifische *Knockout* von HIF-1 α hatte auch in anderen Studien einen protektiven Einfluss. In Hepatozyten schützte der HIF-1 α *Knockout* Mäuse vor LPS- oder Alkohol-induziertem Leberschaden, indem die Induktion von CCL2 und die Rekrutierung von Monozyten in die Leber reduziert wurden (Nath *et al.* 2011; Roychowdhury *et al.* 2014). Darüber hinaus bewahrte der Makrophagen-spezifische HIF-1 α *Knockout* durch eine reduzierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine Mäuse vor LPS-induzierter Sepsis (Peyssonnaud *et al.* 2007). Schließlich waren Mäuse mit einem

T-Zell-spezifischem HIF-1 α *Knockout* resistent gegenüber experimenteller autoimmuner Enzephalitis und zeigten eine Reduktion der Th17 Zellen sowie Induktion der Tregs (Dang *et al.* 2011). Wiederum in anderen Studien zeigte sich die Stabilisierung von HIF-1 α protektiv. Die Behandlung von Mäusen mit einem PHD-Inhibitor verbesserte die Wundheilung bei der chemisch-induzierten Kolitis (Cummins *et al.* 2008). Mäuse mit einem Hepatozyten-spezifischen PHD1 *Knockout* waren zudem vor Ischämie-induzierten Reperfusionsschäden geschützt (Schneider *et al.* 2010). In beiden Fällen war die HIF-1 α Akkumulation mit einer reduzierten Apoptose von Darmepithelzellen oder Hepatozyten assoziiert. HIF-1 α stellte sich außerdem als essentiell für die IFN γ -vermittelte Kontrolle der *Mycobacterium tuberculosis* Infektion heraus (Braverman *et al.* 2016). Bei einer mangelnden Sauerstoffversorgung kann HIF-1 α eine Vielzahl an Genen regulieren um eine zelluläre Anpassung und das Überleben der Zelle zu ermöglichen. Während essentielle Zellfunktionen aufrechterhalten werden, wird die anaerobe Glykolyse induziert und sauerstoffverbrauchende Prozesse eingeschränkt (Lum *et al.* 2007). So reguliert HIF-1 α verschiedene physiologische und zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation, den Energiestoffwechsel, den Glukosetransport, Migrationsprozesse, Erythropoese und Angiogenese (Ju *et al.* 2016). Aufgrund der diversen Möglichkeiten mit denen HIF-1 α die sauerstoff-abhängige Genexpression regulieren kann, ist anzunehmen, dass HIF-1 α je nach Zelltyp, Gewebe und Modell unterschiedliche Einflüsse auf einen Krankheits- oder Infektionsverlauf nehmen kann.

In der *E. histolytica* Infektion konnte ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg von HIF-1 α im ALA und den hepatischen Tregs, BiTregs und Th17 Zellen festgestellt werden. *E. histolytica*-infizierte *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse zeigten reduzierte Anteile an Th17 Zellen und BiTregs in Mäusen beider Geschlechter im Vergleich zu *AlbCre* Kontrollmäusen (Abb. 19 C, E). Der in C57BL/6J und *AlbCre* beobachtete Geschlechtsdimorphismus in diesen Populationen wurde damit gänzlich aufgehoben. Tregs waren durch den HIF-1 α *Knockout* hingegen nur in *E. histolytica*-infizierten weiblichen Mäusen reduziert (Abb. 19 D). *In vitro* Versuche konnten bereits bestätigen, dass hypoxische Bedingungen die Foxp3 Expression in einer humanen T-Zelllinie sowie humanen und murinen mononukleären Zellen induzieren kann (Ben-Shoshan *et al.* 2008). Zudem führte die hydrodynamische Injektion des *HIF-1 α* Gens *in vivo* zu einem Anstieg der Treg Population (Ben-Shoshan *et al.* 2008). Mäuse mit Kolitis-assoziiertem Darmkrebs zeigten darüber hinaus eine starke Hypoxie im Gewebe, die von einer erhöhten Anzahl und suppressiven Aktivität der Tregs begleitet war (Westendorf *et al.* 2017). Hypoxische Bedingungen führten ebenso zur Induktion von ROR γ ⁺ Th17 Zellen. In Mäusen führte eine fettreiche Ernährung zu einem Anstieg der Th17 Zellen, der durch den Einsatz von siRNA gegen HIF-1 α inhibiert wurde (Liu *et al.* 2018). *In vitro* wurde zudem die Th17 Zelldifferenzierung durch PHD-Inhibitoren gehemmt und durch PHD-Überexpression erhöht (Singh *et al.* 2016). Die Modulation der T-Zelldifferenzierung durch intrinsisches HIF-1 α wurde bereits vielfach untersucht (Dang *et al.* 2011; Shi *et al.* 2011; Clambey *et al.* 2012). Darüber hinaus konnten erste Befunde belegen, dass auch eine HIF-1 α Expression in anderen Zellen die T-Zelldifferenzierung beeinflussen kann. So führte der DC-spezifische HIF-1 α *Knockout* zu einer signifikanten Reduktion der Tregs im Mausmodell für chemisch-induzierte Kolitis (Flück *et al.* 2016). Die *Knockout* Mäuse zeigten schwerwiegendere Entzündungssymptome und produzierten größere Mengen

pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-23. Die Autoren vermuteten daher, dass die Treg Differenzierung durch diese Zytokine inhibiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass eine Induktion von HIF-1 α in den Hepatozyten ebenfalls Einfluss auf die Differenzierung der hepatischen Tregs und Th17 Zellen nehmen kann. Auch hier stellt die Modulation des Zytokinmilieus eine Möglichkeit dar, wie HIF-1 α in den Hepatozyten die T-Zelldifferenzierung beeinflussen könnte.

In der Leber männlicher *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse war eine Reduktion der *IL-6* mRNA und eine kleinere Th17 Zellpopulation im Vergleich zu Kontrollmäusen messbar (Abb. 19 C, 21 A). In der Leber wird IL-6 hauptsächlich von Kupffer-Zellen produziert, kann während Entzündungsreaktionen aber auch von Hepatozyten sezerniert werden (Norris *et al.* 2014). Das *IL-6* Gen besitzt mehrere HREs in seiner Promotorregion und kann direkt durch HIF-1 moduliert werden (Matsui *et al.* 1999; Niu *et al.* 2019). Hypoxische Kulturbedingungen induzierten die *IL-6* mRNA Expression in isolierten Monozyten aus Rattenherzen und in humanen glatten Muskelzellen der Blase *in vitro* (Matsui *et al.* 1999; Wiafe *et al.* 2017). Der hypoxische Einfluss auf die IL-6 Expression konnte auch *in vivo* bestätigt werden. Mäuse, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, zeigten höhere IL-6 Transkripte und Proteinkonzentrationen in der Lunge (Yan *et al.* 1995). Zudem führte die Behandlung von Mäusen mit dem HIF-1 α Inhibitor PX-478 während einer fettreichen Ernährung zu einer verringerten *IL-6* Genexpression (Sun *et al.* 2013). Innerhalb der Hepatozyten könnte HIF-1 während der *E. histolytica* Infektion an HREs in der Promotorregion von *IL-6* binden und so die Produktion von IL-6 innerhalb der Hepatozyten induzieren. Sezerniertes IL-6 kann in der Leber die Differenzierung von Th17 Zellen begünstigen und die Treg Differenzierung inhibieren. Zwar bewirkte der Hepatozyten-spezifische *Knockout* von HIF-1 α auch eine Reduktion der Th17 Zellen in weiblichen Mäusen (Abb. 19 C). Die Reduktion der Th17 Zellen kann in weiblichen Mäusen jedoch keinen vergleichbar großen Effekt ausüben, da die Th17 Zellpopulation in weiblichen Mäusen grundsätzlich kleiner ist. Des Weiteren produzierten lediglich die Th17 Zellen der männlichen *Hep-HIF-1 α ^{-/-}* Mäuse geringere Mengen an IL-17 im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abb. 22 A). Ein Aspekt, der in Zukunft untersucht werden könnte, ist der Einfluss von Androgenen auf die HIF-1 α Expression. Es wurde bereits dargestellt, dass DHT in humanen Prostatakrebszellen HIF-1 α Proteinkonzentrationen induzieren kann und dieser Effekt von Flutamid blockiert wird (Mabjeesh *et al.* 2003). Außerdem wurde HIF-1 α in murinen Granulosazellen *in vitro* durch Testosteron induziert (Zhang *et al.* 2016). Eine höhere HIF-1 α Expression in männlichen Mäusen könnte demnach ein Grund für höhere IL-6 Konzentrationen und eine größere Th17 Zellpopulation sein.

