

**Charakterisierung pro-inflammatorischer  
Monozyten in murinen Infektionen mit  
*Entamoeba histolytica* und  
*Listeria monocytogenes***

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Stefan Hoenow**

Hamburg, 2021

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: 11.06.2021**

---

# Inhaltsverzeichnis

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	I
DANKSAGUNG	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Das Immunsystem	5
1.2 Monozyten – Zellen des angeborenen Immunsystems	6
1.2.1 Entwicklungsmöglichkeiten von Monozyten in verschiedene Subpopulationen	7
1.2.2 Rekrutierung und Migration pro-inflammatorischer Monozyten	8
1.2.3 Differenzierung von Ly6C <sup>hi</sup> Monozyten in Makrophagen	9
1.2.4 Antigenpräsentation, Phagozytose und ROS-Produktion als zellbiologische Charakteristika pro-inflammatorischer Monozyten	10
1.2.5 Zytokinproduktion von Monozyten	11
1.2.6 Immunologische Charakterisierung von Monozyten anhand spezifischer Oberflächenmoleküle	14
1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> und immunologische Grundlagen der Listeriose	22
1.4 <i>Entamoeba histolytica</i> und immunologische Grundlagen der Entwicklung des Amöbenleberabszesses	24
1.5 Die Bedeutung pro-inflammatorischer Monozyten in der Listeriose und dem Amöbenleberabszess	26
1.6 Zielsetzung	28
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Material	30
2.1.1 Laborgeräte	30
2.1.2 Oligonukleotide für die PCR	31
2.1.3 Laborreagenzien	32
2.1.4 Puffer und Kulturmedien	34

2.1.5	Antikörper	35
2.1.6	Verwendete Antikörpermischungen zur Färbung spezifischer Epitope	36
2.1.7	Mäuse und Mikroorganismen	39
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	39
2.2.1.1	Kultivierung von <i>Listeria monocytogenes</i>	39
2.2.1.2	Generierung der Infektionsstocks von <i>Listeria monocytogenes</i>	39
2.2.1.3	Intravenöse Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	40
2.2.1.4	Kryokonservierung und Auftauen von <i>Entamoeba histolytica</i>	41
2.2.1.5	Anfertigung des TY-Mediums, Standardkultur von <i>Entamoeba histolytica</i> und Ansetzen der OP-Amöben	41
2.2.2	Tierexperimentelle Arbeiten	43
2.2.2.1	Induktion des Amöbenleberabszesses	43
2.2.2.2	Isolierung und Antikörperfärbung von Splenozyten	44
2.2.2.3	Isolierung und Antikörperfärbung von Lymphozyten aus der Leber	45
2.2.2.4	Terminale Blutentnahme und Verarbeitung des Blutes zur Antikörperfärbung	46
2.2.2.5	Zellzahlbestimmung	47
2.2.2.6	Determinierung der Menge an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies	47
2.2.2.7	Determinierung der Abszessgewichte	48
2.2.2.8	Adoptiver Transfer von Monozyten	48
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	50
2.2.3.1	FACS-Sortierung von Monozyten und Next-Generation Sequencing	50
2.2.3.2	RNA Isolierung, DNase Verdau und Synthese von komplementärer DNA (cDNA)	51
2.2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
2.2.3.4	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	54
2.2.4	Biochemische Methoden	54
2.2.4.1	LEGENDplex zur Beurteilung der Zytokinproduktion	54
2.2.4.2	Immunhistochemische Untersuchung von Paraffinschnitten	55
2.2.5	Statistische Auswertung der Daten	57
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Zytokinmilieu und Lokalisation der Monozyten in der Leber im Verlaufe der Infektion mit <i>E. histolytica</i> und <i>L. monocytogenes</i></b>	<b>58</b>
<b>3.2</b>	<b>Transkriptomanalyse pro- und anti-inflammatorischer Monozyten aus der Leber</b>	<b>61</b>
<b>3.3</b>	<b>Durchflusszytometrische Analyse</b>	<b>72</b>
3.3.1	Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf neutrophilen Granulozyten	77
<b>3.4</b>	<b>Auswirkungen des Knock-outs von CD38 auf die Entwicklung des Amöbenleberabszesses</b>	<b>79</b>
<b>3.5</b>	<b>Regulation und Determinierung intrazellulär gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies</b>	<b>81</b>
<b>3.6</b>	<b>Adoptiver Transfers pro-inflammatorischer Monozyten</b>	<b>86</b>

---

3.7	Einfluss des pro-inflammatorischen Zytokins IL-18 im Infektionsverlauf	91
4	DISKUSSION	99
4.1	Unterschiedliche Entwicklungen pro-inflammatorischer Monozyten zwischen beiden Modellen	100
4.2	Unterschiede im Zytokinmilieu und der Immunhistologie im Verlauf beider Infektionen	102
4.3	Transkriptionelle und durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf pro-inflammatorischen Monozyten	104
4.4	Entwicklung der ROS Produktion in beiden Infektionsmodellen	108
4.5	Adoptiver Transfer von LIS in ALA	110
4.6	Einfluss des pro-inflammatorischen Zytokins IL-18 auf den Infektionsverlauf	114
5	LITERATURVERZEICHNIS	117
	PUBLIKATIONEN	135
	ANHANG	137

## **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 18.03.2021

---

Stefan Hoenow

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Hanna Lotter bedanken. Für die Möglichkeit meine Arbeit unter ihrer Leitung anzufertigen, für die Betreuung und Begutachtung der Dissertation sowie die Hilfen und Ideen bei der Versuchsplanung. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Tim Gilberger für die Übernahme des Zweitgutachtens zu dieser Arbeit.

Großer Dank geht an die ehemaligen und aktuellen Mitglieder der AG Lotter, vor allem Dr. Julie Sellau und Dr. Helena Fehling, für all die Hilfe, die gemeinsame Zeit und das angenehme Arbeitsklima.

Besonderer Dank geht an:

Claudia Marggraff - Danke, dass du mir den Laboralltag erleichtert hast, nicht müde wurde deine weitreichende wissenschaftliche, soziale und musikalische Expertise mit mir zu teilen und immer für etwas Sonnenschein in regnerischen Zeiten gesorgt hast.

Marie Groneberg - Natürlich für deine unzählige Hilfe im Labor, aber vielmehr für unsere gemeinsame Zeit im Büro zwischen Hoffnung, Humor und Verzweiflung. Danke, dass du immer da warst und für die unglaubliche Erfahrung eines blinden Verständnisses.

Malte Vogelsang: Danke für deine Unterstützung, sowohl an der Pipette als auch abseits dessen, ohne die diese Arbeit nicht zu dem werden konnte was sie ist und dass du trotz allem Freund von deine Spieler bist.

Vincent Wolf: Auch du hast nicht unerheblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit, auch wenn wenig unserer gemeinsamen Arbeit in der Dissertation gelandet ist, was aber definitiv nicht an deinen Koch- und Backkünsten liegt.

Zusätzlich bedanke ich mich bei dem Tierhauspersonal des BNI, die es mir ermöglicht haben in diesem Umfang zu Arbeiten.

Zu guter Letzt danke ich Lea Kaminski und meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben. Vielen Dank für eure Geduld, Unterstützung und Aufbauarbeit in allen Lebenslagen. Ich liebe euch!

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	
AF 594/647/700/750	AlexaFluor 594/647/700/750
ALA-Modell	Infektionsmodell der hepatischen Infektion mit <i>Entamoeba histolytica</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle
APC/APC Cy7	Allophycocyanin / Cyanin 7
Bp	Basenpaare
B-Zelle	B-Lymphozyt
CCL	C-C Chemokin Ligand
CCR	C-C Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cADPR	Cyclische Adenosine Diphosphat Ribose
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CX(x)CR	CX(x)C Rezeptor
d“x“ p.i.	Tag „x“ nach der Infektion
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluoreszenz-assozierte Zellsortierung
Fc-Block	Fc-Gamma Rezeptor Blocklösung
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMO	Fluoreszenz Minus One
FSC	Vorwärtsstreulicht
fwd	Vorwärts
GMP	<i>granulocyte and macrophage progenitors</i>
HSNE	Hierarische Stochastische Ähnlichkeitsanalyse
i.h.	intrahepatisch
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleukin



---

KG	Körpergewicht
LIS-Modell	Infektionsmodell der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6C	Lymphozyt Antigen 6 Komplex
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung
MDP	<i>macrophage and DC progenitors</i>
MHC	Haupt Histokompatibilitäts-Komplex
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NK T-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrine
PerCP	Peridinin chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Mustererkennungsrezeptoren
rev	Rückwärts
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SSC	Seitwärtsstreulicht
T-Zelle	T-Lymphozyt
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung muriner und humaner Monozyten anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle .....	7
Abbildung 2: Schema der durchflusszytometrischen Charakterisierung von Monozyten .....	14
Abbildung 3: Signalweg des Toll-like-Rezeptor 4 nach Bindung von LPS durch LBP und CD14.....	18
Abbildung 4: Enzymatische Funktion und intrazellulärer Einfluss des Ektoenzym CD38 .....	19
Abbildung 5: Signalweg in der und Wirkung auf die Zelle der durch CD74 vermittelten Bindung von MIF .....	21
Abbildung 6: Molekulare Bindungspartner von CD86 auf T-Zellen und Auswirkungen auf die T-Zelle	22
Abbildung 7: Infektionsroute von <i>L. monocytogenes</i> und mögliche befallene Organe im Verlauf der Listeriose.....	23
Abbildung 8: Lebenszyklus von <i>E. histolytica</i> und hauptsächlich auftretende Abszesse in Folge einer invasiven Amöbiasis .....	25
Abbildung 9: Auswirkungen der Depletion von CCR2 auf die Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	27
Abbildung 10: Auswirkung der Depletion von CCR2 auf die Infektion mit <i>E. histolytica</i> .....	27
Abbildung 11: Einfluss der Depletion von IL-23 auf die Entwicklung des Amöbenleberabszesses.....	28
Abbildung 12: Zytokinkonzentrationen in der Leber nach Infektion mit <i>E. histolytica</i> oder <i>L. monocytogenes</i> .....	58
Abbildung 13: Lokalisierung von CD11b <sup>+</sup> und Ly6C <sup>+</sup> Zellen sowie <i>E. histolytica</i> Trophozoiten in der Leber .....	60
Abbildung 14: Schematischer Ablauf und durchflusszytometrische Daten der Transkriptomstudie .....	62
Abbildung 15: Darstellung der transkriptionellen Unterschiede in Ly6C <sup>hi</sup> und Ly6C <sup>lo</sup> Monozyten aus beiden Infektionsmodellen .....	64
Abbildung 16: Regulierte Gene im Vergleich der beiden Infektionsmodelle in pro- und anti-inflammatorischen Monozyten .....	65
Abbildung 17: Pathogen abhängige Entwicklung pro-inflammatorischer Monozyten in beiden Infektionsmodellen .....	67
Abbildung 18: Expressionsniveau entwicklungsspezifischer Gene in pro-inflammatorischen Monozyten .....	69
Abbildung 19: Expression Oberflächenprotein-codierender Gene in pro-inflammatorischen Monozyten aus beiden Infektionsmodellen .....	71
Abbildung 20: Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf pro-inflammatorischen Monozyten im Zeitverlauf beider Infektionsmodelle .....	73
Abbildung 21: Hierachial-Stochastic-Neighbour-Embedding Analyse zur Darstellung komplexer Expressionsmuster auf pro-inflammatorischen Monozyten im Verlauf beider Infektionsmodelle	76

---

Abbildung 22: Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf neutrophilen Granulozyten im Zeitverlauf beider Infektionsmodelle.....	78
Abbildung 23: Einfluss des Knock-outs von CD38 auf die Infektion mit <i>E. histolytica</i> .....	80
Abbildung 24: Expression ROS-assoziiierter Gene in beiden Infektionsmodellen .....	82
Abbildung 25: Phänotypische Charakterisierung von pro-inflammatorischen Monozyten anhand der intrazellulären ROS-Produktion .....	83
Abbildung 26: Phänotypische Charakterisierung neutrophiler Granulozyten anhand der intrazellulären ROS-Produktion.....	85
Abbildung 27: Schematischer Ablauf des adoptiven Transfer von pro-inflammatorischen Monozyten	87
Abbildung 28: Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf Ly6C <sup>hi</sup> Monozyten nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ actA.....	88
Abbildung 29: Adoptiver Transfer pro-inflammatorischer Monozyten beeinflusst die Ausbildung des Amöbenleberabszesses .....	90
Abbildung 30: Veränderung der relativen Expression von Genen im IL-18 Signalweg im Verlauf beider Infektionsmodelle .....	92
Abbildung 31: Auswahlstrategie zur Bestimmung möglicher Zielzellen von IL-18 im Verlauf beider Infektionsmodelle .....	93
Abbildung 32: Expression von IL-18R auf verschiedenen Immunzellen im Verlaufe beider Infektionsmodelle .....	95
Abbildung 33: Einfluss des Knock-out von IL-18 auf die Infektion mit <i>E. histolytica</i> .....	97
Anhang 1: Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf pro-inflammatorischen Monozyten im Knochenmark, der Milz und dem Blut im Zeitverlauf beider Infektionsmodelle ..	137
Anhang 2: Analyse des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) auf pro-inflammatorischen Monozyten aus der Leber im Zeitverlauf beider Infektionsmodelle .....	138
Anhang 3: Zytokinkonzentration im Serum nach Infektion mit <i>E. histolytica</i> .....	139

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der für diese Arbeit wichtigsten Zytokine .....	12
Tabelle 2: Geräte .....	30
Tabelle 3: Oligonukleotide für die PCR .....	31
Tabelle 4: Laborreagenzien .....	32
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Kulturmedien .....	34
Tabelle 6: Antikörper .....	35
Tabelle 7: Färbeansatz für die Antikörperfärbung im ROS-Assay (Panel 1) .....	36
Tabelle 8: Färbeansatz für die Antikörperfärbung zur Analyse von Oberflächenproteinen auf Monozyten (Panel 2) .....	37
Tabelle 9: Färbeansatz für die Antikörperfärbung zur Analyse der IL-18R-Expression (Panel 3) .....	37
Tabelle 10: Färbeansatz für die Antikörperfärbung zur Analyse von Oberflächenproteinen auf Monozyten im adoptiven Transfer (Panel 4) .....	38
Tabelle 11: Färbeansatz für die Antikörperfärbung zur Charakterisierung immunologischer Zellpopulationen (Panel 5) .....	38
Tabelle 12: Mäuse und Mikroorganismen .....	39
Tabelle 13: PCR Reaktionsansatz für die Bestimmung der optimalen Annealing Temperatur .....	53
Tabelle 14: PCR Programm zur Bestimmung der optimalen Annealing Temperatur .....	53
Tabelle 15: Allgemein genutzter qPCR Reaktionsansatz .....	54
Tabelle 16: Allgemein genutztes qPCR Programm .....	54
Tabelle 17: Vergleichende Auflistung der exprimierten Marker an der Oberfläche der Ly6C <sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Infektionsmodellen .....	77
Tabelle 18: Beschreibung der untersuchten Zellpopulationen zur Analyse zellulärer Ziele für IL-18 ...	94

---

## Zusammenfassung

Die intestinale Infektion mit dem protozoischen Parasiten *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) kann zu einer invasiven Amöbiasis führen, die in etwa 10 % der Fälle in der Ausbildung eines Amöbenleberabszesses (ALA) resultiert, welcher, unbehandelt im Menschen zum Tod führen kann. Neben *E. histolytica*-assoziierten Pathogenitätsfaktoren ist die Bildung des ALA auf eine Überreaktion des Immunsystems zurückzuführen. *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ist ein gram-positives Bakterium, welches zu einer generalisierten Infektion, der Listeriose, führt, in deren Verlauf schwere Komplikationen wie Sepsis oder Enzephalitis auftreten können. In beiden Infektionen spielen Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten eine wichtige Rolle in der Immunantwort des Wirts. Pro-inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten sind eine heterogene Population angeborener Immunzellen, die pathogenabhängig divergierende Einflüsse auf den Verlauf von Infektionserkrankungen ausüben. Es wurde bisher gezeigt, dass pro-inflammatorische Monozyten die Ausbildung des ALA fördern und die immunpathologische Reaktion unterstützen, jedoch zur Kontrolle der Listeriose essentiell sind und in diesem Kontext protektive Eigenschaften besitzen. In der vorliegenden Dissertation wurden Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im Kontext beider Infektionen auf transkriptioneller und phänotypischer Ebene untersucht, um deren divergierende Funktionen zu analysieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde dargestellt, dass das Transkriptom der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Infektionsmodellen grundlegende Unterschiede aufwies. Eine Analyse entwicklungspezifischer Transkriptionsfaktoren zeigte, dass sich Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in der Infektion mit *L. monocytogenes* überwiegend in neutrophilen-ähnliche Monozyten und pro-inflammatorische M1-Makrophagen differenzieren. Im Kontext des ALA nehmen Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten hingegen einen anti-inflammatorischen Phänotyp an und entwickeln sich verstärkt zu M2-Makrophagen. Weiterhin wird durch die Infektion mit *E. histolytica* in der Leber verstärkt anti-inflammatorisches IL-10 gebildet, wobei die Infektion mit *L. monocytogenes* zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder CCL2 führt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Expression zur Klassifizierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten bisher nicht im Fokus stehender Oberflächenmoleküle analysiert, um eine detailliertere Klassifizierung der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten zu ermöglichen. Es konnte gezeigt

werden, dass CD14, CD38 und CD86 zur tiefergehenden Klassifizierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten genutzt werden können und bereits bekannte Kombinationen von Oberflächenmarkern ergänzen. In Abhängigkeit des Pathogens exprimierten pro-inflammatorische Monozyten verstärkt CD14 und CD38 (*E. histolytica*) oder CD38 und CD86 (*L. monocytogenes*). Zusätzlich produzierten Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im Rahmen einer *L. monocytogenes* Infektion große Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), was durch die Infektion mit *E. histolytica* nicht zu beobachten war. Der adoptive Transfer protektiver Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus der Listeriose in das ALA-Modell führte zu einer signifikanten Verkleinerung der Abszessgröße, was die Möglichkeiten zur therapeutischen Nutzung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten unterstreicht.

Zusammenfassend wurden anhand phänotypischer und funktioneller Analysen Unterschiede zwischen Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Infektionsmodellen identifiziert, die zur Beschreibung eines immunpathologischen und eines regulativen Phänotyps innerhalb der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten genutzt werden können.

---

## Abstract

The intestinal infection with the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) can cause an invasive amoebiasis that results in the development of an amoebic liver abscess in approximately 10 % of the cases which will be fatal if left untreated. The development of the ALA is driven by *E. histolytica* derived pathogenicity factors as well as by the overreaction of the host's immune system. Listeriosis is a generalised infection caused by the gram-positive bacterium *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) which can lead to severe complications like encephalitis or sepsis. Pro-inflammatory Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, a heterogeneous group of innate immune cells, play an important role in the host's immune defence against both pathogens, having diverging effects on the course of the disease. The development of the ALA and a corresponding immunopathology are fostered by Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, nevertheless they have a protective role in listeriosis by controlling the bacterial load. In this thesis the transcriptional and phenotypical differences of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes from both infection models were examined to highlight their diverging functions.

The first part showed that there are highly significant differences in the transcriptome of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes from both infection models. In more detail, during infection with *L. monocytogenes* Ly6C<sup>hi</sup> monocytes develop towards neutrophil-like monocytes and predominantly differentiate into M1 macrophages whereas infection with *E. histolytica* results in an anti-inflammatory phenotype of the Ly6C<sup>hi</sup> monocytes and differentiation into M2 macrophages. Furthermore, during ALA development more anti-inflammatory IL-10 is produced in the liver while pro-inflammatory cytokines like IL-6 or CCL2 are secreted during *L. monocytogenes* infection.

In the second part, the expression of specific surface markers on Ly6C<sup>hi</sup> monocytes was analysed to ensure a more detailed classification. The results showed that CD14, CD38 and CD86 can be used as additional markers to improve the subdivision of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes. During listeriosis the expression of CD38 and CD86 is enhanced whereas during *E. histolytica* infection CD14 and CD38 were higher expressed on Ly6C<sup>hi</sup> monocytes. Moreover, the production of reactive oxygen species (ROS) is supported by the infection with *L. monocytogenes* while it is decreased in Ly6C<sup>hi</sup> monocytes following infection with *E. histolytica*. Finally, it was shown that the transfer of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes from *L. monocytogenes* infected mice into recipient mice infected

with *E. histolytica* results in a significant decrease in abscess size, underlining the therapeutic potential of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes.

Taken together, by using phenotypical and functional analyses the differences between Ly6C<sup>hi</sup> monocytes from both infection models were identified thus the characterisation of an immunopathological and a protective phenotype within Ly6C<sup>hi</sup> monocytes is possible.



## 1 Einleitung

Die Rolle pro-inflammatorischer Monozyten wird im Hinblick des Einflusses auf Infektions- oder Autoimmunerkrankungen kontrovers diskutiert. Sie können sowohl protektive als auch immunpathologische Funktionen ausüben und den Krankheitsverlauf stark beeinflussen. Diese gegensätzliche Rolle pro-inflammatorischer Monozyten wurde in der vorliegenden Arbeit im Kontext zweier hepatischer Infektionen im Tiermodell untersucht. Hierbei handelt es sich um die hepatische Infektion mit dem Parasiten *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), die zur Ausbildung eines Amöbenleberabszesses (ALA) führt und in deren Folge pro-inflammatorische Monozyten zur Immunpathologie beitragen. Das zweite Infektionsmodell stellt die Infektion mit *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) dar, in deren Kontext pro-inflammatorische Monozyten protektiv wirken. Im Folgenden werden zunächst immunologische Grundlagen erläutert.

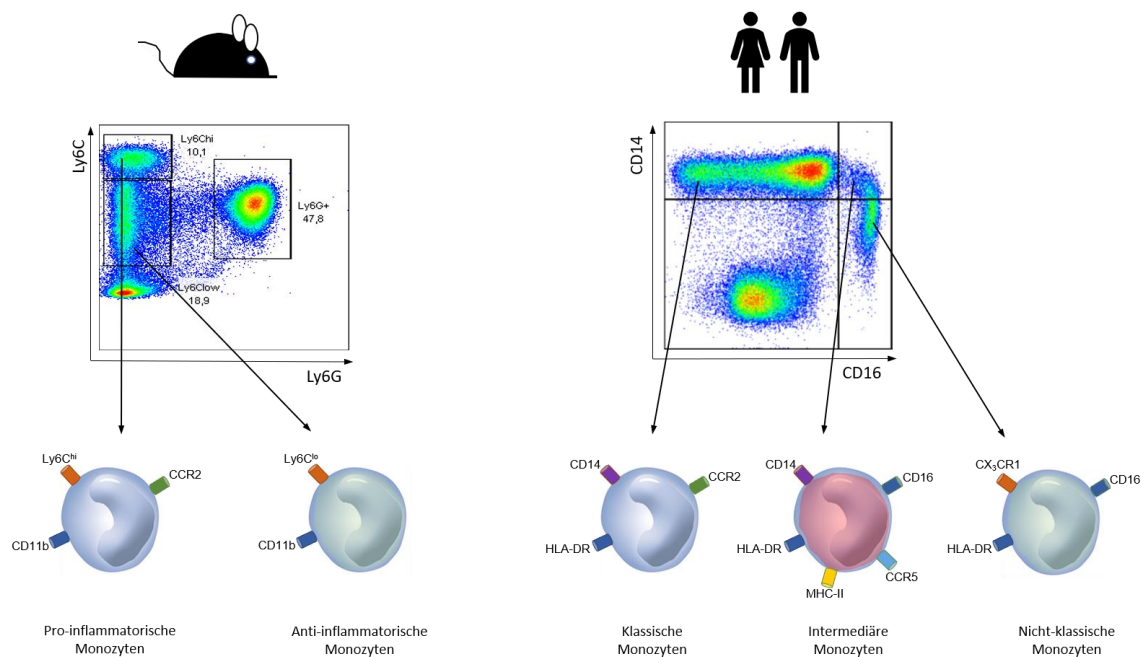
### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus der angeborenen und der erworbenen (adaptiven) Immunität. Das adaptive Immunsystem setzt sich im Wesentlichen aus Dendritischen Zellen, T-Zellen und B-Zellen zusammen, die über die Generierung von Antikörpern eine spezifische Immunantwort ausbilden. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie des Körpers dar und besteht aus zellulären und humoralen Bestandteilen. Die humoralen Bestandteile stellen einerseits Interleukine dar, die andere Immunzellen aktivieren oder inhibieren können und andererseits das Komplementsystem, welches fremde Zellen erkennt und zur Lyse dieser Zellen führt. Die zellulären Bestandteile der angeborenen Immunantwort sind eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten sowie Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen. Hierbei stellen neutrophile Granulozyten mit 50-70 % die größte Population an Immunzellen im Blut dar (1). Sie sind sehr kurzlebige Zellen und wandern im Falle einer Infektion sehr schnell in das betroffene Gewebe ein, phagozytieren dort Pathogene und schütten in großem Maße reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und pro-inflammatorische Zytokine aus (2).

## 1.2 Monozyten – Zellen des angeborenen Immunsystems

Monozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems und gehören, wie auch die Dendritischen Zellen und die gewebsspezifischen Makrophagen, zur Gruppe der mononukleären Phagozyten (3). Sie entstehen aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder der Milz, den Granulozyten- und Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP) oder den Makrophagen und Dendritische Zellen-Vorläufern (MDP) und besitzen eine Lebensdauer von 1-2 Tagen (4, 5). Nach dem Austritt aus ihrem Ursprungsgewebe zirkulieren sie durch den Blutstrom und werden in Gewebe rekrutiert (pro-inflammatorische Monozyten) oder patrouillieren an der Oberfläche von Blutgefäßen (anti-inflammatorische Monozyten) (6–8).

Im Menschen sind drei Subtypen von Monozyten eindeutig beschrieben, die auf Grundlage der Expression von CD14 und CD16 in klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, intermediäre CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> und nicht-klassische CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten unterteilt werden (siehe Abbildung 1) (9). In der Maus werden drei Populationen von Monozyten postuliert, wobei diese, in Anlehnung an die Expression des Oberflächenmoleküls Ly6C, in pro-inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup> und anti-inflammatorische Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten unterteilt werden. Die Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten entsprechen dabei den klassischen und die Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten den nicht-klassischen humanen Monozyten. Die intermediären Monozyten in der Maus (Ly6C<sup>int</sup>) sind bisher nicht vollständig charakterisiert, auch wenn gezeigt wurde, dass sie eine heterogene Zellpopulation bilden (10). Bisher konnten zwei Subpopulationen innerhalb der Ly6C<sup>int</sup> Monozyten identifiziert werden, wobei eine Population positiv für CD209a ist und vermutlich Vorläufer von Dendritischen Zellen mit monozytärem Ursprung (moDC) darstellt (11). Die andere Subpopulation stellt möglicherweise eine Entwicklungsstufe zwischen Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten dar, da diese Population transkriptionelle Charakteristika beider Zelltypen aufweist (12). Jung und Trzebanski weisen in ihrem Review jedoch darauf hin, dass keine Einigkeit über die Ly6C<sup>int</sup> Zellen besteht und sie nur eine Entwicklungsstufe bilden könnten, ohne eine eigenständige Monozytenpopulation darzustellen (4). Aufgrund der bisher nicht eindeutigen Definition der intermediären Monozyten in der Maus werden diese im Rahmen dieser Arbeit nicht als eigenständige Zellpopulation betrachtet.



**Abbildung 1: Einteilung muriner und humaner Monozyten anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle**

Verändert nach: (4, 9, 10, 13, 14)

Monozyten sind, sowohl im Menschen als auch in der Maus, Zellen mit hoher Plastizität, wobei besonders die Entwicklungslinien pro-inflammatorischer Monozyten sehr vielfältig und bisher nicht vollständig geklärt sind. Im Hinblick auf murine Monozyten ist ein akzeptiertes, vorläufiges Modell die Einteilung von Monozyten in die zwei bereits erwähnten Subpopulationen, pro-inflammatorische Monozyten (Ly6C<sup>hi</sup>) und anti-inflammatorischen Monozyten (Ly6C<sup>lo</sup>). Aufgrund der prominenten Rolle der pro-inflammatorischen Monozyten für die beiden untersuchten Infektionsmodelle wird der Fokus der Arbeit auf diesem Zelltyp liegen.

### 1.2.1 Entwicklungsmöglichkeiten von Monozyten in verschiedene Subpopulationen

Neuere Erkenntnisse, besonders auf Grundlage von Einzelzell-Sequenzierungen, deuten darauf hin, dass sich Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten in mindestens 4 verschiedene Subpopulationen entwickeln können. Die bisher am klarsten definierten Subpopulationen sind hierbei Neutrophilen-ähnliche Monozyten (nMo), Dendritische Zellen-ähnliche Monozyten (dcMo), SatM-Monozyten (SatMo) und plastische Monozyten (Mo) (4, 15). Die Analyse der Genexpression dieser Zellen, zeigt deutlich

auf, dass nMo viele Gene exprimieren, die typischerweise von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, wie z.B. *s100a8* oder *elane* wohingegen dcMo viele Gene exprimieren, die mit der Antigenpräsentation assoziiert sind, wie z.B. *cd74* (15, 16). Eine umfassende Beschreibung der phänotypischen Charakteristika dieser Zelltypen ist bisher nicht erfolgt. Es besteht bisher keine Einigkeit darüber, ob diese Zelltypen, analog zu den Ly6C<sup>int</sup> Monozyten, tatsächlich eigenständige Populationen darstellen oder sie verschiedene Entwicklungsstufen von Monozyten sind (4, 17).

Nachdem sie aus dem Knochenmark in die Blutbahn gelangt sind, zirkulieren pro-inflammatorische Monozyten mit dem Blutstrom und wandern u.a. in infiziertes oder entzündetes Gewebe ein. Außerdem entwickeln sie sich, bei fehlendem inflammatorischen Stimulus, in anti-inflammatorische Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten (13). Die Konversion von Ly6C<sup>hi</sup> in Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten wird z.B. durch das Delta-like1 Protein (Dll1), welches auf Endothelzellen vorkommt, vermittelt. Durch Bindung von Dll1 an den Notch2 Rezeptor konnte, in der Arbeit von Gamrekelashvili et al., in einem *in-vitro* Experiment gezeigt werden, dass Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten sich durch diese Bindung zu Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten entwickeln. Diese Entwicklung betrifft sowohl die geringere Expression von Ly6C als auch die verstärkte Expression der Transkriptionsfaktoren *nr4a1* und *pou2f2* (18).

### 1.2.2 Rekrutierung und Migration pro-inflammatorischer Monozyten

Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten exprimieren, im Gegensatz zu Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten, den C-C Chemokin Rezeptor 2 (CCR2), welcher den Rezeptor für den C-C Chemokin Ligand 2 (CCL2) bildet (19). CCL2 sorgt für die Freisetzung der Monozyten aus dem Knochenmark und das Einwandern in infizierte Gewebe (20, 21).

Durch eine Blockade oder den genetischen Knock-out von CCR2 kann die Freisetzung aus dem Knochenmark und die Rekrutierung von Monozyten in die Gewebe verhindert werden (22). Murine Modelle eines CCR2 Knock-outs weisen deutlich geringere Zellzahlen an pro-inflammatorischen Monozyten in der Zirkulation auf (23). Allerdings ist CCR2 zwar der wichtigste, aber nicht der einzige Rezeptor, der für die Rekrutierung von pro-inflammatorischen Monozyten verantwortlich ist, da diese z. B. auch über CCR5 und CXCR3 vermittelt werden kann (20, 24). Weiterhin können Monozyten aus der Milz weitestgehend CCR2 unabhängig mobilisiert werden, da in deren Fall Angiotensin II der entscheidende Faktor ist (5, 25, 26). Diese Populationen, die aus

der Milz rekrutiert wird (25, 26), weist im Vergleich zu Monozyten aus dem Knochenmark eine unterschiedliche Zytokinexpression auf (5). In infiziertem oder geschädigtem Gewebe wird durch eine Vielzahl an Zellen CCL2 sezerniert, was zur Rekrutierung pro-inflammatorischer Monozyten führt (27). Im Gewebe werden Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten u.a. durch IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  aktiviert und tragen zur Auslösung einer pro-inflammatorischen Immunantwort bei. Allerdings können die pro-inflammatorischen Faktoren, insbesondere IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , auch selber sekretieren und damit die Inflammation verstärken (28–31). Monozyten phagozytieren vorhandene Pathogene oder Zelltrümmer, füllen das Reservoir von gewebspezifischen Makrophagen auf (32–34), und können somit zum Auflösen der pro-inflammatorischen Situation beitragen (35).

### 1.2.3 Differenzierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in Makrophagen

Entzündliche Prozesse oder Infektionen können die Apoptose von Makrophagen, wie den Kupffer-Zellen der Leber, induzieren. Die abgestorbenen Zellen werden einerseits durch Zellteilung der noch bestehenden gewebspezifischen Makrophagen ersetzt und andererseits durch einwandernde Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem Blut, die sich in residente Makrophagen entwickeln (36). Jedoch entwickeln sich nicht alle infiltrierenden Monozyten in Makrophagen, sondern können ebenfalls als residente Monozyten erhalten bleiben (5). Der Ursprung gewebspezifischer Makrophagen sind embryonale Stammzellen, die sich komplett unabhängig von hämatopoetischen Stammzellen, den Vorläufern der Monozyten, ausbilden (17, 37). Gewebspezifische Makrophagen monozytären Ursprungs haben mit jenen embryonalen Ursprungs sehr große Ähnlichkeit, jedoch bestehen weiterhin konsistente transkriptionelle und epigenetische Unterschiede (12). In einem Modell, in welchem die Kupffer-Zellen spezifisch depletiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten zu gewebspezifischen Makrophagen der Leber hauptsächlich in den 24 Stunden nach dem Absterben der Kupffer-Zellen stattfindet (33). Obwohl die Population der Kupffer-Zellen erst nach fünf Tagen wieder vollständig aufgefüllt ist, kann einen Tag nach der Depletion kein verstärkter Einstrom pro-inflammatorischer Monozyten festgestellt werden (33). Inflammatorische Zustände können zur unkontrollierten Aktivierung von Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten führen. Dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle bei der Arteriosklerose, kardiovaskulären Erkrankungen (38) oder

Ischämie und Perfusion (26, 39). Eine korrekte Aktivierung von Monozyten ist bei der Bekämpfung von Infektionserkrankungen, wie Malaria oder Dengue ebenfalls entscheidend, da in diesen Erkrankungen einem Großteil der schweren Verläufe eine Immunpathologie zu Grunde liegt (40–42).

Die Differenzierung pro-inflammatorischer Monozyten im Gewebe umfasst vor allem drei Möglichkeiten. Sie können sich in pro-inflammatorische Makrophagen (M1), anti-inflammatorische Makrophagen (M2) oder in Dendritische Zellen mit monozytärem Ursprung (Tip-DC) entwickeln (35). Die Determinierung dessen ist von vielen Faktoren abhängig, hierzu zählen das Zytokinmilieu im Gewebe, vorhandene Pathogene bzw. von diesen freigesetzte Moleküle und auch das vorherige Priming der Monozyten durch Zytokine oder Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), wie z.B. LPS (43, 44). Hohe Konzentrationen an IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  sind für die Entwicklung in Richtung M2-Makrophagen verantwortlich (35, 45), wohingegen IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  die Bildung von M1-Makrophagen unterstützen (45, 46). Die Entwicklung der Makrophagen ist, analog zu der der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten, sehr variabel und es gibt eine große Vielfalt an Subtypen und Entwicklungsschritten (47).

Die Entwicklung und Aktivierung pro-inflammatorischer Monozyten muss sehr gut reguliert werden, da eine zu starke Aktivierung und verstärkte Bildung von M1-Makrophagen zu überbordender Entzündung und einer sich selbst verstärkenden Entzündungskaskade, auf der Grundlage der Ausschüttung von z.B. IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  führen kann (48). Eine zu starke Aktivierung von M2-Makrophagen hingegen trägt zu Fibrose und übermäßigem Gewebewachstum bei (48, 49).

#### **1.2.4 Antigenpräsentation, Phagozytose und ROS-Produktion als zellbiologische Charakteristika pro-inflammatorischer Monozyten**

Monozyten gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APC), nehmen Antigene aus ihrer Umgebung auf und können diese auf ihrer Oberfläche präsentieren (50). Die Erkennung der Antigene erfolgt vor allem über Toll-Like Rezeptoren wie TLR4 und TLR7, die in hohem Maße auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert werden (51). Anschließend erfolgt die Phagozytose, der Verdau im Phagosom und die abschließende Präsentation über einen Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC II). Die Intensität der Phagozytoseaktivität gibt einen Aufschluss über den Aktivierungsstatus der Monozyten und kann somit zur phänotypischen

Charakterisierung herangezogen werden. So steigt die Phagozytoseaktivität pro-inflammatorischer Monozyten während einer Sepsis an (52). Zur Untersuchung dieser Eigenschaft stehen einfache Testsysteme zur Verfügung, die mittels durchflusszytometrischer Analyse die Menge aufgenommener Farbstoff-markierter Partikel bestimmen (53). Die Phagozytoseaktivität ist für die untersuchten Infektionsmodelle jedoch nur bedingt aussagekräftig, da *L. monocytogenes* phagozytiert werden kann, *E. histolytica* aufgrund der Größe jedoch nicht.

Ein weiteres Charakteristikum von Monozyten ist die Produktion intra- und extrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B.  $H_2O_2$  oder  $O_2^-$ . Diese werden zum Abtöten sowohl intra- als auch extrazellulärer Pathogene benötigt und unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt gebildet (54, 55). Zum Nachweis von ROS gibt es photometrische und durchflusszytometrische Testsysteme, wobei der intrazelluläre ROS Nachweis größere Robustheit und eine geringere Fehleranfälligkeit besitzt (56). Eine weit verbreitete Substanz zum Nachweis von ROS ist 2,7-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFDA) oder dessen Derivate. Das Nachweisprinzip dabei ist, dass DCFDA in die Zelle diffundiert und dort von Esterasen deacetyliert wird. Dieses Zwischenprodukt wird durch vorhandene ROS oxidiert, wobei fluoreszierendes 2,7-Dichlorfluorescein (DCF) entsteht (56). Das Ergebnis, die Fluoreszenzintensität, kann je nach Testsystem durchflusszytometrisch oder photometrisch bestimmt werden. Nachteilig hierbei ist, dass die ROS intrazellulär bestimmt werden, was keinen direkten Rückschluss auf die Menge extrazellulärer ROS, die z.B. zur Bekämpfung von *E. histolytica* benötigt werden, zulässt.

### 1.2.5 Zytokinproduktion von Monozyten

Das Immunsystem wird von vielen Signalen beeinflusst. So haben verschiedene Zytokine stimulierende (pro-inflammatorische) oder inhibierende (anti-inflammatorische) Wirkung auf die Aktivität von Immunzellen. Diese Botenstoffe können einerseits von Immunzellen selbst aber auch von anderen Körperzellen produziert werden und auf viele verschiedene Zelltypen wirken. Monozyten produzieren, je nach Aktivierungszustand und umgebendem Milieu, sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine. Pro-inflammatorische Monozyten produzieren z.B.  $TNF\alpha$  oder IL-6, wohingegen anti-inflammatorische Monozyten z.B. IL-10 oder Arg1 bilden (43, 57). Durch eine quantitative oder qualitative Determinierung der

Zytokinmenge können Rückschlüsse auf den Aktivierungsstatus sowie die Funktion der Monozyten gewonnen werden. Problematisch hierbei ist, dass die Monozyten meist für mehrere Stunden in Kultur gehalten und stimuliert werden müssen.

Ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin, das von Monozyten produziert wird, ist IL-18, welches der IL-1 Familie zugeordnet wird. Es bindet an den IL-18 Rezeptor, welcher durch die IL-18R $\alpha$ 1 Kette und die IL-18R $\beta$  Kette, auch IL-18RAP genannt, gebildet wird (58). Die Bindung von IL-18 an den Rezeptor führt zur Aktivierung einer Signalkaskade über MyD88, IRAK und TRAF6 und schließlich zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, welcher die Transkription weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle induziert (59–61). Die Wirkung von IL-18 wurde bisher vor allem auf Zellen des angeborenen Immunsystems, jedoch auch einigen wenigen T-Zell Subtypen, nachgewiesen (62, 63). Die biologische Funktion des IL-18 wird durch das IL-18 Bindeprotein (IL-18BP) inhibiert (64). Im Menschen sind 4 Subtypen des IL-18BP(a-d) beschrieben, wobei in der Maus bisher nur ein Typ des IL-18BP identifiziert wurde (58). Die Bindung an IL-18 findet bei IL-18BP mit höherer Affinität als die Bindung zum IL-18 Rezeptor statt (65). Die Induktion der Expression von IL-18BP, z.B. durch die Applikation von Remifentanyl, zeigt in einem Rattenmodell für Ischämie und Perfusion hepatoprotektive Effekte (66). Weiterhin kann IL-18BP auch IL-37 binden und die biologische Funktion dieses Zytokins inhibieren (64).

In der nachstehenden Tabelle sind die weiteren Zytokine, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, vergleichend dargestellt.

**Tabelle 1: Übersicht der für diese Arbeit wichtigsten Zytokine**

Zusammengestellt mit Informationen aus: (58, 64, 67–73)

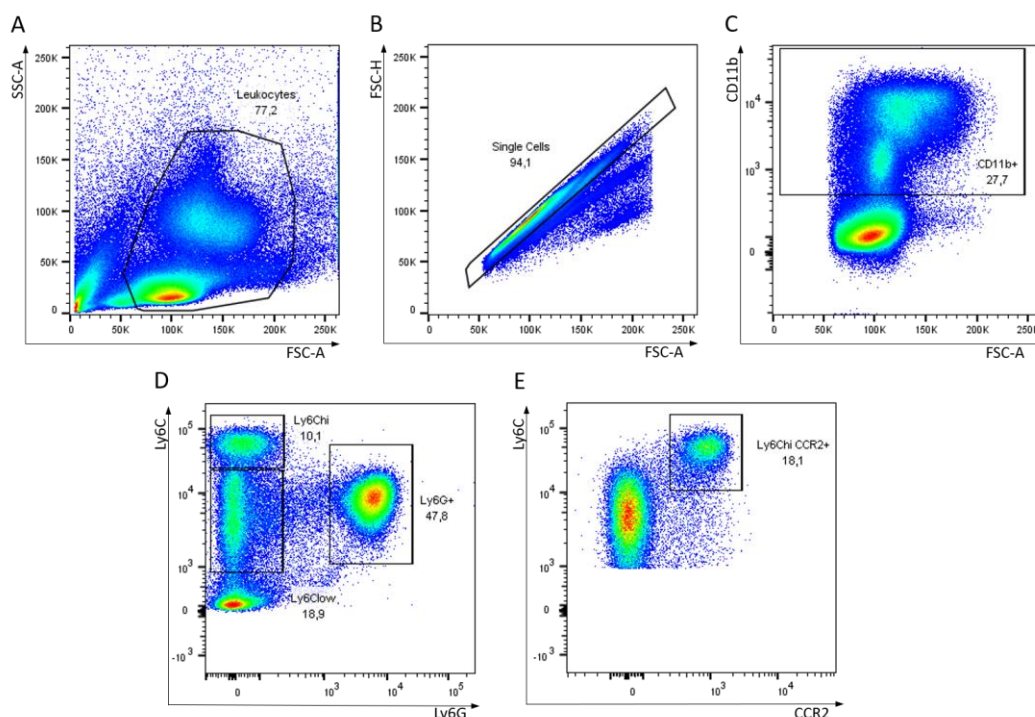
Zytokin	Produktion	Zielzellen	Funktion
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen	Makrophagen, DZ, NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen, Epithelzellen	Vermittlung von Zytotoxizität, Erhöhung der MHC I und MHC II Expression, Stimulation von Immunzellen,
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen,	u.a. Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Epithelzellen, T-Zellen	Induzieren von Apoptose, Produktion von Collagenasen, Produktion von Akute-Phase Proteine,



<b>IL-6</b>	Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Monozyten	u.a. T-Zellen, B- Zellen, Hepatozyten, Monozyten, Makrophagen	Stimulation der IL-6 Produktion, löst Fieber aus Regulation von: Immunantwort, Akut-Phase Reaktion, Hämatopoese, Entzündung, T-Zell und B- Zell-Proliferation
<b>IL-10</b>	CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T- Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DZ	Makrophagen, T- und B- Zellen, NK-Zellen, Mastzellen, DZ, Granulozyten	Inhibierung von IFN $\gamma$ - Produktion in T-Zellen, allgemeine Immunsuppression
<b>IL-17</b>	T <sub>H</sub> 17 Zellen, Monozyten, NK- Zellen, DZ	u.a. Epithelzellen, mesenchymale Zellen	Rekrutierung von Immunzellen, Induktion der Expression pro- inflammatorischer Zytokine und Chemokine
<b>IL-18</b>	Makrophagen, DZ	u.a. Monozyten, Makrophagen, aktivierte T <sub>H</sub> -Zellen	Induktion der Expression pro- inflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle
<b>IL-18BP</b>	Mononukleäre Zellen (z.B. Monozyten)	IL-18 / IL-37	Bindung und Inhibierung der biologischen Funktion von IL- 18 und IL-37
<b>CCL2</b>	u.a. Epithelzellen, Makrophagen, Kupffer-Zellen, Hepatozyten	u.a. Monozyten, T- Zellen, NK-Zellen, B- Zellen, Makrophagen, DZ	Chemotaxis von Immunzellen in infiziertes oder zerstörtes Gewebe
<b>CCL3</b>	Knochen, Knochenmarkszell en	Neutrophile, Eosinophile, Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen	Chemotaxis von Neutrophilen und Monozyten, pro- inflammatorische Aktivierung

## 1.2.6 Immunologische Charakterisierung von Monozyten anhand spezifischer Oberflächenmoleküle

Wie bereits erwähnt, können Monozyten in pro- und anti-inflammatorische Monozyten unterteilt werden. Diese unterscheiden sich jedoch nicht nur anhand ihrer Aufgaben im Immunsystem sondern damit einhergehend auch in der Expression zellspezifischer Oberflächenmoleküle. Die wichtigsten und meist genutzten Moleküle zur Klassifizierung muriner Monozyten sind CD11b, CCR2, Ly6G und Ly6C (4, 9, 14). Im Rahmen dieser Arbeit werden Monozyten mit folgenden Charakteristika beschrieben: Sie sind positiv für CD11b und Ly6C und negativ für Ly6G. Die Einteilung in pro- und anti-inflammatorische Monozyten erfolgt zusätzlich anhand von CCR2 und dem Expressionsniveau von Ly6C. Pro-inflammatorische Monozyten (Ly6C<sup>hi</sup>) werden als CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup>, Ly6C<sup>hi</sup>, CCR2<sup>+</sup> definiert, wohingegen anti-inflammatorische Monozyten (Ly6C<sup>lo</sup>) folgende Kombination aufweisen: CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup>, Ly6C<sup>lo</sup>, CCR2<sup>-</sup>. Beispielhaft ist nachstehend die durchflusszytometrische Charakterisierung dargestellt.