In der Leber weiblicher Mäuse war der prozentuale Anteil der Tregs durch den HIF-1 α *Knockout* reduziert und ging mit einer tendenziellen Reduktion der *IL-2* Transkripte einher (Abb. 21 D). Es wurde bereits dargestellt, dass IL-2 durch hypoxische Bedingungen induziert werden kann. Pathophysiologische hypoxische Bedingungen führten *in vitro* zu einem Anstieg an IL-2 in PHA-stimulierten T-Zellen (Gaber *et al.* 2013). In einem *in vivo* Modell bewirkte die Hypoxie und Ischämie eine Induktion der *IL-2* Transkripte in den Gehirnen von Ratten (Girard *et al.* 2008). In männlichen Mäusen war die Reduktion der *IL-2* Transkripte durch den HIF-1 α *Knockout* sogar stärker

ausgeprägt als in weiblichen Mäusen, war aber nicht mit einer Reduktion der Tregs assoziiert (Abb. 19 D). Es lässt sich daher vermuten, dass die Induktion hepatischer Tregs in männlichen Mäusen nicht primär über IL-2 vermittelt wird. Die CD4⁺ T-Zellen in *E. histolytica*-infizierten *Hep-HIF-1α^{-/-}* Mäusen beider Geschlechter produzierten zudem signifikant weniger IL-10 (Abb. 22 B). Diese Entwicklung könnte in weiblichen Mäusen durch die Reduktion von Tregs begründet sein. Der Einfluss auf die IL-10 Produktion ist jedoch nicht zwangsläufig durch die Tregs bedingt. IL-10 ist zwar ein Schlüsselzytokin der Tregs, kann jedoch auch von Th1, Th2, Tr1 und Th17 Zellen produziert werden (Bedke *et al.* 2019). In männlichen Mäusen könnten demnach diese Zellpopulationen für eine Reduktion der IL-10 Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sein. C57BL/6J Mäuse zeigten während der *E. histolytica* Infektion einen signifikanten Anstieg der Tregs (Abb. 17 B). Durch eine hohe Foxp3 Expression ließ sich vermuten, dass die Tregs weiblicher Mäuse hochsuppressiv wirken (Abb. 17 H). Diese hochregulatorischen Tregs könnten ein Mechanismus sein, mit dem die weibliche Maus der gravierenden Immunpathologie im ALA entgegenwirkt. Eine Reduktion dieser immunsuppressiven Tregs durch den HIF-1α *Knockout* (Abb. 19 D) in weiblichen Mäusen würde somit erklären, wieso weibliche Mäuse tendenziell größere Läsionen aufweisen.

Die Modulation des Zytokinmilieus stellt jedoch nur eine Möglichkeit dar, wie HIF-1α die Tregs und Th17 Zellen regulieren könnte. Hepatozyten könnten Tregs außerdem über direkte Zell-Zell-Kontakte induzieren. Burghardt *et al.* demonstrierten, dass murine Hepatozyten die Differenzierung der Foxp3⁺ T-Zellen über eine Interaktion der Notch-Rezeptoren (exprimiert auf T-Zellen) mit Jagged-1 (exprimiert auf Hepatozyten) *in vitro* induzieren können (Burghardt *et al.* 2014). Es konnte zudem gezeigt werden, dass HIF-1α die Expression von Jagged-1 in murinen mesenchymalen Stammzellen induzieren kann (Gonzalez-King *et al.* 2017). Es wäre demnach möglich, dass die Stabilisierung von HIF-1α während der *E. histolytica* Infektion einen Anstieg der Jagged-1 Expression auf Hepatozyten zur Folge hat, wodurch eine Induktion der Treg Differenzierung über Notch-Rezeptoren erfolgen kann.

Zusammenfassend führte der Hepatozyten-spezifische HIF-1α *Knockout* in männlichen Mäusen zu kleineren Abszessen und war von einer reduzierten hepatischen *IL-6* Genexpression, Th17 Zellpopulation und *IL-17* Produktion begleitet. Es wird daher vermutet, dass HIF-1α in der *E. histolytica* Infektion *IL-6* induzieren kann, wodurch die Th17 Zelldifferenzierung in männlichen Mäusen begünstigt wird. In weiblichen Mäusen hatte der Hepatozyten-spezifische HIF-1α *Knockout* eine Reduktion der Tregs zur Folge und resultierte in tendenziell größeren Läsionen. Die immunsuppressiven Tregs könnten daher ein Mechanismus sein, wie weibliche Mäuse der schweren Immunpathologie im ALA entgegenwirken.

Literaturverzeichnis

- Alexiou, E., E. Hatzigelaki, V. Pergialiotis, C. Chrelias, D. Kassanos, C. Siristatidis, G. Kyrkou, M. Kreatsa, and E. Trakakis. 2017. 'Hyperandrogenemia in women with polycystic ovary syndrome: prevalence, characteristics and association with body mass index', *Horm Mol Biol Clin Investig*, 29: 105-11.
- Angele, M. K., M. W. Knoferl, A. Ayala, K. I. Bland, and I. H. Chaudry. 2001. 'Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage', *Cytokine*, 16: 22-30.
- Anipindi, V. C., P. Bagri, K. Roth, S. E. Dizzell, P. V. Nguyen, C. R. Shaler, D. K. Chu, et al. 2016. 'Estradiol Enhances CD4+ T-Cell Anti-Viral Immunity by Priming Vaginal DCs to Induce Th17 Responses via an IL-1-Dependent Pathway', *PLoS Pathog*, 12: e1005589.
- Araneo, B. A., T. Dowell, M. Diegel, and R. A. Daynes. 1991. 'Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells', *Blood*, 78: 688-99.
- Ashcroft, G. S., and S. J. Mills. 2002. 'Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing', *J Clin Invest*, 110: 615-24.
- Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. 'Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells', *Annu Rev Immunol*, 27: 669-92.
- Ayyoub, M., F. Deknuydt, I. Raimbaud, C. Dousset, L. Leveque, G. Bioley, and D. Valmori. 2009. 'Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 8635-40.
- Bedke, T., F. Muscate, S. Soukou, N. Gagliani, and S. Huber. 2019. 'Title: IL-10-producing T cells and their dual functions', *Semin Immunol*, 44: 101335.
- Ben-Shoshan, J., S. Maysel-Auslender, A. Mor, G. Keren, and J. George. 2008. 'Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha', *Eur J Immunol*, 38: 2412-8.
- Bernin, H., C. Marggraff, T. Jacobs, N. Brattig, V. A. Le, J. Blessmann, and H. Lotter. 2014. 'Immune markers characteristic for asymptotically infected and diseased *Entamoeba histolytica* individuals and their relation to sex', *BMC Infect Dis*, 14: 621.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. 'Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells', *Nature*, 441: 235-8.
- 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: 4107-20.
- Biswas, S. K., M. Chittechath, I. N. Shalova, and J. Y. Lim. 2012. 'Macrophage polarization and plasticity in health and disease', *Immunol Res*, 53: 11-24.

- Blatner, N. R., M. F. Mulcahy, K. L. Dennis, D. Scholtens, D. J. Bentrem, J. D. Phillips, S. Ham, et al. 2012. 'Expression of ROR γ marks a pathogenic regulatory T cell subset in human colon cancer', *Sci Transl Med*, 4: 164ra59.
- Blessmann, J., P. Van Linh, P. A. Nu, H. D. Thi, B. Muller-Myhsok, H. Buss, and E. Tannich. 2002. 'Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam', *Am J Trop Med Hyg*, 66: 578-83.
- Bonnardel, J., W. T'Jonck, D. Gaublomme, R. Browaeys, C. L. Scott, L. Martens, B. Vanneste, et al. 2019. 'Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche', *Immunity*, 51: 638-54 e9.
- Bouman, A., M. Schipper, M. J. Heineman, and M. M. Faas. 2004. 'Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans', *Am J Reprod Immunol*, 52: 19-26.
- Braun, A., N. Dewert, F. Brunnert, V. Schnabel, J. H. Hardenberg, B. Richter, K. Zachmann, et al. 2015. 'Integrin α E(CD103) Is Involved in Regulatory T-Cell Function in Allergic Contact Hypersensitivity', *J Invest Dermatol*, 135: 2982-91.
- Braverman, J., K. M. Sogi, D. Benjamin, D. K. Nomura, and S. A. Stanley. 2016. 'HIF-1 α Is an Essential Mediator of IFN- γ -Dependent Immunity to Mycobacterium tuberculosis', *J Immunol*, 197: 1287-97.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. 'Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse', *Nat Genet*, 27: 68-73.
- Budda, S. A., A. Girton, J. G. Henderson, and L. A. Zenewicz. 2016. 'Transcription Factor HIF-1 α Controls Expression of the Cytokine IL-22 in CD4 T Cells', *J Immunol*, 197: 2646-52.
- Burghardt, S., B. Claass, A. Erhardt, K. Karimi, and G. Tiegs. 2014. 'Hepatocytes induce Foxp3⁺ regulatory T cells by Notch signaling', *J Leukoc Biol*, 96: 571-7.
- Cai, J. J., J. Wen, W. H. Jiang, J. Lin, Y. Hong, and Y. S. Zhu. 2016. 'Androgen actions on endothelium functions and cardiovascular diseases', *J Geriatr Cardiol*, 13: 183-96.
- Campbell, E. L., W. J. Bruyninckx, C. J. Kelly, L. E. Glover, E. N. McNamee, B. E. Bowers, A. J. Bayless, et al. 2014. 'Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation', *Immunity*, 40: 66-77.
- Card, J. W., M. A. Carey, J. A. Bradbury, L. M. DeGraff, D. L. Morgan, M. P. Moorman, G. P. Flake, and D. C. Zeldin. 2006. 'Gender differences in murine airway responsiveness and lipopolysaccharide-induced inflammation', *J Immunol*, 177: 621-30.
- Channappanavar, R., C. Fett, M. Mack, P. P. Ten Eyck, D. K. Meyerholz, and S. Perlman. 2017. 'Sex-Based Differences in Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection', *J Immunol*, 198: 4046-53.
- Chaplin, D. D. 2010. 'Overview of the immune response', *J Allergy Clin Immunol*, 125: S3-23.
- Chauhan, S. K., D. R. Saban, H. K. Lee, and R. Dana. 2009. 'Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation', *J Immunol*, 182: 148-53.