**Abbildung 2: Schema der durchflusszytometrischen Charakterisierung von Monozyten**

Definition der Zellen auf Grundlage der Expression der wichtigsten Oberflächenmoleküle CD11b (C), Ly6C und Ly6G (D) und CCR2 (E)

---

Eine detailliertere Einteilung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in nMO, dcMO und saa3<sup>+</sup>/cxcl10<sup>+</sup> Monozyten wurde bisher vor allem auf Grundlage von Transkriptionsfaktoren postuliert, jedoch nicht auf Ebene spezifischer Oberflächenmarker untersucht (15, 74). Eine Verifizierung dieser neuen Einteilung von Monozyten auf Proteinebene, besonders im Zusammenhang mit einer Infektion, steht noch aus. Mit CD43 und CD62L konnten bisher zwei zusätzliche Oberflächenmoleküle identifiziert werden, die eine kleinteiligere Einteilung inflammatorischer Monozyten in der Homöostase ermöglichen können (14, 75). Eine umfassende Untersuchung in einem Infektionsmodell ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit wurden bisher nicht im Fokus stehende Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten herangezogen. Diese, sowie die wichtigsten Standardmarker, werden im Folgenden genauer erläutert.

### **CD11b**

Es bildet zusammen mit CD18 ein Integrin-Heterodimer, welches auch als Mac-1 bekannt ist (76). Die Expression von CD11b ist auf vielen Immunzellen, vor allem Zellen der myeloiden Entwicklungslinie, welche Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Dendritische Zellen und NK-Zellen beinhaltet, beschrieben (77, 78). CD11b aktiviert viele pro-inflammatorische Mechanismen, wie Migration und Transmigration von Immunzellen (79). Weiterhin spielt es eine Schlüsselrolle in der Phagozytose von Bakterien oder apoptotischen Zellen (80).

### **Ly6C**

Es gibt zwei Formen dieses Oberflächenmoleküls, Ly6C1 und Ly6C2, wobei beide Formen eine hohe Übereinstimmung der Gen- und Proteinsequenz (>95%) aufweisen und durch Antikörper nicht voneinander zu unterscheiden sind (81).

Dieser Marker wird auf vielen Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems, wie T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Dendritischen Zellen exprimiert (81). Er wird einerseits zur Identifizierung von aktivierten Effektor T-Zellen (82) genutzt und andererseits zur Unterscheidung muriner Monozyten in jene mit hoher Expression (Ly6C<sup>hi</sup>) und jene mit niedriger Expression (Ly6C<sup>lo</sup>) (14). Die Expression von Ly6C ist durch Interferon induzierbar (83) und die Aktivierung und Funktionalität von T-Zellen ist an das Vorhandensein von Ly6C gebunden (84). Weiterhin gibt es Publikationen,

die auf einen Einfluss von Ly6C auf die Aktivität und Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten hindeuten (85, 86).

### **Ly6G**

Zusammen mit Ly6C bildet Ly6G, welches ein Glycosylphosphatidylinositol verankertes Protein ist, den Antigenkomplex GR-1 (81, 87). Dieser wurde zunächst als Identifizierungsmarker für Monozyten und neutrophile Granulozyten benutzt, bevor die Auftrennung in Ly6C und Ly6G möglich war (81). Die Expression von Ly6G ist besonders auf neutrophile Granulozyten sowie Monozyten während ihrer Reifung im Knochenmark beschränkt. In der Zirkulation und in Geweben exprimieren Monozyten kein Ly6G. Neutrophile Granulozyten hingegen exprimieren Ly6G verstärkt während der Differenzierung und Reifung, weshalb Ly6G als wichtiger Ausschlussmarker für neutrophile Granulozyten genutzt wird (87–89). Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe hängt essentiell mit der Expression von Ly6G zusammen (90) und die Nutzung von Ly6G-blockierenden Antikörpern beeinflusst ebenfalls die Mobilität und das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten (91, 92).

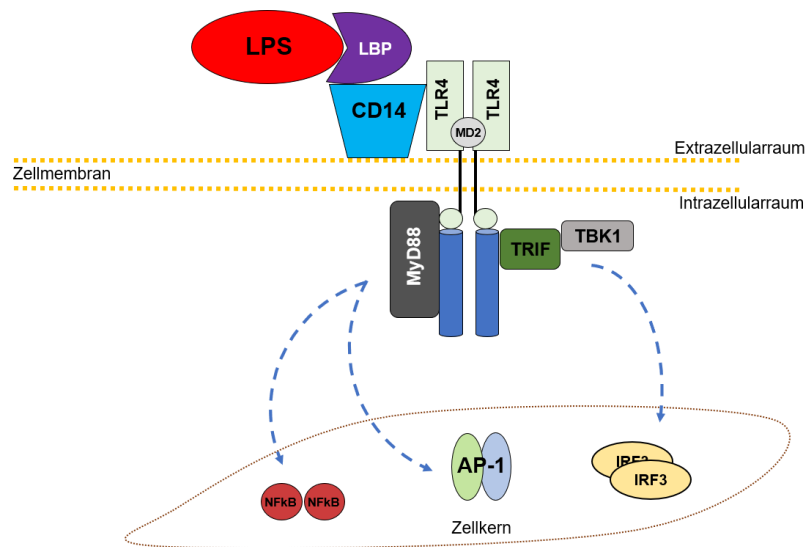
### **CCR2**

Der C-C Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2) ist ein chemotaktischer Rezeptor, der vor allem auf pro-inflammatorischen Monozyten exprimiert wird, obwohl er auch auf Dendritischen Zellen (93) und T-Zellen (94) nachweisbar ist. Das C-C Chemokin 2 (CCL2) bindet an diesen und ist sowohl für das Verlassen der pro-inflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark, als auch für das Einwandern pro-inflammatorischer Monozyten in infiziertes oder entzündetes Gewebe verantwortlich (95, 96). Die Blockade der Interaktion von CCL2/CCR2 als anti-inflammatorische Therapie ist in den vergangenen Jahren intensiv erforscht worden und bietet ein großes therapeutisches Potenzial im Bereich der Krebs- und Autoimmunerkrankungen (97–100). Die Generierung der CCR2 Knock-out Maus (CCR2<sup>-/-</sup>) stellte einen wichtigen Schritt in der Erforschung des Migrationsverhaltens von Monozyten dar. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Migration von Monozyten *in-vivo* und *in-vitro* beeinträchtigt ist und durch den CCR2<sup>-/-</sup> keine CCL2-abhängige Mobilisierung von Monozyten erreicht wird (101). Zusätzlich konnte in der Arbeit von Boring et al. eine Verminderung der Zytokinproduktion durch den CCR2<sup>-/-</sup> festgestellt werden.

In vielen murinen Erkrankungsmodellen sind CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse weniger anfällig oder gänzlich geschützt vor diesen Erkrankungen. Dies gilt z.B. für das Modell der multiplen Sklerose, EAE, (102) sowie für die Dextran-Natrium-Sulfat induzierte Colitis (103). Bakterielle und virale Infektionen, wie *L. monocytogenes* (104), *T. gondii* (105), Chikungunya (CHIKV) oder Ross River Virus (RRV) (106) weisen hingegen zumeist eine höhere Suszeptibilität und einen schwereren Verlauf im CCR2<sup>-/-</sup> auf. Sowohl die milderen Verläufe in EAE und Colitis als auch die schwereren Verläufe in Infektionsmodellen sind auf die verringerte Rekrutierung pro-inflammatorischer Monozyten durch den CCR2 Knock-out zurückzuführen.

### **CD14**

Dieses Oberflächenmolekül zählt zu den Struktur-Erkennungs-Rezeptoren (PRR) und ist bei der Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS), einem wichtigen Baustein bakterieller Zellmembranen, beteiligt, indem es zusammen mit Toll-Like Rezeptor 4 (TLR 4) und dem Lipopolysaccharid-Bindeprotein den LPS-Rezeptor bildet (107, 108). Die Bindung von LPS führt zur Aktivierung des TLR4-Signalweges über MyD88 und TRIF/TRAM, was in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- $\kappa$ B oder IRF3 resultiert und zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt (109). Zusätzlich dient CD14 als Co-Rezeptor für verschiedene Toll-Like-Rezeptoren (TLR) an der Zelloberfläche oder in Endosomen und trägt damit zur Bildung von Typ-I Interferon bei (110). CD14 wird vor allem auf Makrophagen und Monozyten exprimiert (111), ist aber in einigen Fällen auch auf neutrophilen Granulozyten (112) oder Dendritischen Zellen (113) vorhanden. Es werden zwei Formen von CD14 im Körper gebildet, eine membran-gebundene Form (mCD14) und eine lösliche Form (sCD14), welche entweder durch Abtrennung von mCD14 entsteht oder direkt aus Vesikeln sekretiert wird (114). Die genaue Funktion von sCD14 ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch hat es z. B. einen Einfluss auf die Überlebensrate von Zellen in Krebsmodellen (115). Der Signalweg nach Bindung von LPS an CD14 und die Aktivierung der folgenden Signalkette ist in nachstehender Abbildung schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: Signalweg des Toll-like-Rezeptor 4 nach Bindung von LPS durch LBP und CD14**

LPS = Lipopolysaccharid, LBP = LPS Bindeprotein; verändert nach: (116)

Der Knock-out von CD14 führt bei intranasalen Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* oder *Streptococcus pneumoniae* zu einer deutlich erhöhten Überlebensrate sowie geringerer Inflammation (117) und geringerer Bakterienlast in der Lunge (118). Mittels CD14 und CD16 erfolgt die Charakterisierung humaner Monozyten, während CD14 im murinen Modell bisher keinen Standardmarker zur Charakterisierung darstellt.

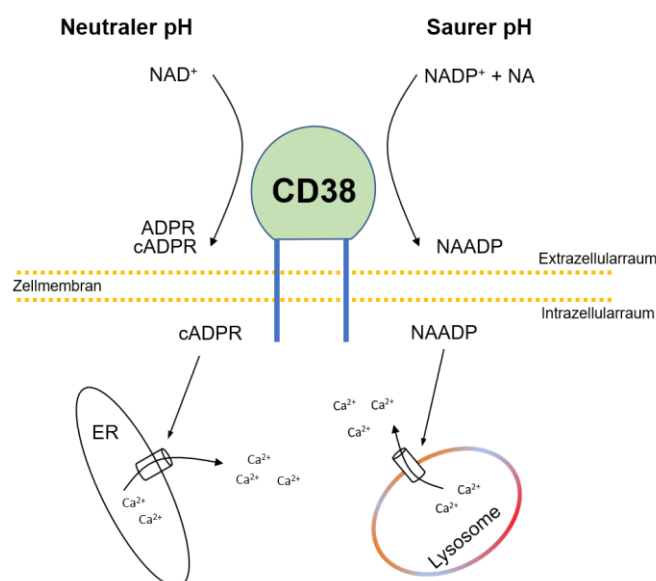
### CD38

Die Erstbeschreibung von CD38 erfolgte als Marker für den Aktivierungsstatus von T-Zellen, wird jedoch auch auf B-Zellen, Dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert (119). Eine wichtige Rolle von CD38 ist die Wirkung als Ektoenzym, denn es wandelt, pH-Wert abhängig,  $\text{NAD}^+$  in cyclisches ADPR (cADPR) (neutraler pH) oder in saurem Milieu  $\text{NADP}^+$  in NAADP um (120). Beides sind sekundäre Botenstoffe, die zur Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum oder aus dem Lysosom sorgen und damit die Autophagie unterstützen oder hemmen (121, 122). Unter physiologischen Bedingungen spielt die Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  in cADPR die wichtigere Rolle und findet zu großen Teilen im extrazellulären Raum statt. Durch den Verbrauch von extrazellulärem NAD reguliert CD38 auch die Menge an verfügbarem Adenosin, was besonders im Hinblick auf die immunsuppressive Wirkung von Adenosin (123), durch

Bindung an purinerge Rezeptoren, von Bedeutung ist. Weiterhin trägt ADPR als second-messenger Molekül entscheidend zur Chemotaxis von Immunzellen bei. Die Blockade von CD38 oder die Inhibierung der cADPR/ADPR Signalkette führt zu stark eingeschränkter Migration von Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen oder Dendritischen Zellen durch chemotaxische Moleküle (124–126).

Die Expression von CD38 in humanen und murinen Makrophagen wird z.B. durch LPS oder IFN $\gamma$  induziert (127, 128), und die Aktivierung von CD38 durch Bindung eines Liganden wie CD31 resultiert in der Expression von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10. Es gibt Hinweise auf zusätzliche Funktionen von CD38 in der Aktivierung und Mobilisierung von Neutrophilen (129), der Beschleunigung des Altersprozesses (120) und einen Einfluss auf das Tumorstadium bei einigen Krebsarten (130–132). Zusätzlich zeigen HIV-1 infizierte Patienten erhöhte Expression von CD38 auf CD8 $^+$  T-Zellen, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Entwicklung von AIDS befinden (133). Andererseits besteht eine Korrelation zwischen hoher CD38 Expression auf CD4 $^+$  T-Zellen und geringer Viruslast in HIV-Patienten (134).

Ein Knock-out von CD38 führt auf zellulärer Ebene zu einer eingeschränkten humoralen Immunantwort auf Grundlage inhibierter Proliferation und Immunglobulin-M Sekretion in B-Zellen (135, 136). Die Blockade von CD38 z.B. im Rahmen einer Antikörpertherapie zur Krebsbehandlung führt zur erhöhten Suszeptibilität gegenüber sekundären Infektionen (137).



**Abbildung 4: Enzymatische Funktion und intrazellulärer Einfluss des Ektoenzym CD38**

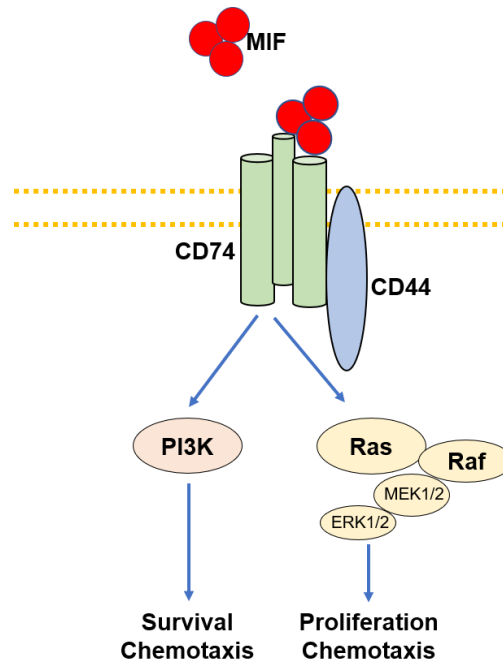
verändert nach: (138, 139)

Der CD38<sup>-/-</sup> führt weiterhin bei einer Infektion mit *L. monocytogenes* zu einer schlechteren Kontrolle der Bakterienlast in der Leber und der Milz, was zu höheren Bakterientitern führt (104). Ebenso steht der Knock-out von CD38 im Zusammenhang mit höherer Suszeptibilität gegenüber *Mycobacterium avium* (140) oder *Streptococcus pneumoniae* (129, 140). Zusätzlich führt der CD38<sup>-/-</sup> zu schnellerer Entwicklung von einigen autoimmunen Erkrankungsmodellen (140). In einem Modell der neurologischen Ischämie zeigt eine Defizienz von CD38 hingegen positive Effekte auf den Heilungsverlauf vermutlich aufgrund geringerer Postischämischer Zytokinproduktion (141).

### **CD74**

Das Typ-II membranintegrierte Protein CD74 weist viele verschiedene Funktionen im Körper auf (142). Es wird vor allem auf Antigen präsentierenden Zellen wie Monozyten oder Dendritischen Zellen exprimiert, ist jedoch auch auf B-Zellen zu finden und wird auf vielen Tumorzellen verstärkt exprimiert (143, 144). Es wirkt als Rezeptor für den Makrophagen Migration Inhibitorischen Faktor (MIF) und ist bei der Antigenpräsentation und der Geweberegeneration beteiligt (145, 146). Bezogen auf Monozyten spielt CD74 vor allem für die Antigenpräsentation und als Rezeptor für MIF eine wichtige Rolle. MIF ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches die Zellproliferation aktiviert und viele weitere Funktionen besitzt (147). Als invariante Kette des MHCII-Komplexes kommt CD74 außerdem eine prominente Rolle bei der Antigenpräsentation zu (148). Einerseits ist es am Transport des MHCII-Komplexes an die Oberfläche beteiligt, andererseits schützt es die Bindungsstelle des MHC-II Komplexes vor der Bindung unerwünschter endogener Proteine (149). Ein Knock-out von CD74 hat, wie auch bei CD38, keinen klaren Phänotyp, weist jedoch vor allem immunsupprimierende Eigenschaften auf. In einem Modell einer okularen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* entwickelten Mäuse mit einer CD74-Defizienz mildere Symptome (150). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass LPS-induzierte myokardiale Anomalien im Tiermodell des CD74 Knock-out nicht mehr auftreten (151) und autoimmune Erkrankungsmodelle weniger schwerwiegend verlaufen (152).





**Abbildung 5: Signalweg in der und Wirkung auf die Zelle der durch CD74 vermittelten Bindung von MIF**  
Verändert nach: (153, 154)

## CD86

Dieses Oberflächenmolekül, ein 70 kDa großes Glycoprotein mit Transmembrandomäne und großer intrazellulärer Domäne, bildet zusammen mit CD80 einen immunologischen Komplex auf Antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen) (155, 156). Weiterhin wird CD86 auf B-Zellen exprimiert, wenn diese z.B. mit IL-4 stimuliert werden. Die Bindung von CD86 an CD28 auf reifen, naiven T-Zellen führt zur Aktivierung der T-Zellen, wohingegen die Interaktion mit dem ko-inhibitorischen Molekül *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) inhibierend auf regulatorische T-Zellen wirkt (157). CD86 wird als Oberflächenprotein zur Charakterisierung pro-inflammatorischer M1-Makrophagen verwendet, da diese mittels CD86 u.a. T-Zellen aktivieren können (158, 159). Die Blockierung von CD86 durch monoklonale Antikörper resultiert in verminderter T-Zellen Stimulation durch Antigen-präsentierende Zellen und führt damit zu geringerer Aktivität von T-Zellen (160).

Der genetische Knock-out von CD86 hat große Auswirkungen auf das Immunsystem und führt sowohl zur Veränderung der Abstoßungsreaktion auf xenographe Organe (161) als auch zur höheren Suszeptibilität gegenüber *T. cruzii* Infektionen (162). Die Ausbildung einer kompletten humoralen Immunantwort nach intravenöser Verabreichung von Antigen ist im CD86<sup>-/-</sup> vermindert (163). Weiterhin werden Ansätze

zur Blockade von CD86 mittels Antikörper intensiv erforscht, um Transplantatabstoßungen zu verhindern (164, 165).

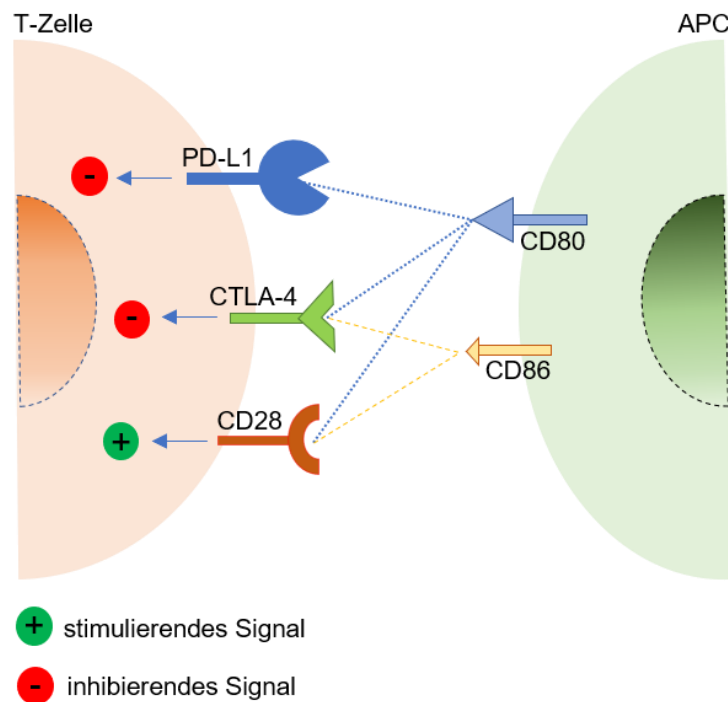
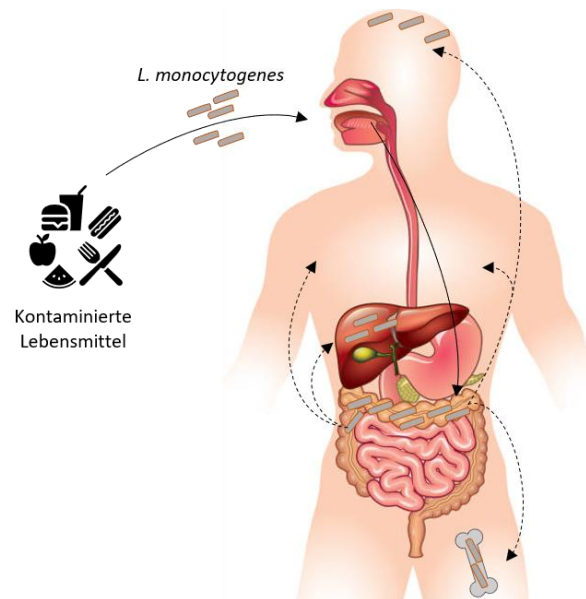


Abbildung 6: Molekulare Bindungspartner von CD86 auf T-Zellen und Auswirkungen auf die T-Zelle verändert nach: (166, 167)

### 1.3 *Listeria monocytogenes* und immunologische Grundlagen der Listeriose

*L. monocytogenes* ist ein gram-positives stäbchenförmiges Bakterium, welches ubiquitär vorkommt (168). Es ist Katalase-positiv sowie Oxidase-negativ und besitzt, obwohl es keine Sporen bildet, eine hohe Widerstandskraft gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen, wie Trockenheit, extremen Temperaturen oder auch dem pH-Wert (169). *L. monocytogenes* besitzt eine hohe Pathogenität und verursacht in verschiedenen Tierarten sowie dem Menschen Erkrankungen, die als Listeriose bezeichnet werden (170).



**Abbildung 7: Infektionsroute von *L. monocytogenes* und mögliche befallene Organe im Verlauf der Listeriose**

Verändert nach: (171, 172)

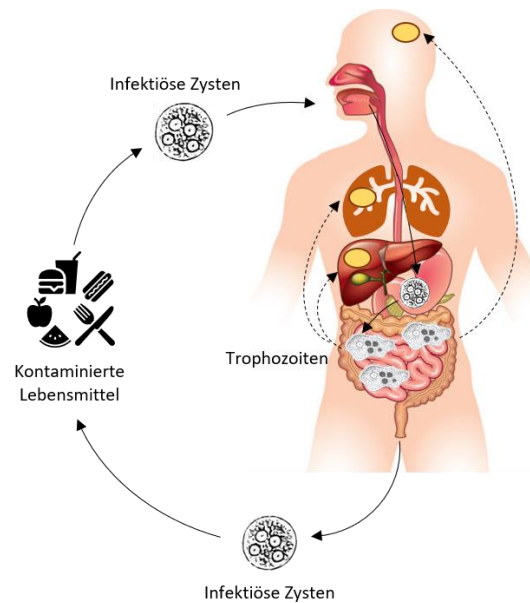
Die Infektion mit Listerien erfolgt fast immer durch verunreinigte Nahrungsmittel wie Fleischwaren oder Molkereiprodukte und sie gehören zusammen mit Salmonella, Toxoplasma, Campylobacter und dem Norovirus zu den am häufigsten durch Lebensmittel übertragenen Krankheitserregern (173). Im Darm werden Listerien von Makrophagen phagozytiert oder sie induzieren die Aufnahme in nicht-phagozytierende Zellen mit Hilfe von InternalinA und B (174). Im Anschluss an die Aufnahme durch die Zielzellen gelangen sie auf der Vakuole ins Zytoplasma der Zielzelle, wobei Porenformenden Proteinen wie Listeriolysin O oder Phospholipasen eine essentielle Bedeutung zukommt (175). Im Zytoplasma vermehren sich die Listerien (176) und können durch die Bildung Aktin-bindender Proteine, z.B. actA, das Zytoskelett der Zelle nutzen, um direkt in benachbarte Zellen einzudringen (177). Diese Fähigkeit spielt eine besondere Rolle bei der Ausbildung einer Enzephalitis, da *L. monocytogenes* Epithelien wie die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (175).

Die meisten Fälle einer Listeriose verlaufen mild oder asymptomatisch, wobei die Letalität bei älteren Menschen (>60 Jahre) und immunsupprimierten Personen stark erhöht ist (172). Eine weitere Gruppe mit stark erhöhtem Risiko sind Neugeborene sowie Föten, die aufgrund ihres noch unterentwickelten Immunsystems weniger Abwehrmöglichkeiten gegen diesen Keim besitzen (170).

Als problematisch stellt sich weiterhin die rechtzeitige Diagnose dar, da diese anhand der Symptomatik (Fieber, Muskelschmerzen, Erbrechen, Durchfall) nicht immer zweifelsfrei möglich ist. Zusätzlich werden Blutbildanalysen, Erreger-spezifische PCR oder die Anzucht der Erreger aus dem Blut oder Liquor zur Sicherung der Diagnose benötigt (172, 178). Im Blutbild der Patienten ist meist eine Leukozytose zu erkennen, eine Erhöhung des Anteils an Leukozyten im Blut, seltener tritt eine wirkliche Monozytose, eine Erhöhung des Anteils an Monozyten im Blut der Patienten, auf (179). Wird eine Infektion mit *L. monocytogenes* zu spät erkannt und es entwickelt sich eine Listerien-Meningitis oder eine Listerien-Sepsis, verlaufen diese auch mit medikamentöser Therapie in 13 – 21 % der Fälle tödlich (172). Eine Therapie erfolgt mit Ampicillin, Amoxicillin oder auch Gentamycin (178). Die Inzidenz der Listeriose liegt in Deutschland bei bis zu 600 Fällen pro Jahr mit einer Letalität von 7% (172).

#### **1.4 *Entamoeba histolytica* und immunologische Grundlagen der Entwicklung des Amöbenleberabszesses**

*E. histolytica* ist ein anaerob lebender einzelliger Parasit und der Erreger der Amöbiasis. Jedes Jahr treten schätzungsweise 40 Millionen Infektionen auf, welche zu etwa 50.000 Todesfällen pro Jahr führen (180). Damit ist eine Infektion mit *E. histolytica* die dritt häufigste Parasiten-bedingte Todesursache (181). Der weitaus größte Anteil an Infektionen mit *E. histolytica* findet in tropischen und subtropischen Ländern wie Indien, Mexiko, Brasilien oder Nigeria (182) statt. In industrialisierten Ländern finden kaum Übertragungen statt, was vor allem an besseren hygienischen Standards liegt. Die Aufnahme infektiöser Zysten erfolgt über kontaminierte Lebensmittel oder Wasser (183). Als Zysten überstehen die Zellen die Magenpassage und gelangen in den Darm des Wirtes, wo sie excystieren, zu Trophozoiten werden und die Darmschleimhaut besiedeln (183). Einige Trophozoiten entwickeln sich zu Zysten, lösen sich von der Darmmukosa, werden über den Stuhl ausgeschieden und können somit verbreitet werden (183).



**Abbildung 8: Lebenszyklus von *E. histolytica* und hauptsächlich auftretende Abszesse in Folge einer invasiven Amöbiasis**

Verändert nach: (184, 185)

Infektionen mit *E. histolytica* verlaufen in den meisten Fällen asymptomatisch. Bei einer apparenten Infektion treten hingegen Symptome wie blutige Diarrhoe, abdominale Beschwerden und Fieber auf (186). Die Diagnose der Infektion kann über mikroskopische Stuhluntersuchung erfolgen, jedoch werden, aufgrund der höheren Sensitivität, mittlerweile PCR und, bei extraintestinaler Infektion, serologische Bestimmung von Antikörpern mittels ELISA bevorzugt (184, 187). Zur Behandlung einer Amöbiasis werden Metronidazol, Tinidazol oder Paromomycin eingesetzt.

Die klinisch bedeutsamste Komplikation einer intestinalen Amöbiasis stellt die Ausbildung eines Amöbenabszesses dar. Im Verlauf der Amöbiasis können Trophozoiten die Darmmukosa überwinden, in den Blutstrom übergehen und in periphere Organe gelangen. Werden die Amöben durch den Blutstrom in die Leber transportiert, führen sie hier zur Ausbildung eines ALA (185). Die Ausbildung des Amöbenleberabszess ist einerseits auf Pathogenitätsfaktoren der Amöben und andererseits auf eine Überreaktion des Immunsystems auf die Amöben (188, 189) zurückzuführen. Beim Eindringen von *E. histolytica* in das Lebergewebe sorgen die Amöben selbst durch Sekretion von Virulenzfaktoren, wie Cysteinproteasen, Prostaglandin E2 oder dem *E. histolytica* homolog des *Monocyte Migration Inhibitory Factors* (*EhMIF*) dafür, dass das Immunsystem sehr stark aktiviert wird (189). Als erstes strömen neutrophile Granulozyten in das Gewebe ein, welche durch Ausschüttung zytotoxischer Granula dazu beitragen die Amöben abzutöten (190). Der

---

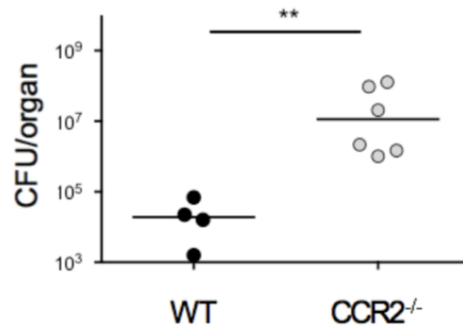
massive Einstrom und das Absterben der neutrophilen Granulozyten, sowie die bereits genannten Pathogenitätsfaktoren bewirken die pro-inflammatorische Aktivierung von Monozyten und Makrophagen (189, 191). Diese sind an der Beseitigung der Amöben durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Mediatoren, wie TNF und ROS beteiligt, verstärken dabei jedoch den Einstrom von Immunzellen sowie die Überreaktion der leberständigen Makrophagen, welche den Infektionsherd umschließen und zur Bildung des Abszesses führen (181, 189, 192, 193).

### **1.5 Die Bedeutung pro-inflammatorischer Monozyten in der Listeriose und dem Amöbenleberabszess**

Im Hinblick auf beide Infektionen konnten bereits divergierende Einflüsse pro-inflammatorischer Monozyten auf den Verlauf der Infektion festgestellt werden (104, 194).

Phagozytierende Zellen wie Monozyten, neutrophile Granulozyten und auch andere Zellen des angeborenen Immunsystems sind, besonders zu Beginn der Infektion essentiell für die Bekämpfung einer Infektion mit *L. monocytogenes* (27, 195). In den ersten Tagen sind fast ausschließlich die Zellen des angeborenen Immunsystems für die Bekämpfung der Infektion verantwortlich. In einem Mausmodell der Listeriose, in welchem die Rekrutierung pro-inflammatorischer Monozyten stark vermindert ist (*CCR2<sup>-/-</sup>*), ist die Bakterienlast in der Leber und der Milz signifikant erhöht (104). Im späteren Verlauf einer Listeriose ist die adaptive Immunantwort entscheidend beteiligt. Durch cytotoxische T-Zellen werden infizierte Zellen abgetötet und sorgen somit für eine Eliminierung der Bakterien (196, 197). Aus diesem Grund sind Personen mit geschwächter adaptiver Immunantwort, wie beispielsweise HIV Patienten oder ältere Menschen, deutlich anfälliger für schwere Verläufe einer Listeriose (170).

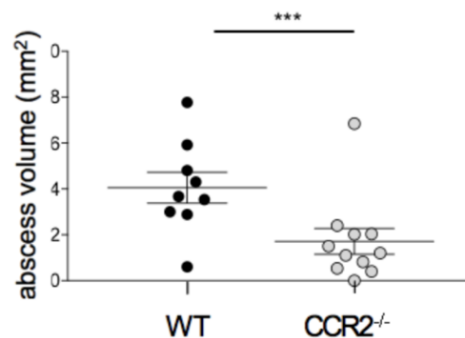
Die schlechtere Kontrolle der Bakterienlast in der Leber und der Milz in der *CCR2<sup>-/-</sup>* Maus zeigt die protektive Wirkung pro-inflammatorischer Monozyten im Infektionsmodell der Listeriose auf.



**Abbildung 9: Auswirkungen der Depletion von CCR2 auf die Infektion mit *L. monocytogenes***

Anstieg der Bakterienlast in der Leber anhand der Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) an Tag 2 nach der Infektion mit *L. monocytogenes* in C57Bl6/J Wildtyp und CCR2 Knock-out (CCR2<sup>-/-</sup>) Mäusen, Daten entnommen aus (104).

Im Infektionsmodell der hepatischen Amöbiasis kommt den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in der pro-inflammatorischen Kaskade, die zur Ausbildung des ALA führt, eine Schlüsselrolle zu. Der Amöbenleberabszess im CCR2<sup>-/-</sup> ist an Tag 3 nach Infektion, dem Zeitpunkt der maximalen Ausprägung, signifikant schwächer ausgeprägt (siehe Abbildung 10). Die Depletion von neutrophilen Granulozyten durch Clodronat verringert das Volumen des ALA hingegen nicht signifikant (194). Die Überreaktion des Immunsystems (Immunpathologie) auf die Amöben in der Leber ist maßgeblich für die Ausbildung des Abszesses verantwortlich, da immunsupprimierende Medikamente die Ausbildung eines ALA verhindern bzw. abschwächen (198). Diese Immunpathologie ist, wie bereits beschrieben, zu großem Teil von Monozyten und Makrophagen verursacht, was diese Zelltypen auch als therapeutische Ansatzpunkte besonders interessant macht.

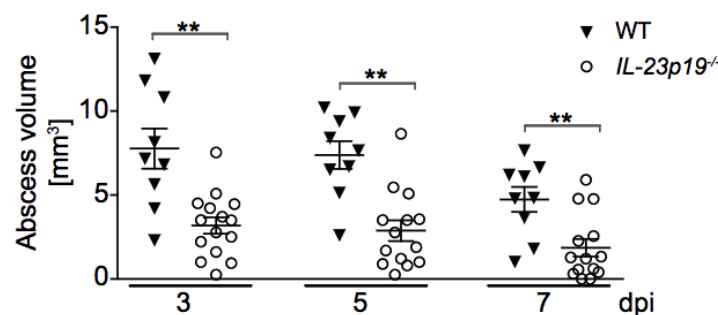


**Abbildung 10: Auswirkung der Depletion von CCR2 auf die Infektion mit *E. histolytica***

Darstellung der Größe des Amöbenleberabszess an Tag 3 nach der Infektion [mm<sup>3</sup>]; Vergleich zwischen Wildtyp-Tieren und CCR2<sup>-/-</sup>; Daten entnommen aus: (194).

Weiterhin ist bekannt, dass Monozyten durch Zytokine in ihrem Phänotyp beeinflusst werden können. Die Depletion von IL-23 führt zu signifikant geringeren

Abszessgrößen im Vergleich zu Kontrolltieren (siehe Abbildung 3) (199). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine spezifische therapeutische Beeinflussung von Monozyten möglich ist, um den Verlauf der Erkrankung abzumildern. Anstatt einer generellen Immunsuppression, wie durch die Depletion von IL-23, ist ein selektiver Mechanismus wünschenswert, der spezifisch auf die Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten wirkt. Für die Entwicklung eines spezifischen Therapeutikums ist jedoch ein besseres Verständnis der Rolle der Monozyten im Verlauf des Amöbenleberabszesses unerlässlich.



**Abbildung 11: Einfluss der Depletion von IL-23 auf die Entwicklung des Amöbenleberabszesses**

Darstellung der Größe des Amöbenleberabszess an Tag 3, 5 und 7 nach der Infektion; Vergleich zwischen Wildtyp und IL-23<sup>-/-</sup> Mäusen; Daten entnommen aus (199).

## 1.6 Zielsetzung

Pro-inflammatorische Monozyten haben im Kontext der hepatischen Amöbiasis und der Infektion mit *L. monocytogenes* unterschiedliche Auswirkungen auf den Infektionsverlauf. Der protektiven Funktion in der Listeriose, die u.a. die Phagozytose der Bakterien umfasst, steht die Verstärkung der Immunpathologie in der hepatischen Amöbiasis gegenüber, die zur Ausbildung des Amöbenleberabszesses führt. Bisherige Ergebnisse und neue Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass pro-inflammatorische Monozyten keine homogene Zellpopulation bilden. Diese These sollte mit Hilfe der beschriebenen Infektionsmodelle, untersucht werden. Hierzu wurde eine Transkriptomstudie der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Modellen angefertigt, auf Grundlage derer eine differenziertere Genexpressionsanalyse erfolgte.

Es sollten die Unterschiede in entwicklungspezifischen Genen, Transkriptionsfaktoren und Genen, welche für Oberflächenproteine codieren,



analysiert werden. Weiterhin wurde die Lokalisation der Monozyten und das Zytokinmilieu im infizierten Lebergewebe untersucht.

Im Verlauf beider Infektionsmodelle wurde eine detaillierte Charakterisierung der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Infektionen auf Grundlage der Expression spezifischer Oberflächenmarker sowie anhand der Produktion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies vorgenommen werden, um eine phänotypische Beschreibung der jeweiligen Subpopulation zu ermöglichen.