- Chen, C., and T. Lou. 2017. 'Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma', *Oncotarget*, 8: 46691-703.
- Chen, Q., L. Mo, X. Cai, L. Wei, Z. Xie, H. Li, J. Li, and Z. Hu. 2018. 'ICOS signal facilitates Foxp3 transcription to favor suppressive function of regulatory T cells', *Int J Med Sci*, 15: 666-73.
- Chuang, K. H., S. Altuwajiri, G. Li, J. J. Lai, C. Y. Chu, K. P. Lai, H. Y. Lin, et al. 2009. 'Neutropenia with impaired host defense against microbial infection in mice lacking androgen receptor', *J Exp Med*, 206: 1181-99.
- Clambey, E. T., E. N. McNamee, J. A. Westrich, L. E. Glover, E. L. Campbell, P. Jedlicka, E. F. de Zoeten, et al. 2012. 'Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2784-93.
- Clark, R. V., J. A. Wald, R. S. Swerdloff, C. Wang, F. C. W. Wu, L. D. Bowers, and A. M. Matsumoto. 2019. 'Large divergence in testosterone concentrations between men and women: Frame of reference for elite athletes in sex-specific competition in sports, a narrative review', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 90: 15-22.
- Cossu, F. 2010. 'Genetics of SCID', *Ital J Pediatr*, 36: 76.
- Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Förster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, et al. 2003. 'HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation', *Cell*, 112: 645-57.
- Crisosto, N., C. Flores, M. Maliqueo, B. Echiburru, J. Vasquez, F. Maluenda, and T. Sir-Petermann. 2017. 'Testosterone increases CCL-2 expression in visceral adipose tissue from obese women of reproductive age', *Mol Cell Endocrinol*, 444: 59-66.
- Cummins, E. P., F. Seeballuck, S. J. Keely, N. E. Mangan, J. J. Callanan, P. G. Fallon, and C. T. Taylor. 2008. 'The hydroxylase inhibitor dimethylxalylglycine is protective in a murine model of colitis', *Gastroenterology*, 134: 156-65.
- Dang, E. V., J. Barbi, H. Y. Yang, D. Jinasena, H. Yu, Y. Zheng, Z. Bordman, et al. 2011. 'Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1', *Cell*, 146: 772-84.
- Davey, R. A., and M. Grossmann. 2016. 'Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside', *Clin Biochem Rev*, 37: 3-15.
- De Filippo, K., A. Dudeck, M. Hasenberg, E. Nye, N. van Rooijen, K. Hartmann, M. Gunzer, A. Roers, and N. Hogg. 2013. 'Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation', *Blood*, 121: 4930-7.
- Deitch, E. A., P. Ananthakrishnan, D. B. Cohen, D. Z. Xu, E. Feketeova, and C. J. Hauser. 2006. 'Neutrophil activation is modulated by sex hormones after trauma-hemorrhagic shock and burn injuries', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291: H1456-65.
- Despommier, Dickson D., Daniel O. Griffin, Robert W. Gwadz, Peter J. Hotez, and Charles A. Knirsch. 2017. *Parasitic Diseases* (Springer-Verlag).
- Devalaraja, R. M., L. B. Nanne, J. Du, Q. Qian, Y. Yu, M. N. Devalaraja, and A. Richmond. 2000. 'Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice', *J Invest Dermatol*, 115: 234-44.
- Devaud, C., P. K. Darcy, and M. H. Kershaw. 2014. 'Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages', *Cancer Immunol Immunother*, 63: 869-76.

- 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: 431-2.
- Dong, C. 2008. 'TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming', *Nat Rev Immunol*, 8: 337-48.
- Eggert, T., K. Wolter, J. Ji, C. Ma, T. Yevesa, S. Klotz, J. Medina-Echeverz, et al. 2016. 'Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression', *Cancer Cell*, 30: 533-47.
- Elderman, M., A. van Beek, E. Brandsma, B. de Haan, H. Savelkoul, P. de Vos, and M. Faas. 2016. 'Sex impacts Th1 cells, Tregs, and DCs in both intestinal and systemic immunity in a mouse strain and location-dependent manner', *Biol Sex Differ*, 7: 21.
- Eruslanov, E. B., S. Singhal, and S. M. Albelda. 2017. 'Mouse versus Human Neutrophils in Cancer: A Major Knowledge Gap', *Trends Cancer*, 3: 149-60.
- Fallah, J., and B. I. Rini. 2019. 'HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development', *Curr Oncol Rep*, 21: 6.
- Feldhoff, L. M., C. M. Rueda, M. E. Moreno-Fernandez, J. Sauer, C. M. Jackson, C. A. Chougnet, and J. Rupp. 2017. 'IL-1 β induced HIF-1 α inhibits the differentiation of human FOXP3(+) T cells', *Sci Rep*, 7: 465.
- Fijak, M., E. Schneider, J. Klug, S. Bhushan, H. Hackstein, G. Schuler, M. Wygrecka, J. Gromoll, and A. Meinhardt. 2011. 'Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion', *J Immunol*, 186: 5162-72.
- Flück, K., G. Breves, J. Fandrey, and S. Winning. 2016. 'Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis', *Mucosal Immunol*, 9: 379-90.
- Frede, S., P. Freitag, T. Otto, C. Heilmaier, and J. Fandrey. 2005. 'The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation', *Cancer Res*, 65: 4690-7.
- Frede, S., C. Stockmann, P. Freitag, and J. Fandrey. 2006. 'Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB', *Biochem J*, 396: 517-27.
- Fridlender, Z. G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G. S. Worthen, and S. M. Albelda. 2009. 'Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN', *Cancer Cell*, 16: 183-94.
- Furman, D., B. P. Hejblum, N. Simon, V. Jojic, C. L. Dekker, R. Thiebaut, R. J. Tibshirani, and M. M. Davis. 2014. 'Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 869-74.
- Fuseini, H., J. A. Yung, J. Y. Cephus, J. Zhang, K. Goleniewska, V. V. Polosukhin, R. S. Peebles, Jr., and D. C. Newcomb. 2018. 'Testosterone Decreases House Dust Mite-Induced Type 2 and IL-17A-Mediated Airway Inflammation', *J Immunol*, 201: 1843-54.