Abschließend wurde mittels adoptivem Transfer der Monozyten vom Modell der Listeriose in das Modell der hepatischen Amöbiasis untersucht, ob der protektive Phänotyp der Monozyten stabil und auf eine andere Infektion übertragbar ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Modell / Hersteller
Chirurgische Klammern	Woundclip Autoclip 9mm, #427631; Becton Dickinson
Durchflusszytometer	FACSAria II, LSR II, Accuri C6, Fortessa; BD Biosciences
Edelstahlkugeln	5 mm; Qiagen
EPC-Inkubator	Thermomixer 5436; Eppendorf
EPC-Schüttler	Vortexgenie 2, Scientific Industries
Gelelektrophorese-System	Gene Power Supply GPS 200/400; Pharmacia EVL 310; Consort
Infrarotlampe	SIL-06; Sanitas
Isoflurananlage	FlowMeter, Penton Sigma Delta Verdampfer, Absaugereinrichtung VaporGuard; UNO
Kochplatten	CT1810; Rommelsbacher
Mikroskope	Eclipse TS100; Nikon BZ-X; Keyence
PCR Maschine	Primus 96 plus; MWG AG Biotech
Pipetten	Pipet-Lite XLS, Gilson
Photometer	Nano-Drop 2000c; ThermoFisher Scientific
qPCR Maschinen	Quantitative real-time PCR Cyclers „CorbettRG6000“; Qiagen LightCycler 480 II; Roche
Schermaschine	GT420 Isis; Aesculap
Sterilwerkbank	Nunc-Microflow; Microflow GmbH Lamin Air HB2448; Heraeus Instruments
Wärmeplatten	Temperature Controller, CU0901432; UNO
Zellkulturbrutschränke	HERA cell 150i; ThermoFisher Scientific B 6060; Heraeus instruments Innova Co170; New Brunswick Scientific

Zellaufschluss	TissueLyser LT; Qiagen
Zellkulturflaschen	T25, T75, T150; Sarstedt
Zellkulturplatte	6-, 12-, 24-, 48-Wells, TC-Standard; Sarstedt 96-Well CELLSTAR; Greiner
Zellsiebe	70 µm #83.3945.070; Sarstedt 50 µm steril, #CT190207; Sysmex 50 µm unsteril, #CT191040
Zentrifugen	5424 D, 5810 R, 5427R; Eppendorf Varifuge 3.0R; Heraeus Sepatech

## 2.1.2 Oligonukleotide für die PCR

Tabelle 3: Oligonukleotide für die PCR

Gen	Primersequenz 5' > 3'
<i>gapdh</i>	Fwd: GGTGTGAACCACGAGAAAT Rev: CCTTCCACAATGCCAAAGTT
<i>il-18</i>	Fwd: CAAAGAAAGCCGCCTCAAACC Rev: AAAGTTGTCTGATTCCAGGTCTCC
<i>Il-18r</i>	Fwd: CACTGTCTTCTGCTGTCTGGAG Rev: GTGGCTGTTTCATTCCTGTGC
<i>Il-18bp</i>	Fwd: ACCTCACCCCTCTCTCTAAGG Rev: ACTGCCTCCTTGGAGTTTGTT
<i>Il-18rap</i>	Fwd: ACTTGAAACCCTCTTCCTCCAG Rev: ACTTTGAAACCCTCTTCCTCCAG
<i>rps9</i>	Fwd: GCTAGACGAGAAGGATCCCC Rev: TTGCGGACCCTAATGTGACG
<i>ncf1</i>	Fwd: AAGCTCCTGGATGGCTGGT Rev: CCTGGCGCTCACCCTTTGT

### 2.1.3 Laborreagenzien

Tabelle 4: Laborreagenzien

Reagenz	Firma / Zusammensetzung
Antibody-Diluent	Fa. Zytomed #ZC025-100
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Fa. Roth #K298.1
Ampuwa H <sub>2</sub> O	Fa. Fresenius
Ammonium-Eisen(III)-Citrat	#F5879; Fa. Sigma Aldrich
Atipamezol	Antisedan, 134786-3; Fa. Orion Pharma
L(+)-Ascorbinsäure	#20150.184; Fa. VWR Chemicals
Chloroform	#102442; Fa. Merck
CM-H2DCFDA	Fa. ThermoFisher Scientific
L-Cystein Hydrochlorid Anhydrid	#C19051353; Fa. US Biological Life Sciences
Ethanol	#100983; Merck
BBL Hefeextrakt	#211929, Fa. BD Biosciences
QuantiFAST SYBR Green RT-PCR Kit	Fa. Qiagen
cDNA Synthese Kit: Maxima Erststrang-cDNA-Synthesekit	K 1642; Fa. ThermoFisher Scientific
DMEM	Fa. Sigma-Aldrich
Eukitt	
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. PAN-Biotech
Fc-Block	
Gentamycin	
Glucose	#X997.3; Fa. Roth
L-Glutamin	Fa. PAA
Isopropanol	#6752.4; Fa. Roth
Isofluran	Fa. Piramal Healthcare
Kaliumchlorid (KCl)	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	#104873; Fa. Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	#105104; Fa. Merck
Ketamin	Ketamin Inresa 10 mL; Fa. Inresa GmbH
Kompensationsbeads	One Comp Beads, #01-1111-42; Fa. Invitrogen  One Comp Ultra Beads, #01-2222-42; Fa. Invitrogen

LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation	Fa. ThermoFisher Scientific
Maxima First Strand Synthesis Kit with dsDNase	Fa. ThermoFisher Scientific
Medetomidin	Cepetor; Fa. CP Pharma
Molekulargewichtsmarker für Agarosegelelektrophorese	Fa. ThermoFisher Scientific GeneRuler 100 bp Gene Ladder
Monozytenisoliations-Kit	EasySep Mouse Monocyte, #19801A; Fa. StemCell Monocyte Isolation Kit mouse (BM), #130-100-629; Fa. Miltenyi
Chirurgisches Nahtmaterial	Vicry Plus VCP 315H; Fa. Ethicon
Natriumacetattrihydrat	
Natriumchlorid	#3957.1; Fa. Roth
Natriumhydroxid	#106469; Fa. Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	#4984.1; Fa. Roth
Paraformaldehyd (PFA)	#K12297505; Fa. Merck
Penicillin/Streptomycin- 100x Mix	#PS-B; Fa. Capricorn
Percoll	Fa. GE Healthcare
Perm/Wash	#51-2091KZ; Fa. BD Biosciences
Phagocytose-Kit	Phagocytosis Assay-Kit (IgG-PE) #600540; Fa. Cayman Chemicals
Proteaseinhibitor	Fa. Roche
Restriktionsenzyme	Fa. ThermoFisher Scientific
RNase-Free Dnase Set (50)	#79254; Fa. Qiagen
RPMI	Fa. Sigma-Aldrich
Trimethylbenzidin (TMB)	
TRIS	#4855.2; Fa. Roth
TRIZol Reagenz	#15596026; Fa. Life Technologies
BBL Trypticase Peptone	#211921; Fa. BD Biosciences
Tween20	
Ultrapure Agarose	#16500-500; Fa. Invitrogen
qPCR-Kit: Maxima SYBR Green 2x qPCR Master Mix	Fa. ThermoFischer Scientific
Rinderserum	ABS-1A Lot: CP18-2056; Fa. Capricorn
Vitamin-Mix (Diamond Vitamin Tween 80 Solution)	Fa. BioConcept; #5-78F00-I
Zitronensäure-Monohydrat	Fa. Sigma Aldrich; #C7129-500G

## 2.1.4 Puffer und Kulturmedien

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Kulturmedien

Name	Zusammensetzung / Firma
Citratpuffer für IHC	Zitronensäure-Monohydrat 2,1 g/L; pH 6,0 mit NaOH einstellen
DMEM-Medium	+ 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 0,5 % Gentamycin
DPBS	Dulbecco's PBS Fa. Pan Biotech
FACS-Puffer	2 % FCS in PBS, steril filtriert
PFA-Lösung zur Fixierung von Zellen	Stammlösung: 4 % PFA in PBS lösen; zur Anwendung ggf. in PBS verdünnt
RPMI-Medium	Fa. Pan Biotech + 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 0,5 % Gentamycin
Erythrozytenlysepuffer	9 Teile 0,16 M NH <sub>4</sub> Cl + 1 Teil 0,17 M TRIS 0,16M NH <sub>4</sub> Cl: 8,5 g/L in dH <sub>2</sub> O TRIS Base (pure): 20,6 g/L, pH 7,6
LEGENDplex Lysepuffer	0,05 % Tween 20; eine Tablette Proteaseinhibitor; in PBS; steril filtrieren
Percoll-Lösung	100 %iges Percoll: 1 Teil 10-fach PBS + 9 Teile Percoll 40/80 %iges Percoll: 4/8 Teile 100% iges Percoll + 6/2 Teile komplettes RPMI Medium
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	20 x Stammlösung: KCl 4 g/L; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4 g/L; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O 23 g/L; NaCl 160 g/L; pH nicht eingestellt
Spülpuffer für IHC	NaCl 8,2 g/L; TRIS Base (pure) 1,2 g/L; Tween 20 250 µL/L; pH 7,4; in dH <sub>2</sub> O
TAE-Puffer für Agarosegelelektrophorese	50x Stammlösung: Natriumacetattrihydrat 34 g/L; TRIS Base (pure) 242 g/L; Dinatrium-EDTA 37,25 g/L; pH 7,9; in dH <sub>2</sub> O
TMB-Stammlösung	30 mg Tetramethylbenzidine in 5 mL DMSO
TBE-Puffer	0,89 M Tris; 0,89 M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 20 mM EDTA
TY-Medium (ohne Rinderserum, Vitaminmix, Penicillin/Streptomycin = inkomplettes TY- Medium)	Angaben für Endvolumen von 4350 mL: Trypticase 100 g; Hefeextrakt 50 g; Glucose 50 g; NaCl 10 g; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,8 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 g; L-Cystein 5 g; Ascorbinsäure 1 g; Fe(III)Ammoniumcitrat 114 mg; pH 6,8 500 mL Rinderserum 150 mL Vitamin-Mix 50 ml Pencillin-Streptomycin-Mix

## 2.1.5 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Epitop	Klon / Cat.No.	Anwendung	Konjugierter Farbstoff	Firma
CD4	RM 4-5	FACS	FITC	Biolegend
			APC	
CD8	GK1.5	FACS	PE	BD Bioscience
	53-6.7		Alexa Fluor 488	Biolegend
			PE	
			APC	
		FITC	BD Bioscience	
CD11b	M1/70	FACS	BV510	Biolegend
CD11c	N418	FACS	FITC	Biolegend
CD14	Sa14-2	FACS	BV421, PE-Texas Red	Biolegend
CD19		FACS		Biolegend
CD38	90	FACS	PE-Cy7	Biolegend
CD49b	DX5	FACS	PE	Biolegend
CD62L	MEL-14	FACS	BV711	Biolegend
CD74	In1/CD74	FACS	AF647	Biolegend
CD86	GL-1	FACS	AF700	Biolegend
CD206	C068C2	FACS	BV605	Biolegend
CCR2	FAB55381RS	FACS	AF750	R&D Systems
CX3CR1	SAO11F11	FACS	PerCP/Cy5.5	Biolegend
F4/80	BM8	FACS	BV421	Biolegend
			BV650	
IL-18R	FAB1216T	FACS	AF594	R&D Systems
Ly6C	HK1.4	FACS	FITC	Biolegend
			PE	
			APC	
Ly6G	1A8	FACS	APC	Biolegend
			BV785	
			APC/Cy7	
NK1.1	PK136	FACS	BV421	Biolegend
IL-18BP	Bs-4040R	IHC		Bioss
F4/80	MCA497RT	IHC		BioRad

7/4	CL8993AP	IHC	Cedarlane
CD11b	Ab133357	IHC	Abcam
Rgs16	Orb412239	IHC	Biorbyt
	Orb312923		
Arg1	610709	IHC	BD Biosciences

## 2.1.6 Verwendete Antikörpermischungen zur Färbung spezifischer Epitope

Tabelle 7: Färbeansatz für die Antikörperfärbung im ROS-Assay (Panel 1)

Epitop	Farbstoff	Eingesetzte Verdünnung des Antikörpers
Ly6C	PE	1:800
Ly6G	APC	1:400
CD11b	BV510	1:400
F4/80	BV421	1:100
CCR2	AF750	1:100
CD38	PE/Cy7	1:600
CX3CR1	PerCP-Cy5.5	1:100
	Fc-Block	Ad 30 µL



**Tabelle 8: Färbeansatz für die Antikörperfärbung zur Analyse von Oberflächenproteinen auf Monozyten (Panel 2)**

<b>Epitop</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung des Antikörpers</b>
Ly6C	FITC	1:400
Ly6G	BV785	1:400
CD11b	BV510	1:200
F4/80	BV650	1:200
CCR2	AF750	1:100
CX3CR1	PerCP-Cy5.5	1:400
CD14	BV421	1:200
CD38	PE/Cy7	1:600
CD49b	PE-Texas	1:200
CD74	AF647	1:200
CD86	AF700	1:400
IL-18R	AF594	1:100
	Fc-Block	Ad 30µL

**Tabelle 9: Färbeansatz für die Antikörperfärbung zur Analyse der IL-18R-Expression (Panel 3)**

<b>Epitop</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung des Antikörpers</b>
Ly6C	APC	1:400
Ly6G	BV785	1:400
CD11b	BV510	1:400
F4/80	BUV737	1:200
CD11c	FITC	1:100
CD19	PE-Cy7	1:100
IL-18R	AF594	1:100
CD3	AF700	1:100
NK1.1	BV421	1:100
	Fc-Block	Ad 30 µL

**Tabelle 10: Färbeansatz für die Antikörperfärbung zur Analyse von Oberflächenproteinen auf Monozyten im adoptiven Transfer (Panel 4)**

<b>Epitop</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung des Antikörpers</b>
CX3CR1	PerCP-Cy5.5	1:400
Ly6C	FITC	1:400
CD38	PE-Cy7	1:600
CD45.1	PE	1:200
CCR2	AF750	1:100
CD86	AF700	1:400
CD74	AF647	1:200
Ly6G	BV785	1:400
CD45.2	BV650	1:200
CD11b	BV510	1:200
CD14	BV421	1:400
F4/80	BUV737	1:200
Viability	Zombie UV	1:1000
	Fc-Block	Ad 30 µL

**Tabelle 11: Färbeansatz für die Antikörperfärbung zur Charakterisierung immunologischer Zellpopulationen (Panel 5)**

<b>Epitop</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung des Antikörpers</b>
CX3CR1	PerCP-Cy5.5	1:400
CD45	FITC	1:100
CD38	PE-Cy7	1:600
SiglecF	PE	1:100
CCR2	AF750	1:100
CD86	AF700	1:400
Ly6C	APC	1:600
Ly6G	BV785	1:400
F4/80	BV650	1:200
CD11b	BV510	1:400
NK1.1	BV421	1:100
	Fc-Block	Ad 30 µL

## 2.1.7 Mäuse und Mikroorganismen

Tabelle 12: Mäuse und Mikroorganismen

Stamm	Herkunft	Abkürzung in der Arbeit
C57 BL/6J Wildtyp	BNITM Hamburg	WT
C57 BL/6J CD38 Knock-out	UKE - Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker (UKE)	CD38 <sup>-/-</sup>
C57 BL/6J IL-18 Knock-out	Jackson Laboratories – zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Manuel Friese - Zucht am BNITM Hamburg	IL-18 <sup>-/-</sup>
C57 BL/6J CD45.1	BNITM Hamburg	CD45.1
C57 BL/6J CCR2 knock-out	BNITM Hamburg	CCR2 <sup>-/-</sup>
<i>Entamoeba histolytica</i> Klon: B2-5	BNITM Hamburg	B2-5
<i>Listeria monocytogenes</i> Stamm EGD	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker (UKE)	LIS
<i>Listeria monocytogenes</i> Stamm $\Delta$ actA	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker (UKE)	LIS $\Delta$ actA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *Listeria monocytogenes*

Die Anzucht von *L. monocytogenes* (Stamm EGD und  $\Delta$ actA) erfolgte auf TSB-Agar bzw. in TSB-Medium. Eine dauerhafte Kultur wurde nicht durchgeführt, sondern nur kurzzeitige Anzuchten zur Gewinnung von Infektionsstocks oder hitze-inaktivierten *L. monocytogenes*.

#### 2.2.1.2 Generierung der Infektionsstocks von *Listeria monocytogenes*

Ein Infektionsstock mit bekannter Zellzahl (bereitgestellt von der AG Mittrücker (UKE)) wurde genutzt um C57Bl6/J Männchen zu infizieren. Die Infektionsdosis lag bei  $1 \times 10^4$  Bakterien pro Tier und wurde wie in 2.2.1.3 beschrieben durchgeführt. An d3 p.i. wurde

ein Leberlappen des infizierten Tieres entnommen, homogenisiert und anschließend mit sterilem PBS bis  $10^{-7}$  verdünnt. Aus den Verdünnungstufen  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  wurden 100  $\mu$ L auf Palcam-Agarplatten ausplattiert und 48 h bei 37 °C inkubiert. Die Bebrütung fand auf Palcam-Agar statt, da dieser als Selektivagar für *L. monocytogenes* genutzt wird. Dieser Selektivnährboden ist durch die Zugabe von Lithiumchlorid, Ceftazidim, Polymyxin B und Acriflavin hochselektiv und durch die Verstoffwechslung von enthaltenem Äsculin und anschließender Reaktion mit weiteren Inhaltsstoffen entstehen schwarze Höfe um Kolonien von *L. monocytogenes*. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte das Überführen einer Einzelkolonie, die einen schwarzen Vorhof aufwies, in 100 mL vorgewärmtes TSB-Medium. Die Kultur inkubierte ü.N. bei 200 rpm und 37 °C. Anschließend erfolgte die Abschätzung der Zelldichte mittels Messung der OD<sub>600</sub> (OD<sub>600</sub> von 1.0 =  $8 \times 10^9$  Zellen / mL). Im Anschluss wurde die Kultur auf zwei 50 mL Schraubdeckelgefäße aufgeteilt und bei 2000 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet zweimal mit eiskaltem, sterilem PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte ein Resuspendieren der Zellen in 50 mL sterilem PBS/10% Glycerin. Die Suspension wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur exakten Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE), wurde ein Aliquot mit sterilem PBS bis  $10^{-8}$  verdünnt, anschließend 100  $\mu$ L der  $10^{-4}$  bis  $10^{-8}$  Verdünnungen jeweils auf einer TSB-Agarplatte ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{KBE} = 10 * \text{Zellzahl} * \text{Verdünnungsstufe}$$

Die Infektionsstocks für *L. monocytogenes*  $\Delta$ actA wurden, aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur Ausbildung einer stabilen Infektion, direkt aus einer Übernachtskultur gewonnen und es erfolgte keine Passage über eine Maus.

#### 2.2.1.3 Intravenöse Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die Infektion mit *L. monocytogenes* erfolgte intravenös und ohne Narkose. Die Tiere wurden mit Hilfe einer Infrarotlampe erwärmt und anschließend in eine Fixationsröhre platziert. Die *L. monocytogenes* (EGD =  $1 \times 10^4$  bzw.  $\Delta$ actA =  $1 \times 10^7$ ) wurden in einem Volumen von 200  $\mu$ L PBS (auf 37°C vorgewärmt) i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die

Injektion dauert nur wenige Sekunden. Im Anschluss, sofern keine Blutungen auftraten, wurden die Tiere zurück in den Käfig gesetzt.

#### 2.2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von *Entamoeba histolytica*

Der im Folgenden beschriebene Ablauf gilt für eine T25-Zellkulturflasche. Der Gefrierbehälter wurde 45 min vor Benutzung zur Vorkühlung bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Kryo-Röhrchen mit Schraubdeckel wurden mit 100 µL DMSO und 60 µL 50 %iger Sucroslösung (beides steril) befüllt.

Die Amöben sollten eine Konfluenz von ca. 90% aufweisen. Das alte Medium wurde entfernt und die Amöben in 5 mL eiskaltem TY-Medium abgelöst und resuspendiert. Im Anschluss wurden 840 µL der Zellsuspension in die vorgefüllten Schraubdeckelgefäße überführt. Die befüllten Röhrchen wurden in den Gefrierbehälter gegeben und ü.N. in einer -80 °C Tiefkühltruhe gelagert. Hierdurch erfolgte ein definiertes Abkühlen der Suspension von 1 °C/min. Im Anschluss wurden die Kryo-Röhrchen zur Langzeitlagerung in Kryotanks, welche flüssigen Stickstoff als Kühlmittel verwenden, überführt.

Zur Überprüfung der Kryokonservierung, wurde einige Tage später ein Aliquot entnommen und entsprechend folgendem, allgemein gültigem, Ablauf aufgetaut.

Direkt nach der Entnahme aus dem Kryotank wurde das Röhrchen auf Eis gelagert. Mit vorgewärmtem TY-Medium (37°C) wurde das Röhrchen aufgefüllt und die Suspension zügig zum Schmelzen gebracht. Der gesamte Inhalt wurde, zusammen mit vorgewärmtem TY-Medium, in eine T25-Zellkulturflasche gegeben und diese randvoll gefüllt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums durch vorsichtiges Abgießen und anschließendem Befüllen mit neuem vorgewärmtem Medium.

#### 2.2.1.5 Anfertigung des TY-Mediums, Standardkultur von *Entamoeba histolytica* und Ansetzen der OP-Amöben

Das TY-Medium wurde wie in Tabelle 5 angegeben zusammengefügt und in einem Endvolumen von 4350 mL gelöst. Im Anschluss wurden jeweils 435 mL des Mediums in Schottflaschen aufgeteilt. Das Autoklavieren des Mediums erfolgte in Schnellkochtöpfen, in denen es bei voll aufgebautem Druck für 15 min gekocht wurde.

Nach dieser Kochzeit kühlten die Töpfe, bis zum Abbau des Überdruckes ab, und das Medium wurde bis zur Komplettierung bei 4°C gelagert.

Zur Komplettierung wurden 50 mL hitzeinaktiviertes Rinderserum, 15 mL Vitamin-Mix, und jeweils 0,5 % (v/v) Penicillin und Streptomycin hinzugegeben. Nach Zugabe aller Substanzen erfolgte die Lagerung der Flaschen ebenfalls bei 4°C. Vor der Nutzung für die Kultur wurde das Medium nochmal steril filtriert.

Die Kultivierung von *E. histolytica* erfolgte in T25-Zellkulturflaschen. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90 % wurde das Medium abgegossen und die Zellen durch kräftiges Schütteln und nachfolgendem Abspülen mittels Stabpipette in 5 mL frischem, vorgewärmtem Medium abgelöst. Anschließend wurde in neue vorgefüllte Flaschen ein Aliquot der Zellsuspension gegeben, um eine passende Verdünnung zu erreichen. Die Flaschen wurden randvoll gefüllt, um damit eine anaerobe Kultivierung zu erreichen. Die Bestimmung der passenden Verdünnung konnte nicht anhand fester Kriterien erfolgen. Generell ist davon auszugehen, dass ein Drittel der abgelösten Zellsuspension eingesetzt werden muss, damit 24 h später wieder 90 % Konfluenz erreicht werden. Bei jeder Verlängerung der Wachstumsphase um 24 h sollte die Menge der eingebrachten Zellsuspension gedrittelt werden (48 h ein Zehntel; 72 h ein Dreißigstel). Aufgrund der großen Anfälligkeit von *E. histolytica*, gegenüber auch kleinen Veränderungen äußerer Parameter, wurden immer verschiedene Verdünnungen für die Kultivierung genutzt und dabei auch das Wachstumsverhalten der vergangenen Tage berücksichtigt. Beispielhaft hierfür waren für 48 h Wachstumsphase je eine Kulturflasche mit 1/5 und 1/10 und für 72 h 1/10, 1/20 und 1/30 der Zellsuspension.

Für die Durchführung der Induktionen des ALA wurde *E. histolytica* zusätzlich speziell kultiviert. Hierfür wurden die Amöben 24 h vor der OP aus den T25-Zellkulturflaschen in T75-Zellkulturflaschen überführt, was vom Ablauf dem bei der Routinekultur entsprach. Die Amöben, die für die OP genutzt werden, sollten eine Konfluenz von ca. 50 % aufweisen. Ähnlich wie bei der Standardkultur ist auch beim Ansetzen der OP-Amöben von einer Varianz des Wachstums auszugehen, weshalb verschiedene Verdünnungen angesetzt wurden. Als passend haben sich meist die Verdünnungsstufen 1:3 und 1:4 herausgestellt. Aus einer passend bewachsenen T75-Zellkulturflasche enthält man die Anzahl an Amöben um etwa 3-5 Tiere zu operieren.

## 2.2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden nach Begutachtung durch die Hamburger Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt und unter Berücksichtigung aller tierschutzrechtlichen Kriterien durchgeführt (N082/2018). C57BL/6J (Wildtyp), C57/BL6J CCR2<sup>-/-</sup> und C57/BL6J IL-18<sup>-/-</sup> wurden im Tierhaus des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin gezüchtet und während ihrer gesamten Lebensdauer unter 50-60 % Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus und einer Umgebungstemperatur von 21 °C gehalten. Das Euthanasieren der Tiere vor der Organentnahme erfolgte durch den Einstrom von 20% CO<sub>2</sub>/Minute, über eine Verwirbelungsplatte in den Käfig, bis zum Atemstillstand und anschließender Herzpunktion bzw. cervikaler Dislokation.

### 2.2.2.1 Induktion des Amöbenleberabszesses

Der erste Schritt stellte das Ablösen der Amöben und das Einstellen der korrekten Zellzahl/mL dar. Hierfür wurde das Medium, bis auf ca. 15 mL, aus den T75-Zellkulturflaschen abgegossen und die Flaschen auf Eis gelegt. Nach einer Inkubation von 5-10 min auf Eis wurden die Amöben durch kräftiges Klopfen vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und anschließend in 50 mL Schraubdeckelgefäße überführt. In diesen erfolgte die Zentrifugation bei 300 x g, 4°C für 5 min, nach derer der Überstand abgekippt und die Zellen im Rückfluss resuspendiert wurden. Die Zellzahl der Suspension wurde durch Zählen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und durch Verdünnen mit inkomplettem TY-Medium oder erneute Zentrifugation und Resuspendieren in geringerem Volumen auf 1x10<sup>7</sup> Zellen/mL eingestellt. Die Zellsuspension wurde möglichst schnell für die Induktion des ALA verwendet und bis dahin auf Eis gelagert.

Für die intrahepatische Infektion mit *E. histolytica* wurden die Tiere zunächst in Narkose gelegt. Zur Einleitung der Narkose wurde eine Lösung intraperitoneal verabreicht, die aus 1 mg/kg KG Medetomidin und 75 mg/kg KG Ketamin in Saline (0,9% ige NaCl-Lösung) besteht. Von dieser Injektionslösung wurden 8 µL pro g/KG i.p. injiziert. Die Toleranzzeit dieser Methode beträgt pro Tier etwa 60 min. Nach dem Einsetzen der Narkose, erfolgter Rasur, Auftragung von Augencreme und Hautdesinfektion mit iodhaltiger Lösung, wurde für die intrahepatische Injektion der

Amöben eine Laparotomie durchgeführt. Die Größe des Schnittes betrug ca. 5 mm. Es wurden  $2 \times 10^5$  *E. histolytica* Trophozoiten in einem Volumen von 20  $\mu$ l unter die Leberkapsel des großen Leberlappens injiziert. Im Anschluss erfolgte das Verschließen des Peritoneums und der Muskularisschicht mit einer U-Naht aus resorbierbarem Nahtmaterial und der äußeren Haut mit einem chirurgischen Wundclip. Die intramuskuläre Injektion von 2,5 mg/kg KG Atipamezol in Saline führte zur Aufhebung der Narkose innerhalb von 10 min. Die Tiere lagen während der gesamten Behandlung bis zum Erlangen des vollen Bewusstseins auf 37 °C warmen Wärmeplatten.

#### 2.2.2.2 Isolierung und Antikörperfärbung von Splenozyten

Den zu untersuchenden Tieren wurde die Milz entnommen, in PBS überführt und, bis die Organentnahme für alle Tiere abgeschlossen war, auf Eis gelagert. Die Milzzellen wurden durch Nutzung eines Zellsiebes (70  $\mu$ m) vereinzelt und insgesamt in 10 mL PBS aufgenommen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 300 x g und 4°C für 5 min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 3 mL Erythrozytenlyse-Puffer suspendiert und die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von 10 mL PBS und eine erneute Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 3 mL Medium resuspendiert und die Lösung durch ein Zellsieb (50  $\mu$ m) gegeben, um entstandene Zellklumpen zurückzuhalten. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Zellzahl, nach derer das entsprechende Volumen in 3 mL Polystyrolröhrchen (FACS-Röhrchen) überführt und mit 1 mL PBS aufgefüllt wurde. Für die Färbung wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro Probe eingesetzt. Danach folgte erneut eine Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 5 min) wonach der Überstand entfernt, und Antikörperlösung hinzugegeben wurde. Diese bestand aus den verwendeten Antikörpern, die in der passenden Konzentration in murinem Fc-Block angesetzt wurden (



Tabelle 8, Tabelle 9).

Nach Zugabe der Antikörperlösung wurden die Proben für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 2 mL PBS gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Pellet in 100 µL 1%iger PFA-Lösung resuspendiert und mindestens 30 min maximal ü.N. bei 4°C fixiert. Die Messung der Proben erfolgte bis maximal 24 h nach der Fixierung.

### 2.2.2.3 Isolierung und Antikörperfärbung von Lymphozyten aus der Leber

An verschiedenen Tagen im Infektionsverlauf wurden Lymphozyten aus der Leber von naiven und infizierten Versuchstieren isoliert. Hierzu wurde jeweils der große Leberlappen entnommen und, bis die Organentnahme bei allen Versuchstieren abgeschlossen war, in PBS auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Leberlappen mit Hilfe eines 70 µm Zellsiebes in ein 50 mL Schraubdeckelgefäß (2 mL PBS vorgelegt) homogenisiert. Die Zellsiebe wurden zweimal mit 5 mL PBS gespült. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet in 5 mL 80 %igem Percoll resuspendiert und die Suspension in 15 mL Schraubdeckelgefäße überführt. Im Anschluss daran erfolgte vorsichtiges Überschichten mit 5 mL 40%igem Percoll, wonach die Proben zentrifugiert (1500 x g, 21°C, 25 min, Be- und Entschleunigung auf niedrigster Stufe) wurden und die intermediäre Phase mit einer 1000 mL Kolbenhubpipette entnommen wurde. Sie wurde in ein neues 15 mL Schraubdeckelgefäß überführt, anschließend mit PBS auf 15 mL aufgefüllt und zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C). Das entstandene Pellet wurde in 2 mL Erythrozytenlyse-Puffer resuspendiert, für 5 min inkubiert, anschließend mit 10 mL PBS abgestoppt und zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im Rückfluss resuspendiert und in 3 mL Polystyrolröhrchen (FACS-Röhrchen) überführt. Diese wurden mit 1 mL PBS befüllt, anschließend zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C) und der Überstand gänzlich dekantiert. Anschließend wurden die Proben mit 30 µL Antikörperlösung (

Tabelle 8) vermischt und für 30 min, 4°C inkubiert. Nach der Färbung wurden die Proben dreimal mit jeweils 2 mL PBS gewaschen und nach der letzten Zentrifugation in 100 µL 1%iger PFA-Lösung resuspendiert und für mindestens 30 min oder ü.N. bei 4°C fixiert. Die Messung der Proben erfolgte bis maximal 24 h nach der Fixierung.

#### 2.2.2.4 Terminale Blutentnahme und Verarbeitung des Blutes zur Antikörperfärbung

Direkt nach Eintritt des Todes der Tiere, erkennbar durch Ausbleiben des Atemreflexes, wurde eine Herzpunktion durchgeführt, um terminal das Blut zu entnehmen. Das Blut wurde in 1,6 mL Heparinröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Blut aus den Heparinröhrchen wurde vollständig in ein 50 mL Schraubdeckelgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 mL Erythrozyten-Lysepuffer und eine Inkubation von 5 min. Danach wurden 30 mL PBS hinzugegeben, die Proben zentrifugiert (400 x g, 10 min, 4°C), der Überstand größtenteils dekantiert, jedoch der letzte Rest vorsichtig mit einer Stabpipette abgenommen und das Pellet in 20 mL frischen Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach 5 min Inkubation wurden 30 mL PBS hinzugegeben, die Proben zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde im Rückfluss resuspendiert, die Zellsuspension über ein 50 µm Zellsieb gegeben und dieses mit 1 mL FACS-Puffer gespült. Es wurden, soweit vorhanden,  $2 \times 10^6$  Zellen zur Färbung eingesetzt. Die Proben wurden mit 30 µL Antikörperlösung (

Tabelle 8) vermischt und für 30 min, 4°C inkubiert. Nach der Färbung wurden die Proben dreimal mit jeweils 2 mL PBS gewaschen, nach der letzten Zentrifugation in 100 µL 1%iger PFA-Lösung resuspendiert und für mindestens 30 min oder ü.N. bei 4°C fixiert. Die Messung der Proben erfolgte bis maximal 24 h nach der Fixierung

#### 2.2.2.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 m<sup>2</sup>).

Hierfür wurde zunächst eine geeignete Verdünnung (meist 1:50 oder 1:100) der Zellsuspension in 0,4 % Trypanblau hergestellt, wovon 10 µL in die Zählkammer pipettiert wurden. Unter dem Lichtmikroskop wurden anschließend die lebendigen Zellen in vier Großquadraten gezählt. Die Zellzahl pro mL wurde mittels folgender Formel berechnet:

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

#### 2.2.2.6 Determinierung der Menge an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies

Bevor die Untersuchung durchgeführt werden konnte, musste die Nachweisreagenz titriert werden. Diese (CM-H2DCFDA) lag in 50 µg Aliquots vor und wurde in 100 µL purem Ethanol gelöst. Hieraus wurde eine 1:100 Verdünnung in purem Ethanol angesetzt. Aus dieser 1:100 Verdünnung wurden Gesamtverdünnungen von 1:2000, 1:5000; 1:10.000 und 1:20.000 in DPBS angefertigt. Es wurde jene Konzentration benutzt, die bei pro-inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus naiven Tieren ca. 30-50 % ROS<sup>+</sup> Zellen ergab.

Die Bestimmung der intrazellulären Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS-Assay) wurde für beide Infektionsmodelle an den Tagen 1, 2 und 3 nach Infektion sowie für naive Tiere durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere ggf. wie bereits beschrieben mit dem jeweiligen Erreger infiziert. An den zu untersuchenden Zeitpunkten wurde von den Tieren die Milz entnommen, in PBS überführt und auf Eis gelagert. Die Milzzellen wurden wie bereits beschrieben vereinzelt (siehe 2.2.2.2). Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und das Überführen der entsprechenden Anzahl an Splenozyten ( $2 \times 10^6$  pro Ansatz) in eine 96-Well U-Boden Platte. Die Zellen wurden noch zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend in

100 µL der entsprechenden Verdünnung des CM-H2DCFDA oder DPBS (Kontrolle) resuspendiert. Darauffolgend wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> lichtgeschützt für 30 min inkubiert und danach zweimal mit DBPS gewaschen und abschließend in Antikörperlösung (Tabelle 7) resuspendiert. Die Färbung erfolgte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln und abschließend wurden die Proben zweimal mit DPBS gewaschen. Die Analyse der Menge intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte am Durchflusszytometer LSR II. Die Versuche wurden zusammen mit Malte Vogelsang durchgeführt und sind zum Teil in seiner Bachelorarbeit „Zur Rolle von inflammatorischen Effektormolekülen im Infektionsmodell für *Listeria monocytogenes* und *Entamoeba histolytica*“ enthalten, die am 07.07.2020 an der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg eingereicht wurde.

#### 2.2.2.7 Determinierung der Abszessgewichte

Um die Gewichte der Leberabszesse zu bestimmen, wurde der gesamte entnommene Leberlappen, inklusive des Abszesses, abgetrocknet und anschließend gewogen. Darauffolgend wurde der Abszess mit Hilfe eines Skalpells aus dem Leberlappen herausgeschnitten. Weiterhin konnte in diesem Schritt beurteilt werden, ob es sich um einen Abszess oder einen Leberinfarkt handelt. Ein Abszess bildet feste, scharf abgegrenzte Strukturen im tiefen Lebergewebe aus, während ein Infarkt eine große oberflächliche Verhärtung und Verfärbung des Lebergewebes verursacht, jedoch nicht in die Tiefe des Gewebes reicht.

#### 2.2.2.8 Adoptiver Transfer von Monozyten

Für den adoptiven Transfer von Monozyten wurden C57Bl/6 CD45.1 Tiere mit *L. monocytogenes*  $\Delta$ actA infiziert. An d2 p.i. wurde submandibulär ein Tropfen Blut entnommen und der Aktivierungsstatus der Monozyten anhand der Oberflächenmarker (Panel 2) analysiert. Gleiches wurde für naive C57Bl/6 CD45.1 Tiere durchgeführt. An d3 p.i. erfolgte das Euthanasieren der Tiere mittels CO<sub>2</sub> und cervikaler Dislokation. Es wurden die Milz entnommen und die beiden Hinterbeine abgetrennt. Die Knochen der Hinterbeine wurden mit 2 mL ausgespült. Hierfür wurde der Oberschenkelknochen als auch der Unterschenkelknochen vom Gewebe getrennt und vom Fuß-, Knie- und Hüftgelenk abgetrennt. Im Anschluss wurde das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle herausgespült und über ein Zellsieb vereinzelt. Die

Milzzellen wurden wie bereits beschrieben vereinzelt und alle Zellen in PBS (2% FBS+1mM EDTA) resuspendiert. Die Zellzahl wurde determiniert, die Zellen auf  $1 \times 10^8$ /mL eingestellt und die Isolierung der Monozyten mit dem EasySep™ Monocyte Isolation Kit der Fa. StemCell Technologies durchgeführt. Es wurde nach der zugehörigen Arbeitsvorschrift vorgegangen. Nach Erhalt der isolierten Zellen, wurden diese auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$ /mL eingestellt. Aufgrund der geringen Zellzahl aus naiven Milzen, wurden Zellen aus dem Knochenmark hinzugefügt, um die notwendige Zellzahl an zu transferierenden Monozyten zu erreichen. Im Selben Verhältnis wurden den Milz-Monozyten aus den infizierten Tieren, Monozyten aus dem Knochenmark infizierter Tiere hinzugefügt. Während der Isolierung wurden zeitgleich die Amöben für die Operation vorbereitet (2.2.1.5). Die Isolierung und Reinigung der Monozyten wurde mit freundlicher Unterstützung von Claudia Marggraff durchgeführt.

Nach Abschluss der ALA-Induktion wurden  $1 \times 10^6$  isolierte Monozyten intravenös in jede Rezipientenmaus gegeben. Die Reinheit und die Effizienz der Isolierung und die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle der isolierten Monozyten wurde mit einem kleinen Aliquot der Zellen durchflusszytometrisch untersucht (

Tabelle 8).

An Tag 3 nach der ALA-Induktion wurden die Tiere euthanasiert, die Leber, Milz sowie das Blut entnommen. Anschließend erfolgte das Auswiegen des Abszessgewebes und die Aufbereitung der Zellen zur Analyse mittels Durchflusszytometrie (2.2.2.2, 2.2.2.3, 2.2.2.4). Zusätzlich wurde 20 µL Leberhomogenat in 180 µL TriZol aufgenommen und für spätere Analysen bei -80°C gelagert. Weiterhin wurden die Blutproben zentrifugiert (10min, 4°C, 2000 x g) um Serum zu erhalten, welches ebenfalls für spätere Analysen bei -80°C gelagert wurde.

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 FACS-Sortierung von Monozyten und Next-Generation Sequencing

Die Vorbereitungen für das FACS-Sorting begannen 24 h vor dem Experiment. Die 15 mL Schraubdeckelgefäße, in die später die Zellen sortiert wurden, wurden mit 5 mL *RNAprotect Cell reagent* befüllt und anschließend auf einem Rollschüttler bis zur Verwendung inkubiert.

Es wurden verschiedene biologische Zustände untersucht: naive Tiere, ALA d3 p.i., ALA d5 p.i., LIS d3 p.i. und LIS d5 p.i. Im Folgenden wurden jeweils fünf Leberlappen in denen ein ALA sichtbar war und je drei Leberlappen aus den LIS-Tieren zu einer biologischen Probe vereint.

Die Tiere wurden mit CO<sub>2</sub> getötet und anschließend erfolgte die Perfusion der Leber mit 5 mL PBS und die Entnahme des entsprechenden Leberlappens. Dieser wurde im Anschluss mit einem Spritzenstempel durch ein 70 µm Zellsieb homogenisiert und dieses mit 10 mL PBS gespült. Nachfolgend erfolgte eine Zentrifugation bei 300 x g, 4°C für 5 min. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 5 mL 40% Percoll resuspendiert und in ein 15 mL Schraubdeckelgefäß überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 400 x g, 30 min, RT und Bremse und Beschleunigung auf niedrigster Stufe. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 3 mL Erythrozyten-

Lysepuffer resuspendiert und für 5 min, RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Auffüllen des Gefäßes mit PBS und eine Zentrifugation 300 x g, 4°C, 5 min. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet im Rückfluss resuspendiert, die gesamte Suspension in 3 mL Polysterolröhrchen (FACS-Röhrchen) überführt, das Röhrchen zusätzlich mit 500 µL FACS-Puffer ausgespült und diese anschließend ebenfalls in das FACS-Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurde das FACS-Röhrchen zentrifugiert (300 x g, 4°C, 5 min) und der Überstand entfernt. Es wurden 50 µL Blocklösung (1 µL Rattenserum; 0,5 µL Fc-Block (anti CD16 +CD32); 48,5 µL FACS-Puffer) und 50 µL Färbelösung (0,75 µL Ly6C-FITC; 0,5 µL CD11b-APCCy7; 0,5 µL Ly6G-APC; 48,15 µL FACS-Puffer) in das Röhrchen gegeben, das Pellet darin resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach der Färbung wurden die Proben dreimal mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen, jeweils bei 300 x g, 4°C für 5 min zentrifugiert und abschließend in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert. Während des FACS-SORT wurden die Zellen in die vorbereiteten 15 mL Schraubdeckelgefäße mit 5 mL RNAprotect Cell Reagent sortiert, nach Abschluss der Sortierung invertiert und ü.N. bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde die RNA mit dem RNeasy Plus Micro Kit der Fa. Qiagen nach Herstellerangaben aus den sortierten Zellen isoliert, wobei  $<5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt wurden. Nach Abschluss der RNA Isolation erfolgte die Bestimmung der RNA-Integrität mittels Messung am Agilent RNA 6000, auch hier wurde nach Angaben aus dem Herstellerhandbuch vorgegangen.

Die RNA wurde auf Trockeneis gelagert und zu BGI nach Hongkong geschickt, wo die Sequenzierung durchgeführt wurde. Die Isolierung der Zellen und Aufarbeitung der RNA wurden von Dr. Jill Noll und Dr. Karsten Yan durchgeführt. Die Analyse und Aufbereitung der Rohdaten übernahm im Rahmen des SFB841 Dr. Christian Casar. Die Feinauswertung und Zusammenstellung der Graphen und Abbildungen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, vom Verfasser selbst.

#### 2.2.3.2 RNA Isolierung, DNase Verdau und Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Zur RNA-Isolierung wurden Gewebeproben mit 1000 µL TRIzol-Reagenz versetzt. Der Aufschluss der Gewebe erfolgte anschließend durch Homogenisierung mit dem TissueLyzer LT unter Verwendung einer 5 mm Edelstahlkugel per Eppendorfreaktionsgefäß (EPC) für 4 min bei 50 Hz. Für den Aufschluss von Zellen ist

Vermengung mit TRIzol-Reagenz und anschließendes gründliches Vortexen ausreichend. Danach wurde in einem Verhältnis von 1:6 (v/v) Chloroform hinzugegeben, die Probe intensiv gemischt und im Anschluss für 3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues EPC überführt, 800 µL Isopropanol hinzugegeben und intensiv gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Probe bei 4°C und 12.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µL Ethanol (75%) suspendiert. Abschließend folgte erneute Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g 10 min, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µL Ethanol (75%) resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation bei 4°C, 12.000 x g für 10 min wurde der Überstand komplett entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µL RNase-freiem Wasser (Leberproben: 200 µL) resuspendiert. Als letzter Schritt erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Nano-Drop Photometer und anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Für den DNase-Verdau wurde das RNase-Free DNase Set der Fa. Qiagen verwendet. Es wurde nach den Herstellerangaben gearbeitet. Die Deaktivierung der DNase erfolgte durch 15-minütige Erhitzung des Ansatzes auf 75°C. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der DNase-verdauten Proben bei -80°C.

Zur Generierung von cDNA aus isolierter RNA wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit der Fa. ThermoFisher genutzt. Es wurde, wie in der zugehörigen Arbeitsvorschrift beschrieben, vorgegangen.

### 2.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Determinierung der optimalen Annealing Temperatur der verwendeten Primer wurden mit dem Maxima SYBR Green 2x qPCR Master Mix der Fa. ThermoFisher durchgeführt. Die Ansätze der Reaktionen waren wie folgt zusammengesetzt und liefen mit folgendem Programm.



**Tabelle 13: PCR Reaktionsansatz für die Bestimmung der optimalen Annealing Temperatur**

Reagenz	Volumen
SYBR Green Master Mix	5 $\mu$ L
Primer Forward	0,5 $\mu$ L (10 pmol)
Primer Reverse	0,5 $\mu$ L (10 pmol)
cDNA	0,5 $\mu$ L (100 ng)
Wasser	Add 10 $\mu$ L

**Tabelle 14: PCR Programm zur Bestimmung der optimalen Annealing Temperatur**

Reaktionsschritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Time [s]	
Initiale Denaturierung	95	180	
Denaturierung	95	30	
Annealing	54-64	20	40
Elongation	72	15	Zyklen
Finale Elongation	72	300	

Die Bewertung der optimalen Annealing Temperatur erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (2% Agarose in TAE-Puffer). Zur Detektion der DNA wurde den Gelen interkalierender Farbstoff (SYBR Green) zugesetzt (0,05  $\mu$ L / mL Gel).

### 2.2.3.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Zur Beurteilung der quantitativen Genexpression wurde eine qPCR mit folgender Zusammensetzung der eingesetzten Reagenzien und folgendem Programm durchgeführt. Es wurde das Maxima SYBR Green 2x qPCR Master Mix Kit der Fa. ThermoFisher genutzt.

**Tabelle 15: Allgemein genutzter qPCR Reaktionsansatz**

Reagenz	Volumen
Maxima SYBR-Green 2x qPCR Master Mix	5 $\mu$ L
Primer fwd (10 pmol)	0,5 $\mu$ L
Primer rev (10 pmol)	0,5 $\mu$ L
cDNA	0,5 $\mu$ L (100 ng)
Wasser	Add 20 $\mu$ L

**Tabelle 16: Allgemein genutztes qPCR Programm**

Reaktionsschritt	T [°C]	Time [s]	
Anfangsdenaturierung	95	180	
Denaturierung	95	30	40
Annealing/Elongation	60	20	Zyklen
Schmelzkurvenanalyse von 67 – 95 °C			

Die Bewertung der optimalen Annealing Temperatur erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (2% Agarose in TAE-Puffer). Zur Detektion der DNA wurde den Gelen interkalierender Farbstoff (SYBR Green) zugesetzt (0,05  $\mu$ L / mL Gel).

## 2.2.4 Biochemische Methoden

### 2.2.4.1 LEGENDplex zur Beurteilung der Zytokinproduktion

Der LEGENDplex (Biolegend) wurde mit Zellkulturüberständen, Blutplasma und lysiertem Lebergewebe durchgeführt. Das Lebergewebe wurde vorher extra behandelt, um die Zellen zu lysieren. Hierzu wurde eine bestimmte Menge an Leber (ca. 0,15 g) entnommen. Das Gewebstück wurde anschließend durch ein Zellsieb

(70µm) homogenisiert, um die Zellen zu vereinzeln und zu lysieren. Das Zellsieb wurde im Anschluss mit 2 mL LEGENDplex-Lysepuffer gewaschen und die gesamte Suspension 30 Sekunden gevortext. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Ansätze (8000 x g, 5 min, 4 °C). Es wurden 500 µL des entstandenen Überstandes abgenommen und in ein EPC überführt. Dieser Überstand wurde direkt als Probe im LEGENDplex eingesetzt.

Für die Durchführung des Legendplex mussten alle genutzten Materialien auf Raumtemperatur erwärmt sein, bevor sie eingesetzt wurden. Für den LEGENDplex wurden 6,25 µL Assay Buffer, 6,25 µL Probe, 6,25 µL Mixed Beads und 6,25 µL Detektions-Antikörper eingesetzt. Für die Tests wurden 96-well V-Boden Platten genutzt. Die Durchführung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben aus der dem Kit beiliegenden Arbeitsanweisung.

Die Analyse erfolgte an einem geeigneten Durchflusszytometer (BD Accuri, BD LSRII). Der Ablauf der Datenanalyse ist der zum Kit zugehörigen Arbeitsanleitung zu entnehmen.

#### 2.2.4.2 Immunhistochemische Untersuchung von Paraffinschnitten

Zur Vorbereitung der Einbettung in Paraffinwachs wurden die genutzten Leberlappen mindestens 24 h vorher in Formalin (4% Formaldehydlösung) fixiert. Das Einbetten und Schneiden der Präparate wurde durch die Mitarbeiter der AG Zoonosen unter Leitung von Prof. Dennis Tappe durchgeführt.

Für die Färbung der Präparate wurde zunächst die Paraffinschicht entfernt und die Präparate hydratisiert. Hierfür wurden die Glasobjektträger, auf denen die Schnitte fixiert wurden, zweimal für 7 min in Xylol inkubiert. Im Anschluss erfolgten Waschschriffe in einer absteigenden Alkoholreihe (99,8%; 99,8 %; 90 %; 80 %; 70%) für je 5 Minuten. Darauffolgend konnten die Objektträger bis zur weiteren Verwendung einige Stunden in Spülpuffer gelagert werden. Nachfolgend an die Entparaffinierung und Hydratisierung erfolgte die Antigendemaskierung durch Kochen in Citratpuffer. Hierfür wurden 2 L des Citratpuffers in einen Schnellkochtopf gefüllt und die Objektträger in einen geeigneten Ständer hineingegeben. Der Puffer wurde bei geschlossenem Ventil für 2 min zum Kochen gebracht, bis der Druck vollständig aufgebaut war. Danach wurde der Druck abgelassen und ca. 1 L kaltes Leitungswasser hinzugegeben, um die Lösung abzukühlen. Der Ständer mit den

Objektträgern wurde anschließend entnommen und zügig in Spülpuffer überführt. Alle weiteren Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 100 rpm durchgeführt. Im Anschluss an die Antigendemaskierung erfolgte ein Wasserstoffperoxid-Block mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 10 min, gefolgt von drei minütigem Waschen in Waschpuffer. Danach erfolgte ein Proteinblock mit 3 % BSA-Lösung in Spülpuffer für mindestens 10 min und anschließendem Waschen in Waschpuffer für 3min. Darauffolgend wurde der Primärantikörper in Antibody-Diluent in der jeweiligen Verdünnung auf den Objektträger aufgebracht. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 4°C ohne Schütteln. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurde der Objektträger dreimal für 5 min in jeweils frischem Spülpuffer gewaschen. Die weitere Verfahrensweise war abhängig vom genutzten Sekundärsystem.

ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (Färbung von CD11b und *E. histolytica*):

Im Anschluss an den letzten Waschschrift nach dem Primärantikörper erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit PostBlock (Reagent 2) mit anschließendem dreifachen 5-minütigem Waschen in Spülpuffer. Danach wurde für 30 min mit dem HRP-Polymer (Reagent3) inkubiert und abschließend dreimal für 2 min mit Spülpuffer gewaschen.

DCS DetectionLine SuperVision2 (Färbung von Ly6C):

Im Anschluss an den letzten Waschschrift nach dem Primärantikörper erfolgte eine zehn minütige Inkubation mit dem Polymer-Enhancer (RT, in feuchter Kammer). Darauffolgend wurden die Schnitte dreimal für 2 min in Spülpuffer gewaschen, anschließend für zehn Minuten (RT, feuchte Kammer) mit HRP-Polymer-Reagenz inkubiert und dreimal für 2 min in Spülpuffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift des Objektträgers folgte bei beiden Systemen die enzymatische Farbreaktion. Hierfür wurde zunächst eine Entwicklerlösung angesetzt (1 mL Substratpuffer + 2 Tropfen DAB-Substrat). Einige Tropfen dieser Entwicklerlösung wurden auf den Schnitt aufgegeben und anschließend die Färbung sofort mikroskopisch begutachtet. Nach Erlangen einer ausreichenden Farbtintensität erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Abklopfen der Entwicklerlösung und Überführung in Wasser. Als Kontrolle der Spezifität der Färbung wurde ein Objektträger nur mit dem Sekundärsystem behandelt und anschließend entwickelt. Im Anschluss an die Antikörperfärbung erfolgte eine Gegenfärbung des Gewebes mit Hämatoxylin nach Meyer für 3 min. Nach diesen 3 min, wurde der Objektträger für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Zum Schutz des Gewebes wurden die Schnitte mit Eukitt® eingedeckt. Hierzu wurde der Objektträger mittels einer

aufsteigenden Alkoholreihe (70 %; 80 %; 90 %; 99,8 %; 99,8 %) und anschließender dreimaliger 5 minütiger Inkubation in Xylol dehydratisiert. Abschließend wurde der Schnitt mit Eukitt® permanent eingedeckt.

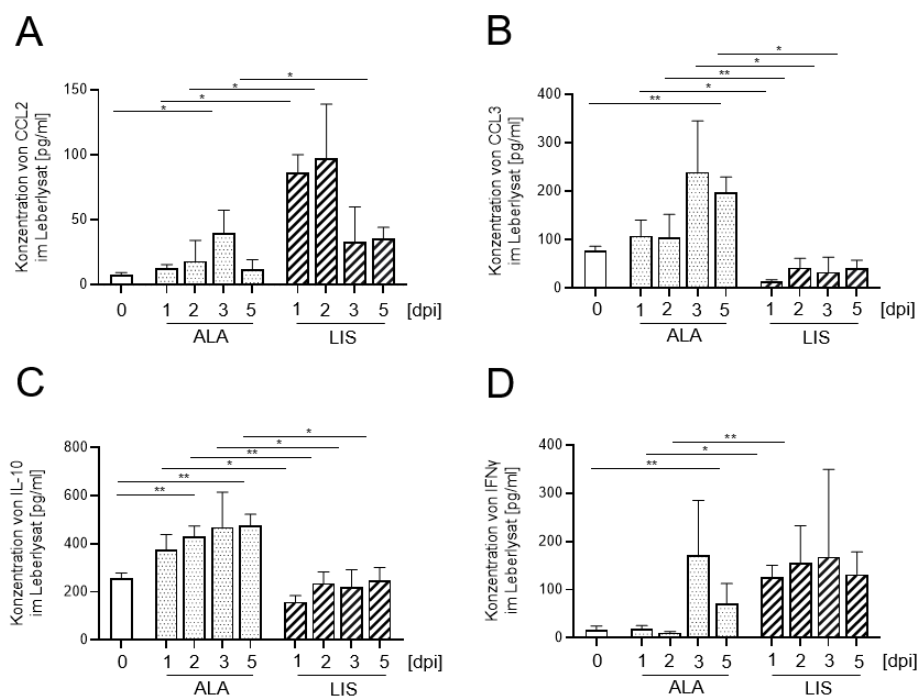
### **2.2.5 Statistische Auswertung der Daten**

Die statistische Beurteilung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism Version 9. Soweit nicht anders angegeben, wurde für alle erhaltenen Ergebnisse eine Nicht-Normalverteilung der Werte angenommen. Aufgrund zu kleiner Gesamtstichproben konnten nicht immer Tests auf eine Normalverteilung durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde bei t-Tests mit zwei Stichproben mit unbekannter Verteilung der Mann-Whitney-Test genutzt. Die Signifikanzen sind in den Abbildungen mit Sternen visualisiert. Als Signifikanzwert wird der p-Wert ermittelt: p-Werte (Mann-Whitney-t-Test und Students-t-Test)  $<0,05 = *$ ;  $<0,01 = **$ ;  $<0,001 = ***$ ;  $<0,0001 = ****$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytokinmilieu und Lokalisation der Monozyten in der Leber im Verlaufe der Infektion mit *E. histolytica* und *L. monocytogenes*

Die Bildung von z.B. CCL2 und CCL3 verantwortet die Rekrutierung pro-inflammatorischer Monozyten (CCL2) oder neutrophiler Granulozyten (CCL3) in Gewebe. Die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-10 oder IFN $\gamma$  im Gewebe beeinflusst sowohl die bereits vorhandenen als auch neu einströmende Zellen. Durch die verstärkte Produktion von IFN $\gamma$  werden pro-inflammatorische Kaskaden aktiviert, wohingegen IL-10 als anti-inflammatorischer Marker zur Regulierung und Kontrolle der Immunantwort dient. Die Konzentrationen dieser vier wichtigen Zytokine wurden mittels Multizytokin-Test im Leberhomogenat im Verlauf beider Infektionsmodelle bestimmt.



**Abbildung 12: Zytokin-Konzentrationen in der Leber nach Infektion mit *E. histolytica* oder *L. monocytogenes***

Männliche C57Bl/6 Wildtyp Mäuse wurden entweder intrahepatisch mit *E. histolytica* ( $2 \times 10^5$ ) oder intravenös mit *L. monocytogenes* ( $2 \times 10^4$ ) infiziert, zu den indizierten Zeitpunkten die Leber entnommen und aus dem Leberhomogenat die Zytokin-Konzentrationen mittels Multizytokin-Assay (Legendplex, BioLegend) determiniert. (A) CCL2, (B) IL-10, (C) CCL3 und (D) IFN $\gamma$  Konzentrationen im Leberlysate von *E. histolytica* oder *L. monocytogenes* infizierten Mäusen; n=5; gezeigt ist eins von drei repräsentativen Experimenten; Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt; Signifikanzwerte wurden mittels Mann-Whitney-Test bestimmt (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

Die Konzentration von CCL2 steigt vom naiven Zustand (ca. 10 pg/mL) bis zum Tag 3 nach Infektion im ALA-Modell auf ca. 50 pg/ml signifikant an ( $p < 0,05$ ). An d5 p.i. ist die Konzentration wieder im Bereich der naiven Tiere (Abbildung 12A). Während der Infektion mit *L. monocytogenes* (LIS-Modell) ist ein sehr schneller Anstieg der CCL2-Konzentration auf 80-100 pg/mL an d1 und d2 p.i. zu verzeichnen. Dieser sinkt zu d3 und d5 signifikant ab, liegt jedoch mit etwa 40 pg/mL noch über dem Niveau naiver Proben.

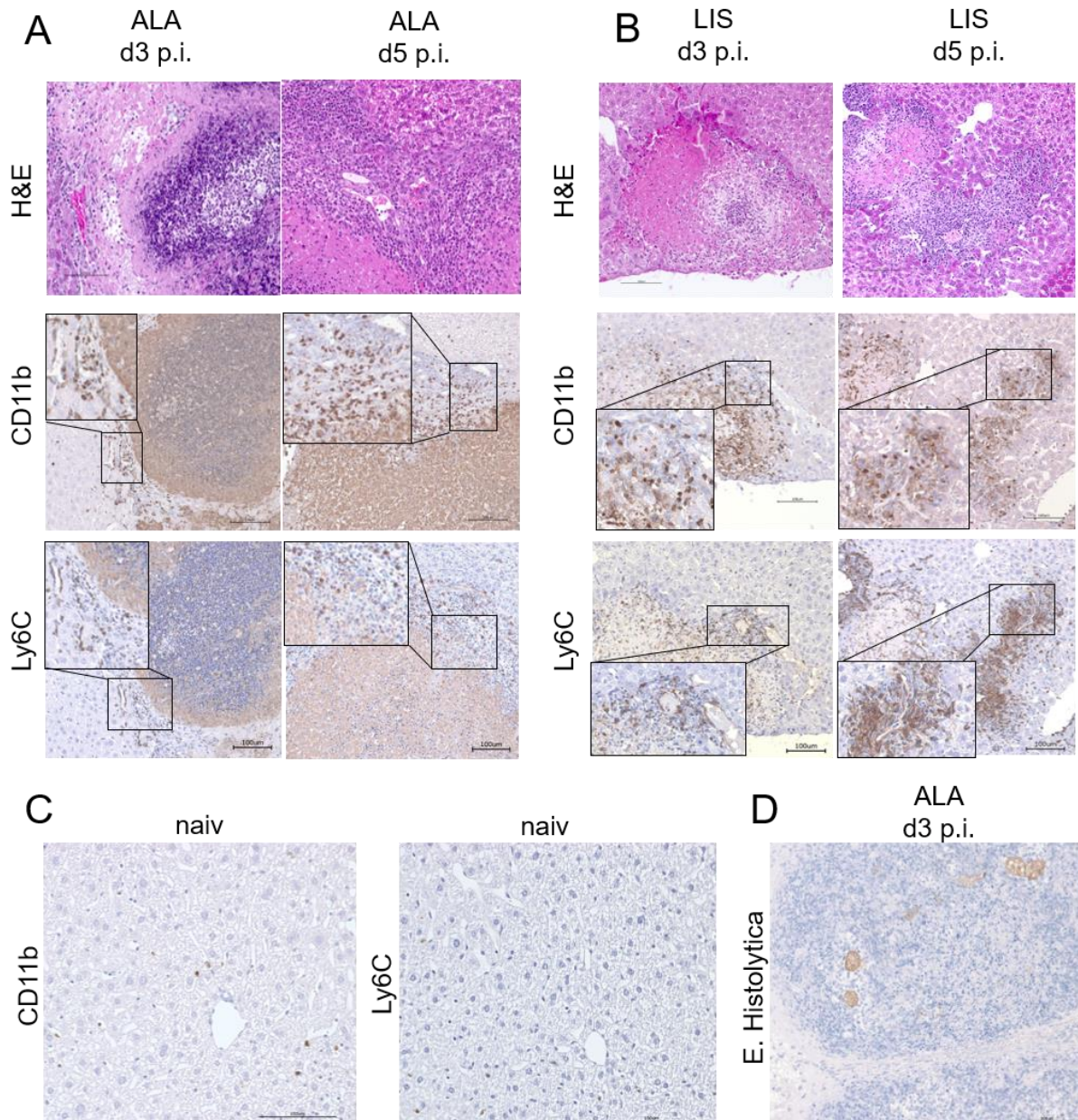
Die Konzentrationen von IL-10 liegen im ALA-Modell an allen untersuchten Zeitpunkten signifikant über denen der naiven Proben und es ist ein signifikanter Anstieg von d1 p.i. (ca. 380 pg/mL) zu d5 p.i. (ca. 500 pg/mL) zu erkennen (Abbildung 12B). Im Vergleich dazu ist im LIS-Modell keine erhöhte Produktion von IL-10 zu erkennen und die Konzentration an allen Zeitpunkten ist signifikant niedriger als im ALA-Modell ( $p < 0,05$ ).

Ein ähnliches Bild ergibt sich beim Blick auf die Konzentrationen von CCL3 (Abbildung 12C), welches an allen untersuchten Tagen signifikant geringere Konzentrationen im LIS-Modell, als zum jeweiligen Zeitpunkt im ALA-Modell, aufweist. In ALA-Modell steigt die Konzentration zu d3 p.i. an und liegt an 5 p.i. (ca. 200 pg/mL) signifikant ( $p < 0,01$ ) über dem Niveau naiver Proben. Im LIS-Modell ist keine signifikante Veränderung der CCL3-Konzentrationen zu erkennen.

Im ALA-Modell ist die IFN $\gamma$ -Menge im Vergleich zum naiven Status erst an d3 p.i. (Abbildung 12D) signifikant erhöht. Im LIS-Modell ist hingegen schon an d1 p.i. signifikant mehr IFN $\gamma$  nachweisbar als in naiven Kontrolltieren.

Die Konzentration der untersuchten Zytokine im zeitlichen Verlauf der Infektionen zeigt teils große Unterschiede zwischen beiden Modellen, sowohl in der Kinetik als auch den absoluten Mengen. In der Infektion mit *L. monocytogenes* sind pro-inflammatorische Zytokine in höherer Konzentration nachweisbar, wobei im ALA-Modell anti-inflammatorisches IL-10 in signifikant höheren Konzentrationen vorliegt.

Neben der Expression der Zytokine wurde auch die Lokalisation der Monozyten in der Leber im Verlauf beider Infektionsmodelle untersucht.



**Abbildung 13: Lokalisierung von CD11b<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> Zellen sowie *E. histolytica* Trophozoiten in der Leber**

Männliche C57Bl/6 Wildtyp Mäuse wurden entweder intrahepatisch mit *E. histolytica* ( $2 \times 10^5$ ) oder intravenös mit *L. monocytogenes* ( $2 \times 10^4$ ) infiziert, zu den indizierten Zeitpunkten die Leber entnommen, immunohistochemisch behandelt und gefärbt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin und monoklonalen Antikörpern gegen CD11b (EPR1344), Ly6C (ER-MP20) und einem polyklonalen Antikörper gegen *E. histolytica* gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Schnitte, ausgewählt aus 3 biologischen Replikaten; bräunliche Färbung bedeuten positive Signale; große Bilder = 20x Vergrößerung, kleine Ausschnitte = 40x Vergrößerung.

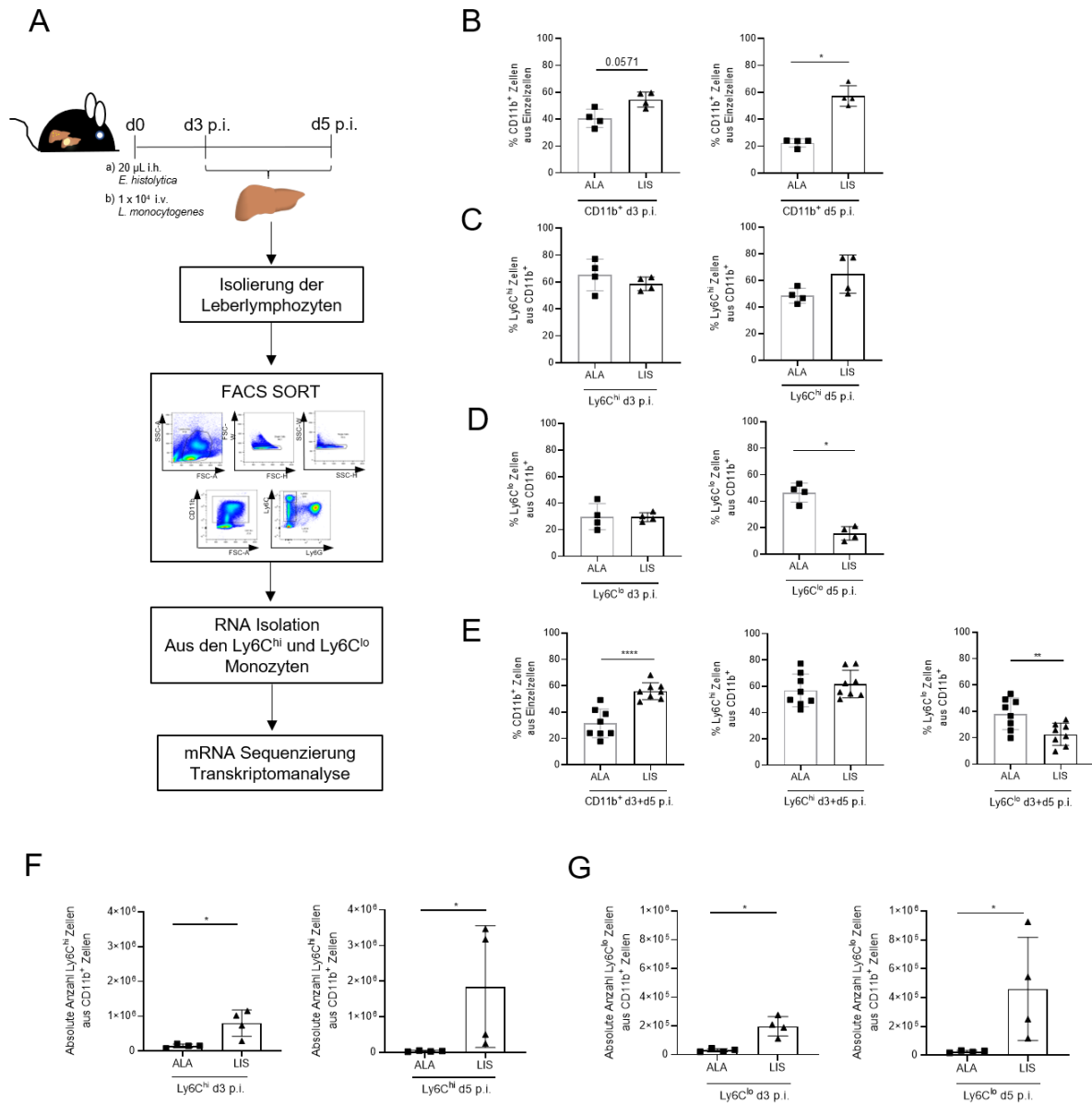
Die Betrachtung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ermöglicht eine histologische Beurteilung des Gewebes. In beiden Infektionsmodellen bilden sich Abszessstrukturen aus. Diese sind im ALA-Modell durch große Bereiche lysierten Gewebes gekennzeichnet, was im LIS-Modell nicht der Fall ist (siehe Abbildung 13A+B). Ein



weiterer deutlicher Unterschied liegt in der Lokalisation der CD11b<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> Zellen. Diese erscheinen im ALA-Modell vor allem außerhalb des Abszesses als ringähnliche Struktur, wobei die vollständige Braunfärbung des Abszesses als unspezifische Färbung einzuschätzen ist, da keine distinkten Zellen angefärbt werden. Im LIS-Modell sind die CD11b<sup>+</sup> als auch die Ly6C<sup>+</sup> Zellen direkt in den Abszessesstrukturen lokalisiert. Im naiven Gewebe (Abbildung 13C) sind nur wenige CD11b<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> Zellen vorhanden, die sich dazu noch homogen verteilen. Die Anfärbung der *E. histolytica* Trophozoiten (Abbildung 13D) beweist das Vorhandensein dieser innerhalb des Amöbenleberabszesses und, dass an d3 p.i. noch intakte Parasiten in der Leber vorliegen und die Infektion somit nicht vollständig bekämpft wurde.

### **3.2 Transkriptomanalyse pro- und anti-inflammatorischer Monozyten aus der Leber**

Aus beiden Infektionsmodellen wurden Monozyten isoliert um eine mRNA-Sequenzierung durchzuführen. Diese Methode ermöglicht einen tiefgehenden Einblick in die zellulären Reaktionen der untersuchten Zellpopulation zum Zeitpunkt der Isolation. Es wird die Analyse aller abgelesenen Gene durchgeführt und durch den Vergleich zwischen beiden Infektionsmodellen können besonders aktivierte oder herunterregulierte Gene untersucht werden. Der generelle Versuchsablauf ist in Abbildung 14A dargestellt. Die Infektion der Versuchstiere sowie die Isolation der Monozyten und anschließend der RNA wurden von Jill Noll und Karsten Yan durchgeführt. Die Analyse der Daten wurde, in Zusammenarbeit mit Christian Casar, vom Verfasser selbst durchgeführt.



**Abbildung 14: Schematischer Ablauf und durchflusszytometrische Daten der Transkriptomstudie**

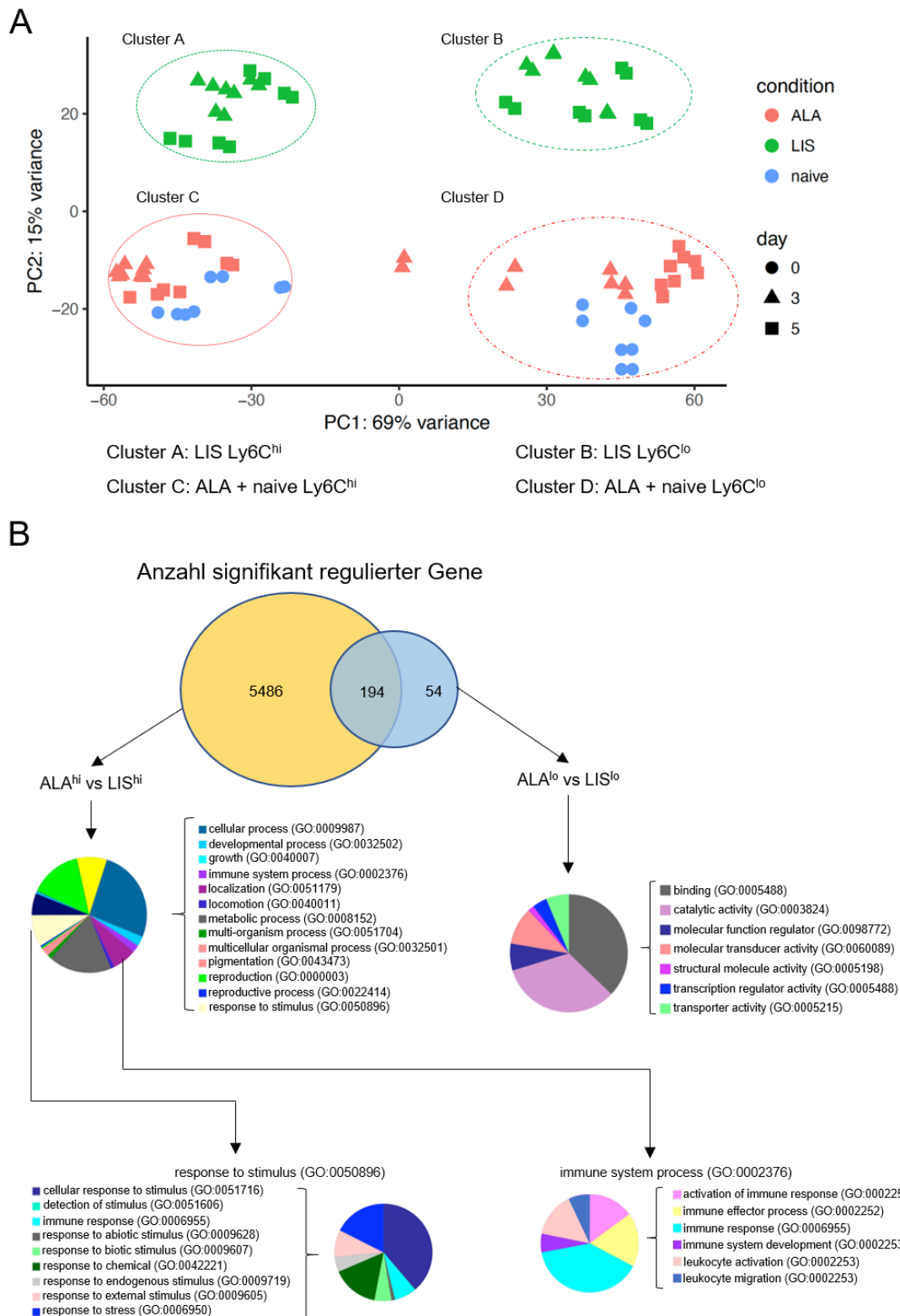
(A) Männliche C57Bl/6 Wildtyp Mäuse wurden entweder intrahepatisch mit *E. histolytica* ( $2 \times 10^5$ ) oder intravenös mit *L. monocytogenes* ( $2 \times 10^4$ ) infiziert, zu den indizierten Zeitpunkten die Leber entnommen, die Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten durchflusszytometrisch sortiert und anschließend für die Transkriptomstudie präpariert. Prozentuale Verteilung von CD11b<sup>+</sup> (B), Ly6C<sup>hi</sup> (C) und Ly6C<sup>lo</sup> (D) Zellen in der Leber infizierter Tiere an d3 und d5 p.i. sowie zusammengefasste Daten für CD11b, Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>lo</sup> (E); absolute Anzahl an isolierten Ly6C<sup>hi</sup> (F) und Ly6C<sup>lo</sup> (G) Zellen aus der Leber infizierter Tiere an d3 und d5 p.i.; Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt; n = 4 infizierte Tiere pro Zeitpunkt; Signifikanzwerte wurden mittels Mann-Whitney-Test bestimmt (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001).

Die Analyse der prozentualen Verteilung der Zellpopulationen zeigt, dass an d5 p.i. im LIS-Modell signifikant mehr CD11b<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 14B) in der Leber infizierter Tiere vorhanden sind als im ALA-Modell. Die prozentuale Verteilung der proinflammatorischen Monozyten (Ly6C<sup>hi</sup>) ist hingegen zu beiden Zeitpunkten gleich

---

(Abbildung 14C). Einzig der Anteil anti-inflammatorischer Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten ist im LIS-Modell an d5 p.i. signifikant geringer als im ALA-Modell (Abbildung 14D). Die gleichen Ergebnisse zeigen sich, wenn man beide Zeitpunkte zusammengefasst betrachtet (Abbildung 11E). Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass die absolute Anzahl pro- als auch anti-inflammatorischer Monozyten in der Leber *L. monocytogenes* infizierter Tiere signifikant höher ist als im ALA-Modell (Abbildung 14E+F).

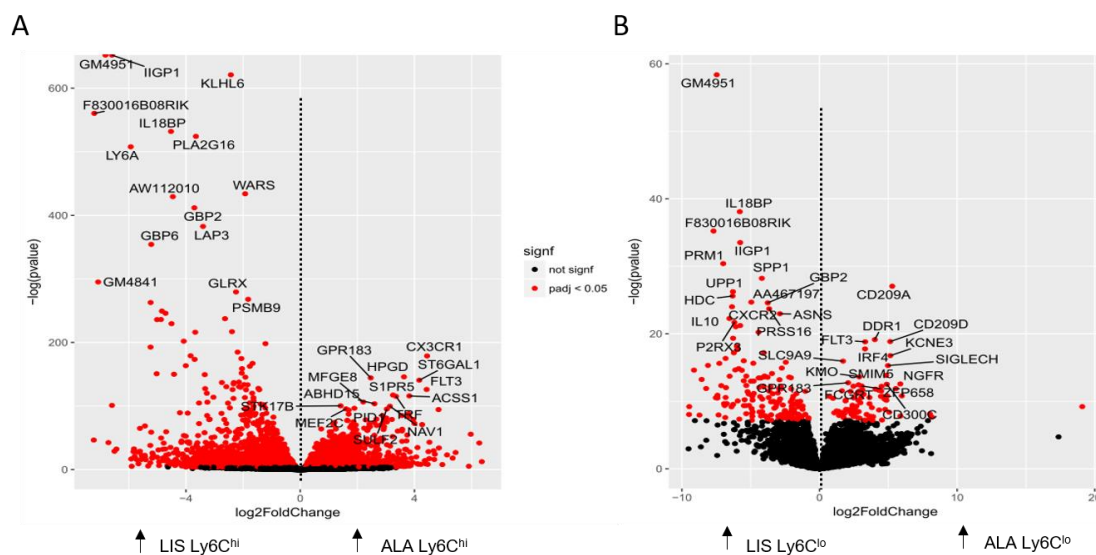
Eine tiefergehende Analyse der transkriptionellen Unterschiede erfolgte auf Grundlage einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) sowie der Klassifizierung der signifikant regulierten Gene nach Genontologie Gruppen (GO-Terms). Anhand der Auftragung mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) kann die Verschiedenheit untersuchter Gruppen quantifiziert werden. Je größer die Entfernung zweier Datenpunkte, desto unterschiedlicher und umgekehrt. Es zeigt sich, dass 4 Hauptgruppen (Cluster A-D) identifiziert werden konnten (Abbildung 15A).



**Abbildung 15: Darstellung der transkriptionellen Unterschiede in Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten aus beiden Infektionsmodellen**

(A) Hauptkomponentenanalyse der Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten aus naiven (do) und infizierten Tieren an d3 und d5 p.i., Cluster A: LIS-Modell Ly6C<sup>hi</sup>, Cluster B: LIS-Modell Ly6C<sup>lo</sup>, Cluster C: ALA-Modell und naiv Ly6C<sup>hi</sup>, Cluster D: ALA-Modell und naive Ly6C<sup>lo</sup>; (B) Analyse signifikant regulierter Gene in der Gruppe der Ly6C<sup>hi</sup> (gelb) und Ly6C<sup>lo</sup> (blau) Monozyten anhand der Einteilung in GO-Terme.

Die Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem LIS-Modell (Cluster A) heben sich deutlich von den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem ALA-Modell (Cluster C) ab. Nach dieser Analyse sind die pro-inflammatorischen Monozyten aus dem ALA eher mit denen aus naiven Tieren zu vergleichen. Ähnlich verhält es sich mit den Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten, wobei hier auf eine detailliertere Analyse verzichtet wird. Im Vergleich der pro-inflammatorischen Monozyten aus beiden Modellen sind 5486 Gene exklusiv signifikant reguliert, jedoch nur 54 exklusiv zwischen den anti-inflammatorischen Monozyten und 194 Gene sind in beiden Gruppen reguliert (Abbildung 15B). Die Aufschlüsselung nach Genontologie zeigt besonders bei den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten eine große Bandbreite an regulierten biologischen Prozessen, bei denen „Response to stimulus (GO:0050896) und „immune response“ (GO:0002376) für den vorliegenden infektionsbiologischen Hintergrund besonders interessant sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchung der GO-Terme aufzeigt, dass insgesamt 17 GO-Terme mit Bezug auf das Immunsystem reguliert sind. Bei den anti-inflammatorischen Monozyten wird kein GO-Term aus diesem Bereich reguliert, wobei auch etwa 100 mal mehr Gene zwischen den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Modellen signifikant reguliert sind.



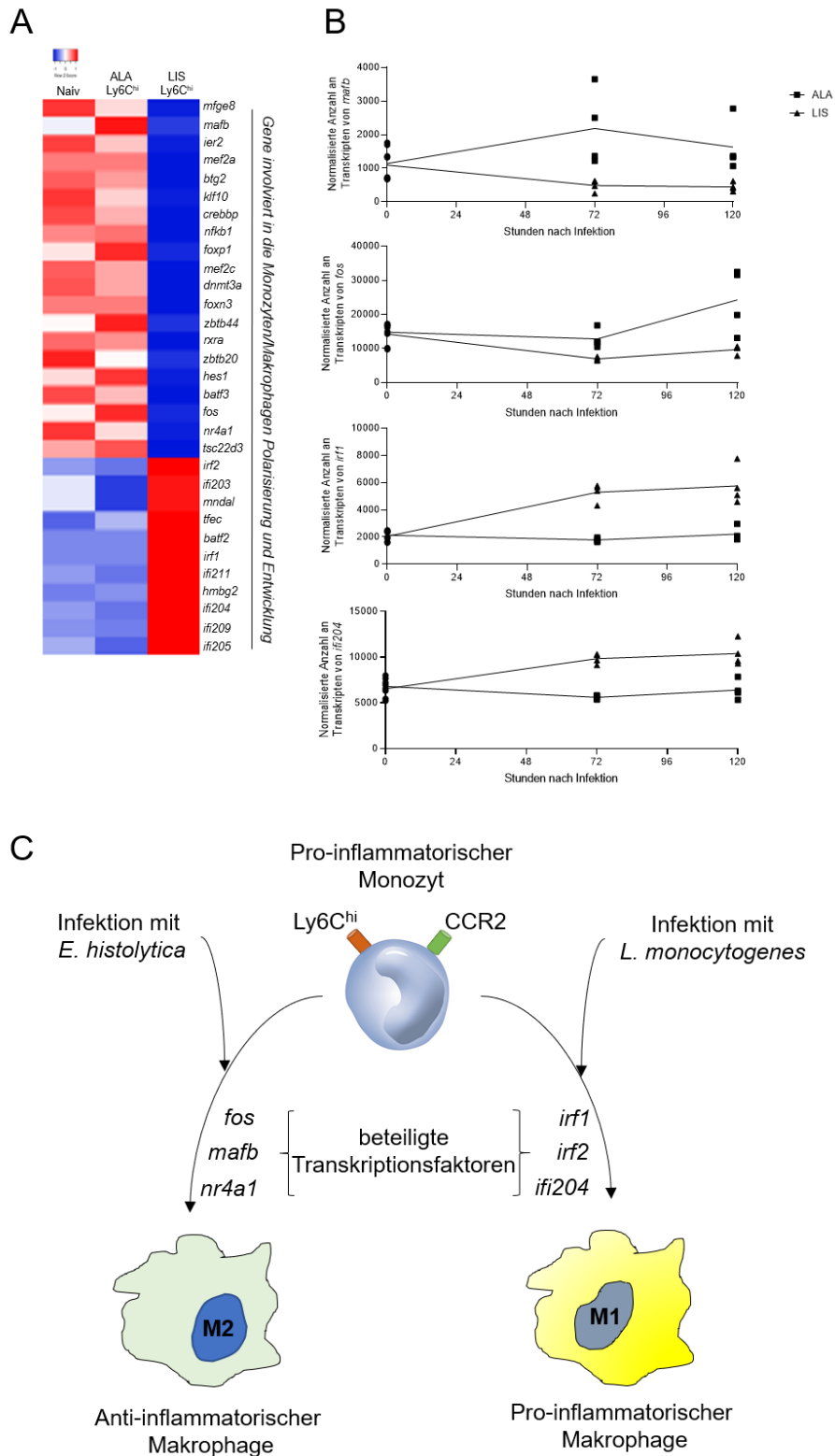
**Abbildung 16: Regulierte Gene im Vergleich der beiden Infektionsmodelle in pro- und anti-inflammatorischen Monozyten**

Volcano-Diagramm zur Visualisierung signifikant (roter Punkt) und nicht signifikant (schwarzer Punkt) regulierter Genen im Vergleich der Infektion mit *L. monocytogenes* (links) und *E. histolytica* (rechts) in (A) Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten und (B) Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten; zusammengefasste Daten von d3 und d5 p.i..

---

Dies verdeutlicht die Auftragung der Ergebnisse als Volcano-Plot. In diesem werden die Änderungsrate der Genexpression (foldchange) und der logarithmierte Signifikanzwert (p-value) gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 16). Die absolute Anzahl signifikant regulierter Gene ist bei den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten, wie bereits beschrieben, größer, jedoch sind die logp-values mit >600 auch über zehnmal höher als bei den Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten, was auf eine stärkere Regulierung hindeutet.

Die erste Analyse der Transkriptomsequenzierung zeigt, trotz der gleichen durchflusszytometrischen Sortierung in beiden Infektionsgruppen, sehr große Unterschiede zwischen Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in beiden Infektionsmodellen. Aufbauend darauf wurden einige Gengruppen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren und Polarisierungsmarker, detaillierter untersucht. Die Untersuchung der Transkriptionsfaktoren ermöglicht die genauere Beurteilung der zukünftigen Entwicklung der vorliegenden Zellen. Alle in den folgenden Abschnitten untersuchten Gene sind zwischen beiden Infektionsmodellen signifikant reguliert.



**Abbildung 17: Pathogen abhängige Entwicklung pro-inflammatorischer Monozyten in beiden Infektionsmodellen**

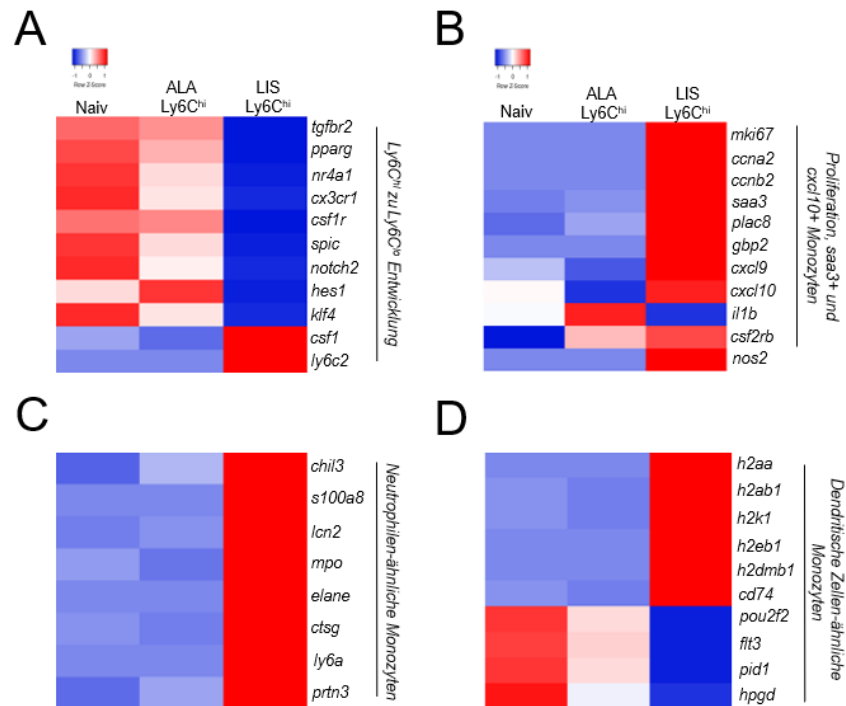
(A) Heatmap zur Visualisierung von stärker (rot) und schwächer (blau) exprimierten Transkriptionsfaktoren im Verhältnis zu naiven Proben, zusammengefasste Daten beider Zeitpunkte (d3 und d5 p.i.), im Verlauf beider Infektionen; (B) zeitlich analysierte Expression der Transkriptionsfaktoren *mafb*, *fos*, *irf1*, *ifi04*; (C) Schematische Darstellung der Polarisierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in M1 bzw. M2 Makrophagen unter Beteiligung einiger wichtiger Transkriptionsfaktoren und im Kontext der untersuchten Infektionsmodelle.

Es zeigt sich, dass es durch die Infektion mit *L. monocytogenes* zu einer, im Vergleich zu den naiven Proben, verstärkten Expression von Transkriptionsfaktoren (Abbildung 17A) kommt, die vor allem auf eine IFN $\gamma$  gesteuerte Immunantwort und klassische pro-inflammatorische M1-Polarisation hindeuten, wie z. B. *irf2*, *mdal*, *irf1*, *hmgb2* oder *ifi202*. Weiterhin ist eine verminderte Expression von Faktoren zu erkennen, die eine anti-inflammatorische M2-Polarisation begünstigen, wie z. B. *mafB*, *tsc22d3*, *fos* oder *nr4a1*. Die Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu naiven Proben fallen im ALA-Modell geringer aus als im LIS-Modell, jedoch werden auch im ALA-Modell einige Transkriptionsfaktoren deutlich stärker exprimiert (*mafB*, *foxp1*, *zbtb44*) oder herunterreguliert (*mfige8*, *ier2*, *zbtb20*, *batf3*) als in naiven Proben.

Anhand der zeitlich aufgelösten Expressionsanalyse (Abbildung 17B), ist die Infektionsmodell-spezifische Aktivierung oder Reduktion der Transkriptionsfaktorexpression klar zu erkennen. So wird z.B. *fos* im ALA-Modell erst ab d3 p.i. stärker exprimiert, wohingegen es im LIS-Modell an d3 p.i. deutlich weniger exprimiert wird als in den naiven Proben. Eine gegensätzliche Entwicklung zeigen z. B. *irf1* oder *ifi204*, bei denen eine Induktion im LIS-Modell vorliegt, jedoch keine Regulierung im ALA-Modell. Besonders pro-inflammatorische IFN $\gamma$  induzierte Transkriptionsfaktoren werden ausschließlich im LIS-Modell verstärkt exprimiert, wohingegen keine Veränderung im ALA-Modell zu erkennen ist.

Die Analyse der Transkriptionsfaktoren, die für Zellentwicklung und Polarisierung verantwortlich sind, unterstreicht und verdeutlicht die großen Unterschiede, die sich aus der Analyse der Transkriptomstudie ergeben haben. Zusätzlich gibt diese Untersuchung einen ersten Anhaltspunkt, worüber sich die Unterschiede der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Infektionsmodellen definieren lassen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden weitere Gene untersucht, die vor allem in jüngerer Vergangenheit als Indikatoren für die Entwicklungslinie von Monozyten genutzt wurden (siehe 1.2.6).





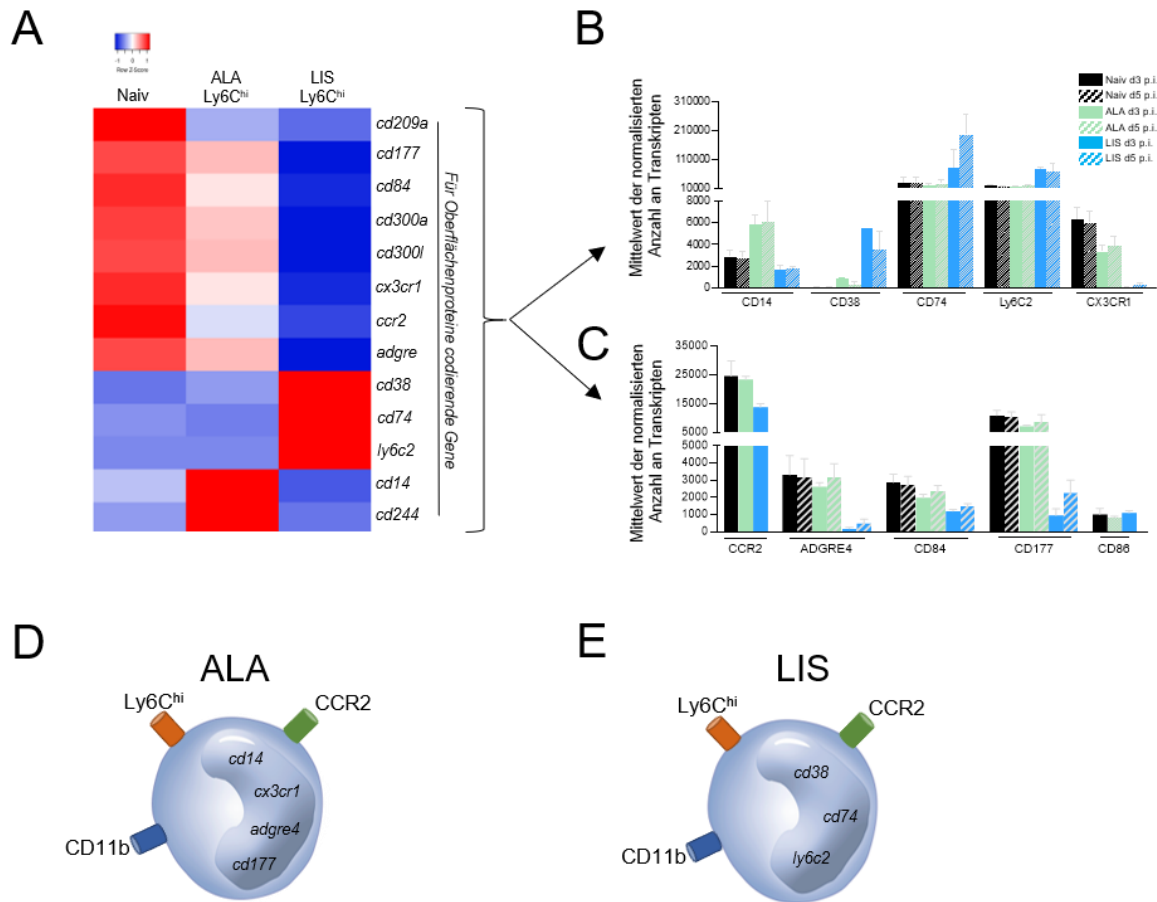
**Abbildung 18: Expressionsniveau entwicklungsspezifischer Gene in pro-inflammatorischen Monozyten**

Vergleich des relativen Expressionsniveaus anhand einer Heatmap (rot=hohe Expression; blau=geringe Expression) zwischen beiden Infektionsmodellen und naiven Proben; analysiert sind Gene, die mit folgenden Entwicklungen assoziiert sind (A) Übergang von Ly6C<sup>hi</sup> zu Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten, (B) Proliferation sowie Ausbildung eines saa3<sup>+</sup>/cxc10<sup>+</sup> ähnlichen Phänotyps, (C) Ausbildung eines Neutrophilen-ähnlichen Phänotyps, (D) Ausbildung eines Dendritischen Zellen ähnlichen Phänotyps; Daten sind von beiden Zeitpunkten zusammengefasst (d3 und d5 p.i.).