- Gaber, T., C. L. Tran, S. Schellmann, M. Hahne, C. Strehl, P. Hoff, A. Radbruch, G. R. Burmester, and F. Buttgerit. 2013. 'Pathophysiological hypoxia affects the redox state and IL-2 signalling of human CD4+ T cells and concomitantly impairs survival and proliferation', *Eur J Immunol*, 43: 1588-97.
- Gagliano-Juca, T., K. M. Pencina, W. Guo, Z. Li, G. Huang, S. Basaria, and S. Bhasin. 2020. 'Differential effects of testosterone on circulating neutrophils, monocytes, and platelets in men: Findings from two trials', *Andrology*, 8: 1324-31.
- Gao, Z., Y. Gao, Z. Li, Z. Chen, D. Lu, A. Tsun, and B. Li. 2012. 'Synergy between IL-6 and TGF- β signaling promotes FOXP3 degradation', *Int J Clin Exp Pathol*, 5: 626-33.
- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. 'Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells', *Science*, 327: 656-61.
- Girard, S., A. Larouche, H. Kadhim, M. Rola-Pleszczynski, F. Gobeil, and G. Sébire. 2008. 'Lipopolysaccharide and hypoxia/ischemia induced IL-2 expression by microglia in neonatal brain', *Neuroreport*, 19: 997-1002.
- Gonzalez-King, H., N. A. Garcia, I. Ontoria-Oviedo, M. Ciria, J. A. Montero, and P. Sepulveda. 2017. 'Hypoxia Inducible Factor-1alpha Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes', *Stem Cells*, 35: 1747-59.
- Gubbels Bupp, M. R., and T. N. Jorgensen. 2018. 'Androgen-Induced Immunosuppression', *Front Immunol*, 9: 794.
- Guerrant, R. L. 1986. 'Amebiasis: introduction, current status, and research questions', *Rev Infect Dis*, 8: 218-27.
- Guo, H., M. Zheng, K. Zhang, F. Yang, X. Zhang, Q. Han, Z. N. Chen, and P. Zhu. 2016. 'Functional defects in CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) regulatory cells in ankylosing spondylitis', *Sci Rep*, 6: 37559.
- Guo, X., E. Houtp, and W. A. Petri, Jr. 2007. 'Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies', *Curr Opin Immunol*, 19: 376-84.
- Hamers, A. A. J., H. Q. Dinh, G. D. Thomas, P. Marcovecchio, A. Blatchley, C. S. Nakao, C. Kim, et al. 2019. 'Human Monocyte Heterogeneity as Revealed by High-Dimensional Mass Cytometry', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39: 25-36.
- Handelsman, D. J., M. Jimenez, G. K. Singh, J. Spaliviero, R. Desai, and K. A. Walters. 2015. 'Measurement of testosterone by immunoassays and mass spectrometry in mouse serum, testicular, and ovarian extracts', *Endocrinology*, 156: 400-5.
- Hearps, A. C., G. E. Martin, T. A. Angelovich, W. J. Cheng, A. Maisa, A. L. Landay, A. Jaworowski, and S. M. Crowe. 2012. 'Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function', *Aging Cell*, 11: 867-75.
- Helk, E., H. Bernin, T. Ernst, H. Ittrich, T. Jacobs, J. Heeren, F. Tacke, E. Tannich, and H. Lotter. 2013. 'TNF α -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during Entamoeba histolytica infection', *PLoS Pathog*, 9: e1003096.
- Henze, L., D. Schwinge, and C. Schramm. 2020. 'The Effects of Androgens on T Cells: Clues to Female Predominance in Autoimmune Liver Diseases?', *Front Immunol*, 11: 1567.

- Hofer, M. D., E. Y. Cheng, M. I. Bury, W. Xu, S. J. Hong, W. E. Kaplan, and A. K. Sharma. 2015. 'Androgen supplementation in rats increases the inflammatory response and prolongs urethral healing', *Urology*, 85: 691-7.
- Hoffman, K. W., J. J. Lee, G. A. Foster, D. Krysztof, S. L. Stramer, and J. K. Lim. 2019. 'Sex differences in cytokine production following West Nile virus infection: Implications for symptom manifestation', *Pathog Dis*, 77.
- Hovhannisyan, Z., J. Treatman, D. R. Littman, and L. Mayer. 2011. 'Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases', *Gastroenterology*, 140: 957-65.
- Hsu, Y. L., Y. J. Chen, W. A. Chang, S. F. Jian, H. L. Fan, J. Y. Wang, and P. L. Kuo. 2018. 'Interaction between Tumor-Associated Dendritic Cells and Colon Cancer Cells Contributes to Tumor Progression via CXCL1', *Int J Mol Sci*, 19.
- Ivanov, I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. 'The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells', *Cell*, 126: 1121-33.
- Izumi, K., L. Y. Fang, A. Mizokami, M. Namiki, L. Li, W. J. Lin, and C. Chang. 2013. 'Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation', *EMBO Mol Med*, 5: 1383-401.
- Jaillon, S., A. Ponzetta, D. Di Mitri, A. Santoni, R. Bonecchi, and A. Mantovani. 2020. 'Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy', *Nat Rev Cancer*, 20: 485-503.
- Jiang, W., L. Zhang, R. Lang, Z. Li, and G. Gilkeson. 2014. 'Sex differences in monocyte activation in systemic lupus erythematosus (SLE)', *PLoS One*, 9: e114589.
- Ju, C., S. P. Colgan, and H. K. Eltzschig. 2016. 'Hypoxia-inducible factors as molecular targets for liver diseases', *J Mol Med (Berl)*, 94: 613-27.
- Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki. 1996. 'Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells', *Clin Exp Immunol*, 106: 410-5.
- Kay, E., L. Gomez-Garcia, A. Woodfin, R. S. Scotland, and J. R. Whiteford. 2015. 'Sexual dimorphisms in leukocyte trafficking in a mouse peritonitis model', *J Leukoc Biol*, 98: 805-17.
- Kim, E. K., Y. S. Kim, J. A. Milner, and T. T. Wang. 2013. 'Indole-3-carbinol and 3',3'-diindolylmethane modulate androgen's effect on C-C chemokine ligand 2 and monocyte attraction to prostate cancer cells', *Cancer Prev Res (Phila)*, 6: 519-29.
- Kim, H., M. Kim, S. K. Im, and S. Fang. 2018. 'Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes', *Lab Anim Res*, 34: 147-59.
- Klein, S. L., and K. L. Flanagan. 2016. 'Sex differences in immune responses', *Nat Rev Immunol*, 16: 626-38.
- Kluger, M. A., M. C. Meyer, A. Nosko, B. Goerke, M. Luig, C. Wegscheid, G. Tiegs, R. A. Stahl, U. Panzer, and O. M. Steinmetz. 2016. 'ROR γ t(+)Foxp3(+) Cells are an Independent Bifunctional Regulatory T Cell Lineage and Mediate Crescentic GN', *J Am Soc Nephrol*, 27: 454-65.

- Kluger, M. A., A. Nosko, T. Ramcke, B. Goerke, M. C. Meyer, C. Wegscheid, M. Luig, G. Tiegs, R. A. Stahl, and O. M. Steinmetz. 2017. 'ROR γ t expression in T(regs) promotes systemic lupus erythematosus via IL-17 secretion, alteration of T(reg) phenotype and suppression of Th2 responses', *Clin Exp Immunol*, 188: 63-78.
- Kolios, G., V. Valatas, and E. Kouroumalis. 2006. 'Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease', *World J Gastroenterol*, 12: 7413-20.
- Komatsu, N., K. Okamoto, S. Sawa, T. Nakashima, M. Oh-hora, T. Kodama, S. Tanaka, J. A. Bluestone, and H. Takayanagi. 2014. 'Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis', *Nat Med*, 20: 62-8.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jäger, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007. 'IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells', *Nature*, 448: 484-87.
- Lai, J. J., K. P. Lai, K. H. Chuang, P. Chang, I. C. Yu, W. J. Lin, and C. Chang. 2009. 'Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF-alpha expression', *J Clin Invest*, 119: 3739-51.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. 'IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation', *J Exp Med*, 201: 233-40.
- Lapierre, P., K. Beland, C. Martin, F. Alvarez, Jr., and F. Alvarez. 2010. 'Forkhead box p3+ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis', *Hepatology*, 51: 1789-98.
- Laskin, D. L., V. R. Sunil, C. R. Gardner, and J. D. Laskin. 2011. 'Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51: 267-88.
- Lee, J. H., C. Elly, Y. Park, and Y. C. Liu. 2015. 'E3 Ubiquitin Ligase VHL Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α to Maintain Regulatory T Cell Stability and Suppressive Capacity', *Immunity*, 42: 1062-74.
- Legorreta-Herrera, M., K. E. Nava-Castro, M. I. Palacios-Arreola, R. Hernandez-Cervantes, J. Aguilar-Castro, L. A. Cervantes-Candelas, and J. Morales-Montor. 2018. 'Sex-Associated Differential mRNA Expression of Cytokines and Its Regulation by Sex Steroids in Different Brain Regions in a Plasmodium berghei ANKA Model of Cerebral Malaria', *Mediators Inflamm*, 2018: 5258797.
- Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyrna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. 'Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 13031-6.
- Leposavic, G., M. Perisic, D. Kosec, N. Arsenovic-Ranin, K. Radojevic, Z. Stojic-Vukanic, and I. Pilipovic. 2009. 'Neonatal testosterone imprinting affects thymus development and leads to phenotypic rejuvenation and masculinization of the peripheral blood T-cell compartment in adult female rats', *Brain Behav Immun*, 23: 294-304.
- Ley, K., H. M. Hoffman, P. Kubes, M. A. Cassatella, A. Zychlinsky, C. C. Hedrick, and S. D. Catz. 2018. 'Neutrophils: New insights and open questions', *Sci Immunol*, 3.

- Li, Z., D. Li, A. Tsun, and B. Li. 2015. 'FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation', *Cell Mol Immunol*, 12: 558-65.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser. 2006. 'Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides', *J Exp Med*, 203: 2271-9.
- Liaskou, E., D. V. Wilson, and Y. H. Oo. 2012. 'Innate immune cells in liver inflammation', *Mediators Inflamm*, 2012: 949157.
- Liberal, R., C. R. Grant, M. S. Longhi, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2015. 'Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease', *IUBMB Life*, 67: 88-97.
- Liu, C., J. Ma, J. Zhang, H. Zhao, Y. Zhu, J. Qi, L. Liu, et al. 2019. 'Testosterone Deficiency Caused by Castration Modulates Mitochondrial Biogenesis Through the AR/PGC1alpha/TFAM Pathway', *Front Genet*, 10: 505.
- Liu, J., W. Li, W. Zhu, W. He, H. Zhao, Y. Xiang, C. Liu, and W. Wu. 2018. 'Chronic intermittent hypoxia promotes the development of experimental non-alcoholic steatohepatitis by modulating Treg/Th17 differentiation', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 50: 1200-10.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25: 402-8.
- Lo, H. M., T. H. Lai, C. H. Li, and W. B. Wu. 2014. 'TNF-alpha induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways', *Acta Pharmacol Sin*, 35: 339-50.
- Lochner, M., L. Peduto, M. Cherrier, S. Sawa, F. Langa, R. Varona, D. Riethmacher, M. Si-Tahar, J. P. Di Santo, and G. Eberl. 2008. 'In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells', *J Exp Med*, 205: 1381-93.
- 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: 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: e55694.
- Lotter, H., T. Jacobs, I. Gaworski, and E. Tannich. 2006. 'Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease', *Infect Immun*, 74: 118-24.
- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, J. Abraham, et al. 2012. 'Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010', *Lancet*, 380: 2095-128.
- Lum, J. J., T. Bui, M. Gruber, J. D. Gordan, R. J. DeBerardinis, K. L. Covello, M. C. Simon, and C. B. Thompson. 2007. 'The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis', *Genes Dev*, 21: 1037-49.

- Mabjeesh, N. J., M. T. Willard, C. E. Frederickson, H. Zhong, and J. W. Simons. 2003. 'Androgens Stimulate Hypoxia-inducible Factor 1 Activation via Autocrine Loop of Tyrosine Kinase Receptor/Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Protein Kinase B in Prostate Cancer Cells', *Clin Cancer Res*, 9: 2416-25.
- Malkin, C. J., P. J. Pugh, R. D. Jones, D. Kapoor, K. S. Channer, and T. H. Jones. 2004. 'The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men', *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 3313-8.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. 'Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage', *Nature*, 441: 231-4.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends Immunol*, 25: 677-86.
- Marchetti, P. M., and J. H. Barth. 2013. 'Clinical biochemistry of dihydrotestosterone', *Ann Clin Biochem*, 50: 95-107.
- Markman, J. L., R. A. Porritt, D. Wakita, M. E. Lane, D. Martinon, M. Noval Rivas, M. Luu, E. M. Posadas, T. R. Crother, and M. Arditi. 2020. 'Loss of testosterone impairs anti-tumor neutrophil function', *Nat Commun*, 11: 1613.
- Marks, E., C. Naudin, G. Nolan, B. J. Goggins, G. Burns, S. W. Mateer, J. K. Latimore, et al. 2017. 'Regulation of IL-12p40 by HIF controls Th1/Th17 responses to prevent mucosal inflammation', *Mucosal Immunol*, 10: 1224-36.
- Marra, F., and F. Tacke. 2014. 'Roles for chemokines in liver disease', *Gastroenterology*, 147: 577-94 e1.
- Massa, M. G., C. David, S. Jörg, J. Berg, B. Gisevius, S. Hirschberg, R. A. Linker, R. Gold, and A. Haghikia. 2017. 'Testosterone Differentially Affects T Cells and Neurons in Murine and Human Models of Neuroinflammation and Neurodegeneration', *Am J Pathol*, 187: 1613-22.
- Matsui, H., Y. Ihara, Y. Fujio, K. Kunisada, S. Akira, T. Kishimoto, and K. Yamauchi-Takahara. 1999. 'Induction of interleukin (IL)-6 by hypoxia is mediated by nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL6 in cardiac myocytes', *Cardiovasc Res*, 42: 104-12.
- McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea, and D. J. Cua. 2009. 'The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo', *Nat Immunol*, 10: 314-24.
- McMahon, S., M. Charbonneau, S. Grandmont, D. E. Richard, and C. M. Dubois. 2006. 'Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression', *J Biol Chem*, 281: 24171-81.
- Menezes, S., D. Melandri, G. Anselmi, T. Perchet, J. Loschko, J. Dubrot, R. Patel, et al. 2016. 'The Heterogeneity of Ly6C(hi) Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS(+) Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells', *Immunity*, 45: 1205-18.
- Meyer, M., H. Fehling, J. Matthiesen, S. Lorenzen, K. Schuldt, H. Bernin, M. Zaruba, et al. 2016. 'Overexpression of Differentially Expressed Genes Identified in Non-pathogenic and

- Pathogenic *Entamoeba histolytica* Clones Allow Identification of New Pathogenicity Factors Involved in Amoebic Liver Abscess Formation', *PLoS Pathog*, 12: e1005853.
- Mingyuan, X., P. Qianqian, X. Shengquan, Y. Chenyi, L. Rui, S. Yichen, and X. Jinghong. 2018. 'Hypoxia-inducible factor-1 α activates transforming growth factor- β 1/Smad signaling and increases collagen deposition in dermal fibroblasts', *Oncotarget*, 9: 3188-97.
- Mokart, D., E. Kipnis, P. Guerre-Berthelot, N. Vey, C. Capo, A. Sannini, J. P. Brun, et al. 2008. 'Monocyte deactivation in neutropenic acute respiratory distress syndrome patients treated with granulocyte colony-stimulating factor', *Crit Care*, 12: R17.
- Moroda, M., M. Takamoto, Y. Iwakura, J. Nakayama, and F. Aosai. 2017. 'Interleukin-17A-Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Toxoplasma gondii* Infection Due to Excessively Induced T. *gondii* HSP70 and Interferon Gamma Production', *Infect Immun*, 85.
- Murray, P. J. 2017. 'Macrophage Polarization', *Annu Rev Physiol*, 79: 541-66.
- Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2003. 'Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice', *J Immunol*, 171: 6173-7.
- Nath, B., I. Levin, T. Csak, J. Petrasek, C. Mueller, K. Kodys, D. Catalano, P. Mandrekar, and G. Szabo. 2011. 'Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1 α is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice', *Hepatology*, 53: 1526-37.
- Naugler, W. E., T. Sakurai, S. Kim, S. Maeda, K. Kim, A. M. Elsharkawy, and M. Karin. 2007. 'Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production', *Science*, 317: 121-4.
- Nguyen, G. T., E. R. Green, and J. Meccas. 2017. 'Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance', *Front Cell Infect Microbiol*, 7: 373.
- Nishiyama, Y., N. Goda, M. Kanai, D. Niwa, K. Osanai, Y. Yamamoto, N. Senoo-Matsuda, et al. 2012. 'HIF-1 α induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice', *J Hepatol*, 56: 441-7.
- Niu, X., Y. Chen, L. Qi, G. Liang, Y. Wang, L. Zhang, Y. Qu, and W. Wang. 2019. 'Hypoxia regulates angiogenic-osteogenic coupling process via up-regulating IL-6 and IL-8 in human osteoblastic cells through hypoxia-inducible factor-1 α pathway', *Cytokine*, 113: 117-27.
- Noll, J., E. Helk, H. Fehling, H. Bernin, C. Marggraff, T. Jacobs, S. Huber, et al. 2016. 'IL-23 prevents IL-13-dependent tissue repair associated with Ly6C(lo) monocytes in *Entamoeba histolytica*-induced liver damage', *J Hepatol*, 64: 1147-57.
- Norris, C. A., M. He, L. I. Kang, M. Q. Ding, J. E. Radder, M. M. Haynes, Y. Yang, et al. 2014. 'Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli', *PLoS One*, 9: e96053.
- Ohh, M., C. W. Park, M. Ivan, M. A. Hoffman, T. Y. Kim, L. E. Huang, N. Pavletich, V. Chau, and W. G. Kaelin. 2000. 'Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein', *Nat Cell Biol*, 2: 423-7.
- Ohms, M., S. Moller, and T. Laskay. 2020. 'An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro', *Front Immunol*, 11: 532.