In der Betrachtung der Expressionsunterschiede bezüglich des Überganges von Ly6C<sup>hi</sup> in Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten (Abbildung 18A) ist erkennbar, dass bis auf *ly6c2* und *csf1* alle Gene während einer Infektion mit *L. monocytogenes* herunterreguliert werden, wohingegen nur sehr geringe Veränderungen im Vergleich der naiven Proben mit dem ALA-Modell festzustellen sind. Die Auswahl untersuchter Gene, die für Proliferation und Entwicklung von cxc10<sup>+</sup>/saa3<sup>+</sup> Monozyten verantwortlich sind (Abbildung 18B), sind bis auf *il1b* alle im LIS-Modell hochreguliert. Im ALA-Modell ist nur eine sehr geringe Veränderung im Vergleich zu Monozyten aus naiven Tieren zu erkennen. Die Gene *il1b* und *csf2rb* werden stärker und *cxc10* wird im ALA-Modell schwächer exprimiert als in den naiven Proben. Noch deutlicher ist die starke Aktivierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im LIS-Modell mit Blick auf die Gene, die die Entwicklung zu Neutrophilen-ähnlichen Monozyten (nMo) indizieren (Abbildung 18C). Alle analysierten Gene werden in den pro-inflammatorischen Monozyten aus dem Modell der Infektion mit *L. monocytogenes* stärker exprimiert als im naiven Zustand,

---

wohingegen kein Unterschied zwischen dem ALA-Modell und naiven Proben vorhanden ist. Die Entwicklung in Dendritische Zellen-ähnliche Monozyten (DCMo) weist nicht so ein klares Bild auf, wie die vorherigen analysierten Gruppen. Nur die Gene, die mit dem MHC-Komplex in Verbindung stehen (*h2aa*, *h2ab1*, *h2k1*, *h2eb1*, *h2dmb1*, *cd74*), werden im LIS-Modell deutlich stärker exprimiert (Abbildung 17D) als in den Proben des ALA-Modells oder des naiven Zustandes. Andere wichtige Gene jedoch, wie *pou2f2*, *flt3*, *pid1* und *hpgd*, werden im LIS-Modell deutlich schwächer exprimiert als in der naiven Kontrollgruppe. Nur für diese Gene ist auch im ALA-Modell eine Veränderung zu erkennen, jedoch ist hier eine verringerte Expression, wenn auch weniger stark als im LIS-Modell, gegenüber der naiven Kontrollgruppe zu verzeichnen. Die Analyse ergab eine verstärkte Expression von Genen im LIS-Modell, die für die Entwicklung in nMO, *cxc110<sup>+</sup>/saa3<sup>+</sup>* Monozyten und teilweise in DCMo verantwortlich sind. Wohingegen im ALA-Modell nur wenige Gene signifikant reguliert werden, die im Zusammenhang mit *cxc110<sup>+</sup>/saa3<sup>+</sup>* Monozyten und DCMo Entwicklung stehen. Ein weiterer Fokus wurde auf die Untersuchung von Genen gelegt, die für Oberflächenproteine kodieren. Unterschiede in der Expression würden, wenn auf Proteinebene übertragbar, eine bessere Differenzierung der pro-inflammatorischen Monozyten ermöglichen. Hierzu wurde eine Auswahl entsprechender Gene analysiert.



**Abbildung 19: Expression Oberflächenprotein-codierender Gene in pro-inflammatorischen Monozyten aus beiden Infektionsmodellen**

Relative Beurteilung des Expressionsniveaus anhand (A) einer Heatmap (rot=starke Expression; blau=geringe Expression) sowie absolutes Expressionsniveau (B+C) auf Grundlage der Auftragung der normalisierten Zählung der Transkripte aus der Sequenzierung für eine Auswahl an Genen, die für Oberflächenproteine codieren; Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt, Farbcode: schwarz = naive d3, schwarz-gestreift = naive d5, grün = ALA d3 p.i., grün-gestreift = ALA d5 p.i., blau = LIS d3 p.i., blau-gestreift = LIS d5 p.i.; grafisches Modell zur Unterscheidung der Monozyten aus dem ALA-Modell (D) und dem LIS-Modell (E) anhand der Expression von Genen, die für Oberflächenproteine codieren; (A-C) jeweils 4 Tiere pro Zeitpunkt.

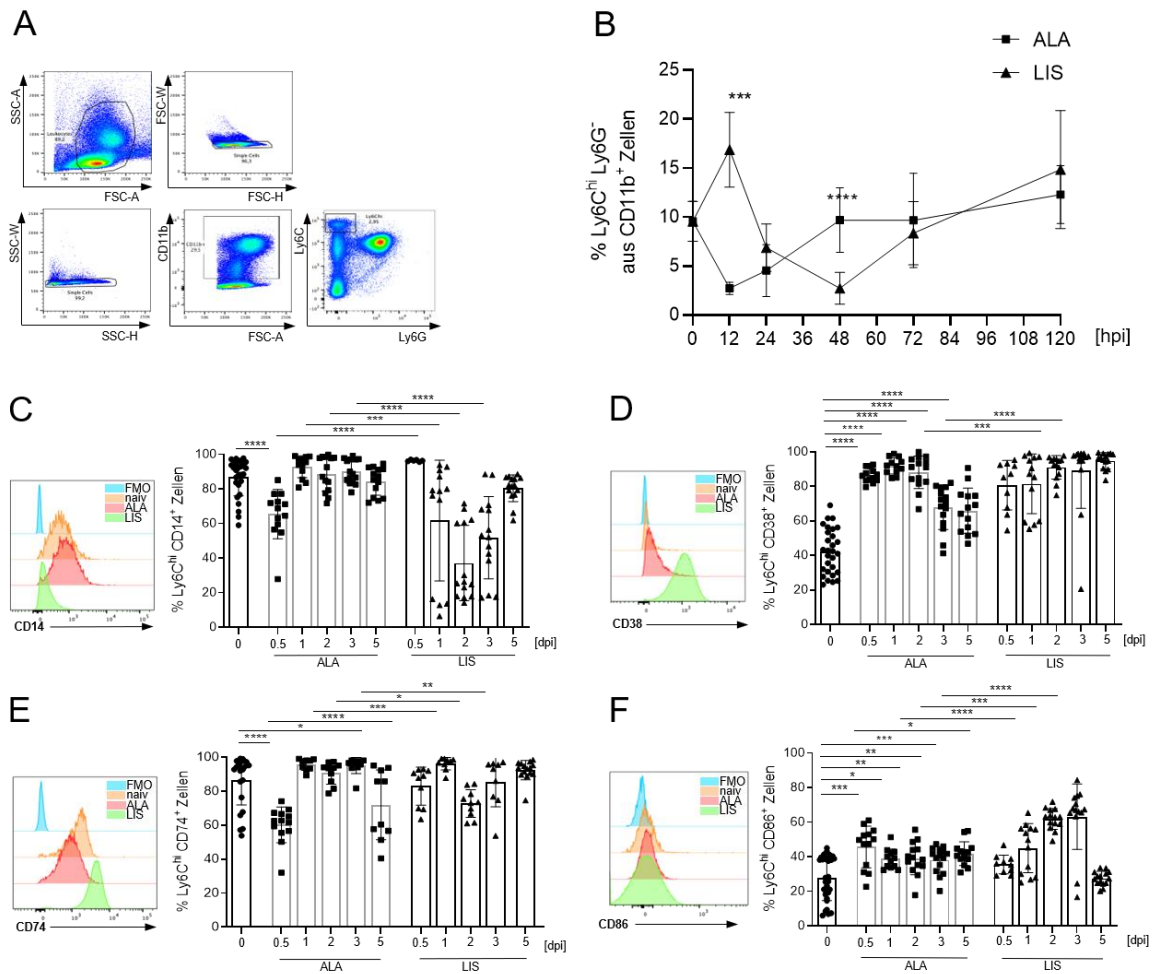
Besonders interessant, im Zusammenhang mit einer detaillierteren Einteilung der pro-inflammatorischen Monozyten, sind jene Gene, die spezifisch in einem Infektionsmodell reguliert werden. Aus Abbildung 19A ist zu erkennen, dass während einer Infektion mit *L. monocytogenes* *cd38*, *cd74* und *ly6c2* stärker exprimiert werden als in der ALA- oder naiven Kontrollgruppe. Auf der anderen Seite sind *cd14* und *cd244* nur während einer Infektion mit *E. histolytica* stärker exprimiert. Diese relativen Angaben können für *cd14*, *cd38*, *cd74* und *ly6c2* quantifiziert werden. Aus Abbildung 19B und C ist ersichtlich, welche signifikanten Änderungen es auf Ebene der mittleren normalisierten Transkriptzahlen im Verlauf der Infektion gibt. Für *cd14* ist eine

---

Verdopplung der Transkripte im ALA-Modell festzustellen und *cd38* wird in relevanten Mengen nur an d3 p.i. im ALA-Modell und im LIS-Modell an d3 und d5 p.i. exprimiert. Die relative Erhöhung der Expression von *cd74* und *ly6c2* im LIS-Modell ist auch in absoluten Zahlen erkennbar. Zusätzlich zu den schon erwähnten Oberflächenmolekülen weisen *cd177*, *cx3cr1* und *adgre4* eine stark verminderte Expression im LIS-Modell auf, jedoch nur geringere Veränderungen im ALA-Modell im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe.

### 3.3 Durchflusszytometrische Analyse

Ausgehend von der detaillierten Analyse der Transkriptomstudie wurde die Entwicklung der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in beiden Infektionsmodellen mittels Durchflusszytometrie auf Proteinebene untersucht. Zusätzlich wurden neutrophile Granulozyten in die Analyse mit einbezogen, da sie für den Verlauf der Infektion mit *E. histolytica* eine entscheidende Rolle spielen. Zur differenzierten Analyse der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten und der neutrophilen Granulozyten wurde Panel 1 (siehe 2.1.6) genutzt. Im Folgenden wird immer die Expression in der Leber dargestellt und erläutert. Die Expressionsdaten für Milz, Blut und Knochenmark sind Anhang 1 zu entnehmen. Aufgrund der Expressionsergebnisse der Transkriptomstudie wurden CD14, CD38 und CD74 als weitere Oberflächenmarker für die Typisierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten ausgewählt. Zusätzlich ist mit CD86 ein bekannter Marker für inflammatorische Makrophagen in das Panel aufgenommen worden, auch wenn die Transkriptmenge durch beide Infektionen nur minimal beeinflusst wird (siehe Abbildung 19C).



**Abbildung 20: Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf pro-inflammatorischen Monozyten im Zeitverlauf beider Infektionsmodelle**

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, zu den indizierten Zeitpunkten die Leber entnommen und die Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten durchflusszytometrisch analysiert; (A) Auswahlstrategie (Gating) der Durchflusszytometrie zur Beschreibung pro-inflammatorischer Monozyten; (B) Relative Entwicklung der Ly6C<sup>hi</sup> Zellpopulation im Verlauf beider Infektionsmodelle (ALA = Quadrate; LIS = Dreiecke) ausgehend vom naiven Zustand über 12, 24, 48, 72 und 120 Stunden nach Infektion; Histogramm der Färbung und Darstellung der positiv angefärbten Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in % für (C) CD14, (D) CD38, (E) CD74 und (F) CD86 im Verlauf beider Infektionsmodelle (ALA = Quadrate; LIS = Dreiecke) und im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe (Kreise); Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}}=27$ ,  $n_{\text{infiziert}}=12-19$ ; Für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) bestimmt.

Die Definition der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in der durchflusszytometrischen Analyse wurde nach der in Abbildung 20A dargestellten Auswahlstrategie (Gating) durchgeführt. Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil pro-inflammatorischer Monozyten an allen CD11b<sup>+</sup> Zellen bis 72 h p.i. in beiden Modellen gegenläufig ist. Die Infektion mit *L. monocytogenes* führt zu einem starken Anstieg des prozentualen Anteils an Ly6C<sup>hi</sup>

Monozyten von ca. 10% (naiv) auf ca. 17% an 12h p.i., während im ALA-Modell zu diesem Zeitpunkt ein Absinken auf ca. 3 % zu beobachten ist (Abbildung 20B). Zum Zeitpunkt 24 h p.i. beträgt der Anteil an Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus den CD11b<sup>+</sup> Zellen in beiden Infektionsmodellen ca. 5%, wonach sich der Anteil im ALA-Modell allerdings auf das Niveau der naiven Kontrolle erhöht (ca. 10%). Der Anteil im LIS-Modell sinkt jedoch auf ca. 3% ab und liegt nun signifikant niedriger als im ALA-Modell ( $p < 0.0001$ ). Zum Zeitpunkt 72 h p.i. steigt der Anteil auch im LIS-Modell wieder auf das Niveau im naiven Zustand an und es gibt ab hier keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Die Expression von CD14 (Abbildung 20C) im Zeitverlauf zeigt im ALA-Modell nur zum 12h p.i. Zeitpunkt eine Abnahme der CD14<sup>+</sup> Zellen und liegt sonst sowohl im naiven Zustand, als auch in allen untersuchten Zeitpunkten im ALA-Modell, bei etwa 90%. Im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* sinkt der Anteil CD14<sup>+</sup> Zellen signifikant ( $p < 0.001$ ) auf 60 % (d1 und d3 p.i.) bzw. auf 40% ( $p < 0.0001$ ) an d2 p.i. ab. Zum Zeitpunkt d5 p.i. steigt die Expression wieder auf ca. 85% und liegt auf einem Niveau mit dem naiven Zustand.

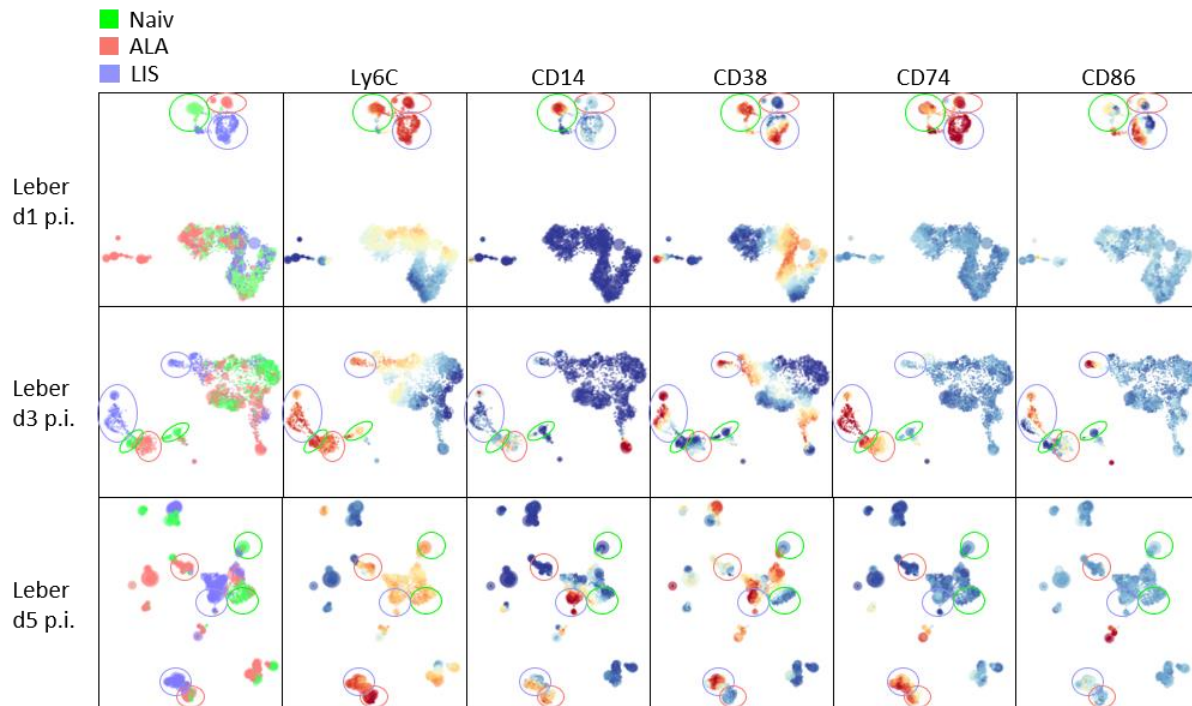
CD38 hingegen ist an allen Zeitpunkten im ALA-Modell signifikant stärker ( $p < 0.0001$ ) exprimiert als im naiven Zustand, wobei ca. 40% der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten CD38<sup>+</sup> sind (Abbildung 20D). Der Anteil CD38<sup>+</sup> Zellen steigt im Verlauf der *E. histolytica* Infektion, zu 12 h p.i. (ca.90%), sehr schnell an und sinkt von d2 p.i. zu d5 p.i. auf ca. 60 % ab. Im LIS-Modell sind zum Zeitpunkt 12 h p.i. 80 % der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten CD38<sup>+</sup>. Dieser Anteil steigt zu d2 p.i. auf etwa 90 % an und bleibt an den restlichen untersuchten Tagen auf diesem Niveau. Damit sind an d3 und d5 p.i. im LIS-Modell signifikant ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.0001$ ) mehr Zellen positiv für CD38 als im ALA-Modell. Ein unterstützendes Ergebnis wurde mittels Bestimmung des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI), welcher die Stärke der Fluoreszenz und damit die Menge des nachgewiesenen Proteins quantifiziert, erhalten und ist in Anhang 2 dargestellt.

Aus der Untersuchung der Expression von CD74 im Verlauf der Infektion (Abbildung 20E) lassen sich keine eindeutigen Erkenntnisse gewinnen. Zwar unterscheidet sich die Expression zwischen den Modellen und im Vergleich zum naiven Zeitpunkt teilweise signifikant, jedoch ist in keinem Modell ein eindeutiger Trend zu geringerer oder stärkerer Expression zu erkennen. Anders verhält es sich bei CD86 (Abbildung 20F), wo zu allen untersuchten Zeitpunkten der Anteil CD86<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> im ALA-Modell signifikant höher ist ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ) als im naiven Zustand. Der Anteil

---

CD86<sup>+</sup> Zellen ist im ALA-Modell konstant bei 40%, im naiven Zustand jedoch bei ca. 25 %. Im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* steigt der Anteil ebenfalls und liegt an d2 und d3 p.i., mit ca. 60%, signifikant ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.0001$ ) höher als zum gleichen Zeitpunkt im ALA-Modell. Allerdings sinkt im LIS-Modell an d5 p.i der Anteil auf etwa 25 % ab und liegt damit signifikant ( $p < 0.0001$ ) unter den Werten aus dem ALA-Modell an d5 p.i.

Auf Grundlage dieser Daten können Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Modellen anhand unterschiedlicher Oberflächenmarker detaillierter beschrieben werden. Zur Bestimmung neuer, monozyten-spezifischer Marker ist jedoch die singuläre Expression nicht ausreichend. Zur Beantwortung dieser Fragestellung ist eine Auftragung sinnvoll, die die Expression mehrerer Marker auf denselben Zellen veranschaulicht. Hierfür wurde die Methode der Hierachial-Stochastic-Neighbour-Embebbing (HSNE) Analyse verwendet. HSNE fasst Zellen, die aufgrund der Expression definierter Oberflächenmarker sehr ähnlich sind, zu Gruppen zusammen. Für jede Gruppe wird die Expression eines Markers farblich dargestellt und durch die Kombination mehrerer Bilder ist das Expressionsverhalten von Zellgruppen schnell zu erfassen. Die dargestellten Oberflächenmoleküle, der nachfolgenden HSNE, sind Ly6C, CD14, CD38, CD74 und CD86. Zellen mit einer hohen Expression eines Markers erscheinen rötlich, wohingegen blaue Töne niedrige Expression bedeuten.



**Abbildung 21: Hierarchical-Stochastic-Neighbour-Embedding Analyse zur Darstellung komplexer Expressionsmuster auf pro-inflammatorischen Monozyten im Verlauf beider Infektionsmodelle**

Analyse der Expression basierend auf den Molekülen Ly6C, CD14, CD38, CD74 und CD86; analysierte Zellen wurden ausgewählt nach  $CD11b^+ Ly6C^+ Ly6G^-$  und aus 5 biologischen Proben von naiven, *E. histolytica* und *L. monocytogenes* infizierten Tieren zusammengefasst und auf  $1 \times 10^5$  Zellen normalisiert; Zellen wurden aus der Leber infizierter Tiere zu den indizierten Zeitpunkten isoliert und durchflusszytometrisch analysiert; Entwicklung des Gruppierungsclusters ist komplett computergesteuert und datenabhängig (hohe Expression=rot, niedrige Expression=blau); jeweils 5 Tiere pro Zeitpunkt.

Ähnlich wie bei der PCA zur Untersuchung der Transkriptomdaten bedeutet eine große Entfernung der Zellgruppen voneinander auch einen großen Unterschied, wohingegen sehr ähnliche Zellen eng beieinander liegen. Aufgrund dessen, dass in einer HSNE die MFI zur Berechnung der Grafik genutzt wird, können geringe Unterschiede des Expressionsniveaus im Vergleich zu Abbildung 20 auftreten. Durch die Visualisierung mittels HSNE (siehe Abbildung 21) wird verdeutlicht, dass die  $Ly6C^{hi}$  Monozyten aus allen drei Gruppen (Naiv, ALA, LIS) an d1 p.i. nah zusammen sind und die Unterschiede in der Expression besonders bei CD38 und CD86 auftreten. Im Verlauf beider Infektionen unterscheiden sich die Zellen zunehmend und entfernen sich in der Auftragung weiter voneinander. Aus den  $Ly6C^{hi}$  Monozyten jedes Infektionsmodells gehen zu den untersuchten Zeitpunkten Zellgruppen hervor, die sich auch im Vergleich zu den naiven Monozyten teilweise sehr deutlich voneinander unterscheiden. Die Einteilung der Monozytengruppen anhand der Expression der untersuchten Marker ist in Tabelle 17 zu sehen.



**Tabelle 17: Vergleichende Auflistung der exprimierten Marker an der Oberfläche der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Infektionsmodellen**

Beschreibung der Gruppen erfolgt anhand starker/mittlerer Expression der Marker CD14, CD38, CD74, CD86

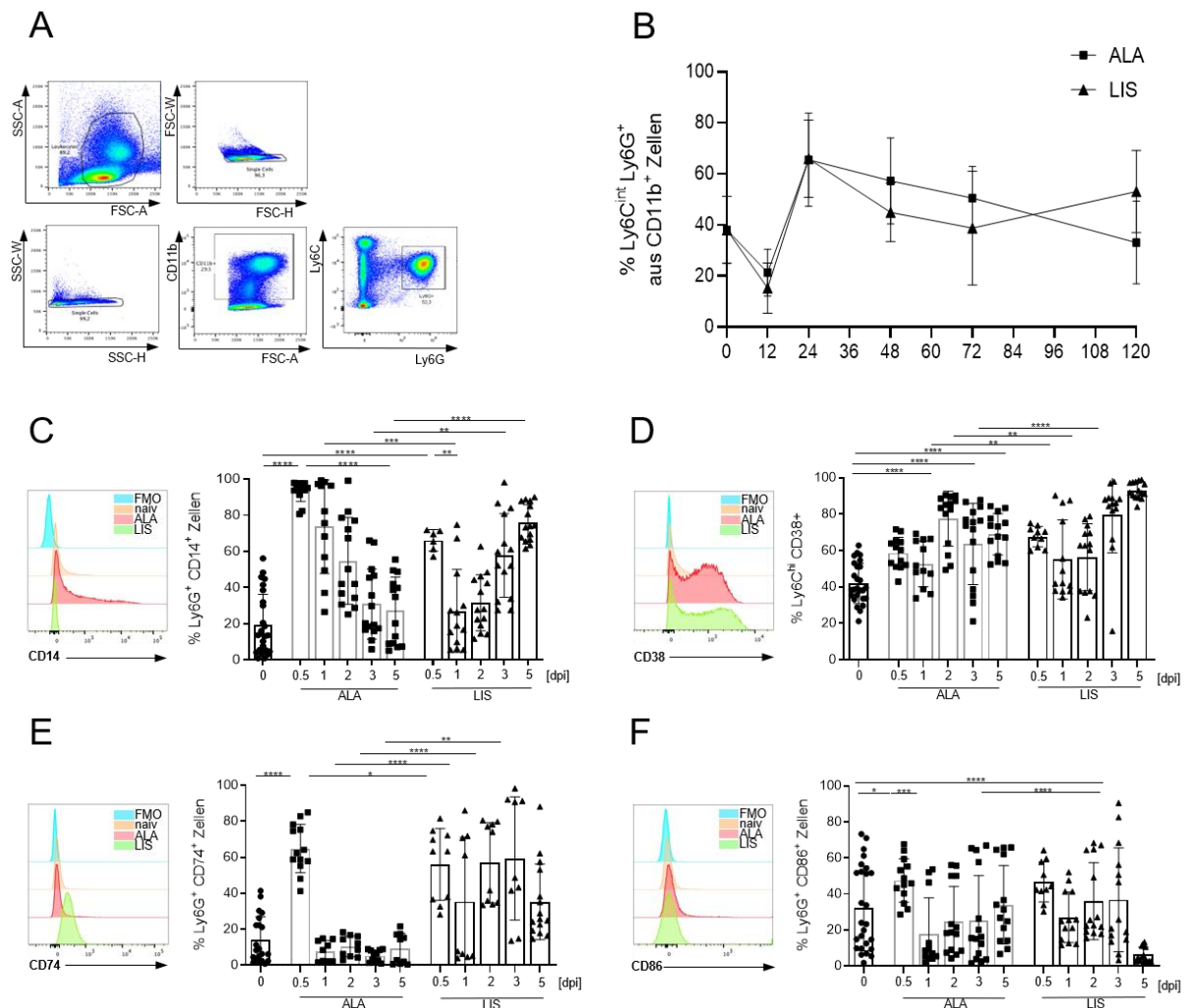
	d1 p.i.	d3 p.i.	d5 p.i.
Infektion mit <i>E. histolytica</i>	Gruppe 1: CD74+, CD86 +/-	Gruppe1: CD14+/-, CD74+/-, CD86 +/-	Gruppe 1: CD14+, CD74+ Gruppe 2: CD38+/-
Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	Gruppe 1: CD38+, CD74+, CD86+/-	Gruppe 1: CD38+, CD74+, CD86+ Gruppe 2: CD38+, CD86+	Gruppe 1: CD14+, CD38+ Gruppe 2: CD14+/-, CD38+, CD74+, CD86+/-

Zusammenfassend sind mittels HSNE-Analyse Zellcluster identifiziert worden, die sich in der Expression der untersuchten Oberflächenproteine deutlich voneinander unterscheiden. Auf Grundlage dessen konnte eine Ähnlichkeitsverteilung erzeugt werden die aufzeigt, dass die Cluster aus der PCA der Transkriptomdaten auf Proteinebene, zumindest in ähnlicher Art und Weise, wiederzufinden sind.

### 3.3.1 Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf neutrophilen Granulozyten

Vergleichend zu der Analyse der Monozyten wurde die Zellpopulation der neutrophilen Granulozyten bezüglich der Expression der beschriebenen Oberflächenmarker untersucht (Abbildung 22). Die prozentuale Entwicklung der Population unterscheidet

sich, im Gegensatz zu den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten, zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zwischen beiden Infektionsmodellen (Abbildung 22B).



**Abbildung 22: Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf neutrophilen Granulozyten im Zeitverlauf beider Infektionsmodelle**

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, an den indizierten Zeitpunkten wurde die Leber entnommen und die Ly6G<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten durchflusszytometrisch analysiert; (A) Auswahlstrategie (Gating) in der Durchflusszytometrie zur Beschreibung neutrophiler Granulozyten; (B) Entwicklung der neutrophilen Granulozyten Zellpopulation im Verlauf beider Infektionsmodelle (ALA = Quadrate; LIS = Dreiecke) ausgehend vom naiven Zustand über 12, 24, 48, 72 und 120 Stunden nach Infektion; Histogramm der Färbung und Darstellung der positiven Zellen in % für (C) CD14, (D) CD38, (E) CD74 und (F) CD86 im Verlauf beider Infektionsmodelle (ALA = Quadrate; LIS = Dreiecke) und im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe; Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}}=27$ ,  $n_{\text{infiziert}}=12-19$ ; Für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Auch die Analyse der Oberflächenmarker zeigt nicht so eindeutige Ergebnisse wie bei den Monozyten, was die Spezifität der ausgewählten Marker für eine weitere

Charakterisierung der Ly6C<sup>hi</sup> Monozytenpopulation unterstreicht. Dennoch ist deutlich erkennbar, dass der Anteil an CD14<sup>+</sup> Zellen im Verlauf der Infektionen stark variiert. In der Infektion mit *E. histolytica* steigt der Anteil vom naiven Zustand (20 %) zu 12 h p.i. sehr stark auf ca. 100 % ( $p < 0.0001$ ). Darauf folgend sinkt der Anteil wieder auf ca. 30 % an d5 p.i.. Im Modell der Infektion mit *L. monocytogenes* ist am Anfang zu 12 h p.i. ein starker Anstieg ( $p < 0.0001$ ), im Vergleich zur naiven Kontrolle, auf 60 % CD14<sup>+</sup> Zellen zu verzeichnen. Danach sinkt der Anteil zu d1 p.i. jedoch signifikant ab ( $p < 0.01$ ) und steigt im Verlaufe der Infektion zu d5 p.i. auf ca. 60 % an. Somit sind an d3 und d5 p.i. im LIS-Modell signifikant mehr neutrophile Granulozyten CD14<sup>+</sup> als im ALA-Modell ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.0001$ ).

Der Anteil der CD38<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten steigt, im Vergleich zur naiven Kontrolle, in beiden Modellen an. Im ALA-Modell ist der höchste Anteil an d2 p.i. erreicht, wo dieser auch signifikant höher ist als im LIS-Modell ( $p < 0.01$ ). Anschließend daran steigt der prozentuale Anteil an CD38<sup>+</sup> Neutrophilen im LIS-Modell jedoch weiter an und sinkt im ALA-Modell ab, was zu einem signifikant höheren Anteil ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.0001$ ) an d3 und d5 p.i. im LIS-Modell führt.

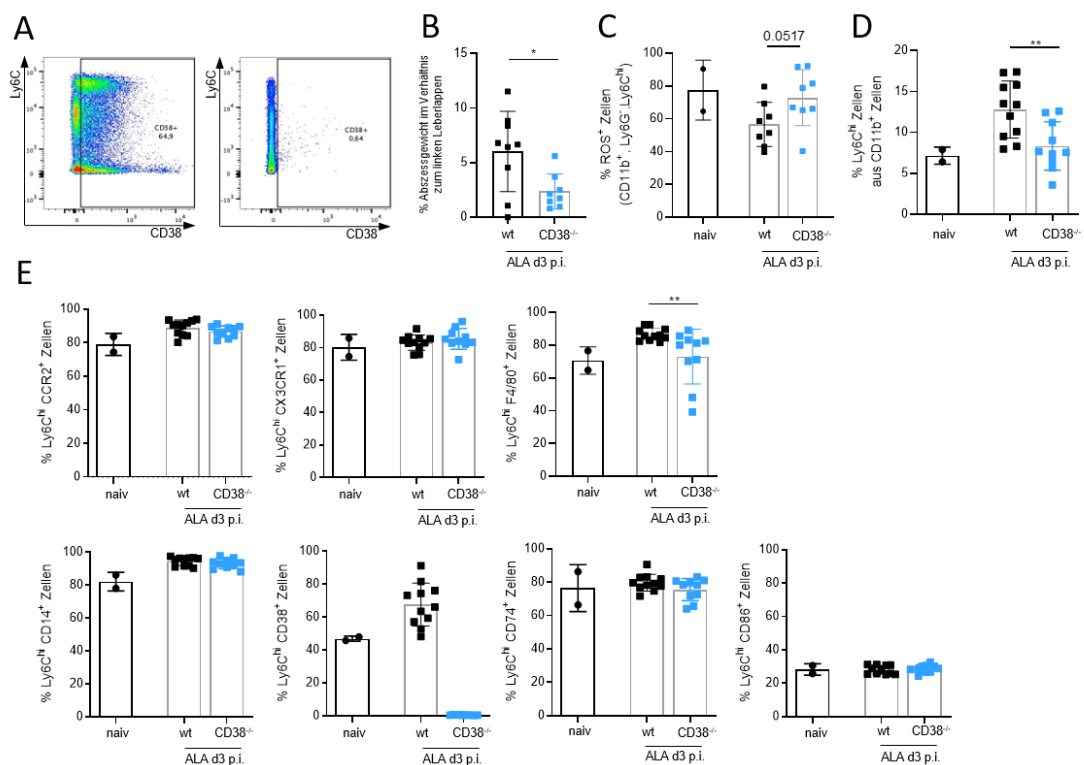
CD74 wird von neutrophilen Granulozyten im ALA-Modell nur 12 h p.i. stark exprimiert (60 %) und sinkt danach wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe (10 %) ab. Im LIS-Modell ist der Anteil CD74<sup>+</sup> Zellen an allen Zeitpunkten höher als im naiven Zustand und, mit Ausnahme des Zeitpunktes 12h p.i., auch signifikant höher als im ALA-Modell ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.0001$ ).

Sehr früh im Verlauf der Infektion mit *E. histolytica* (12 h p.i.) ist ein erhöhter Anteil an CD86<sup>+</sup> Zellen vorhanden, allerdings sinkt dieser zu d1 p.i. signifikant ab ( $p < 0.01$ ). Danach steigt der Anteil wieder kontinuierlich und erreicht an d5 p.i. die Werte der naiven Gruppe. Im LIS-Modell ist nur an d5 p.i. ein signifikantes Absinken des Anteils CD86<sup>+</sup> neutrophiler Granulozyten im Vergleich zum naiven Zeitpunkt als auch zum ALA-Modell zu beobachten.

### **3.4 Auswirkungen des Knock-outs von CD38 auf die Entwicklung des Amöbenleberabszesses**

Die Bedeutung von CD38 zur Kontrolle einer Infektion mit *L. monocytogenes* als auch anderen Pathogenen konnte schon mehrfach gezeigt werden (129, 140, 200). Der Einfluss auf die Ausbildung des Amöbenleberabszesses wurde bisher hingegen nur in

Bezug auf neutrophile Granulozyten beleuchtet (201). Anhand der vorhergehenden Daten zur CD38 Expression im Verlaufe einer hepatischen Infektion mit *E. histolytica* und dem Einfluss von Monozyten auf die Abszessbildung ist die Analyse der Abszessbildung in der CD38 Knock-out Maus von großem Interesse. Zusätzlich sollte der Einfluss des CD38<sup>-/-</sup> auf die Expression spezifischer Oberflächenmarker untersucht werden, um Rückschlüsse auf eine veränderte Aktivierung oder Polarisierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten ziehen zu können. Hierzu erfolgte die Analyse der intrazellulären ROS-Produktion in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten, um anhand dessen die Aktivität der Zellen zu bestimmen.



**Abbildung 23: Einfluss des Knock-outs von CD38 auf die Infektion mit *E. histolytica***

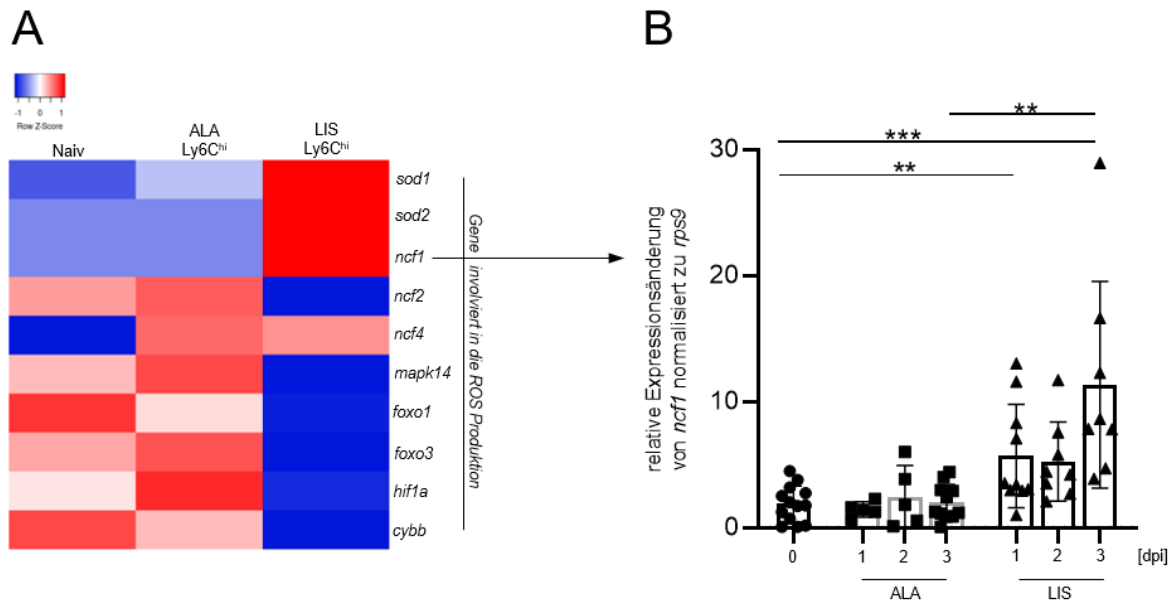
Männliche C57Bl/6 Wildtyp und CD38<sup>-/-</sup> Tiere wurden intrahepatisch mit  $2 \times 10^5$  *E. histolytica* infiziert, die Leber an d3 p.i. entnommen, das Abszessgewicht bestimmt und die Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert, zeitgleich erfolgte die Determinierung von intrazellulären ROS in Splenozyten; (A) Nachweis des Knock-outs von CD38 mittels durchflusszytometrischer Messung des CD38-Proteins auf Einzelzellen; (B) Determinierung des Abszessgewichtes als relatives Gewicht im Verhältnis zum gesamten linken Leberlappen; (C) intrazelluläre ROS-Produktion in pro-inflammatorischen Monozyten (CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>hi</sup>, Ly6G<sup>+</sup>) in Wildtyp und CD38<sup>-/-</sup> Tieren an d3 p.i.; (D) prozentualer Anteil an Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus der Population der CD11b<sup>+</sup> positiven Zellen in naiven Tieren sowie Wildtyp und CD38<sup>-/-</sup> Tieren an d3 p.i.; (E) durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteine CCR2, CX3CR1, F4/80, CD14, CD38, CD74 und CD86 im naiven Kontrolltier als auch in *E. histolytica* infizierten Wildtyp und CD38<sup>-/-</sup> Tieren; Daten sind als Median  $\pm$ SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}}=27$ ,  $n_{\text{infiziert}}=12-19$ ; Für alle Gruppen erfolgte ein Normalerteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

Durch den Knock-out von CD38 entwickelt sich in den Lebern *E. histolytica* infizierter Tiere ein signifikant kleinerer Abszess ( $p < 0.05$ ) an d3 p.i. (Abbildung 23B). Die intrazelluläre ROS-Produktion in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten (Abbildung 23C) ist jedoch höher als in den infizierten Wildtyp-Tieren, auch wenn dieses Ergebnis nicht signifikant ist. Die Menge intrazellulärer ROS ist in diesem Fall identisch mit der Menge in naiven Kontrolltieren. Gleichzeitig ist der prozentuale Anteil an Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in der Leber signifikant niedriger als in der Wildtyp-Gruppe ( $p < 0.01$ ) und liegt mit etwa 8 % auf dem Niveau der naiven Kontrollgruppe. Die Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle ergab, dass im CD38<sup>-/-</sup> an d3 p.i. weniger Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten F4/80 exprimieren als im Wildtyp ( $p < 0.01$ ). Die Expression aller anderen untersuchten Oberflächenmoleküle ist im Vergleich zwischen Wildtyp und CD38<sup>-/-</sup> gleich. Die erhaltenen Ergebnisse für die Expression von CD14, CD38 und CD74 an d3 p.i. decken sich mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen im Zeitverlauf Abbildung 20.

Die Analyse des CD38<sup>-/-</sup> ergab, dass kleinere Abszesse an d3 p.i. vorliegen und tendenziell mehr intrazelluläre ROS in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten d3 p.i. gebildet wird als im Wildtyp. Bis auf F4/80 hat der CD38<sup>-/-</sup> keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle.

### **3.5 Regulation und Determinierung intrazellulär gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies**

Das genetische Netzwerk, welches für die Produktion intra- und extrazellulärer ROS verantwortlich ist, ist hoch komplex und umfasst eine Vielzahl an Genen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression einiger wichtiger Gene, die zur Bildung von ROS benötigt werden, in den pro-inflammatorischen Monozyten aus beiden Modellen untersucht.



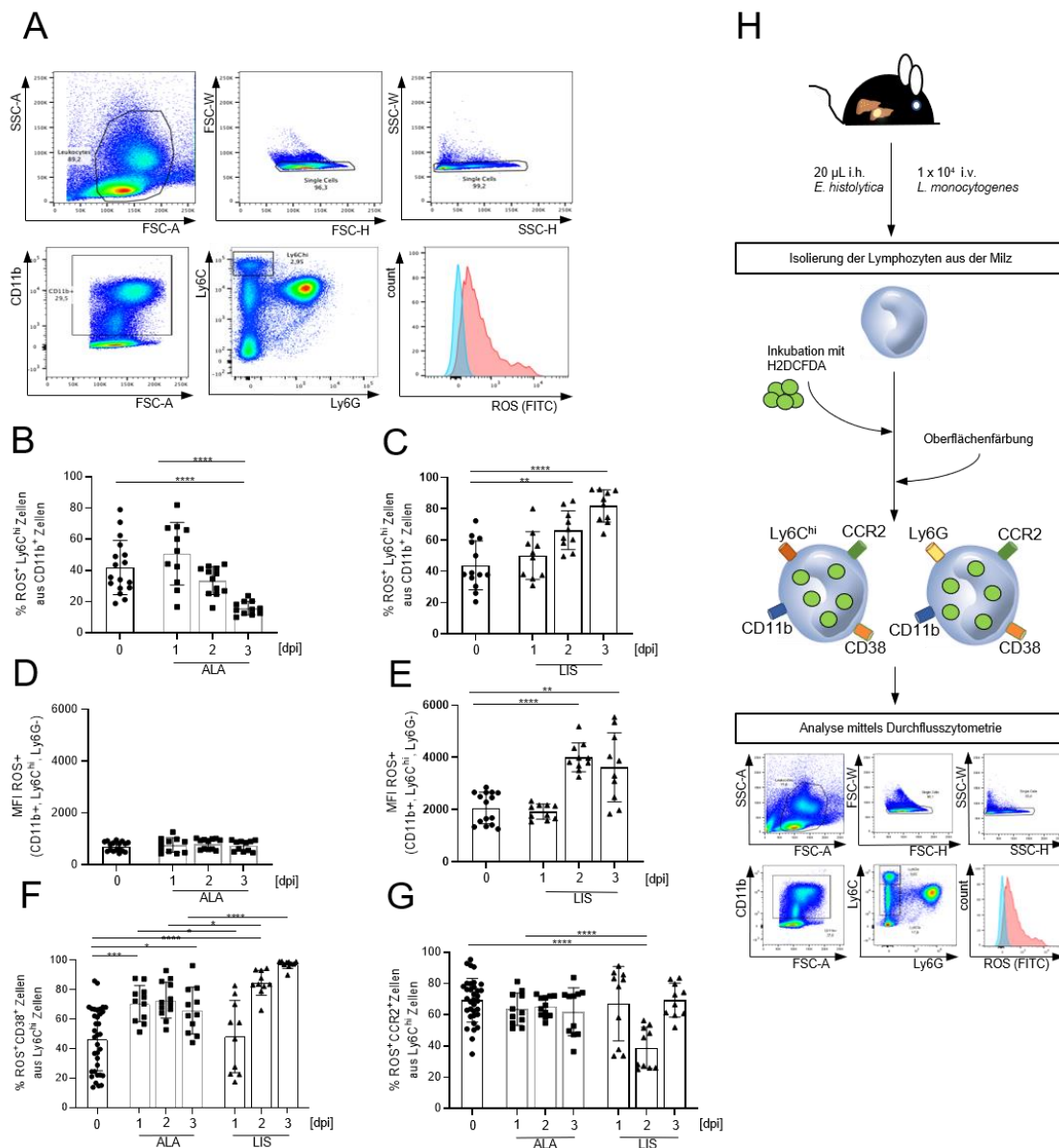
**Abbildung 24: Expression ROS-assoziiierter Gene in beiden Infektionsmodellen**

(A) Analyse der relativen Expression ROS-assoziiierter Gene in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in beiden Infektionsmodellen mittels Heatmap (blau = geringe, rot = starke Expression); (B) Bestimmung der relativen Veränderung der Expression von *ncf1* in Total-RNA aus der Leber erfolgte durch qPCR mittels der  $\Delta\Delta Ct$  Methode; Daten sind als Median  $\pm$ SD dargestellt; Für alle Gruppen erfolgte ein Normalerteilungstest;  $n_{\text{naiv}} = 13$ ,  $n_{\text{infiziert}} = 5 - 11$ ; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Es zeigte sich, dass die Expression von *sod1*, *sod2* und *ncf1* im LIS-Modell deutlich höher ist als im naiven Zustand oder im ALA-Modell (Abbildung 24A). *ncf4* ist in beiden Infektionsmodellen verstärkt exprimiert, wobei alle anderen untersuchten Gene während einer Infektion mit *L. monocytogenes* schwächer exprimiert werden als im ALA-Modell oder der naiven Kontrollgruppe. Beispielhaft wurde die Expression von *ncf1* auch auf Ebene der Gesamt-RNA aus der Leber analysiert, wobei im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* ebenfalls ein signifikanter Anstieg im Vergleich zum ALA-Modell bzw. der naiven Kontrollgruppe zu verzeichnen ist (Abbildung 24B).

Die ROS-Produktion in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten wurde anschließend in beiden Modellen mittels eines durchflusszytometrischen *ex-vivo* Assays untersucht. Bereits unter 1.2.4 wurden mögliche Parameter aufgezeigt, um die Monozyten phänotypisch zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies im Infektionsverlauf konzentriert. Zusätzlich wurden Testmessungen mit Leberlymphozyten durchgeführt, die mittels Percoll-Gradient

isoliert wurden. Es zeigte sich, dass in diesen Proben keine verlässlich, reproduzierbaren Werte ermittelt werden konnten.



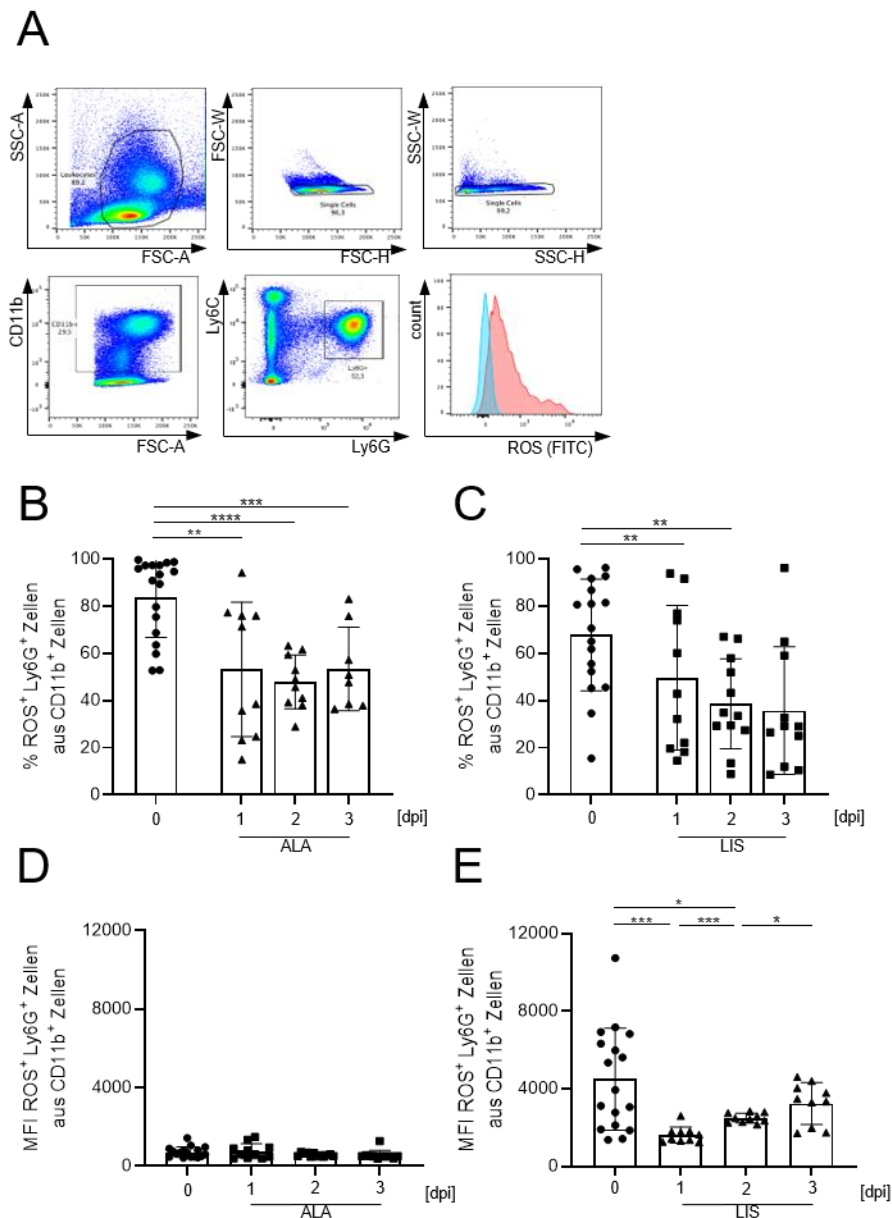
**Abbildung 25: Phänotypische Charakterisierung von pro-inflammatorischen Monozyten anhand der intrazellulären ROS-Produktion**

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, zu den indizierten Zeitpunkten wurde die Milz entnommen und die ROS-Produktion in den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten durchflusszytometrisch analysiert; (A) Auswahlstrategie (Gating) in der durchflusszytometrischen Analyse von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten; Auftragung der Entwicklung des Anteils ROS<sup>+</sup> Zellen im Verlauf der Infektion mit (B) *E. histolytica* oder (C) *L. monocytogenes* an d1, d2 und d3 p.i.; Absolute Menge an gebildetem ROS durch Auftragung des Median der Fluoreszenz Intensität (MFI) in der Infektion mit (D) *E. histolytica* und (E) *L. monocytogenes* an d1, d2 und d3 p.i.; Prozentuale Auftragung der ROS<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im Verlauf beider Infektionen, die zusätzlich entweder positiv für (F) CD38 oder (G) CCR2 sind; (H) Schematischer Ablauf des ROS-Assays; Daten sind als Median  $\pm$ SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}} = 15-35$ ;  $n_{\text{infiziert}} = 10-13$ ; Für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Die Bestimmung der intrazellulären ROS-Produktion ergab im ALA-Modell einen signifikanten Rückgang des Anteils an ROS<sup>+</sup> Zellen von d1 p.i. zu d3 p.i. ( $p < 0.0001$ ), sodass an d3 p.i. nur noch etwa 20 % der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten auch ROS<sup>+</sup> sind (Abbildung 25B). Die gegenteilige Entwicklung ist im LIS-Modell zu erkennen, in welchem der Anteil an ROS<sup>+</sup> Monozyten an d2 und d3 p.i. signifikant höher ist ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.0001$ ) als zum naiven Zeitpunkt (Abbildung 25C). Im Modell der Infektion mit *L. monocytogenes* ist ebenfalls ein Anstieg der produzierten Menge an ROS, dargestellt anhand der MFI, zu erkennen (Abbildung 25E). An d2 p.i. ist die MFI signifikant höher als zum naiven Kontrollzeitpunkt ( $p < 0.001$ ) und an d3 p.i. auch signifikant höher als an d1 p.i. ( $p < 0.05$ ). Im ALA-Modell ist keine Veränderung in der MFI im Verlauf der Infektion auszumachen (Abbildung 25D). Der Anteil an ROS<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen ist zu allen untersuchten Zeitpunkten im ALA-Modell signifikant höher ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$ ) als zum naiven Kontrollzeitpunkt (Abbildung 25F). Im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* ist dieser Anteil an d2 und d3 p.i. signifikant höher als im ALA-Modell ( $p < 0,01$ ;  $p < 0.0001$ ), wobei der Anteil an d1 p.i. geringer ist als im ALA-Modell ( $p < 0.05$ ). Es zeigt sich eine unterschiedliche Kinetik in der Entwicklung ROS<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen im Verlauf beider Infektionen. Mit Ausnahme von d2 p.i. im LIS-Modell ist der Anteil von ROS<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> Zellen im Verlauf beider Infektionen unverändert bei etwa 60% und liegt damit auf dem Niveau der naiven Kontrolle (Abbildung 25G).

Die Produktion intrazellulärer ROS ist in beiden Infektionsmodellen verändert, jedoch mit unterschiedlichen Entwicklungen. Es ist eine ansteigende ROS-Produktion im LIS-Modell zu verzeichnen, wohingegen im ALA-Modell der Anteil der ROS<sup>+</sup> Zellen absinkt. Ähnlich wie bei der Analyse der Oberflächenmarker erfolgte auch bei der ROS-Produktion die Analyse der neutrophilen Granulozyten, da sie im Verlaufe einer Infektion wichtige ROS-Produzenten sind.





**Abbildung 26: Phänotypische Charakterisierung neutrophiler Granulozyten anhand der intrazellulären ROS-Produktion**

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, zu den indizierten Zeitpunkten wurde die Milz entnommen und die ROS-Produktion in den neutrophilen Granulozyten durchflusszytometrisch analysiert; (A) Auswahlstrategie (Gating) in der durchflusszytometrischen Analyse neutrophiler Granulozyten; Auftragung der Entwicklung des Anteils ROS-positiver Zellen im Verlauf der Infektion mit (B) *E. histolytica* oder (C) *L. monocytogenes* an d1, d2 und d3 p.i.; Absolute Menge and gebildetem ROS durch Auftragung des Median der Fluoreszenz Intensität (MFI) in der Infektion mit (D) *E. histolytica* und (E) *L. monocytogenes* an d1, d2 und d3 p.i.; Daten sind als Median  $\pm$ SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}} = 15-35$ ;  $n_{\text{infiziert}} = 10-13$ ; für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

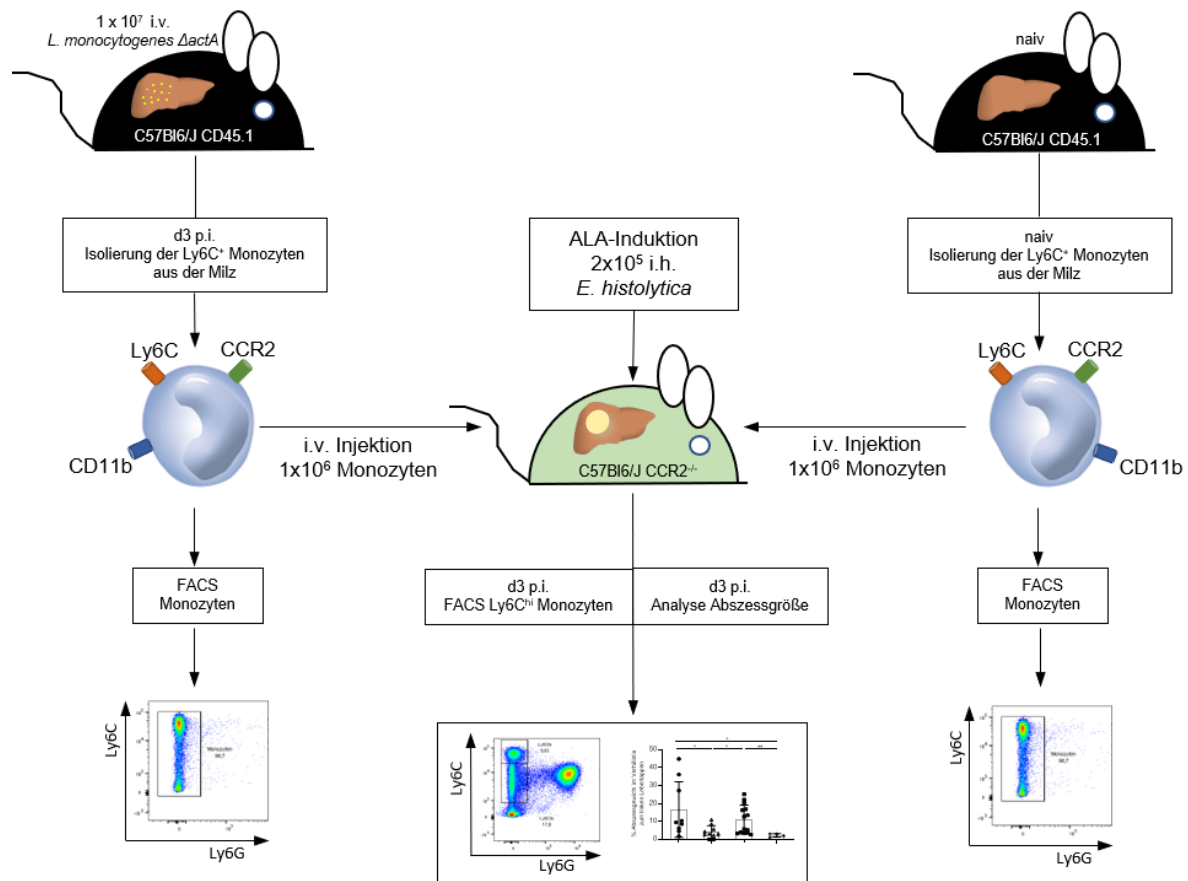
---

Im Gegensatz zur ROS-Produktion in Monozyten verhält sich diese in den neutrophilen Granulozyten in beiden Modellen ähnlich. Im Verlauf der Infektionen ist sowohl im ALA-Modell (Abbildung 26B) als auch im LIS-Modell (Abbildung 26C) eine signifikante Verringerung des Anteils an ROS<sup>+</sup> Zellen zu erkennen. Im LIS-Modell ist ebenfalls eine Verringerung der MFI zu Beginn der Infektion zu erkennen, wobei an d3 p.i., im Vergleich zum naiven Zeitpunkt, keine signifikante Veränderung mehr vorliegt. Eine gegensätzliche Entwicklung der ROS-Produktion zwischen beiden Modellen ist in neutrophilen Granulozyten nicht erkennbar.

Die pathogen-spezifische Veränderung der ROS-Produktion konnte im vorliegenden Rahmen nur in den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten gezeigt werden. Die neutrophilen Granulozyten zeigen im Verlauf der Infektionen eine generelle Abnahme des Anteils der ROS<sup>+</sup> Zellen.

### **3.6 Adoptiver Transfers pro-inflammatorischer Monozyten**

Frühere Untersuchungen zeigten, dass Monozyten im ALA-Modell eine Immunpathologie verstärken, die zur Bildung des Abszesses führt (194). Im LIS-Modell wirken Monozyten hingegen protektiv und leisten einen essentiellen Beitrag zur Bekämpfung der Infektion (104). Im folgenden Versuchsteil sollte der Einfluss eines Transfers von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem LIS Modell auf die Abszessentwicklung in der CCR2<sup>-/-</sup> Maus, welche keine Monozyten aus dem Knochenmark rekrutieren kann, untersucht werden.



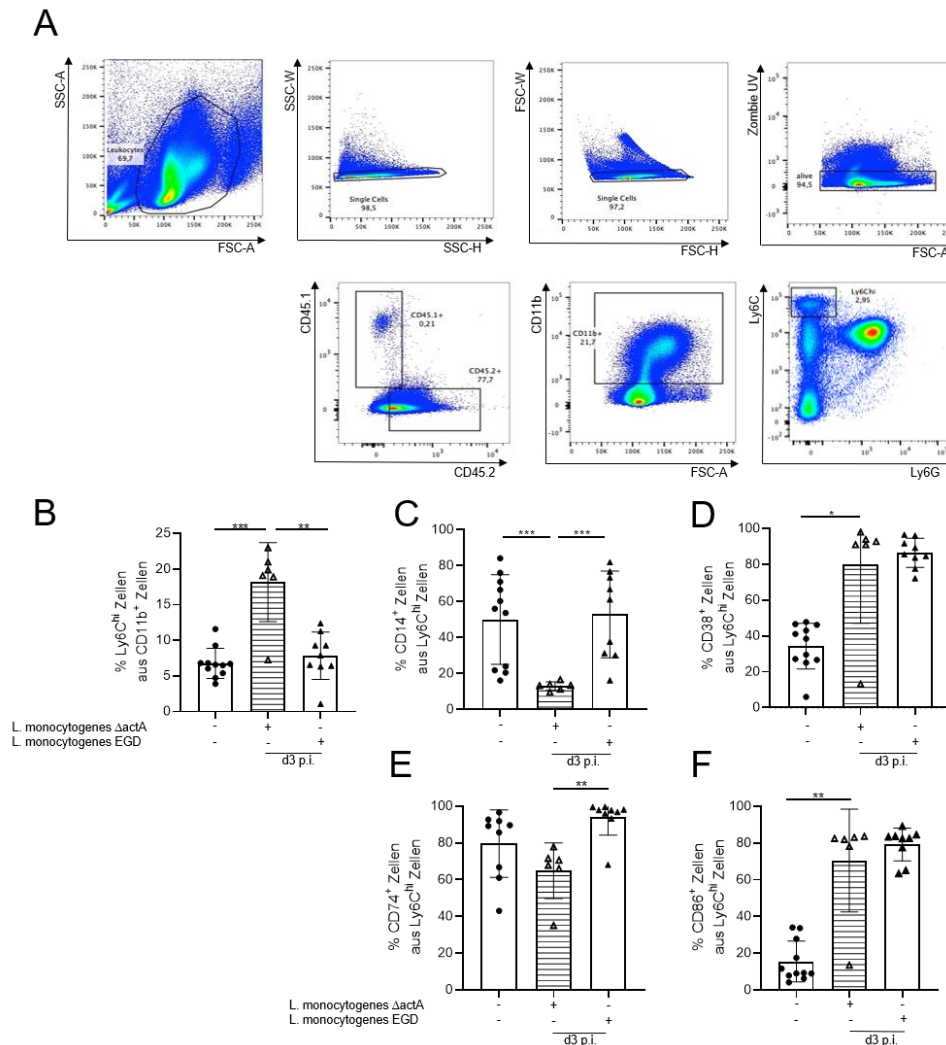
**Abbildung 27: Schematischer Ablauf des adoptiven Transfer von pro-inflammatorischen Monozyten**

Männliche C57Bl/6 Ly5.1 Tiere wurden mit *L. monocytogenes*  $\Delta actA$  ( $1 \times 10^7$ ) infiziert oder naiv belassen. An d3 p.i. wurden die Monozyten aus der Milz isoliert. Gleichzeitig wurden männliche CCR2<sup>-/-</sup> Tiere intrahepatisch mit *E. histolytica* ( $2 \times 10^5$ ) infiziert und anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Monozyten entweder aus naiven oder mit *L. monocytogenes*  $\Delta actA$  infizierten Tieren intravenös transferiert, Analyse des relativen Abszessgewichtes und der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf pro-inflammatorischen Monozyten an d3 p.i. sowie Analyse der transferierten Monozyten am Tag des Transfers.

Um die Übertragung von Listerien über transferierte Monozyten zu verhindern, wurde anstelle von *L. monocytogenes* EGD ein Stamm genutzt, welcher einen genetischen Knock-out besitzt, *L. monocytogenes*  $\Delta actA$ . Der Knock-out von *actA* führt zum Verlust der inter- und intrazellulären Aktin-gestützten Beweglichkeit.

Zunächst musste jedoch die Infektion mit einem weniger pathogenen Listerien-Stamm etabliert werden, dem die Fähigkeit fehlt, von einer infizierten Zelle in eine andere zu wandern. Daraus resultierend ist die Bekämpfung für das Immunsystem deutlich leichter und die Bakterien werden bei einem adoptiven Transfer von Monozyten nicht mittransferiert. Aufgrund der geringeren Pathogenität sind allerdings höhere Bakterientiter bei der Infektion nötig, um eine vergleichbare Aktivierung des

Immunsystems zu erhalten (202). Dieser Stamm, *L. monocytogenes*  $\Delta$ actA, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Hans-Willi Mittrücker vom Universitätsklinikum Eppendorf zur Verfügung gestellt. Die Etablierung zielte darauf ab, anhand der vergleichbaren Expression spezifischer Oberflächenmarker eine zwischen beiden Stämmen, vergleichbare Aktivierung der Monozyten zu gewährleisten (Abbildung 28).

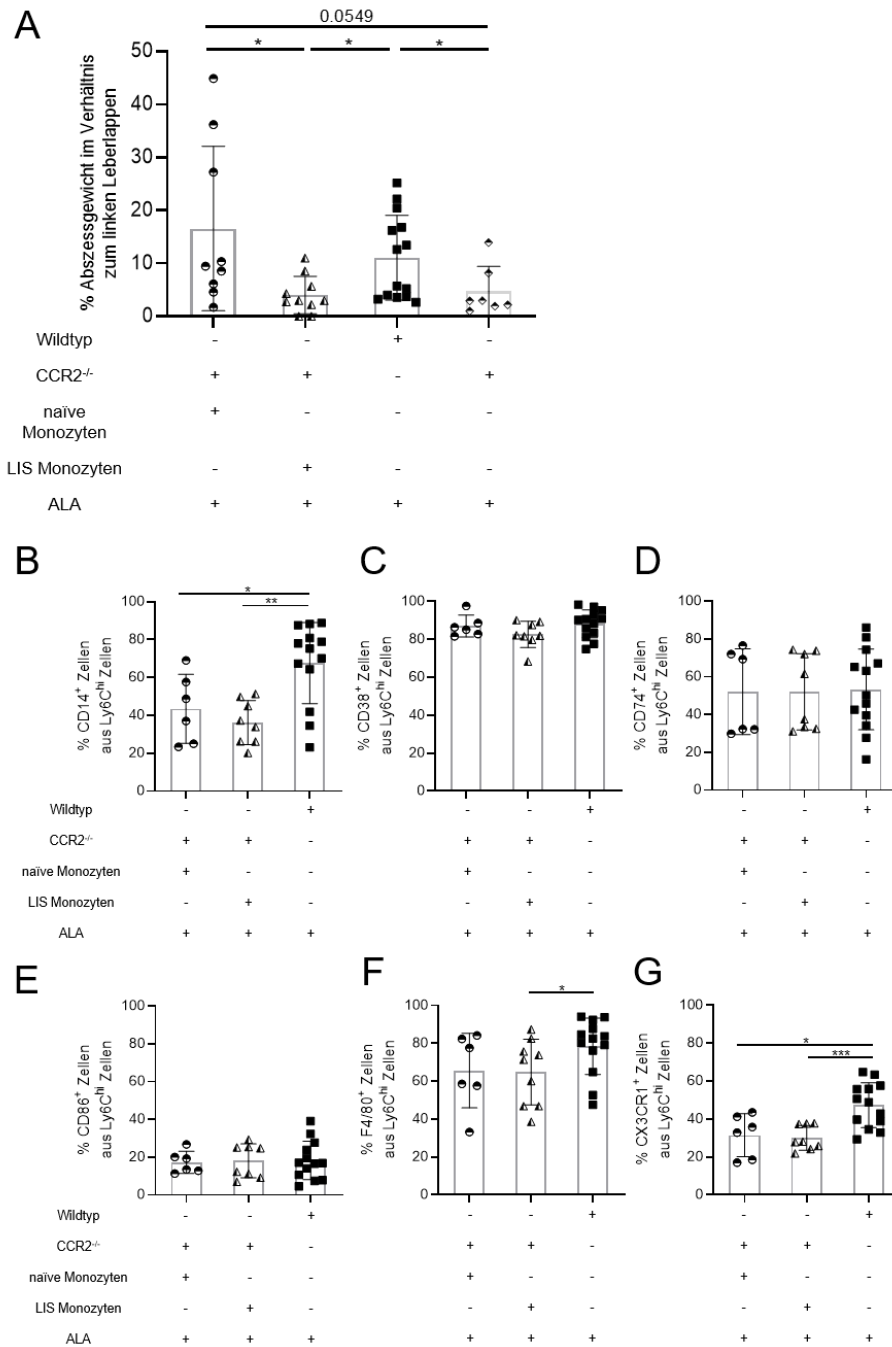


**Abbildung 28: Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten nach Infektion mit *L. monocytogenes*  $\Delta$ actA**

Männliche C57Bl/6 Wildtyp Mäuse wurden intravenös entweder mit *L. monocytogenes* EGD ( $2 \times 10^4$ ) oder mit *L. monocytogenes*  $\Delta$ actA ( $1 \times 10^7$ ) infiziert, an d3 p.i. wurden die Splenozyten isoliert und die Expression spezifischer Marker auf pro-inflammatorischen Monozyten durchflusszytometrisch analysiert; (A) Auswahlstrategie zur Bestimmung pro-inflammatorischer Monozyten (Ly6C<sup>hi</sup>); (B) prozentualer Anteil an Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten bezogen auf CD11b<sup>+</sup> Zellen; prozentualer Anteil an Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten positiv für (C) CD14, (D) CD38, (E) CD74, (F) CD86; Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}} = 10-11$ ,  $n_{\text{infiziert}} = 6-9$ ; Für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

---

Hierbei zeigte sich, dass der Anteil an Ly6C<sup>hi</sup> Zellen nach Infektion mit *L. monocytogenes*  $\Delta$ actA im Vergleich zur Infektion mit *L. monocytogenes* EGD signifikant erhöht (Abbildung 28), jedoch der Anteil an CD14<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten (Abbildung 28D) signifikant vermindert, ist. Es konnte kein Unterschied im Anteil CD38, CD74 und CD86 positiver Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten festgestellt werden (Abbildung 28D-F). Über den Ausstrich von Splenozyten *L. monocytogenes*  $\Delta$ actA infizierter Tiere auf Palcam-Selektivagar, wurde bestätigt, dass in den zu transferierenden Zellen keine vermehrungsfähigen Listerien vorhanden sind (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 29: Adoptiver Transfer pro-inflammatorischer Monozyten beeinflusst die Ausbildung des Amöbenleberabszesses**

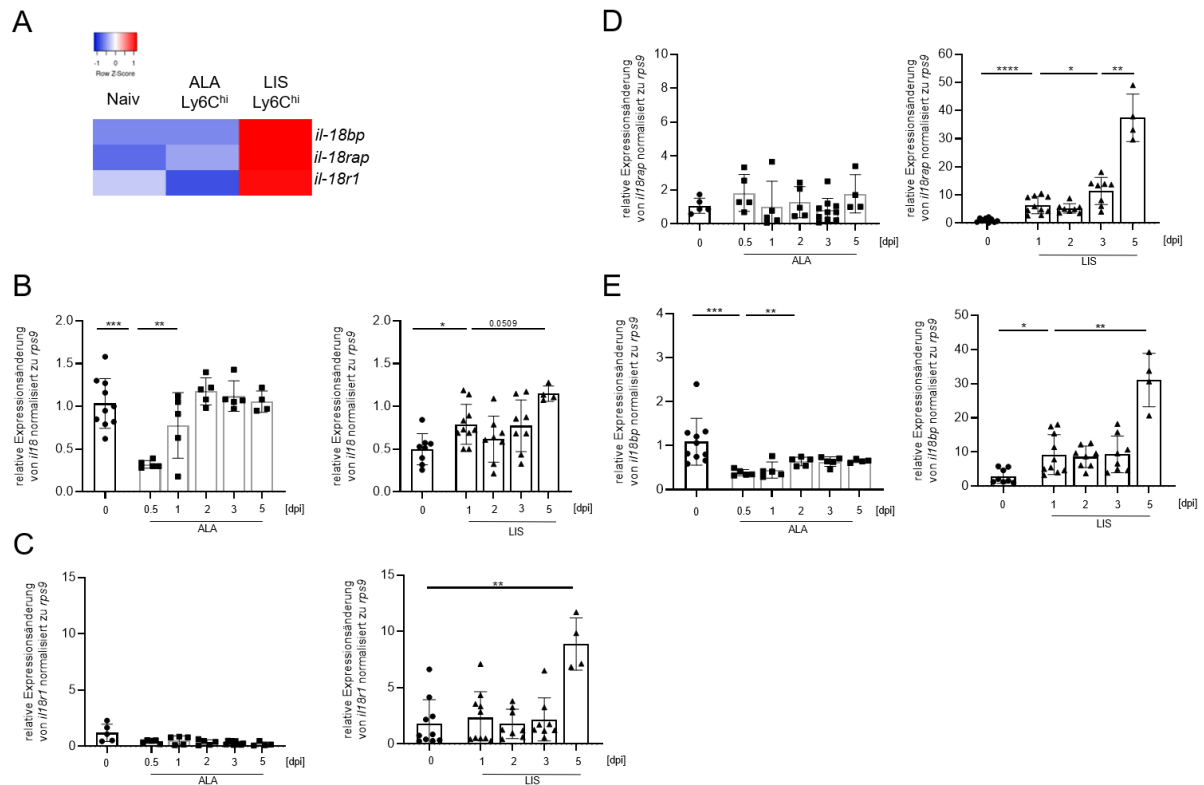
Daten wurden nach dem Schema siehe Abbildung 28 erhalten; (A) Determinierung des Abszessgewichtes als relatives Gewicht im Verhältnis zum gesamten linken Leberlappen Abszessgröße, an d3 nach dem adoptiven Transfer, in C57Bl6/J Wildtyp und CCR2<sup>-/-</sup> Tieren (mit und ohne Transfer von Monozyten), CCR2<sup>-/-</sup> mit naiven Monozyten n = 9, CCR2<sup>-/-</sup> mit LIS Monozyten n = 10, Wildtyp-Tiere ohne Transfer n = 13, CCR2<sup>-/-</sup> ohne Transfer n = 7; Analyse der prozentualen Expression von (B) CD14, (C) CD38, (D) CD74, (E) CD86 (F) F4/80 und (G) CX3CR1 an d3 p.i.; Daten sind als Median ±SD dargestellt; Transfer naive Monozyten n = 6, Transfer Monozyten aus *L. monocytogenes* infizierten Tieren n = 8, ; Wildtyp-Kontrollen ohne Transfer n = 13; für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001).

Die Analyse der Abszessbildung an Tag 3 nach adoptivem Transfer ergab, dass die Übertragung von Monozyten, aus *L. monocytogenes*  $\Delta$ actA infizierten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Abszessgröße ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren oder Rezipienten naiver Monozyten führte (siehe Abbildung 29A).

Der Anteil CD14<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten ist in Wildtyp-Tieren signifikant höher als in beiden CCR2<sup>-/-</sup> Gruppen, wobei keine Unterschiede im Hinblick auf CD38, CD74 und CD86 bestehen. Weiterhin ist der Anteil F4/80<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> sowie CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im Wildtyp signifikant höher als in den Gruppen, welche exogene Monozyten erhalten haben.

### 3.7 Einfluss des pro-inflammatorischen Zytokins IL-18 im Infektionsverlauf

Die Analyse der Transkriptomdaten der Monozyten aus beiden Infektionsmodellen ergab neben Transkriptionsfaktoren oder Oberflächenmolekülen noch viele andere Molekülgruppen, die zwischen beiden Modellen signifikant reguliert sind. Hierzu zählen Zytokine, die das Immunsystem beeinflussen. Es zeigte sich, dass sowohl die beiden Ketten des IL-18 Rezeptors (*il18r1*, *il18ap*) als auch *il18bp* während einer Infektion mit *L. monocytogenes* signifikant stärker exprimiert wird (Abbildung 30A) als im ALA-Modell. Dies gab einen Hinweis, dass die Signalübertragung des IL-18 in den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten eine wichtige Rolle spielt. Zur Überprüfung, ob das auch für die gesamte Leber zutrifft oder es sich hier um eine spezifische Reaktion der Monozyten handelt, wurde die Expression von *il18*, *il18r1*, *il18rap* sowie *il18bp* auf Total-RNA der Leber überprüft. Im Modell der Infektion mit *E. histolytica* wird einzig *il18* im sehr frühen Stadium der Infektion (12h p.i.) signifikant geringer exprimiert ( $p < 0.001$ ) als im naiven Kontrollzustand bzw. allen weiteren untersuchten Zeitpunkten. Alle weiteren untersuchten Gene sind in ihrer relativen Expression im ALA-Modell nicht signifikant verändert. *Il-18* wird im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* leicht erhöht exprimiert, zusätzlich ist an d5 p.i. signifikant mehr *il18r1* mRNA nachweisbar (Abbildung 30C). Ein ähnliches Bild ergibt sich für *il18rap* und *il18bp* die beide im Verlauf der Infektion im LIS-Modell signifikant stärker exprimiert werden als im naiven Zustand (Abbildung 30D+E).

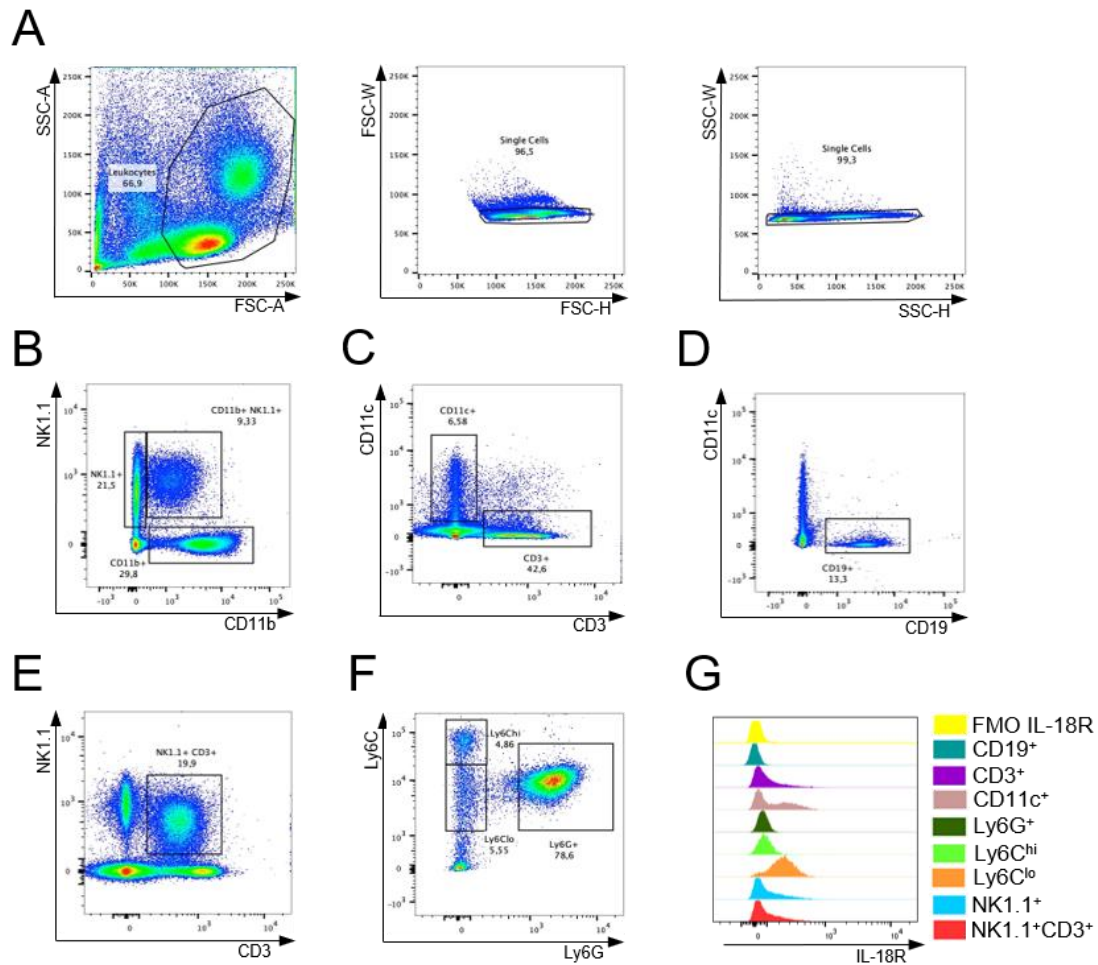


**Abbildung 30: Veränderung der relativen Expression von Genen im IL-18 Signalweg im Verlauf beider Infektionsmodelle**

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, an den indizierten Zeitpunkten wurde die RNA aus der Leber isoliert und das Expressionsniveau von *il18*, *il18r*, *il18rap* und *il18bp* analysiert; (A) Heatmap zum Vergleich der relativen Expression von *il18bp*, *il18r1* und *il18rap* in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten (Daten aus Transkriptomstudie); Auftragung der relativen Veränderung der Expression von (B) *il18*, (C) *il18r1*, (D) *il18rap* und *il18bp*; Analyse der Expression mittels qPCR, Bestimmung der relativen Veränderung der Expression (foldchange) mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Methode; Daten sind als Median  $\pm$  SEM dargestellt; repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten;  $n_{\text{naive}} = 8-10$ ,  $n_{\text{infiziert}} = 5-8$ ; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Zur Beurteilung der Korrelation zwischen Genexpression und Proteingehalt, wurde für beide Infektionsmodelle die Expression der IL-18R-Kette, welche durch *il18r1* codiert wird, auf verschiedenen Immunzellen untersucht.





**Abbildung 31: Auswahlstrategie zur Bestimmung möglicher Zielzellen von IL-18 im Verlauf beider Infektionsmodelle**

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, zu definierten Zeitpunkten die Milz entnommen und die Expression von IL-18R durchflusszytometrisch analysiert; (A) Eingrenzung auf Leukozyten und Einzellzellen; Definition der (B) NK-Zellen ( $\text{NK1.1}^+$ ,  $\text{NK1.1}^+ \text{CD11b}^+$ ) und myeloiden Zellen ( $\text{NK1.1}^- \text{CD11b}^+$ ), der (C) Dendritischen Zellen ( $\text{CD11c}^+$ ) und der T-Zellen ( $\text{CD3}^+$ ), der (D) B-Zellen ( $\text{CD19}^+$ ), (E) der  $\text{NK1.1}^+ \text{CD3}^+$  Zellen (NKT-Zellen) aus Einzelzellen sowie (F) Definition von Monozyten ( $\text{Ly6C}^{\text{hi/lo}} \text{Ly6G}^-$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $\text{Ly6C}^{\text{int}} \text{Ly6G}^+$ ) aus den  $\text{NK1.1}^- \text{CD11b}^+$  Zellen, (G) Histogramm der Färbung von IL-18R auf den angegebenen Zelltypen.

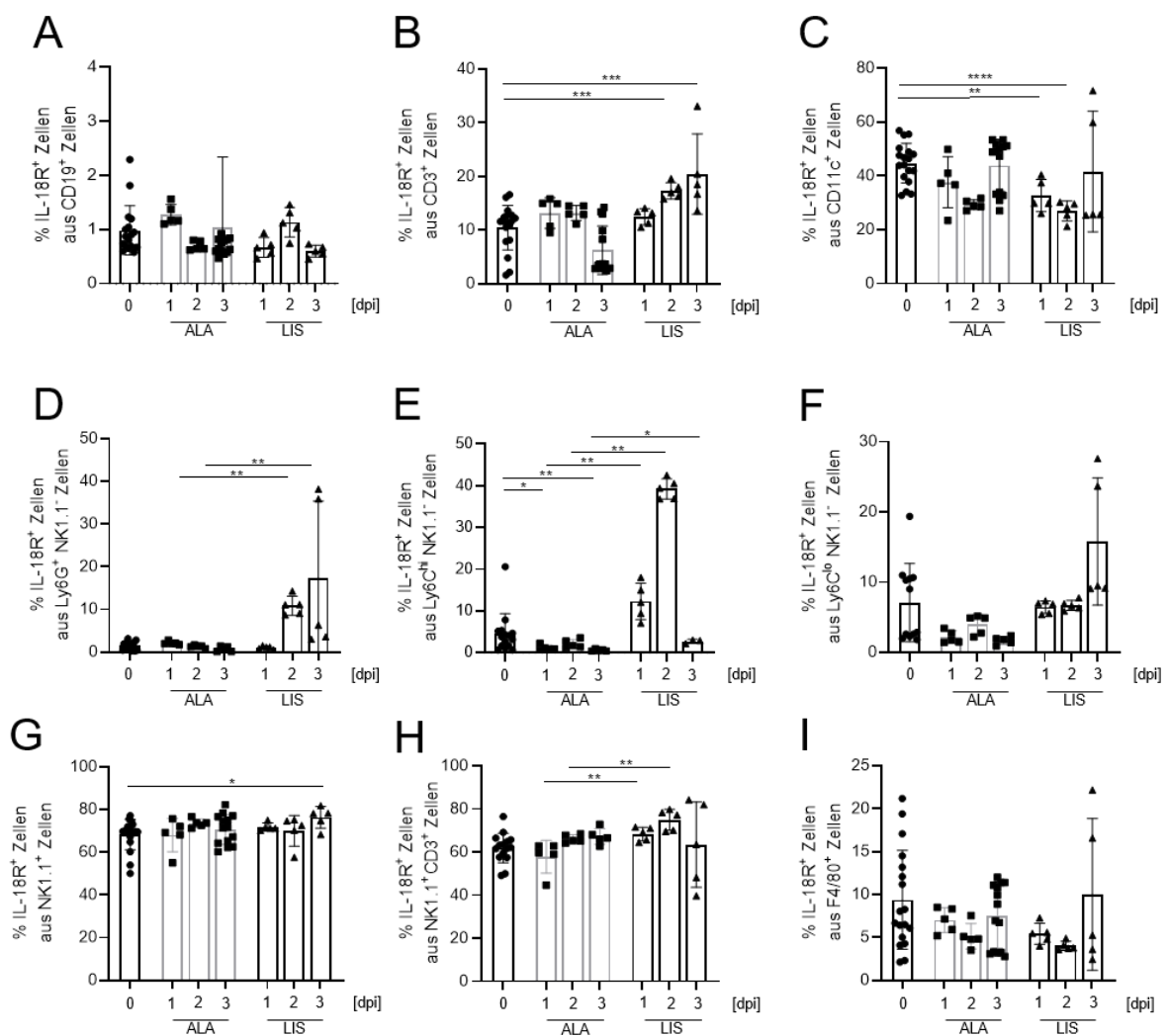
Die für diesen Versuchsteil genutzte Klassifizierung ist in nachstehender Tabelle 18 zusammengefasst.