- Osorio, F., S. LeibundGut-Landmann, M. Lochner, K. Lahl, T. Sparwasser, G. Eberl, and C. Reis e Sousa. 2008. 'DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers', *Eur J Immunol*, 38: 3274-81.
- Palazon, A., A. W. Goldrath, V. Nizet, and R. S. Johnson. 2014. 'HIF transcription factors, inflammation, and immunity', *Immunity*, 41: 518-28.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, et al. 2005. 'A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17', *Nat Immunol*, 6: 1133-41.
- Peng, X., J. Zhang, Z. Xiao, Y. Dong, and J. Du. 2015. 'CX3CL1-CX3CR1 Interaction Increases the Population of Ly6C(-)CX3CR1(hi) Macrophages Contributing to Unilateral Ureteral Obstruction-Induced Fibrosis', *J Immunol*, 195: 2797-805.
- Peyssonnaud, C., P. Cejudo-Martin, A. Doedens, A. S. Zinkernagel, R. S. Johnson, and V. Nizet. 2007. 'Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis', *J Immunol*, 178: 7516-9.
- Racanelli, V., and B. Rehermann. 2006. 'The liver as an immunological organ', *Hepatology*, 43: S54-62.
- Ripoli, M., A. D'Aprile, G. Quarato, M. Sarasin-Filipowicz, J. Gouttenoire, R. Scrima, O. Cela, et al. 2010. 'Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation', *J Virol*, 84: 647-60.
- Ritzman, A. M., J. M. Hughes-Hanks, V. A. Blaho, L. E. Wax, W. J. Mitchell, and C. R. Brown. 2010. 'The chemokine receptor CXCR2 ligand KC (CXCL1) mediates neutrophil recruitment and is critical for development of experimental Lyme arthritis and carditis', *Infect Immun*, 78: 4593-600.
- Roychowdhury, S., D. J. Chiang, M. R. McMullen, and L. E. Nagy. 2014. 'Moderate, chronic ethanol feeding exacerbates carbon-tetrachloride-induced hepatic fibrosis via hepatocyte-specific hypoxia inducible factor 1 α ', *Pharmacol Res Perspect*, 2: e00061.
- Sakiani, S., N. J. Olsen, and W. J. Kovacs. 2013. 'Gonadal steroids and humoral immunity', *Nat Rev Endocrinol*, 9: 56-62.
- Scalerandi, M. V., N. Peinetti, C. Leimgruber, M. M. Cuello Rubio, J. P. Nicola, G. B. Menezes, C. A. Maldonado, and A. A. Quintar. 2018. 'Inefficient N2-Like Neutrophils Are Promoted by Androgens During Infection', *Front Immunol*, 9: 1980.
- Schneider, M., K. Van Geyte, P. Fraisl, J. Kiss, J. Aragonés, M. Mazzone, H. Mairbörl, et al. 2010. 'Loss or silencing of the PHD1 prolyl hydroxylase protects livers of mice against ischemia/reperfusion injury', *Gastroenterology*, 138: 1143-54.e1-2.
- Schumann, J., D. Wolf, A. Pahl, K. Brune, T. Papadopoulos, N. van Rooijen, and G. Tiegs. 2000. 'Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice', *Am J Pathol*, 157: 1671-83.
- Scott, C. L., F. Zheng, P. De Baetselier, L. Martens, Y. Saeys, S. De Prijck, S. Lippens, et al. 2016. 'Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells', *Nat Commun*, 7: 10321.

- Sellau, J., M. Groneberg, H. Fehling, T. Thye, S. Hoenow, C. Marggraff, M. Weskamm, et al. 2020. 'Androgens predispose males to monocyte-mediated immunopathology by inducing the expression of leukocyte recruitment factor CXCL1', *Nat Commun*, 11: 3459.
- Sellau, J., M. Groneberg, and H. Lotter. 2019. 'Androgen-dependent immune modulation in parasitic infection', *Semin Immunopathol*, 41: 213-24.
- Semenza, G. L. 2004. 'Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level', *Physiology (Bethesda)*, 19: 176-82.
- Semenza, G. L. . 2009. 'Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1', *Physiology (Bethesda)*, 24: 97-106.
- Serbina, N. V., and E. G. Pamer. 2006. 'Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2', *Nat Immunol*, 7: 311-7.
- Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. 'Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization', *J Exp Med*, 201: 723-35.
- Seydel, K. B., T. Zhang, and S. L. Stanley, Jr. 1997. 'Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice', *Infect Immun*, 65: 3951-3.
- Shahrara, S., S. R. Pickens, A. M. Mandelin, 2nd, W. J. Karpus, Q. Huang, J. K. Kolls, and R. M. Pope. 2010. 'IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction', *J Immunol*, 184: 4479-87.
- Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. 'Monocyte recruitment during infection and inflammation', *Nat Rev Immunol*, 11: 762-74.
- Shi, L. Z., R. Wang, G. Huang, P. Vogel, G. Neale, D. R. Green, and H. Chi. 2011. 'HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells', *J Exp Med*, 208: 1367-76.
- Shieh, J. M., Y. J. Tsai, C. J. Tsou, and W. B. Wu. 2014. 'CXCL1 regulation in human pulmonary epithelial cells by tumor necrosis factor', *Cell Physiol Biochem*, 34: 1373-84.
- Shiohara, M., A. F. Gombart, Y. Sekiguchi, E. Hidaka, S. Ito, T. Yamazaki, H. P. Koeffler, and A. Komiyama. 2004. 'Phenotypic and functional alterations of peripheral blood monocytes in neutrophil-specific granule deficiency', *J Leukoc Biol*, 75: 190-7.
- Singh, Y., X. Shi, S. Zhang, A. T. Umbach, H. Chen, M. S. Salker, and F. Lang. 2016. 'Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) expression augments the development of regulatory T cells', *Mol Immunol*, 76: 7-12.
- Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky, and M. S. Jordan. 2009. 'T cell activation', *Annu Rev Immunol*, 27: 591-619.
- Soehnlein, O., A. Zernecke, E. E. Eriksson, A. G. Rothfuchs, C. T. Pham, H. Herwald, K. Bidzhekov, M. E. Rottenberg, C. Weber, and L. Lindbom. 2008. 'Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes', *Blood*, 112: 1461-71.
- Stanley, S. L., Jr. 2003. 'Amoebiasis', *Lancet*, 361: 1025-34.
- Strauss, L., C. Bergmann, M. J. Szczepanski, S. Lang, J. M. Kirkwood, and T. L. Whiteside. 2008. 'Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory

- cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression', *J Immunol*, 180: 2967-80.
- Stritesky, G. L., N. Yeh, and M. H. Kaplan. 2008. 'IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage', *J Immunol*, 181: 5948-55.
- Su, L., N. Li, H. Tang, Z. Lou, X. Chong, C. Zhang, J. Su, and X. Dong. 2018. 'Kupffer cell-derived TNF-alpha promotes hepatocytes to produce CXCL1 and mobilize neutrophils in response to necrotic cells', *Cell Death Dis*, 9: 323.
- Sun, K., N. Halberg, M. Khan, U. J. Magalang, and P. E. Scherer. 2013. 'Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1 α ameliorates adipose tissue dysfunction', *Mol Cell Biol*, 33: 904-17.
- Tacke, F., D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, et al. 2007. 'Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques', *J Clin Invest*, 117: 185-94.
- Tak, E., D. H. Jung, S. H. Kim, G. C. Park, D. Y. Jun, J. Lee, B. H. Jung, et al. 2017. 'Protective role of hypoxia-inducible factor-1 α -dependent CD39 and CD73 in fulminant acute liver failure', *Toxicol Appl Pharmacol*, 314: 72-81.
- Taylor, C. T., and S. P. Colgan. 2017. 'Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches', *Nat Rev Immunol*, 17: 774-85.
- Tiegs, G., and A. W. Lohse. 2010. 'Immune tolerance: what is unique about the liver', *J Autoimmun*, 34: 1-6.
- Trigunaite, A., A. Khan, E. Der, A. Song, S. Varikuti, and T. N. Jorgensen. 2013. 'Gr-1(high) CD11b+ cells suppress B cell differentiation and lupus-like disease in lupus-prone male mice', *Arthritis Rheum*, 65: 2392-402.
- Tuku, B., S. Stanelle-Bertram, J. Sellau, S. Beck, T. Bai, N. M. Kouassi, A. Preuss, et al. 2020. 'Testosterone Protects Against Severe Influenza by Reducing the Pro-Inflammatory Cytokine Response in the Murine Lung', *Front Immunol*, 11: 697.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. 'TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells', *Immunity*, 24: 179-89.
- Villani, A. C., R. Satija, G. Reynolds, S. Sarkizova, K. Shekhar, J. Fletcher, M. Griesbeck, et al. 2017. 'Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors', *Science*, 356.
- Vom Steeg, L. G., S. Dhakal, Y. A. Woldetsadik, H. S. Park, K. R. Mulka, E. C. Reilly, D. J. Topham, and S. L. Klein. 2020. 'Androgen receptor signaling in the lungs mitigates inflammation and improves the outcome of influenza in mice', *PLoS Pathog*, 16: e1008506.
- Voo, K. S., Y. H. Wang, F. R. Santori, C. Boggiano, Y. H. Wang, K. Arima, L. Bover, et al. 2009. 'Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 4793-8.
- Vries, M. H., A. Wagenaar, S. E. Verbruggen, D. G. Molin, I. Dijkgraaf, T. H. Hackeng, and M. J. Post. 2015. 'CXCL1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the peri-collateral space', *Angiogenesis*, 18: 163-71.