**Tabelle 18: Beschreibung der untersuchten Zellpopulationen zur Analyse zellulärer Ziele für IL-18**

Zellpopulation	Oberflächenmarker zur Selektion
T-Zellen	CD3 <sup>+</sup>
B-Zellen	CD19 <sup>+</sup>
NK-Zellen	NK1.1 <sup>+</sup> / NK1.1 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>
NKT-Zellen	NK1.1 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>
Dendritische Zellen	CD11c <sup>+</sup>
Pro-inflammatorische Monozyten	CD11b <sup>+</sup> Ly6C <sup>hi</sup> Ly6G <sup>-</sup>
Anti-inflammatorische Monozyten	CD11b <sup>+</sup> Ly6C <sup>lo</sup> Ly6G <sup>-</sup>
Neutrophile Granulozyten	CD11b <sup>+</sup> Ly6C <sup>int</sup> Ly6G <sup>+</sup>
Makrophagen	F4/80 <sup>+</sup>

Die detaillierte Betrachtung der Expression von IL-18R auf den untersuchten Zelltypen ergab eine signifikante Zunahme auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen ( $p < 0.001$ ) zu d2 und d3 p.i. im LIS-Modell im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren. Auf Dendritischen Zellen (CD11c<sup>+</sup>) hingegen ist eine signifikante Abnahme des Anteils IL-18R<sup>+</sup> Zellen zu den Zeitpunkten d1 und d2 p.i. auszumachen. Die Infektion mit *E. histolytica* beeinflusst die Expression auf diesen Zelltypen nicht. Alle drei untersuchten myeloiden Zelltypen (CD11b<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup>) weisen einen starken Anstieg des Anteils an IL-18R<sup>+</sup> positiven Zellen auf. Für neutrophile Granulozyten (Abbildung 32D) ist ein signifikanter Anstieg an d2 und d3 p.i. im LIS Modell, verglichen mit dem ALA Modell, auszumachen. Der Anteil an Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten die IL-18R<sup>+</sup> sind, ist hingegen an d1 und d2 p.i. signifikant erhöht ( $p < 0.01$ ) und sinkt an d3 p.i. wieder ab (Abbildung 32E). Ein Anstieg des Anteils an IL-18R<sup>+</sup> anti-inflammatorischen Monozyten zeigt sich im LIS-Modell an d3 pi. im Vergleich zum ALA-Modell (Abbildung 32F). Sowohl für Monozyten als auch für neutrophile Granulozyten ist keine Änderung im Verlauf der Infektion mit *E. histolytica* zu erkennen. Das Expressionsmuster auf NK-Zellen (NK1.1<sup>+</sup>) ergibt kein klares Bild, auch wenn eine leicht signifikante Steigerung des Anteils an IL-18R<sup>+</sup> NK-Zellen im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* zu erkennen ist (Abbildung 32G). Zu den Zeitpunkten d1 und d2 p.i. exprimieren im LIS-Modell die NKT-Zellen (NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) signifikant mehr IL-18R als im ALA-Modell. Auch

im Verlauf der Infektion mit *E. histolytica* ist eine Tendenz zu leicht erhöhten Anteilen im Vergleich zum naiven Kontrollzeitpunkt zu erkennen, diese ist jedoch nicht signifikant. Der Anteil an IL-18R<sup>+</sup> Zellen liegt mit ca. 60 % bei den NK-Zellen und den NKT-Zellen im Vergleich zu allen untersuchten Immunzellpopulationen am höchsten. Eine eindeutige Aussage über die Expression auf F4/80<sup>+</sup> Zellen ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich (Abbildung 32I)

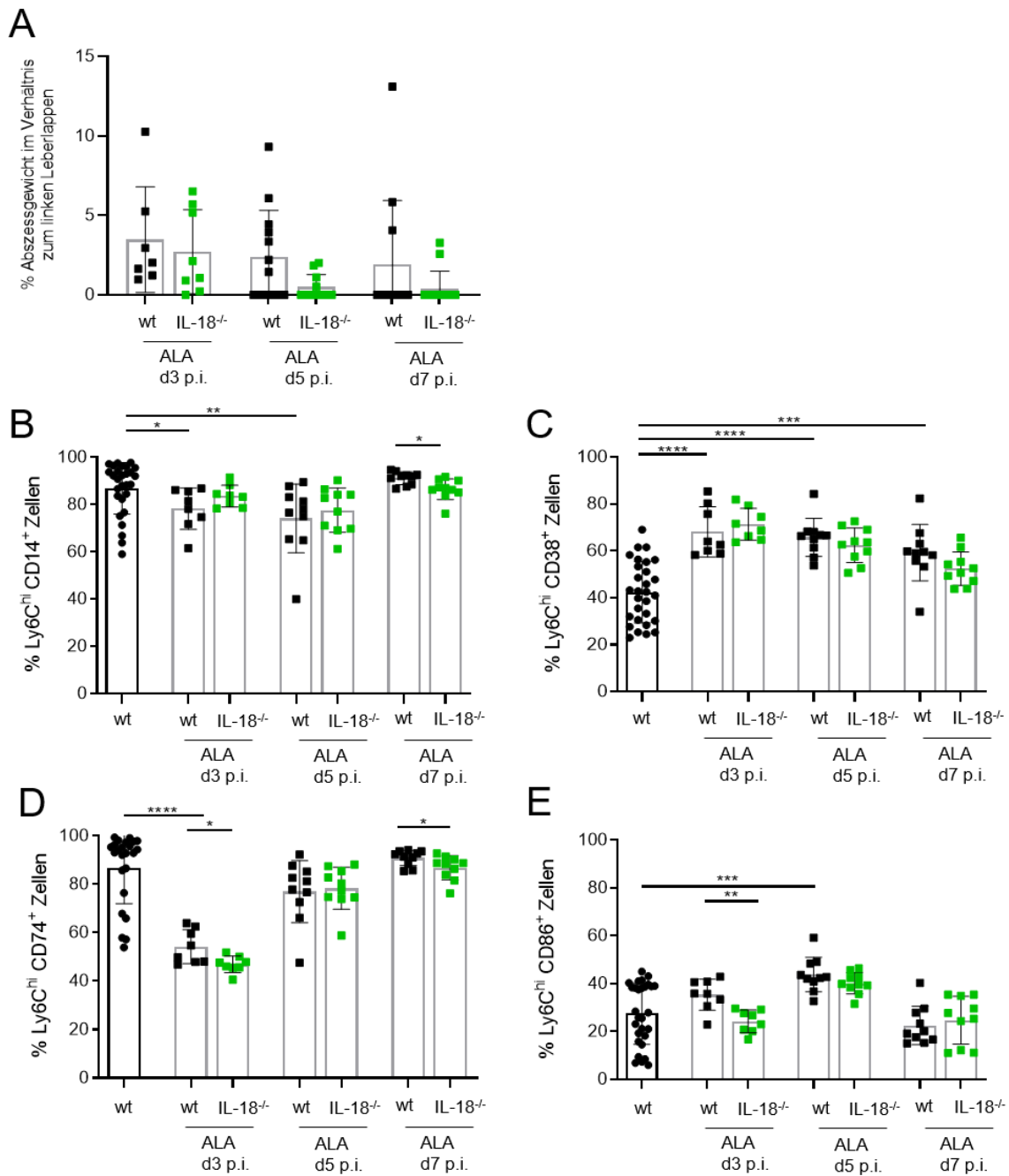


**Abbildung 32: Expression von IL-18R auf verschiedenen Immunzellen im Verlaufe beider Infektionsmodelle**

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, an den indizierten Zeitpunkten wurden die Splenozyten isoliert und die Expression von IL-18R durchflusszytometrisch analysiert; Auftragung der IL-18R Expression der folgenden Zelltypen (A) B-Zellen (CD19<sup>+</sup>); (B) T-Zellen (CD3<sup>+</sup>); (C) Dendritische Zellen (CD11c<sup>+</sup>); (D) neutrophile Granulozyten (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>); (E) pro-inflammatorische Monozyten (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup>); (F) anti-inflammatorische Monozyten (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>lo</sup> Ly6G<sup>-</sup>); (G) NK-Zellen (NK1.1<sup>+</sup>); (H) NKT-Zellen (NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>); (I) Makrophagen (F4/80<sup>+</sup>); Daten sind als Median ± SD dargestellt;  $n_{naive} = 18$ ,  $n_{infiziert} = 5-14$ ; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

---

Es zeigt sich, dass Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten sowie neutrophile Granulozyten im Verlauf einer Infektion mit *L. monocytogenes* verstärkt IL-18R exprimieren. Im ALA-Modell sind nur tendenziell erhöhte Expressionen auf NK-Zellen und NKT-Zellen auszumachen. Im Weiteren wurde der Einfluss des genetischen Knock-outs von IL-18 auf die Abszessgröße und die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im ALA-Modell untersucht.



**Abbildung 33: Einfluss des Knock-out von IL-18 auf die Infektion mit *E. histolytica***

Männliche C57Bl/6 Wildtyp Mäuse und männliche IL-18<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intrahepatisch mit *E. histolytica* ( $2 \times 10^5$ ) infiziert, zu den indizierten Zeitpunkten wurde das Abszessgewicht determiniert sowie die Expression spezifischer Oberflächenmarker auf Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus der Leber durchflusszytometrisch analysiert; (A) Determinierung des Abszessgewichtes als relatives Gewicht im Verhältnis zum gesamten linken Leberlappen Abszessgröße an d3, d5 und d7 p.i. von C57Bl/6/J Wildtyp und IL-18<sup>-/-</sup> Tieren; Analyse der prozentualen Expression von B) CD14, (C) CD38, (D) CD74, (E) CD86 an d3, d5 und d7 p.i.; Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}} = 29$ ;  $n_{\text{infiziert}} = 8-10$ ; für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) bestimmt (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

---

Auf die Entwicklung der Abszessgröße im Verlauf der Infektion mit *E. histolytica* hat der IL-18<sup>-/-</sup> keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 27A). Es besteht lediglich die leichte Tendenz hin zu einer schnelleren Ausheilung und somit kleineren Abszessen an d5 p.i. (p=0.1321) im IL-18<sup>-/-</sup>. Weiterhin bestehen kaum signifikante Unterschiede in der Expression der untersuchten Oberflächenmarker. Es ist an d3 p.i. eine etwas verminderte Expression von CD74 und CD86 im IL-18<sup>-/-</sup> zu erkennen (siehe Abbildung 33D+E) sowie eine leicht geringere Expression von CD74 an d7 p.i.

## 4 Diskussion

Die Infektion mit *L. monocytogenes* als auch die Infektion mit *E. histolytica* kann sich hepatisch manifestieren. Die hepatische Manifestation der Listeriose führt zur Ausbildung von Granulomen, wohingegen die hepatische Amöbiasis in der Ausbildung eines großen singulären Abszesses resultiert. In beiden Infektionen spielen Monozyten, bezüglich der Kontrolle des Infektionsverlaufes (Listeriose) bzw. der Ausbildung einer Immunpathologie (ALA), eine entscheidende Rolle.

Monozyten sind als Zellen des angeborenen Immunsystems, besonders im frühen Stadium einer Infektion, essentiell bei der Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen. Sie werden nach ihren Eigenschaften und produzierten Effektormolekülen in anti- (Ly6C<sup>lo</sup>) und pro-inflammatorische (Ly6C<sup>hi</sup>) Monozyten unterteilt. Besonders die Arbeiten von Weinreb et al. (15), Mildner et al. (10), Yona et al. (74) oder Giladi et al. (203) weisen auf eine höhere Diversität in der Entwicklung von Monozyten hin. Auf der Basis von Einzelzellsequenzierung wurden neue Subtypen von Monozyten wie Neutrophilen-ähnliche Monozyten (nMO) oder Dendritische Zellen-ähnliche Monozyten (dcMO) identifiziert, auch wenn diese Untersuchungen bisher nur in der Homöostase durchgeführt wurden. Weiterhin sind aus diesen Arbeiten vor allem Transkriptionsfaktoren oder andere intrazelluläre Proteine hervorgegangen, weshalb die Charakterisierung der Oberfläche von Monozyten auf die bisher üblichen Marker beschränkt ist.

Besonders wichtige Moleküle zur Unterscheidung der Monozyten Populationen sind hierbei CCR2 auf pro-inflammatorischen Monozyten sowie die unterschiedliche Expression von Ly6C auf beiden Populationen (14).

Im Hinblick auf die beiden untersuchten Infektionsmodelle konnte gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Monozyten im Modell der Listeriose eine protektive Funktion erfüllen, wohingegen sie im Modell des Amöbenleberabszesses an der Ausbildung des Abszesses beteiligt sind und somit zur Immunpathologie beitragen (104, 194). Auch in anderen Erkrankungen, wie rheumatischer Arthritis, trägt fehlende Kontrolle der Monozyten zur Immunpathologie bei (204–206).

#### 4.1 Unterschiedliche Entwicklungen pro-inflammatorischer Monozyten zwischen beiden Modellen

Auf Grundlage der gegensätzlichen Einflüsse von Monozyten im Kontext beider Infektionsmodelle wurden die Unterschiede in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Modellen genauer untersucht.

Dazu wurde die mRNA der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Infektionsmodellen an zwei Zeitpunkten sequenziert. Es wurden Tag 3 und Tag 5 nach Infektion ausgewählt, da d3 p.i. den Höhepunkt der angeborenen Immunantwort in der Listeriose darstellt und der Amöbenleberabszess die Maximalgröße erreicht. Mit Tag 5 nach Infektion beginnt im ALA-Modell die Regenerationsphase und die Aktivität der angeborenen Immunantwort im LIS-Modell nimmt ab.

Die durchflusszytometrischen Daten verdeutlichen einen massiven Einstrom von CD11b<sup>+</sup> Zellen und insbesondere Monozyten im Verlauf des LIS-Modells im Vergleich zum ALA-Modell (siehe Abbildung 14). Es zeigte sich jedoch, dass, obwohl zu den jeweiligen Zeitpunkten dieselben Zellen isoliert und die mRNA aus diesen sequenziert wurde, die zellulären Prozesse der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten einerseits pro-inflammatorisch (LIS) und andererseits anti-inflammatorisch (ALA) sind. Diese großen Unterschiede konnten beispielsweise mittels PCA visualisiert werden (siehe Abbildung 15). Die isolierten pro- als auch anti-inflammatorischen Monozyten aus dem Listerien Modell weisen große Unterschiede im Vergleich zum ALA-Modell auf. Die Monozyten aus dem ALA sind hingegen denen aus den naiven Tieren recht ähnlich. Der Vergleich ergab 5486 Gene, die in den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem LIS-Modell, im Vergleich zum ALA-Modell, signifikant reguliert sind (siehe Abbildung 15).

Die transkriptionellen Unterschiede zwischen den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus beiden Modellen wurden besonders anhand von Transkriptionsfaktoren sowie Genen, die für Oberflächenproteine codieren, oder Genen, die die Entwicklung von Monozyten beeinflussen, verdeutlicht.

Die Analyse der Transkriptionsfaktoren ergab, dass im LIS-Modell verstärkt jene transkribiert werden, die für eine IFN $\gamma$  getriebene pro-inflammatorische Reaktion und Entwicklung der Zellen in einen pro-inflammatorischen M1 Phänotyp typisch ist (siehe Abbildung 17). Hierzu zählen zum Beispiel *irf1*, *irf2*, *ifi204* und *battf2*. Sowohl *irf1* als auch *irf2* sind Teil der IFN $\gamma$ -Signalkaskade und essentiell für die Bekämpfung von *L. monocytogenes* (207) oder anderen intrazellulären Pathogenen, wie *Brucella* spp.



(208). Sowohl die Funktion von TLR4 als auch die Entwicklung myeloider Zellen ist abhängig von der Expression von *ifi204* (209, 210). Die Expression von *batf2* wird ebenfalls durch IFN $\gamma$  induziert. Zusammen mit *irf1* bildet es einen Komplex und reguliert die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen z. B. nach einer Stimulation mit LPS oder IFN $\gamma$  (211) sowie einer mykobakteriellen Infektion (212). Dies geschieht unter anderem, indem der Komplex *irf1/batf2* direkt die Expression wichtiger Zytokine wie TNF oder IL-12 beeinflusst (212).

Im Gegensatz dazu sind im Modell des Amöbenleberabszesses vor allem Transkriptionsfaktoren verstärkt exprimiert, die für eine anti-inflammatorische Entwicklung typisch sind. Hierzu zählen unter anderem *hes1* (213, 214), *mafB* (215, 216) oder *tsc22d3* (217). Neben dem absoluten Unterschied in der Transkription sind auch im Zeitverlauf der Infektionen gegenläufige Entwicklungen zu erkennen (siehe Abbildung 17).

Aufgrund der schon angesprochenen Aktivierung der Monozyten sind alle untersuchten Gene, die für einen Übergang von Ly6C<sup>hi</sup> zu Ly6C<sup>lo</sup> verantwortlich sind wie z.B. *nr4a1* (218, 219), in Monozyten des LIS-Modells signifikant geringer exprimiert als im ALA-Modell (siehe Abbildung 18). Vielmehr ist deutlich erkennbar, dass fast alle untersuchten Gene, die für die Entwicklung hin zu *saa3<sup>+</sup>/cxcl10<sup>+</sup>* oder neutrophil-ähnlichen Monozyten wichtig sind, im Verlauf einer Infektion mit *L. monocytogenes* signifikant stärker exprimiert werden. Ein geteiltes Bild ist für Gene ersichtlich, die die Entwicklung von DCMo beeinflussen. So sind z.B. *h2k1*, *h2eb1* oder *cd74* stärker im LIS-Modell exprimiert, wohingegen *flt3* oder *pid1* im ALA-Modell verstärkt transkribiert werden. Auf Grundlage der vorhandenen Daten ist davon auszugehen, dass, im Unterschied zur Infektion mit *E. histolytica*, eine Infektion mit *L. monocytogenes* die Entwicklung mehrerer Monozytenpopulationen wie nMO und dcMO (4, 15) oder *cxcl10<sup>+</sup>* Monozyten (203), unterstützt. Die verstärkte Entwicklung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in nMo wurde bisher nur unter LPS-Stimulation nachgewiesen (16), wobei die Induktion durch die Infektion mit gram-positiven *L. monocytogenes* in dieser Arbeit das erste Mal gezeigt werden konnte.

Im ALA-Modell scheint, auf Grundlage der vorliegenden Daten, keine eindeutige Entwicklung in einen der bisher beschriebenen neuen Subtypen von Monozyten abzulaufen. Die Monozyten aus dem ALA-Modell sind denen aus den naiven Tieren sehr ähnlich und zeigen, trotz des pro-inflammatorischen Charakters der hepatischen Infektion mit *E. histolytica*, einen anti-inflammatorischen Zustand anstatt ebenfalls

aktiviert zu sein. Dies könnte mit der Wirkung der Amöben-assoziierten immunsupprimierenden Moleküle wie MLIF erklärt werden.

Der nächste Schritt zu einer tiefergehenden Analyse der zellulären Entwicklung und differenzierten Betrachtung der neuen Subtypen pro-inflammatorischer Monozyten wäre die Einzelzellsequenzierung aus beiden Infektionsmodellen. Weiterhin wäre die CiteSeq-Methode geeignet, um eine direkte Korrelation zwischen dem Transkriptom und den Oberflächenproteinen der Zellen herzustellen.

#### **4.2 Unterschiede im Zytokinmilieu und der Immunhistologie im Verlauf beider Infektionen**

Die Infektion mit *L. monocytogenes* induziert eine klassische pro-inflammatorische Antwort, die durch eine hohe Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$  charakterisiert ist (220). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden (siehe Abbildung 12), da im Verlauf der Listerieninfektion die Konzentration von IFN $\gamma$  signifikant ansteigt. Dies ist vor allem zu den frühen untersuchten Zeitpunkten signifikant stärker als im ALA-Modell. Weiterhin ist ein sehr starker Anstieg der CCL2 Konzentrationen im Listerien-Modell zu erkennen, was im ALA-Modell deutlich weniger ausgeprägt ist. Die Infektion mit *L. monocytogenes* resultiert in einer systemischen Infektion, die u.a. zur Folge hat, dass in der gesamten Leber Infektionsherde entstehen und Monozyten einströmen. Im Gegensatz dazu ist die Ausbildung eines Amöbenleberabszesses auf den infizierten Leberlappen und auch da nur auf einen recht kleinen Teil dessen begrenzt. Im ALA-Modell wird, im Vergleich zur Listeriose, mehr IL-10 exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 der Überreaktion des Immunsystems entgegenwirkt, die durch *E. histolytica* selbst ausgelöst wird (221). Durch die Produktion und Sekretion von Prostagrandin-E2 und einem Homolog des Monozyten Migration Inhibitorischen Faktors (*EhMIF*) wird ein pro-inflammatorisches Milieu erzeugt, was besonders Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten verstärkt aktiviert (222–224). Damit wird die Immunpathologie größtenteils bedingt, die die Ausbildung der Leberschädigung unterstützt (182). Gleichzeitig werden von *E. histolytica* zelltoxische Moleküle wie porenbildende Peptide (Amöbapore) oder Cysteinpeptidasen sekretiert, die einströmende Immunzellen abtöten oder lysieren und somit einen Schutz gegen den direkten Angriff auf die Trophozoiten bilden können (225–227). Die Arbeit von

Hellberg et al. (226) zeigte, dass die Überexpression der Cysteinpeptidase 2 (CP2) in *E. histolytica* zur Steigerung der lytischen Aktivität führt. Amöbapore-Proteine hingegen können eukaryotische oder prokaryotische Zellen direkt lysieren (227). Die geringen Konzentrationen von IFN $\gamma$  im frühen Stadium der Infektion mit *E. histolytica* und die dennoch offensichtlich ablaufende Immunpathologie weisen jedoch auf einen starken Effekt dieser Moleküle hin. Dieser pro-inflammatorischen Kaskade wird mit körpereigenem IL-10 gegenreguliert, um eine überschießende Immunreaktion einzudämmen. Allerdings sekretiert *E. histolytica* auch selbst einen Faktor, Monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF), der die Mobilität von Immunzellen beeinflusst und die Produktion von IL-10 induzieren kann (228). Die vielfältige Beeinflussung des Immunsystems stellt eine Überlebensstrategie von *E. histolytica* dar (192).

Eine Depletion von Monozyten durch Antikörper als auch die Depletion von Kupffer-Zellen mittels Clodronat führt zur Verringerung des Abszessvolumens (194). Zusätzlich bilden CCR2<sup>-/-</sup> Tiere, in denen die Rekrutierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem Knochenmark und die Migration in infiziertes Gewebe inhibiert ist, signifikant kleinere Abszesse als Wildtyp-Tiere. Dies hebt die Bedeutung der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten und Kupffer-Zellen für Entstehung des ALA hervor.

In der Listeriose sind die Monozyten hingegen für die Beseitigung der Pathogene sowie das Präsentieren der Antigene gegenüber T-Zellen verantwortlich und somit protektiv. Dies wird durch die höhere Bakterienlast in CCR2<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verdeutlicht (104). Diese Unterschiede zwischen beiden Modellen sind auch in der Immunhistologie deutlich erkennbar. In der hepatischen Amöbiasis bildet sich der Abszess aus Zellen, die eine ring-ähnliche Struktur um die Zone lysierter Zellen bilden (siehe Abbildung 13A). In diesem scharf abgegrenzten Bereich, welcher die lysierten Zellen umschließt, sind deutlich mehr CD11b<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> Zellen vorhanden als distal vom Abszess. Die Monozyten, welche CD11b<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> sind, sind an der Bildung der umschließenden Zellschicht beteiligt. Im Zentrum des Abszesses hingegen sind sehr viele CD11b<sup>+</sup> Zellen vorhanden, die jedoch nur in geringem Maße Ly6C<sup>+</sup> sind (siehe Abbildung 13A), wobei es sich vermutlich entweder um neutrophile Granulozyten oder abgestorbene Monozyten handelt. Im ALA-Modell dringen die Monozyten nicht in den Abszess ein und tragen zur Bekämpfung der Amöben bei, sondern sie sind an der Ausbildung der umschließenden Gewebsschichten beteiligt.

Während einer Infektion mit *L. monocytogenes* bilden sich in der Leber Granulome. Diese sind jedoch homogen über die Leber verteilt und weniger scharf abgegrenzt als der Amöbenleberabszess (siehe Abbildung 10B). Die Monozyten verteilen sich einerseits gleichmäßig in der infizierten Leber, andererseits wandern sie direkt in die Granulome ein und bilden keine ringähnlichen Strukturen. Im LIS-Modell migrieren Monozyten in die Granulome und bekämpfen die Bakterien ohne an der Bildung der Mikroabszesse beteiligt zu sein.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch an d3 p.i. noch intakte *E. histolytica* Trophozoiten innerhalb des Abszesses vorliegen (siehe Abbildung 13D). Der anti-inflammatorische Zustand, den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im Modell der hepatischen Amöbiasis entwickeln, resultiert demnach nicht aus der vollständigen Beseitigung des Pathogens aus der Leber. Dies unterstreicht, dass die *E. histolytica* Trophozoiten für die Beeinflussung der Monozyten verantwortlich sind.

#### **4.3 Transkriptionelle und durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf pro-inflammatorischen Monozyten**

Die Untersuchung von Genen, die für Oberflächenmoleküle codieren, ergab, dass auch hier große Unterschiede zwischen beiden Infektionsmodellen vorhanden sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression als auch die Proteinexpression von vier Markern untersucht, die im Verlauf der Infektionen spezifisch reguliert werden. Hierbei handelt es sich um *cd14*, *cd38*, *cd74* und *cd86* bzw. die entsprechenden Proteine. Von diesen untersuchten wird *cd14* als einziges Gen verstärkt in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im ALA-Modell exprimiert (siehe Abbildung 19). Die Expression von CD14 an der Oberfläche der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten ist zwar in einem sehr frühen Stadium der Infektion mit *E. histolytica* signifikant niedriger als im LIS-Modell, steigt im Verlauf der Infektion jedoch an und ist an d1, d2 und d3 p.i. signifikant höher (siehe Abbildung 20), während sich der Anteil an CD14<sup>+</sup> Zellen an d1, d2 und d3 p.i. in der Infektion mit *L. monocytogenes* verringert.

Die Erkennung eines wichtigen Oberflächenmoleküls von *E. histolytica*, dem Lipopeptidophosphoglycan (LPPG), wird über TLR2 und TLR4 (221, 229) vermittelt. Die erhöhte Expression von CD14 auf Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im ALA-Modell könnte der Erkennung von LPPG dienen, da CD14 als Co-Rezeptor für TLR4 dient. Es konnte jedoch, auf Ebene des Transkriptom der Monozyten aus dem ALA-Modell, keine

erhöhte Expression von TLR4 gezeigt werden. Zwar ist CD14 in besonderem Maße für die Bindung von LPS und anschließendem Transfer auf den TLR4/MD-2 complex zuständig (230), jedoch ist auch die Erkennung vieler anderer Pathogen-assoziiertes molekulare Muster (PAMP) wie Lipoteichonsäure oder Peptidoglycan von CD14 abhängig (107). Zusätzlich zu membrangebundenem CD14 wird vor allem von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten auch lösliches CD14 (sCD14) sekretiert (115). Dieses bindet ebenfalls verschiedene PAMPs, jedoch ist die Weiterleitung eines Signals an die Zielzellen abhängig vom gebundenen Molekül (231). Der verminderte Anteil an CD14<sup>+</sup> Zellen im Verlauf des LIS-Modell könnte auf das Abtrennen von der Oberfläche (Shedding) zurückzuführen sein. Dieser Mechanismus wurde sowohl für LPS-stimulierte Makrophagen als auch für Monozyten während der Differenzierung beschrieben, womit die pro-inflammatorische Antwort der Zellen blockiert wird (114, 232, 233). Dies könnte demnach als regulierender Mechanismus bezeichnet werden, welcher im ALA-Modell nur einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion auftritt.

Das Gen *cd38* wird in den Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem LIS-Modell signifikant stärker exprimiert als in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem ALA-Modell. Auf Proteinebene ist zu allen untersuchten Zeitpunkten ein erhöhter Anteil an CD38<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im ALA-Modell, im Vergleich zu Monozyten aus naiven Tieren, auszumachen. Dieser Anteil sinkt ab d1 p.i. jedoch ab, während er im LIS-Modell bis d2 p.i. ansteigt und dann auf hohem Niveau verbleibt. CD38 dient als Aktivierungsmarker bzw. pro-inflammatorischer Marker für viele Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen (234) oder Monozyten (235, 236). Eine wichtige Funktion des Ektoenzym CD38 ist die Synthese von zyklischer und nicht-zyklischer ADP-Ribose aus extrazellulären NAD<sup>+</sup> (237). Weiterhin steht CD38 in Verbindung mit der Signaltransduktion, Zelldifferenzierung sowie der Zytokinproduktion (238–240). Die verstärkte Expression von CD38 in beiden Infektionsmodellen kann demnach vielfältige Auswirkungen auf die Monozyten haben. Die besondere Bedeutung von CD38 in Hinblick auf die Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit *Mycobacterium avium* (140), *Streptococcus pneumoniae* (129), *L. monocytogenes* (200) und auch *E. histolytica* (201) konnte bereits in Tiermodellen gezeigt werden. Insbesondere bei Infektionen mit *L. monocytogenes* im CD38<sup>-/-</sup> sind unter anderem eine geringere Phagozytoseaktivität von Makrophagen (241) und ein verändertes Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten und pro-inflammatorischen Makrophagen (242) zu

beobachten ist. Es ist jedoch kein Einfluss auf die T-Zell vermittelte Immunantwort im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* zu erkennen (200). Der CD38<sup>-/-</sup> führt, in der hepatischen Amöbiasis, zu geringeren Leberschädigungen zu frühen Zeitpunkten (6 h und 12 h p.i.), jedoch ist der Leberschaden zu späteren Zeitpunkten (48 h und 72 h p.i.) signifikant höher als in Wildtyp Kontrollen (201). Weiterhin findet das Einströmen der neutrophilen Granulozyten in das infizierte Lebergewebe durch den CD38<sup>-/-</sup> am stärksten zum Zeitpunkt 48 h p.i. statt, wohingegen im Wildtyp dies bei 6 h p.i. der Fall ist (201). Im Gegensatz zur Arbeit von Estrada-Figueroa (201), in der der CD38<sup>-/-</sup> zu einer Vergrößerung des Abszesses an d3 p.i. führt, ergab die Untersuchung des CD38<sup>-/-</sup> im Rahmen dieser Arbeit das Gegenteil. Für diese gegensätzlichen Ergebnisse gibt es verschiedene Gründe. Vermutlich am bedeutsamsten ist die Nutzung unterschiedlicher *E. histolytica* Klone zur Induktion des ALA. In der Arbeit von Estrada-Figueroa et al. (201) wurde zwar ebenfalls das Isolat HM1/IMSS genutzt, jedoch im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, in der immer der hochpathogene Klon B2-5 verwendet wurde, kein spezifischer Klon. Weiterhin ist in der Arbeit von Estrada-Figueroa die Zusammensetzung des Medium anders und es wurden mehr Amöben bei jüngeren Tieren injiziert. Die geringere Abszessgröße im CD38<sup>-/-</sup> im Rahmen der vorliegenden Arbeit geht einher mit einer höheren Produktion von ROS (siehe Abbildung 23). Eine höhere Produktion von ROS, welches verstärkt zum Abtöten von extrazellulären Erregern eingesetzt werden kann und gleichzeitig eine schwächere Aktivierung von Monozyten aufgrund des CD38<sup>-/-</sup> ,könnte die Ursache für die signifikant kleineren Abszesse sein. Die Ausbildung des ALA ist, wie schon angesprochen, zu großen Teilen nicht vom Pathogen vermittelt sondern im Zuge einer Immunpathologie von Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Eine geringere Aktivierung dieser Zellen würde zwar auch die Bekämpfung der Amöben beeinflussen, jedoch konnte bisher keine direkte Korrelation zwischen Amöbenanzahl und Abszessgröße festgestellt werden. Diese Hypothese wird durch mehrere Publikationen unterstützt die CD38 in Zusammenhang mit einer Verschlimmerung von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatischer Arthritis (243, 244) systemischer Lupus erythematodes (235) oder entzündlichen Darmerkrankungen (245) setzt.

Die Expression von *cd74* ist auf transkriptioneller Ebene, im Vergleich zum naiven Zustand, im LIS-Modell leicht erhöht, wohingegen kein Unterschied im ALA-Modell zu

erkennen ist (siehe Abbildung 19). Die Expression des Proteins auf der Oberfläche der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten zeigt keine konsistente Veränderung im Verlauf beider Infektionen.

Auf transkriptioneller Ebene (siehe Abbildung 19) ist nur eine geringe Veränderung der Expression von *cd86* zuerkennen. Aus Abbildung 20 ist jedoch ersichtlich, dass im LIS-Modell, aber auch im ALA-Modell, signifikant mehr CD86 auf Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten nachgewiesen werden konnte. Als ko-stimulatorisches Molekül kann CD86 über die Bindung an CD28 einen aktivierenden Einfluss auf T-Zellen ausüben und gilt deshalb auch als klassischer Marker pro-inflammatorischer Makrophagen und Monozyten (159), 245). Der Anstieg der Expression im Verlauf beider Infektionsmodelle erscheint in diesem Zusammenhang schlüssig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht genauer analysiert werden, ob CD86 im Kontext der beiden Infektionen stimulierend auf T-Zellen wirkt. Die Arbeit von Pinto et al. zeigte, dass asymptomatische Chagas-Patienten, höhere Expressionen von CD86 auf Monozyten aufwiesen (246). Besonders im Hinblick auf CD86 ist keine detaillierte mechanistische Beschreibung möglich, sondern nur die deskriptive Analyse der Daten.

Die multifaktorielle Auftragung der FACS-Daten mittels HSNE (siehe Abbildung 21) ergab ein ähnliches Clustering der Zellen wie es auf transkriptioneller Ebene gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 15). Diese Form der Analyse ermöglicht die gleichzeitige Darstellung der Expression mehrerer Marker auf einer Zellgruppe. In Abhängigkeit der jeweiligen Infektion können die Monozyten anhand des Expressionsmusters von Ly6C, CD14, CD38, CD74 und CD86 in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Es zeigt sich einerseits, dass sowohl die Ly6C<sup>hi</sup> als auch die Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten inhomogene Zellpopulationen sind und andererseits ist ersichtlich, dass die Ly6C<sup>hi</sup> Populationen im Verlauf beider Infektionen unterschiedliche Expressionsmuster der analysierten Oberflächenmarker entwickeln. Die pro-inflammatorischen Monozyten aus dem ALA-Modell können vor allem anhand der Expression von CD14 identifiziert werden, wohingegen die Monozyten aus dem LIS-Modell verstärkt CD38 und CD86 exprimieren.

Die hohe Plastizität der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten die, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dargestellt werden konnte, deckt sich mit neuesten Publikationen, die neue Subpopulationen beschreiben. Die Untersuchungen von Weinreb (15), Yona (74), oder Mildner et al. (10) fanden allerdings alle in Homöostase statt und bisher ist keine detaillierte Analyse der Plastizität von Monozyten in Infektionsmodellen durchgeführt

worden. Weiterhin ist ein direkter Vergleich mit den, im Rahmen dieser Arbeit, generierten Daten schwierig, da in den erwähnten Publikationen einerseits Einzelzellsequenzierung genutzt wurde und andererseits keine Analyse der Proteinexpression erfolgte. Die Zusammenstellung der Daten aus der Transkriptomanalyse und der Untersuchung der Expression spezifischer Oberflächenproteine verdeutlicht, dass sich unter der Infektion mit *L. monocytogenes* eine große Diversität pro-inflammatorischer Monozytenpopulationen entwickelt. Die Transkriptomdaten lassen darauf schließen, dass sich sowohl neutrophilen-ähnliche Monozyten als auch *saa3*<sup>+</sup> und *cxc10*<sup>+</sup> Monozyten entwickeln. Diese Entwicklung ist in der Infektion mit *E. histolytica* nicht zu erkennen. Eine direkte Verknüpfung der regulierten Gene mit der Expression der Oberflächenmarker ist nicht möglich. Hierzu wäre ein anderer methodischer Ansatz, das CITE-Seq, notwendig gewesen. In diesem wird von einer Zelle sowohl die mRNA sequenziert, als auch gleichzeitig die Expression von Oberflächenproteinen analysiert. Diese Methode war zum Beginn der Arbeit jedoch nicht kommerziell verfügbar.

Es können, trotz der angesprochenen Einschränkungen, einige Erkenntnisse aus den vorliegenden Daten gewonnen werden. Die Oberflächenproteine CD14, CD38, CD74 und CD86 können als zusätzliche Marker genutzt werden um eine detaillierte Beschreibung pro-inflammatorischer Monozyten zu ermöglichen. Mit Hilfe dieser kann die bisher sehr heterogene Population der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in homogenere Subpopulationen unterteilt werden. Die direkte Verknüpfung der neu entdeckten Subpopulationen zu Expression der analysierten Marker muss mittels neu entwickelter Methoden erfolgen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Expressionsmuster spezifisch für Monozyten sind, da auf neutrophilen Granulozyten keine Regulierung der untersuchten Marker stattfindet.

#### **4.4 Entwicklung der ROS Produktion in beiden Infektionsmodellen**

Die Aktivität der Monozyten kann, anhand der Expression von Oberflächenproteinen oder Transkriptionsfaktoren zwar abgeschätzt werden, jedoch bringt nur die direkte Messung Gewissheit. Zunächst ist auf transkriptioneller Ebene ein deutlicher Unterschied in der Expression von Genen zu finden, die mit der Produktion von ROS in Verbindung stehen (siehe Abbildung 24). Dies konnte sowohl auf transkriptioneller Ebene für die Monozyten als auch exemplarisch für die mRNA aus der gesamten



Leber gezeigt werden. Es wurde die Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten und neutrophilen Granulozyten determiniert, um funktionelle Unterschiede darzustellen. Für diese Testreihen wurden, aus mehreren Gründen, Monozyten aus der Milz der infizierten Tiere genommen. Zum einen ist die Verfügbarkeit von Monozyten in der Milz besser, da die Isolierung schneller ist und die Zellen somit geringeren externen Einflüssen, als bei der Isolierung aus der Leber ausgesetzt sind. Weiterhin ist die Reaktion der Monozyten anhand der Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle zwischen Milz und Leber vergleichbar, was auf eine ähnliche Aktivierung schließen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass im Verlauf einer Infektion mit *L. monocytogenes* die ROS-Produktion in pro-inflammatorischen Monozyten signifikant ansteigt (siehe Abbildung 25). Weiterhin sinkt die ROS-Produktion im Verlauf einer Infektion mit *E. histolytica* im Vergleich zur naiven Kontrolle. Die großen Unterschiede in den prozentualen Anteilen, besonders in den naiven Kontrollgruppen (ALA = 40%; LIS = 70 %) sind dem technischen, manuellen und zeitlichen Ablauf der Messungen geschuldet. Aus diesem Grund wurde bei jedem Infektionsmodell und für jeden Zeitpunkt eine eigene naive Kontrollgruppe mitgeführt. Der signifikante Anstieg der Menge intrazellulärer ROS (MFI) im LIS-Modell deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Infektionen, die ebenfalls eine Erhöhung der ROS-Produktion zur Folge haben (247). Die Erkennung von Pathogenen erhöht die Menge an ROS vor allem in phagozytierenden Zellen, die diese zur Erregerbekämpfung nutzen (248). Umso erstaunlicher ist die Verminderung des Anteils der ROS<sup>+</sup> Zellen im ALA-Modell. Für die Bestimmung des ROS-Gehaltes wurden Splenozyten verwendet, da ein reproduzierbarer ROS-Assay mit isolierten Leberlymphozyten nicht etabliert werden konnte, da in diesen keine ROS-Produktion nachweisbar war. Aufgrund der Restriktion des ALA auf die Leber und der generalisierten Infektion mit *L. monocytogenes* stellte sich hier zunächst die Frage nach der Aussagekraft des Vergleiches.

Die Untersuchung des Expressionsmusters der spezifischen Oberflächenmarker zeigte jedoch, dass die Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in der Milz ein sehr ähnliches Expressionsmuster, im Vergleich mit pro-inflammatorischen Monozyten in der Leber, aufwiesen. Die Abnahme des Anteils an ROS<sup>+</sup> pro-inflammatorischen Monozyten im Verlauf des ALA-Modells ist in der zur Verfügung stehenden Literatur nicht beschrieben. Ferner wurden keine Untersuchungen der ROS-Produktion in Infektionen mit *E. histolytica* durchgeführt. Die Bekämpfung von Parasiten wie *E. histolytica* findet

vor allem durch eosinophile und basophile Granulozyten statt. Diese Zellen wurden nicht auf ihre ROS-Produktion hin untersucht. Allerdings ist die ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten im Verlauf beider Infektionen leicht verringert (siehe Abbildung 26). Es wurde jedoch schon mehrfach gezeigt, dass Neutrophile zur Bekämpfung der Amöben unverzichtbar sind (249). Die Bekämpfung erfolgt jedoch verstärkt über iNOS und weniger über reaktive Sauerstoffspezies (250).

Analog zur Expression spezifischer Oberflächenmarker auf pro-inflammatorischen Monozyten in beiden Modellen, ist die Entwicklung der ROS-Produktion in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten ebenfalls pathogen-spezifisch. Die Analyse der ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten ergab keine Veränderung in Abhängigkeit vom Infektionsmodell. Die Verringerung des Anteils an ROS<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> im ALA-Modell ist umso erstaunlicher, da bisher keine spezifische Beteiligung oder Beeinflussung der Milz im Verlauf des ALA festgestellt werden konnte.

Es bleibt zu klären, ob die Abnahme der ROS-Produktion in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im ALA-Modell durch eine nachfolgende Infektion mit *L. monocytogenes* reversibel ist oder der inhibierte Zustand längerfristig bestehen bleibt. Ein weiterer möglicher nächster Schritt ist die Analyse der Zytokinproduktion oder der Phagozytoseaktivität, um die Eigenschaften pro-inflammatorischer Monozyten in beiden Infektionsmodellen detaillierter zu erfassen.

#### 4.5 Adoptiver Transfer von LIS in ALA

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeiten zeigten, dass durch beide analysierten Infektionsmodelle unterschiedliche Monozytensubtypen entstehen. Abschließend stellte sich die Frage, ob der protektive Phänotyp, der durch Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im LIS-Modell vermittelt wird, auch auf das ALA-Modell übertragbar ist. Hierzu wurde in der CCR2<sup>-/-</sup> Maus, welche keine pro-inflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark rekrutieren kann, ein ALA induziert und direkt im Anschluss ein adoptiver Transfer von Monozyten aus einem *L. monocytogenes* infizierten Tier durchgeführt (siehe Abbildung 27). Die Größe der Abszesse ist im CCR2<sup>-/-</sup> signifikant geringer und es konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass der Transfer naiver Monozyten in die CCR2<sup>-/-</sup> Maus zu Abszessgrößen führt, die denen in Wildtyp-Tieren entsprechen (194). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie

sich der regulative, aktivierte Status der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem LIS-Modell auf die Entwicklung des ALA in der CCR2<sup>-/-</sup> Maus auswirkt.

Um diesen Versuch durchzuführen, musste zunächst die Infektion und die Auswirkung auf den Phänotyp pro-inflammatorischer Monozyten mit einem neuen Listerien Stamm etabliert werden. Es wurde der Stamm *L. monocytogenes*  $\Delta actA$  genutzt, bei dem das Gen *actA*, welches für das „actin assembling protein A“ codiert, depletiert wurde. Das Protein *actA* ist ein wichtiger Virulenzfaktor und die Depletion beeinträchtigt die Fähigkeit von Listerien, auf Aktinfilamenten direkt von einer Wirtszelle in die nächste zu gelangen (202, 251). Die Fähigkeit aus dem extrazellulären Raum in die Wirtszellen einzudringen ist beim  $\Delta actA$  Stamm jedoch nicht vermindert (252). Die Nutzung des Stammes *L. monocytogenes* EGD, welcher bei allen anderen Experimenten verwendet wurde, resultierte in der Übertragung von Listerien aus den Donortieren in die Rezipienten, was auch durch Antibiotikabehandlung nicht verhindert werden konnte. Es zeigte sich, dass mittels einer höheren Infektionsdosis ( $1 \times 10^7$ /Tier) eine vergleichbare Aktivierung der Monozyten, bemessen an der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle, durch *L. monocytogenes*  $\Delta actA$  erreicht werden konnte. Dies deckt sich mit Literaturangaben, die ebenfalls durch höhere Dosen eine vergleichbare T-Zellaktivierung erreichten (202). Dieser Stamm konnte somit mit hinreichender Evidenz für den adoptiven Transfer genutzt werden.

Es zeigte sich, dass der Transfer von LIS-Monozyten signifikant kleinere Abszesse, im Vergleich zum Transfer naiver Monozyten, herbeiführt (siehe Abbildung 28C). Die interne Kontrolle, der Transfer von naiven Monozyten, hingegen führt, wie schon publiziert, zur Ausbildung von Abszessen, die vergleichbar mit denen von Wildtyp Tieren sind (194). Der direkte Vergleich zu vorhandener Literatur gestaltet sich aufgrund der sehr spezifischen Situation schwierig. Prinzipiell zeigt sich hierbei jedoch, dass die Übertragung der LIS-Monozyten in das Modell des ALA dazu führt, dass die Immunpathologie schwächer ausgeprägt ist. Die LIS-Monozyten haben offensichtlich, trotz ihrer starken Aktivierung, einen regulativen Phänotyp.

Ein ähnlicher Effekt konnte in dem Modell der Schistosomiasis beobachtet werden. In der chronischen Phase der Erkrankung wurden naive Monozyten in ein infiziertes Tier gegeben, was zur besseren Ausheilung der Läsionen führte (253). Obwohl in diesem Versuch die infizierten Tiere nicht den CCR2<sup>-/-</sup> Genotyp besaßen, wirkt sich der Transfer naiver Monozyten positiv auf den Heilungsverlauf aus, wobei der exakte

Mechanismus nicht geklärt wurde. Möglicherweise besteht jedoch auch hier der Zustand, dass endogene Zellen nicht korrekt reguliert werden und somit eine Immunpathologie verursachen. Es liegt jedoch ein bedeutender Unterschied zum Transfer von Monozyten in das ALA-Modell vor, da in diesem auch exogene, naive Monozyten zur Immunpathologie beitragen. Im Fall des Amöbenleberabszesses müssen die Monozyten offensichtlich schon vorher, in diesem Fall durch die Infektion mit *L. monocytogenes*, einen regulativen Status erreicht haben, um einen positiven Einfluss auf die Abszessbildung auszuüben, da der Transfer naiver Monozyten keinen positiven Einfluss auf die Abszessbildung aufweist. Durch die Infektion mit *L. monocytogenes* entwickeln die Monozyten einen pro-inflammatorischen Phänotyp, der z. B. verstärkt in der Differenzierung zu M1 Makrophagen resultiert. Der Transfer dieser aktivierten Zellen in das ALA-Modell führt zu signifikant kleineren Abszessen im Vergleich zum Transfer naiver Monozyten. Die Immunpathologie auf der die der Ausbildung des ALA zum Teil beruht, wird durch die Monozyten aus dem LIS-Modell abgeschwächt, was den regulativen Status dieser Zellen unterstreicht. Der Transfer naiver Monozyten in das ALA-Modell hingegen resultiert in einer Immunpathologie, da die naiven Zellen z. B. durch die *E. histolytica*-spezifischen Pathogenitätsfaktoren beeinflusst werden und einen immunpathologischen Status entwickeln, da sie vorher keinen schützenden Phänotyp entwickeln konnten.

In diesem Zusammenhang sind vor allem die Veränderungen zu beachten, denen die Zellen im Verlauf des Transfers unterliegen. In der Arbeit von Mildner et al. (10) wurden die transkriptionellen Veränderungen beschrieben, die während des Prozesses des Transfers induziert wurden. Monozyten sind, wie oben schon erwähnt, eine hoch variable und flexible Zellpopulation und werden durch jegliche exogenen Einflüsse in ihrem Phänotyp verändert. Durch einen Transfer dieser Zellen findet, neben der Änderung der Genexpression, auch eine Abnahme der Ly6C Expression auf Proteinebene bis 48 Stunden nach dem Transfer statt (10). Bisher sind keine Veröffentlichungen vorhanden, die phänotypische Untersuchungen transferierter Monozyten zeigen. Aus diesem Grund kann keine Aussage über den Einfluss dieser verminderten Expression von Ly6C getätigt werden. Die geringere Expression von Ly6C in transferierten Monozyten konnte auch in der vorliegenden Arbeit an d3 p.i. festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt trat sowohl bei Monozyten aus den *L. monocytogenes* infizierten Tieren, als auch bei denen aus naiven Tieren auf.