- Walecki, M., F. Eisel, J. Klug, N. Baal, A. Paradowska-Dogan, E. Wahle, H. Hackstein, A. Meinhardt, and M. Fijak. 2015. 'Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T-cells', *Mol Biol Cell*, 26: 2845-57.
- Wang, J., M. Hossain, A. Thanabalasuriar, M. Gunzer, C. Meininger, and P. Kubes. 2017. 'Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair', *Science*, 358: 111-16.
- Wang, L., Y. L. Zhang, Q. Y. Lin, Y. Liu, X. M. Guan, X. L. Ma, H. J. Cao, et al. 2018. 'CXCL1-CXCR2 axis mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration', *Eur Heart J*, 39: 1818-31.
- Westendorf, A. M., K. Skibbe, A. Adamczyk, J. Buer, R. Geffers, W. Hansen, E. Pastille, and V. Jendrossek. 2017. 'Hypoxia Enhances Immunosuppression by Inhibiting CD4+ Effector T Cell Function and Promoting Treg Activity', *Cell Physiol Biochem*, 41: 1271-84.
- WHO/PAHO/UNESCO. 1997. 'WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997', *Epidemiol Bull*, 18: 13-4.
- Wiafe, B., A. Adesida, T. Churchill, E. E. Adewuyi, Z. Li, and P. Metcalfe. 2017. 'Hypoxia-increased expression of genes involved in inflammation, dedifferentiation, pro-fibrosis, and extracellular matrix remodeling of human bladder smooth muscle cells', *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 53: 58-66.
- Wolf, A. A., A. Yanez, P. K. Barman, and H. S. Goodridge. 2019. 'The Ontogeny of Monocyte Subsets', *Front Immunol*, 10: 1642.
- Wuerz, T., J. B. Kane, A. K. Boggild, S. Kraiden, J. S. Keystone, M. Fuksa, K. C. Kain, R. Warren, J. Kempston, and J. Anderson. 2012. 'A review of amoebic liver abscess for clinicians in a nonendemic setting', *Can J Gastroenterol*, 26: 729-33.
- Yan, S. F., I. Tritto, D. Pinsky, H. Liao, J. Huang, G. Fuller, J. Brett, L. May, and D. Stern. 1995. 'Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6', *J Biol Chem*, 270: 11463-71.
- Yang, B. H., S. Hagemann, P. Mamareli, U. Lauer, U. Hoffmann, M. Beckstette, L. Föhse, et al. 2016. 'Foxp3(+) T cells expressing ROR γ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation', *Mucosal Immunol*, 9: 444-57.
- Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, et al. 2001. 'Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense', *J Exp Med*, 194: 519-27.
- Zanoni, I., R. Ostuni, L. R. Marek, S. Barresi, R. Barbalat, G. M. Barton, F. Granucci, and J. C. Kagan. 2011. 'CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4', *Cell*, 147: 868-80.
- Zhang, K., L. Tian, L. Liu, Y. Feng, Y. B. Dong, B. Li, D. S. Shang, W. G. Fang, Y. P. Cao, and Y. H. Chen. 2013. 'CXCL1 contributes to beta-amyloid-induced transendothelial migration of monocytes in Alzheimer's disease', *PLoS One*, 8: e72744.

- Zhang, Y., S. F. Wang, J. D. Zheng, C. B. Zhao, Y. N. Zhang, L. L. Liu, and J. H. Huang. 2016. 'Effects of testosterone on the expression levels of AMH, VEGF and HIF-1alpha in mouse granulosa cells', *Exp Ther Med*, 12: 883-88.
- Zheng, S. G., J. Wang, P. Wang, J. D. Gray, and D. A. Horwitz. 2007. 'IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells', *J Immunol*, 178: 2018-27.
- Zhou, J., S. A. Stohlman, D. R. Hinton, and N. W. Marten. 2003. 'Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis', *J Immunol*, 170: 3331-6.
- Zhou, L., M. M. Chong, and D. R. Littman. 2009. 'Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation', *Immunity*, 30: 646-55.
- Ziraldó, C., Y. Vodovotz, R. A. Namas, K. Almahmoud, V. Tapias, Q. Mi, D. Barclay, et al. 2013. 'Central role for MCP-1/CCL2 in injury-induced inflammation revealed by in vitro, in silico, and clinical studies', *PLoS One*, 8: e79804.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der an der Th17 und regulatorischen T-Zelldifferenzierung beteiligten Zytokine. | 4 |
| Abbildung 2: HIF-1 α unter Normoxie und Hypoxie. | 6 |
| Abbildung 3: Lebenszyklus von <i>E. histolytica</i> | 9 |
| Abbildung 4: Immunpathologie in der <i>E. histolytica</i> Infektion.. | 12 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung des Cre/loxP Systems zur Zucht der <i>Hep-HIF-1α^{-/-}</i> Mäuse. | 30 |
| Abbildung 6: Geschlechtsspezifische Unterschiede der CD11b ⁺ Ly6C ⁺ Zellen in Blut und Leber während der murinen <i>E. histolytica</i> Infektion. | 33 |
| Abbildung 7: Geschlechtsspezifische Unterschiede der CD11b ⁺ Ly6C ⁺ Zellen im Knochenmark naiver C57BL/6J Mäuse.. | 34 |
| Abbildung 8: CXCL1 Expression im Verlauf der <i>E. histolytica</i> Infektion. | 35 |
| Abbildung 9: Auswirkungen der CXCL1-Depletion auf die Abszessentwicklung. | 36 |
| Abbildung 10: Geschlechtsspezifische Unterschiede <i>in vitro</i> stimulierter muriner Splenozyten. | 37 |
| Abbildung 11: Geschlechtsspezifische Unterschiede in der TNF, CCL2 und CXCL1 Produktion muriner Leberlymphozyten während der <i>E. histolytica</i> Infektion. | 38 |
| Abbildung 12: Einfluss von Testosteron auf hepatische Ly6C ^{hi} Monozyten und neutrophile Granulozyten in der <i>E. histolytica</i> Infektion. | 39 |
| Abbildung 13: Einfluss von Dihydrotestosteron auf die Zytokinproduktion <i>in vitro</i> stimulierter humaner Monozyten. | 40 |
| Abbildung 14: HIF-1 α , ROR γ und Foxp3 mRNA Expression der Leber während der murinen <i>E. histolytica</i> Infektion. | 42 |
| Abbildung 15: Immunhistologie der HIF-1 α ⁺ Zellen im murinen Amöbenleberabszess. | 43 |
| Abbildung 16: Analyse der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs im Verlauf der murinen <i>E. histolytica</i> Infektion mittels Durchflusszytometrie. | 44 |
| Abbildung 17: Geschlechtsspezifische Analyse der Th17 Zellen, Tregs und BiTregs im Verlauf der murinen <i>E. histolytica</i> Infektion mittels Durchflusszytometrie. | 45 |
| Abbildung 18: Einfluss des leberspezifischen HIF-1 α <i>Knockouts</i> auf die Abszessentwicklung. | 46 |
| Abbildung 19: Einfluss des leberspezifischen HIF-1 α <i>Knockouts</i> auf die Th17 Zellen, Tregs und BiTregs in der murinen <i>E. histolytica</i> Infektion. | 47 |
| Abbildung 20: mRNA Expressionsprofil regulatorischer Zytokine in der Leber <i>E. histolytica</i> -infizierter C57BL/6J Mäuse. | 48 |
| Abbildung 21: Geschlechtsspezifische Unterschiede im mRNA Expressionsprofil regulatorischer Zytokine in der Leber <i>E. histolytica</i> -infizierter <i>Hep-HIF-1α^{-/-}</i> Mäuse. | 50 |
| Abbildung 22: Geschlechtsspezifische Unterschiede der intrazellulären IL-17 und IL-10 Produktion hepatischer CD4 ⁺ T-Zellen <i>E. histolytica</i> -infizierter <i>Hep-HIF-1α^{-/-}</i> Mäuse. | 51 |

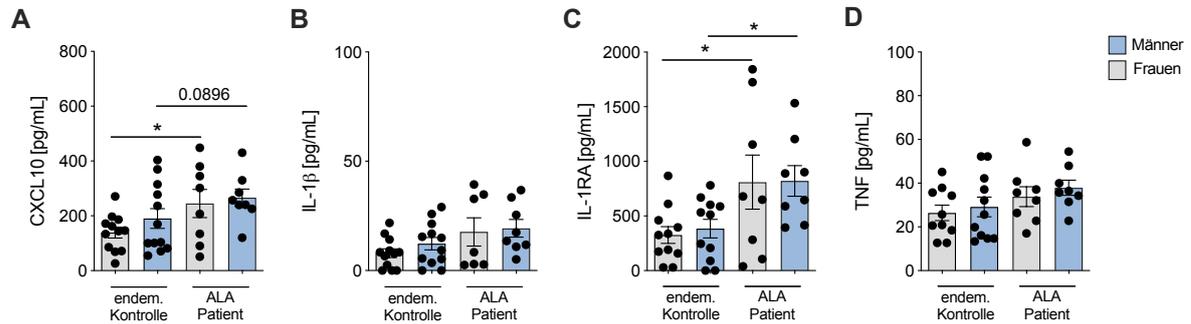
Appendix A: Geschlechtsspezifische Zytokinkonzentrationen im Serum von Probanden einer vietnamesischen Kohorte.....**XXV**

Appendix B: Geschlechtsspezifische Unterschiede *in vitro* stimulierter muriner Splenozyten.....**XXV**

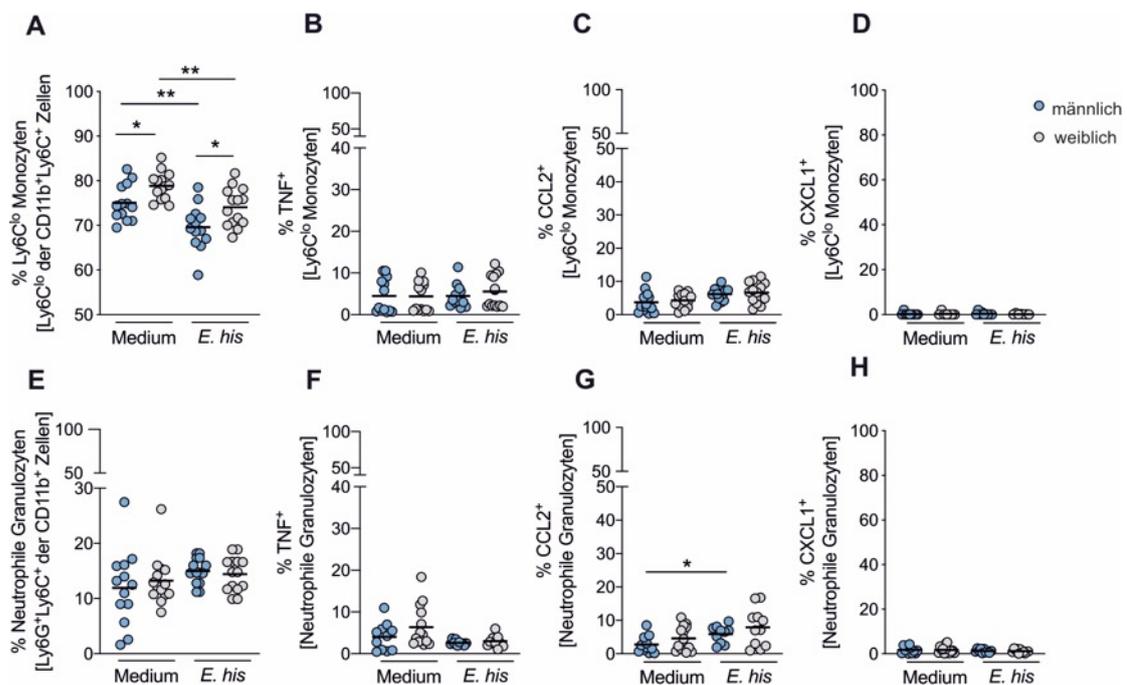
Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Tabelle 1: Auflistung des verwendeten Laborequipments | 15 |
| Tabelle 2: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials | 16 |
| Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien..... | 16 |
| Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits und Reagenzien | 17 |
| Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien und deren Zusammensetzung | 18 |
| Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Stimulantien für <i>in vitro</i> Versuche..... | 19 |
| Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Antikörper | 19 |
| Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide..... | 20 |
| Tabelle 10: Auflistung der verwendete Mauslinien | 21 |
| Tabelle 11: Auflistung verwendeter Software und Datenbanken..... | 21 |
| Tabelle 12: PCR Programm für die <i>AlbCre</i> und <i>HIF-1α^{flox}</i> Genotypisierung..... | 23 |
| Tabelle 13: Größe der <i>AlbCre</i> und <i>HIF-1α^{flox}</i> Amplifikate | 23 |
| Tabelle 14: Verwendetes qPCR Programm..... | 24 |

Appendix



Appendix A: Geschlechtsspezifische Zytokinkonzentrationen im Serum von Probanden einer vietnamesischen Kohorte. CXCL10 (A), IL-1 β (B), IL-1RA (C) und TNF (D) Konzentrationen im Serum weiblicher und männlicher Kontrollprobanden (n=9 Frauen, 10 Männer) und Patienten mit einem Amöbenleberabszess (ALA; n=8). Die Konzentrationen wurden mittels *Bead*-basiertem Immunoassay analysiert (Mann-Whitney U Test; *p < 0,05).



Appendix B: Geschlechtsspezifische Unterschiede *in vitro* stimulierter muriner Splenozyten. Splenozyten aus männlichen und weiblichen C57BL/6J Mäusen wurden isoliert und für 4 h mit *E. histolytica* Lysat (1mg/mL) stimuliert. Ly6C^{lo} Monozyten (A) und neutrophile Granulozyten (E) sowie deren intrazelluläre Produktion von TNF (B, F), CCL2 (C, G) und CXCL1 (D, H) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (fusionierte Daten von zwei unabhängigen Experimenten; n=13-14). (Mann-Whitney U Test; *p < 0,05; **p < 0,01).

Publikationen

- Sellau, J., **M. Groneberg**, and H. Lotter. 2019. 'Androgen-dependent immune modulation in parasitic infection', *Semin Immunopathol*, 41: 213-24.
- Sellau, J., **M. Groneberg**, H. Fehling, T. Thye, S. Hoenow, C. Marggraff, M. Weskamm, C. Hansen, S. Stanelle-Bertram, S. Kuehl, J. Noll, V. Wolf, N. G. Metwally, S. H. Hagen, C. Dorn, J. Wernecke, H. Ittrich, E. Tannich, T. Jacobs, I. Bruchhaus, M. Altfeld, and H. Lotter. 2020. 'Androgens predispose males to monocyte-mediated immunopathology by inducing the expression of leukocyte recruitment factor CXCL1', *Nat Commun*, 11: 3459.
- Fehling, H., S. L. Choy, F. Ting, D. Landschulze, H. Bernin, S. C. Lender, M. Muhlenpfordt, E. Bifeld, J. Eick, C. Marggraff, N. Kottmayr, **M. Groneberg**, S. Hoenow, J. Sellau, J. Clos, C. Meier, and H. Lotter. 2020. 'Antileishmanial Effects of Synthetic EhPIb Analogs Derived from the Entamoeba histolytica Lipopeptidephosphoglycan', *Antimicrob Agents Chemother*, 64.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich in den letzten drei Jahren und beim Anfertigen meiner Dissertation unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Hanna Lotter für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, die konstruktiven Gespräche und die Möglichkeit zur persönlichen Weiterentwicklung bedanken. Ich habe Deinen Einsatz stets sehr geschätzt.

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

Ein ganz großes Dankeschön gilt Dr. Julie Sellau. Vielen Dank für Deine unkomplizierte Unterstützung, die spaßige Zusammenarbeit und besondere Kompetenz in allen immunologischen Fragestellungen. Vielen Dank auch für Deine Mühe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ich möchte zudem allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Infektionsimmunologie für eine entspannte, lustige und herzliche Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere:

- Stefan Hoenow für schöne Zeiten bei uns im Kabuff oder im OP.
- Claudia Marggraff für Deine Unterstützung im Labor und Deine lustige Art.
- Dr. Helena Fehling für Deine gute Laune und Fröhlichkeit.

Dr. Siew-Ling Choy und Dr. Corinna Lender möchte ich für die schöne Zeit im Labor und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Danke, insbesondere Corinna, für Deine ausführlichen Anmerkungen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie meinen Dank aussprechen. Ich danke Euch – Julian, Mama, Papa, Oma und Lena für Eure Unterstützung in den letzten drei Jahren, den liebevollen Rückhalt, das emotionale Mitfiebern und das stets offene Ohr.

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, den 1. Dezember 2020

Ort, Datum

Marie Groneberg

Marie Groneberg