Offensichtlich beeinträchtigt die Verminderung der Ly6C Expression nicht den regulatorischen Einfluss der transferierten Monozyten.

Auch im Modell für Typ-1 Diabetes konnte ein positiver Einfluss auf den Krankheitsverlauf durch den adoptiven Transfer *in-vitro* generierter M2 Makrophagen gezeigt werden. In diesem Fall werden die exogenen M2-Makrophagen einerseits verstärkt in den Pankreas rekrutiert, gleichzeitig führen sie zum verzögerten und reduzierten Auftreten der Typ-1-Diabetes Symptomatik (254).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Transfer zuvor aktivierter Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten die neuronale Pathologie nach Induktion eines Schlaganfalles in Mäusen abmildert (255). Hierbei wurden pro-inflammatorische Monozyten durch LPS-Injektion in einen konditionierten Zustand gebracht und kurze Zeit nach der Erzeugung des Schlaganfall-ähnlichen Zustandes transferiert. Eine Injektion von LPS führt zu einem reduziertem Infarkt volumen, wobei dieser Effekt durch den Transfer der mit LPS vorkonditionierten Monozyten ebenfalls erreicht werden kann (255).

Monozyten sind zwar eine inhomogene und sehr variable Zellpopulation, sie könnten jedoch trotzdem regulative Einflüsse auf Erkrankungen haben. Möglicherweise sind Monozyten in der Lage einen regulativen Phänotyp zu konservieren und können diesen, trotz ihrer Plastizität und kurzen Lebensdauer, auf andere Situationen übertragen. Somit könnte der Transfer von Monozyten eine Behandlungsstrategie für Erkrankungen darstellen, bei deren Entstehung sie entscheidend beteiligt sind.

Zusammenfassend konnte dargelegt werden, dass Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem ALA-Modell einen anti-inflammatorischen Phänotyp zeigen, der sich unter anderem durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, wie *fos* und *nr4a1* als auch der Bildung geringer Mengen ROS auszeichnet. Pro-inflammatorische Monozyten aus dem LIS-Modell sind hingegen hoch aktiviert, was anhand der Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, wie *irf1* und *ifi204* und der hohen ROS-Produktion gezeigt werden konnte. Die Expressionsanalyse spezifischer Oberflächenproteine lässt den Schluss zu, dass Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem ALA-Modell zusätzlich über CD14 und CD38 beschrieben werden können, wobei CD38 und CD86 zusätzliche Marker für Monozyten aus dem LIS-Modell darstellen. Weiterhin ist der protektive Phänotyp, welchen Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im LIS-Modell besitzen, auf die Infektion mit *E. histolytica* übertragbar. Durch den adoptiven Transfer aktivierter Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus

*L. monocytogenes* infizierten Tieren in das ALA-Modell verringerte sich die Abszessgröße signifikant im Vergleich zum Transfer naiver Monozyten.

Als möglicher nächster Schritt bleibt die weitere Eingrenzung der transferierten Monozyten, wobei die durchflusszytometrische Sortierung der CD38<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten aus dem LIS-Modell und anschließendem adoptivem Transfer ins ALA-Modell im Fokus stünde, um die protektive Funktion dieser Subpopulation weiter zu bestätigen.

#### **4.6 Einfluss des pro-inflammatorischen Zytokins IL-18 auf den Infektionsverlauf**

Aus den Ergebnissen der Transkriptomstudie ist *il18bp*, welches für das IL-18 Bindeprotein (IL-18BP) codiert, eines der am stärksten, differentiell regulierten Gene in Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten zwischen beiden Modellen (siehe Abbildung 15C). Die Aufgabe des IL-18BP, welches auch als löslicher Rezeptor bezeichnet wird, besteht vor allem in der Bindung und damit Inaktivierung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-18 (68). Es konnte auf Grundlage der Transkriptomdaten gezeigt werden, dass die Expression der Gene *il18bp*, *il18r1* und *il-18rap* im LIS-Modell signifikant erhöht ist. Da die Monozyten aus dem LIS-Modell protektiv wirken und diese Zellen einige Bestandteile des IL-18 Netzwerkes verstärkt exprimieren, konnte auf eine protektive Funktion, z. B. aufgrund der hepatoprotektiven Eigenschaften die IL-18BP vermitteln kann, vermutet werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst für beide Infektionsmodelle die relative Änderung der Expression von *il18*, *il18bp*, *il18r1* und *il18rap* auf Ebene der Gesamt-RNA aus der Leber überprüft. Es zeigte sich, dass im Verlauf beider Infektionen nur minimale Änderungen der Expression für *il18* zu finden waren (siehe Abbildung 30b). Eine signifikante Erhöhung der Expression von *il18* konnte demnach weder in den Monozyten noch in der Gesamt-Leber-RNA nachgewiesen werden. Dies ist besonders für die Infektion mit *L. monocytogenes* erstaunlich, da hier schon gezeigt werden konnte, dass in humanen Dendritischen Zellen IL-18 gebildet wird (256). Weiterhin ist die Bedeutung von IL-18 im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* durch Publikationen bewiesen, die eine pathogen-induzierte IL-18 Produktion in murinen Dendritischen Zellen, welche zur IL-10 Produktion in NK-Zellen führt, zeigen (257).

Zusätzlich ist die Depletion von IL-18 verantwortlich für eine geringere Suszeptibilität gegenüber *L. monocytogenes* (258).

Für *il18r1*, *il18bp* und *il18rap* ist im Infektionsmodell der Listeriose ein starker, signifikanter Anstieg der Expression auszumachen, wobei im ALA-Modell nur eine leichte Verringerung der Expression von *il18bp* zu beobachten ist. Obwohl auf transkriptioneller Ebene keine verstärkte Expression von *il18* auszumachen ist, werden die Gene, welche den IL-18 Rezeptor (*il18r1* und *il18rap*) und das IL-18 Bindeprotein (*il18bp*) bilden, verstärkt exprimiert. Offensichtlich werden verstärkt Signale über IL-18 vermittelt, welches jedoch nicht in der Leber gebildet wird.

Wie bereits gezeigt exprimieren Monozyten verstärkt *il18r1* im Verlauf einer Infektion mit *L. monocytogenes*. Aus diesem Grund wurde die Expression von IL-18Ra1 für beide Infektionsmodelle auf Proteinebene auf verschiedenen Immunzellen analysiert (siehe Abbildung 31). Die zellulären Ziele von IL-18 sind bisher, im Verlauf beider Infektionen, nicht untersucht worden. Es stellte sich die Frage, welche Zellen die IL-18Ra1 Kette exprimieren und somit potenzielle Ziele für IL-18 sein können.

Es zeigte sich, dass, im LIS-Modell im Vergleich zum ALA-Modell, mehr neutrophile Granulozyten, pro-inflammatorische Monozyten, T-Zellen sowie NKT-Zellen die IL-18Ra1-Kette exprimieren (siehe Abbildung 32). Dies unterstreicht die bereits erwähnte Bedeutung von IL-18 bei einer Infektion mit *L. monocytogenes*. Es konnte keine Reaktion im ALA-Modell nachgewiesen werden, obwohl zumindest *in-vitro* Experimente gezeigt haben, dass IL-18 einen hemmenden Einfluss auf die *E. histolytica* induzierte IL-10 Produktion hat (259). Andererseits können Cysteinproteinasen von *E. histolytica* (EhCP5) IL-18 spalten und somit inaktivieren (260). Es handelt sich hierbei jedoch um *in-vitro* Versuche, weshalb in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der genetischen Depletion von IL-18 auf die Ausbildung des Abszesses sowie die Expression spezifischer Oberflächenmarker im Infektionsmodell untersucht wurde (siehe Abbildung 33).

Die Abszessgröße weist zu allen untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede auf, obwohl ein Trend zu kleineren Abszessen im IL-18<sup>-/-</sup> vorhanden ist. Die Expression der analysierten Oberflächenmarker zeigt signifikant geringere Expression von CD14 und CD74 an d3 bzw. d3 und d7 p.i.. In der Gruppe der IL-18<sup>-/-</sup> Tiere ist an d3 p.i. ein geringerer Anteil an CD86<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten zu erkennen. Dies deutet auf eine geringere pro-inflammatorische Antwort im frühen Stadium der Infektion hin. Die Analyse eines früheren Zeitpunktes, z. B. d1 p.i., wäre hier eine

---

sinnvolle Ergänzung um jeglichen Einfluss des IL-18<sup>-/-</sup> zu erfassen. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Die Verringerung der Expression von CD86 in den Monozyten im IL-18<sup>-/-</sup> kann für die tendenziell schnellere Ausheilung des Abszesses verantwortlich sein. Trotz der beschriebenen Bedeutung von IL-18 auf die Infektion mit *E. histolytica* konnte kein klarer Phänotyp durch die Depletion bestimmt werden. Dies könnte dem bipolaren Charakter von IL-18 geschuldet sein. Einerseits wirkt es als pro-inflammatorisches Zytokin und führt zur Ausschüttung von z.B. IFN $\gamma$  (261), andererseits kann es die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 induzieren (257). Obwohl für virale (262), bakterielle (257, 258) und parasitäre (263) Infektionsmodelle ein Einfluss von IL-18 gezeigt werden konnte, ist dies für das Modell der hepatischen Infektion mit *E. histolytica* im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.



## 5 Literaturverzeichnis

1. 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.
2. 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.
3. Ginhoux, F., and S. Jung. 2014. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews. Immunology*. 14: 392–404.
4. Trzebanski, S., and S. Jung. 2020. Plasticity of monocyte development and monocyte fates. *Immunol. Lett.* 227: 66–78.
5. Swirski, F. K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.-L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T. R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M. J. Pittet. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 325: 612–616.
6. Bain, C. C., C. L. Scott, H. Uronen-Hansson, S. Gudjonsson, O. Jansson, O. Grip, M. Williams, B. Malissen, W. W. Agace, and A. M. Mowat. 2013. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same ly6chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* 6: 498–510.
7. Bain, C. C., and A. M. Mowat. 2014. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* 260: 102–117.
8. Zigmond, E., C. Varol, J. Farache, E. Elmaliyah, A. T. Satpathy, G. Friedlander, M. Mack, N. Shpigel, I. G. Boneca, K. M. Murphy, G. Shakhar, Z. Halpern, and S. Jung. 2012. Ly6c hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity*. 37: 1076–1090.
9. 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.
10. Mildner, A., J. Schönheit, A. Giladi, E. David, D. Lara-Astiaso, E. Lorenzo-Vivas, F. Paul, L. Chappell-Maor, J. Priller, A. Leutz, I. Amit, and S. Jung. 2017. Genomic characterization of murine monocytes reveals c/ebp $\beta$  transcription factor dependence of ly6c- cells. *Immunity*. 46: 849-862.e7.
11. Menezes, S., D. Melandri, G. Anselmi, T. Perchet, J. Loschko, J. Dubrot, R. Patel, E. L. Gautier, S. Hugues, M. P. Longhi, J. Y. Henry, S. A. Quezada, G. Lauvau, A.-M. Lennon-Duménil, E. Gutiérrez-Martínez, A. Bessis, E. Gomez-Perdiguero, C. E. Jacome-Galarza, H. Garner, F. Geissmann, R. Golub, M. C. Nussenzweig, and P. Guermonprez. 2016. The heterogeneity of ly6chi monocytes controls their differentiation into inos $^+$  macrophages or monocyte-derived dendritic cells. *Immunity*. 45: 1205–1218.
12. Scott, C. L., F. Zheng, P. de Baetselier, L. Martens, Y. Saeys, S. de Prijck, S. Lippens, C. Abels, S. Schoonooghe, G. Raes, N. Devoogdt, B. N. Lambrecht, A.

- Beschin, and M. Williams. 2016. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated kupffer cells. *Nat. Commun.* 7: 10321.
13. Zimmermann, H. W., C. Trautwein, and F. Tacke. 2012. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front. Physiol.* 3: 56.
  14. Geissmann, F., S. Jung, and D. R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19: 71–82.
  15. Weinreb, C., A. Rodriguez-Fraticelli, F. D. Camargo, and A. M. Klein. 2020. Lineage tracing on transcriptional landscapes links state to fate during differentiation. *Science.* 367.
  16. Yáñez, A., S. G. Coetzee, A. Olsson, D. E. Muench, B. P. Berman, D. J. Hazelett, N. Salomonis, H. L. Grimes, and H. S. Goodridge. 2017. Granulocyte-monocyte progenitors and monocyte-dendritic cell progenitors independently produce functionally distinct monocytes. *Immunity.* 47: 890-902.e4.
  17. Williams, M., A. Mildner, and S. Yona. 2018. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity.* 49: 595–613.
  18. Gamrekelashvili, J., R. Giagnorio, J. Jussofie, O. Soehnlein, J. Duchene, C. G. Briseño, S. K. Ramasamy, K. Krishnasamy, A. Limbourg, T. Kapanadze, C. Ishifune, R. Hinkel, F. Radtke, L. J. Strobl, U. Zimmer-Strobl, L. C. Napp, J. Bauersachs, H. Haller, K. Yasutomo, C. Kupatt, K. M. Murphy, R. H. Adams, C. Weber, and F. P. Limbourg. 2016. Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by notch signalling. *Nat. Commun.* 7: 12597.
  19. Qian, B.-Z., J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, J. Zhang, L. R. Campion, E. A. Kaiser, L. A. Snyder, and J. W. Pollard. 2011. Ccl2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 475: 222–225.
  20. Winkler, C. W., T. A. Woods, S. J. Robertson, K. L. McNally, A. B. Carmody, S. M. Best, and K. E. Peterson. 2018. Cutting edge: Ccr2 is not required for ly6chi monocyte egress from the bone marrow but is necessary for migration within the brain in la crosse virus encephalitis. *J. Immunol.* 200: 471–476.
  21. Lim, J. K., C. J. Obara, A. Rivollier, A. G. Pletnev, B. L. Kelsall, and P. M. Murphy. 2011. Chemokine receptor ccr2 is critical for monocyte accumulation and survival in west nile virus encephalitis. *J. Immunol.* 186: 471–478.
  22. Tsou, C.-L., W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A. M. Aslanian, S. P. Weisberg, M. Mack, and I. F. Charo. 2007. Critical roles for ccr2 and mcp-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 117: 902–909.
  23. Li, X., W. Yao, Y. Yuan, P. Chen, B. Li, J. Li, R. Chu, H. Song, D. Xie, X. Jiang, and H. Wang. 2017. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via ccl2/ccr2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut.* 66: 157–167.
  24. Costa, C., S. L. Traves, S. J. Tudhope, P. S. Fenwick, K. B. R. Belchamber, R. E. K. Russell, P. J. Barnes, and L. E. Donnelly. 2016. Enhanced monocyte migration to cxcr3 and ccr5 chemokines in copd. *Eur. Respir. J.* 47: 1093–1102.
  25. Francis, M., R. Sun, J. A. Cervelli, H. Choi, M. Mandal, E. V. Abramova, A. J. Gow, J. D. Laskin, and D. L. Laskin. 2017. Editor's highlight: Role of spleen-derived macrophages in ozone-induced lung inflammation and injury. *Toxicol. Sci.* 155: 182–195.
  26. Hsiao, H.-M., R. Fernandez, S. Tanaka, W. Li, J. H. Spahn, S. Chiu, M. Akbarpour, D. Ruiz-Perez, Q. Wu, C. Turam, D. Scozzi, T. Takahashi, H. P. Luehmann, V. Puri, G. R. S. Budinger, A. S. Krupnick, A. V. Misharin, K. J. Lavine, Y. Liu, A. E. Gelman, A. Bharat, and D. Kreisel. 2018. Spleen-derived

- classical monocytes mediate lung ischemia-reperfusion injury through il-1 $\beta$ . *J. Clin. Invest.* 128: 2833–2847.
27. Serbina, N. V., C. Shi, and E. G. Pamer. 2012. Monocyte-mediated immune defense against murine listeria monocytogenes infection. *Adv. Immunol.* 113: 119–134.
  28. Kraaij, M. D., E. J. F. Vereyken, P. J. M. Leenen, T. P. P. van den Bosch, F. Rezaee, M. G. H. Betjes, C. C. Baan, and A. T. Rowshani. 2014. Human monocytes produce interferon-gamma upon stimulation with lps. *Cytokine.* 67: 7–12.
  29. Gane, J. M., R. A. Stockley, and E. Sapey. 2016. Tnf- $\alpha$  autocrine feedback loops in human monocytes: The pro- and anti-inflammatory roles of the tnf- $\alpha$  receptors support the concept of selective tnfr1 blockade in vivo. *J. Immunol. Res.* 2016: 1079851.
  30. Dallagi, A., J. Girouard, J. Hamelin-Morrisette, R. Dadzie, L. Laurent, C. Vaillancourt, J. Lafond, C. Carrier, and C. Reyes-Moreno. 2015. The activating effect of ifn- $\gamma$  on monocytes/macrophages is regulated by the lif-trophoblast-il-10 axis via stat1 inhibition and stat3 activation. *Cell. Mol. Immunol.* 12: 326–341.
  31. Delneste, Y., P. Charbonnier, N. Herbault, G. Magistrelli, G. Caron, J.-Y. Bonnefoy, and P. Jeannin. 2003. Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood.* 101: 143–150.
  32. Hoeffel, G., and F. Ginhoux. 2018. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell. Immunol.* 330: 5–15.
  33. Bonnardel, J., W. T'Jonck, D. Gaublomme, R. Browaeys, C. L. Scott, L. Martens, B. Vanneste, S. de Prijck, S. A. Nedospasov, A. Kremer, E. van Hamme, P. Borghgraef, W. Toussaint, P. de Bleser, I. Mannaerts, A. Beschin, L. A. van Grunsven, B. N. Lambrecht, T. Taghon, S. Lippens, D. Elewaut, Y. Saeys, and M. Guilliams. 2019. Stellate cells, hepatocytes, and endothelial cells imprint the kupffer cell identity on monocytes colonizing the liver macrophage niche. *Immunity.* 51: 638-654.e9.
  34. Zhao, Y., W. Zou, J. Du, and Y. Zhao. 2018. The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. *J. Cell. Physiol.* 233: 6425–6439.
  35. Kratofil, R. M., P. Kubes, and J. F. Deniset. 2017. Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37: 35–42.
  36. Guilliams, M., G. R. Thierry, J. Bonnardel, and M. Bajenoff. 2020. Establishment and maintenance of the macrophage niche. *Immunity.* 52: 434–451.
  37. Davies, L. C., and P. R. Taylor. 2015. Tissue-resident macrophages: Then and now. *Immunology.* 144: 541–548.
  38. Jaipersad, A. S., G. Y. H. Lip, S. Silverman, and E. Shantsila. 2014. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63: 1–11.
  39. Hummitzsch, L., M. Albrecht, K. Zitta, K. Hess, K. Parczany, R. Rusch, J. Cremer, M. Steinfath, A. Haneya, F. Faendrich, and R. Berndt. 2020. Human monocytes subjected to ischaemia/reperfusion inhibit angiogenesis and wound healing in vitro. *Cell Prolif.* 53: e12753.
  40. Dobbs, K. R., J. N. Crabtree, and A. E. Dent. 2020. Innate immunity to malaria—the role of monocytes. *Immunol. Rev.* 293: 8–24.
  41. Chua, C. L. L., G. Brown, J. A. Hamilton, S. Rogerson, and P. Boeuf. 2013. Monocytes and macrophages in malaria: Protection or pathology? *Trends Parasitol.* 29: 26–34.

42. Castillo, J. A., J. S. Naranjo, M. Rojas, D. Castaño, and P. A. Velilla. 2019. Role of monocytes in the pathogenesis of dengue. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 67: 27–40.
43. Rossol, M., H. Heine, U. Meusch, D. Quandt, C. Klein, M. J. Sweet, and S. Hauschildt. 2011. Lps-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit. Rev. Immunol.* 31: 379–446.
44. Bryn, T., S. Yaqub, M. Mahic, K. Henjum, E. M. Aandahl, and K. Taskén. 2008. Lps-activated monocytes suppress t-cell immune responses and induce foxp3+ t cells through a cox-2-pge2-dependent mechanism. *International immunology*. 20: 235–245.
45. Lee, K. Y. 2019. M1 and m2 polarization of macrophages: A mini-review. *Med Biol Sci Eng.* 2: 1–5.
46. Arango Duque, G., and A. Descoteaux. 2014. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5: 491.
47. Biswas, S. K., M. Chittezhath, I. N. Shalova, and J.-Y. Lim. 2012. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* 53: 11–24.
48. Wynn, T. A., and K. M. Vannella. 2016. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. 44: 450–462.
49. Smigiel, K. S., and W. C. Parks. 2018. Macrophages, wound healing, and fibrosis: Recent insights. *Curr. Rheumatol. Rep.* 20: 17.
50. Jakubzick, C. V., G. J. Randolph, and P. M. Henson. 2017. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature reviews. Immunology*. 17: 349–362.
51. Dale, D. C., L. Boxer, and W. C. Liles. 2008. The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood*. 112: 935–945.
52. Döring, M., K. M. Cabanillas Stanchi, A. Erbacher, S. Haufe, C. P. Schwarze, R. Handgretinger, M. Hofbeck, and G. Kerst. 2015. Phagocytic activity of monocytes, their subpopulations and granulocytes during post-transplant adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Immunobiology*. 220: 605–613.
53. Antal, P., S. Sipka, P. Surányi, I. Csipo, T. Seres, L. Maródi, and G. Szegedi. 1995. Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. *Ann. Hematol.* 70: 259–265.
54. Fang, F. C. 2011. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *mBio*. 2.
55. Sillar, J. R., Z. P. Germon, G. N. Deluliis, and M. D. Dun. 2019. The role of reactive oxygen species in acute myeloid leukaemia. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
56. Generating and detecting reactive oxygen species—section 18.2 | thermo fisher scientific - de. 2021. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-reactive-oxygen-species-including-nitric-oxide/generating-and-detecting-reactive-oxygen-species.html>. Accessed 19 February 2021.
57. Gomes, J. A. S., A. M. Molica, T. S. L. Keesen, M. J. F. Morato, F. F. de Araujo, R. C. G. Fares, J. A. Fiuza, A. T. Chaves, V. Pinheiro, M. d. C. P. Nunes, R. Correa-Oliveira, and M. O. da Costa Rocha. 2014. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of chagas disease. *Hum. Immunol.* 75: 20–28.
58. Dinarello, C. A., D. Novick, S. Kim, and G. Kaplanski. 2013. Interleukin-18 and il-18 binding protein. *Front. Immunol.* 4: 289.
59. Reddy, V. S., S. D. Prabhu, S. Mummidi, A. J. Valente, B. Venkatesan, P. Shanmugam, P. Delafontaine, and B. Chandrasekar. 2010. Interleukin-18

- induces emmprin expression in primary cardiomyocytes via jnk/sp1 signaling and mmp-9 in part via emmprin and through ap-1 and nf-kappab activation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* 299: H1242-54.
60. Kojima, H., M. Takeuchi, T. Ohta, Y. Nishida, N. Arai, M. Ikeda, H. Ikegami, and M. Kurimoto. 1998. Interleukin-18 activates the irak-traf6 pathway in mouse el-4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 183–186.
  61. Chandrasekar, B., K. Vemula, R. M. Surabhi, M. Li-Weber, L. B. Owen-Schaub, L. E. Jensen, and S. Mummidi. 2004. Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death. *The Journal of biological chemistry.* 279: 20221–20233.
  62. Guo, L., I. S. Junntila, and W. E. Paul. 2012. Cytokine-induced cytokine production by conventional and innate lymphoid cells. *Trends Immunol.* 33: 598–606.
  63. El-Darawish, Y., W. Li, K. Yamanishi, M. Pencheva, N. Oka, H. Yamanishi, T. Matsuyama, Y. Tanaka, N. Minato, and H. Okamura. 2018. Frontline science: Il-18 primes murine nk cells for proliferation by promoting protein synthesis, survival, and autophagy. *J. Leukoc. Biol.* 104: 253–264.
  64. Bufler, P., T. Azam, F. Gamboni-Robertson, L. L. Reznikov, S. Kumar, C. A. Dinarello, and S.-H. Kim. 2002. A complex of the il-1 homologue il-1f7b and il-18-binding protein reduces il-18 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 13723–13728.
  65. Mühl, H., and M. Bachmann. 2019. Il-18/il-18bp and il-22/il-22bp: Two interrelated couples with therapeutic potential. *Cell. Signal.* 63: 109388.
  66. Liu, X., Z. Pan, D. Su, Z. Yang, B. Zheng, X. Wang, and J. Tian. 2015. Remifentanyl ameliorates liver ischemia-reperfusion injury through inhibition of interleukin-18 signaling. *Transplantation.* 99: 2109–2117.
  67. Ruiz de Morales, José María G., L. Puig, E. Daudén, J. D. Cañete, J. L. Pablos, A. O. Martín, C. G. Juanatey, A. Adán, X. Montalbán, N. Borruel, G. Ortí, E. Holgado-Martín, C. García-Vidal, C. Vizcaya-Morales, V. Martín-Vázquez, and M. Á. González-Gay. 2020. Critical role of interleukin (il)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmunity Reviews.* 19: 102429.
  68. Novick, D., S.-H. Kim, G. Fantuzzi, L. L. Reznikov, C. A. Dinarello, and M. Rubinstein. 1999. Interleukin-18 binding protein. *Immunity.* 10: 127–136.
  69. Im, S.-H., S.-H. Kim, T. Azam, N. Venkatesh, C. A. Dinarello, S. Fuchs, and M. C. Souroujon. 2002. Rat interleukin-18 binding protein: Cloning, expression, and characterization. *J. Interferon Cytokine Res.* 22: 321–328.
  70. Ho, A. W., and S. L. Gaffen. 2010. Il-17rc: A partner in il-17 signaling and beyond. *Semin. Immunopathol.* 32: 33–42.
  71. Gschwandtner, M., R. Derler, and K. S. Midwood. 2019. More than just attractive: How ccl2 influences myeloid cell behavior beyond chemotaxis. *Front. Immunol.* 10: 2759.
  72. Rabin, R. L. 2003. Cc, c, and cx3c chemokines. In *encyclopedia of hormones.* H. L. Henry, and A. W. Norman, eds. Academic, San Diego, Calif., London. p. 255–263.
  73. Lorenzo, J. 2015. The effects of immune cell products (cytokines and hematopoietic cell growth factors) on bone cells. In *osteimmunology: Interactions of the immune and skeletal systems*, 2nd ed. J. Lorenzo, ed. Elsevier Science, San Diego, CA, USA. p. 143–167.

74. Yona, S., K.-W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guillemins, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, and S. Jung. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 38: 79–91.
75. Sunderkötter, C., T. Nikolic, M. J. Dillon, N. van Rooijen, M. Stehling, D. A. Drevets, and P. J. M. Leenen. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* 172: 4410–4417.
76. Springer, T., G. Galfré, D. S. Secher, and C. Milstein. 1979. Mac-1: A macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 9: 301–306.
77. Plow, E. F., and L. Zhang. 1997. A mac-1 attack: Integrin functions directly challenged in knockout mice. *J. Clin. Invest.* 99: 1145–1146.
78. Khan, S. Q., I. Khan, and V. Gupta. 2018. Cd11b activity modulates pathogenesis of lupus nephritis. *Front. Med. (Lausanne)*. 5: 52.
79. Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C. M. Ballantyne, and P. Kubers. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: A molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* 203: 2569–2575.
80. Dupuy, A. G., and E. Caron. 2008. Integrin-dependent phagocytosis: Spreading from microadhesion to new concepts. *J. Cell Sci.* 121: 1773–1783.
81. Lee, P. Y., J.-X. Wang, E. Parisini, C. C. Dascher, and P. A. Nigrovic. 2013. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J. Leukoc. Biol.* 94: 585–594.
82. Marshall, H. D., A. Chandele, Y. W. Jung, H. Meng, A. C. Poholek, I. A. Parish, R. Rutishauser, W. Cui, S. H. Kleinstein, J. Craft, and S. M. Kaech. 2011. Differential expression of ly6c and t-bet distinguish effector and memory th1 cd4(+) cell properties during viral infection. *Immunity*. 35: 633–646.
83. Dumont, F. J., R. G. Palfree, and L. Z. Coker. 1986. Phenotypic changes induced by interferon in resting t cells: Major enhancement of ly-6 antigen expression. *J. Immunol.* 137: 201–210.
84. Havran, W. L., D. W. Lancki, R. L. Moldwin, D. P. Dialynas, and F. W. Fitch. 1988. Characterization of an anti-ly-6 monoclonal antibody which defines and activates cytolytic t lymphocytes. *J. Immunol.* 140: 1034–1042.
85. Hatakeyama, S., K. Iwabuchi, K. Ogasawara, R. A. Good, and K. Onoé. 1994. The murine c-fgr gene product associated with ly6c and p70 integral membrane protein is expressed in cells of a monocyte/macrophage lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 3458–3462.
86. Fumagalli, L., H. Zhang, A. Baruzzi, C. A. Lowell, and G. Berton. 2007. The src family kinases hck and fgr regulate neutrophil responses to n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Immunol.* 178: 3874–3885.
87. Fleming, T. J., M. L. Fleming, and T. R. Malek. 1993. Selective expression of ly-6g on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. Rb6-8c5 mab to granulocyte-differentiation antigen (gr-1) detects members of the ly-6 family. *J. Immunol.* 151: 2399–2408.
88. Bamezai, A. 2004. Mouse ly-6 proteins and their extended family: Markers of cell differentiation and regulators of cell signaling. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 52: 255–266.
89. Daley, J. M., A. A. Thomay, M. D. Connolly, J. S. Reichner, and J. E. Albina. 2008. Use of ly6g-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* 83: 64–70.

90. Wang, J.-X., A. M. Bair, S. L. King, R. Shnayder, Y.-F. Huang, C.-C. Shieh, R. J. Soberman, R. C. Fuhlbrigge, and P. A. Nigrovic. 2012. Ly6g ligation blocks recruitment of neutrophils via a  $\beta$ 2-integrin-dependent mechanism. *Blood*. 120: 1489–1498.
91. Hutás, G., E. Bajnok, I. Gál, A. Finnegan, T. T. Glant, and K. Mikecz. 2008. Cd44-specific antibody treatment and cd44 deficiency exert distinct effects on leukocyte recruitment in experimental arthritis. *Blood*. 112: 4999–5006.
92. Abbitt, K. B., M. J. Cotter, V. C. Ridger, D. C. Crossman, P. G. Hellewell, and K. E. Norman. 2009. Antibody ligation of murine ly-6g induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 85: 55–63.
93. Sozzani, S., W. Luini, A. Borsatti, N. Polentarutti, D. Zhou, L. Piemonti, G. D'Amico, C. A. Power, T. N. Wells, M. Gobbi, P. Allavena, and A. Mantovani. 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of cc and cxc chemokines. *J. Immunol.* 159: 1993–2000.
94. Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. Chemokine receptor specific for ip10 and mig: Structure, function, and expression in activated t-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184: 963–969.
95. 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: 311–317.
96. Dewald, O., P. Zymek, K. Winkelmann, A. Koerting, G. Ren, T. Abou-Khamis, L. H. Michael, B. J. Rollins, M. L. Entman, and N. G. Frangogiannis. 2005. Ccl2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation research*. 96: 881–889.
97. Sato, F., S. Omura, N. E. Martinez, and I. Tsunoda. 2018. Animal models of multiple sclerosis. In *neuroinflammation*. A. Minagar, ed. Academic Press, London. p. 37–72.
98. Yao, M., G. Brummer, D. Acevedo, and N. Cheng. 2016. Cytokine regulation of metastasis and tumorigenicity. *Adv. Cancer Res.* 132: 265–367.
99. Zhang, J., L. Patel, and K. J. Pienta. 2010. Targeting chemokine (c-c motif) ligand 2 (ccl2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 95: 31–53.
100. Krenkel, O., T. Puengel, O. Govaere, A. T. Abdallah, J. C. Mossanen, M. Kohlhepp, A. Liepelt, E. Lefebvre, T. Luedde, C. Hellerbrand, R. Weiskirchen, T. Longerich, I. G. Costa, Q. M. Anstee, C. Trautwein, and F. Tacke. 2018. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology*. 67: 1270–1283.
101. Boring, L., J. Gosling, M. Cleary, and I. F. Charo. 1998. Decreased lesion formation in ccr2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 394: 894–897.
102. Fife, B. T., G. B. Huffnagle, W. A. Kuziel, and W. J. Karpus. 2000. Cc chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 192: 899–905.
103. Platt, A. M., C. C. Bain, Y. Bordon, D. P. Sester, and A. M. Mowat. 2010. An independent subset of tlr expressing ccr2-dependent macrophages promotes colonic inflammation. *J. Immunol.* 184: 6843–6854.
104. Hoge, J., I. Yan, N. Jänner, V. Schumacher, A. Chalaris, O. M. Steinmetz, D. R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John, and H.-W. Mittrücker. 2013. Il-6 controls the

- innate immune response against listeria monocytogenes via classical il-6 signaling. *J. Immunol.* 190: 703–711.
105. Benevides, L., C. M. Milanezi, L. M. Yamauchi, C. F. Benjamim, J. S. Silva, and N. M. Silva. 2008. Ccr2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control toxoplasma gondii infection in the central nervous system. *Am. J. Pathol.* 173: 741–751.
  106. Haist, K. C., K. S. Burrack, B. J. Davenport, and T. E. Morrison. 2017. Inflammatory monocytes mediate control of acute alphavirus infection in mice. *PLoS pathogens.* 13: e1006748.
  107. Pugin, J., D. Heumann, A. Tomasz, V. V. Kravchenko, Y. Akamatsu, M. Nishijima, M. P. Glauser, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. 1994. Cd14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1: 509–516.
  108. Vasselon, T., E. Hailman, R. Thieringer, and P. A. Detmers. 1999. Internalization of monomeric lipopolysaccharide occurs after transfer out of cell surface cd14. *J. Exp. Med.* 190: 509–521.
  109. Zaroni, I., and F. Granucci. 2013. Role of cd14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3: 32.
  110. Wu, Z., Z. Zhang, Z. Lei, and P. Lei. 2019. Cd14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 48: 24–31.
  111. Landmann, R., B. Müller, and W. Zimmerli. 2000. Cd14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infect.* 2: 295–304.
  112. Haziot, A., B. Z. Tsuberi, and S. M. Goyert. 1993. Neutrophil cd14: Biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 150: 5556–5565.
  113. Tanoue, S., and D. E. Kaplan. 2016. Cd14(+) regulatory dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Hepatology.* 63: 1391–1392.
  114. Bazil, V., and J. L. Strominger. 1991. Shedding as a mechanism of down-modulation of cd14 on stimulated human monocytes. *J. Immunol.* 147: 1567–1574.
  115. Seiffert, M., A. Schulz, S. Ohl, H. Döhner, S. Stilgenbauer, and P. Lichter. 2010. Soluble cd14 is a novel monocyte-derived survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells, which is induced by cll cells in vitro and present at abnormally high levels in vivo. *Blood.* 116: 4223–4230.
  116. Płóciennikowska, A., A. Hromada-Judycka, K. Borzęcka, and K. Kwiatkowska. 2015. Co-operation of tlr4 and raft proteins in lps-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 72: 557–581.
  117. Wieland, C. W., G. J. W. van der Windt, W. J. Wiersinga, S. Florquin, and T. van der Poll. 2008. Cd14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis. *Immunology.* 125: 272–279.
  118. Dessing, M. C., S. Knapp, S. Florquin, A. F. de Vos, and T. van der Poll. 2007. Cd14 facilitates invasive respiratory tract infection by streptococcus pneumoniae. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175: 604–611.
  119. Glaría, E., and A. F. Valledor. 2020. Roles of cd38 in the immune response to infection. *Cells.* 9.
  120. Chini, C. C. S., T. R. Peclat, G. M. Warner, S. Kashyap, J. M. Espindola-Netto, G. C. de Oliveira, L. S. Gomez, K. A. Hogan, M. G. Tarragó, A. S. Puranik, G. Agorrody, K. L. Thompson, K. Dang, S. Clarke, B. G. Childs, K. S. Kanamori, M. A. Witte, P. Vidal, A. L. Kirkland, M. de Cecco, K. Chellappa, M. R. McReynolds, C. Jankowski, T. Tchkonja, J. L. Kirkland, J. M. Sedivy, J. M. van Deursen, D. J. Baker, W. van Schooten, J. D. Rabinowitz, J. A. Baur, and E. N. Chini. 2020.



- Cd38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates nad<sup>+</sup> and nmn levels. *Nat. Metab.* 2: 1284–1304.
121. Calcraft, P. J., M. Ruas, Z. Pan, X. Cheng, A. Arredouani, X. Hao, J. Tang, K. Rietdorf, L. Teboul, K.-T. Chuang, P. Lin, R. Xiao, C. Wang, Y. Zhu, Y. Lin, C. N. Wyatt, J. Parrington, J. Ma, A. M. Evans, A. Galione, and M. X. Zhu. 2009. Naadp mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature.* 459: 596–600.
  122. Rah, S.-Y., Y.-H. Lee, and U.-H. Kim. 2017. Naadp-mediated ca<sup>2+</sup> signaling promotes autophagy and protects against lps-induced liver injury. *The FASEB Journal.* 31: 3126–3137.
  123. Vijayan, D., A. Young, M. W. L. Teng, and M. J. Smyth. 2017. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 17: 709–724.
  124. Partida-Sanchez, S., A. Gasser, R. Fliegert, C. C. Siebrands, W. Dammermann, G. Shi, B. J. Mousseau, A. Sumoza-Toledo, H. Bhagat, T. F. Walseth, A. H. Guse, and F. E. Lund. 2007. Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by adp-ribose, the major product generated by the cd38 enzyme reaction. *J. Immunol.* 179: 7827–7839.
  125. Partida-Sánchez, S., P. Iribarren, M. E. Moreno-García, J.-L. Gao, P. M. Murphy, N. Oppenheimer, J. M. Wang, and F. E. Lund. 2004. Chemotaxis and calcium responses of phagocytes to formyl peptide receptor ligands is differentially regulated by cyclic adp ribose. *J. Immunol.* 172: 1896–1906.
  126. Partida-Sánchez, S., S. Goodrich, K. Kusser, N. Oppenheimer, T. D. Randall, and F. E. Lund. 2004. Regulation of dendritic cell trafficking by the adp-ribosyl cyclase cd38. *Immunity.* 20: 279–291.
  127. Musso, T., S. Deaglio, L. Franco, L. Calosso, R. Badolato, G. Garbarino, U. Dianzani, and F. Malavasi. 2001. Cd38 expression and functional activities are up-regulated by ifn-gamma on human monocytes and monocytic cell lines. *J. Leukoc. Biol.* 69: 605–612.
  128. Lee, C.-U., E.-K. Song, C.-H. Yoo, Y.-K. Kwak, and M.-K. Han. 2012. Lipopolysaccharide induces cd38 expression and solubilization in j774 macrophage cells. *Mol Cells.* 34: 573–576.
  129. Partida-Sánchez, S., D. A. Cockayne, S. Monard, E. L. Jacobson, N. Oppenheimer, B. Garvy, K. Kusser, S. Goodrich, M. Howard, A. Harmsen, T. D. Randall, and F. E. Lund. 2001. Cyclic adp-ribose production by cd38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat. Med.* 7: 1209–1216.
  130. Chen, L., L. Diao, Y. Yang, X. Yi, B. L. Rodriguez, Y. Li, P. A. Villalobos, T. Cascone, X. Liu, L. Tan, P. L. Lorenzi, A. Huang, Q. Zhao, Di Peng, J. J. Fradette, D. H. Peng, C. Ungewiss, J. Roybal, P. Tong, J. Oba, F. Skoulidis, W. Peng, B. W. Carter, C. M. Gay, Y. Fan, C. A. Class, J. Zhu, J. Rodriguez-Canales, M. Kawakami, L. A. Byers, S. E. Woodman, V. A. Papadimitrakopoulou, E. Dmitrovsky, J. Wang, S. E. Ullrich, I. I. Wistuba, J. V. Heymach, F. X.-F. Qin, and D. L. Gibbons. 2018. Cd38-mediated immunosuppression as a mechanism of tumor cell escape from pd-1/pd-l1 blockade. *Cancer Discov.* 8: 1156–1175.
  131. Wo, Y. J., A. S. P. Gan, X. Lim, I. S. Y. Tay, S. Lim, J. C. T. Lim, and J. P. S. Yeong. 2019. The roles of cd38 and cd157 in the solid tumor microenvironment and cancer immunotherapy. *Cells.* 9.

132. Bu, X., J. Kato, J. A. Hong, M. J. Merino, D. S. Schrupp, F. E. Lund, and J. Moss. 2018. Cd38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells. *Carcinogenesis*. 39: 242–251.
133. Mocroft, A., M. Bofill, M. Lipman, E. Medina, N. Borthwick, A. Timms, L. Batista, M. Winter, C. A. Sabin, M. Johnson, C. A. Lee, A. Phillips, and G. Janossy. 1997. Cd8+,cd38+ lymphocyte percent: A useful immunological marker for monitoring hiv-1-infected patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology official publication of the International Retrovirology Association*. 14: 158–162.
134. Savarino, A., F. Bottarel, L. Calosso, M. J. Feito, T. Bensi, M. Bragardo, J. M. Rojo, A. Pugliese, I. Abbate, M. R. Capobianchi, F. Dianzani, F. Malavasi, and U. Dianzani. 1999. Effects of the human cd38 glycoprotein on the early stages of the hiv-1 replication cycle. *FASEB J*. 13: 2265–2276.
135. Cockayne, D. A., T. Muchamuel, J. C. Grimaldi, H. Muller-Steffner, T. D. Randall, F. E. Lund, R. Murray, F. Schuber, and M. C. Howard. 1998. Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase cd38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood*. 92: 1324–1333.
136. Manjarrez-Orduño, N., M. E. Moreno-García, K. Fink, and L. Santos-Argumedo. 2007. Cd38 cross-linking enhances tlr-induced b cell proliferation but decreases igm plasma cell differentiation. *Eur. J. Immunol*. 37: 358–367.
137. Nahi, H., M. Chrobok, C. Gran, J. Lund, A. Gruber, G. Gahrton, P. Ljungman, A. K. Wagner, and E. Alici. 2019. Infectious complications and nk cell depletion following daratumumab treatment of multiple myeloma. *PloS one*. 14: e0211927.
138. Deaglio, S., S. Aydin, T. Vaisitti, L. Bergui, and F. Malavasi. 2008. Cd38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends Mol. Med*. 14: 210–218.
139. Wang, X., J. Song, Z. Wu, B. Fan, and X. Mode. 2017. Dual roles of cd38 in autophagy. *YM*. 01: 8–19.
140. Viegas, M. S., A. do Carmo, T. Silva, F. Seco, V. Serra, M. Lacerda, and T. C. Martins. 2007. Cd38 plays a role in effective containment of mycobacteria within granulomata and polarization of th1 immune responses against mycobacterium avium. *Microbes Infect*. 9: 847–854.
141. Long, A., J. H. Park, N. Klimova, C. Fowler, D. J. Loane, and T. Kristian. 2017. Cd38 knockout mice show significant protection against ischemic brain damage despite high level poly-adp-ribosylation. *Neurochem. Res*. 42: 283–293.
142. Borghese, F., and F. I. L. Clanchy. 2011. Cd74: An emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. *Expert Opin. Ther. Targets*. 15: 237–251.
143. Gai, J.-W., W. Wahafu, L. Song, H. Ping, M. Wang, F. Yang, Y. Niu, W. Qing, and N. Xing. 2018. Expression of cd74 in bladder cancer and its suppression in association with cancer proliferation, invasion and angiogenesis in ht-1376 cells. *Oncol. Lett*. 15: 7631–7638.
144. Ruan, P., Y. Gu, H. Zhou, W. Zhang, D. Wang, J. Liang, and C. Li. 2020. Expression and clinical significance of cd74 and mmp-9 in colon adenocarcinomas. *J. BUON*. 25: 927–932.
145. Leng, L., C. N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R. A. Mitchell, and R. Bucala. 2003. Mif signal transduction initiated by binding to cd74. *J. Exp. Med*. 197: 1467–1476.
146. Farr, L., S. Ghosh, N. Jiang, K. Watanabe, M. Parlak, R. Bucala, and S. Moonah. 2020. Cd74 signaling links inflammation to intestinal epithelial cell

- regeneration and promotes mucosal healing. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 10: 101–112.
147. Flaster, H., J. Bernhagen, T. Calandra, and R. Bucala. 2007. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: Regulation of inflammation and immunity. *Mol. Endocrinol.* 21: 1267–1280.
148. Roche, P. A., M. S. Marks, and P. Cresswell. 1991. Formation of a nine-subunit complex by hla class ii glycoproteins and the invariant chain. *Nature.* 354: 392–394.
149. Lamb, C. A., and P. Cresswell. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and hla-dr-invariant chain complexes. *J. Immunol.* 148: 3478–3482.
150. Zaidi, T., T. Reidy, S. D'Ortona, R. Fichorova, G. Pier, and M. Gadjeva. 2011. Cd74 deficiency ameliorates pseudomonas aeruginosa-induced ocular infection. *Scientific reports.* 1: 58.
151. Luo, Y., C. Fan, M. Yang, M. Dong, R. Bucala, Z. Pei, Y. Zhang, and J. Ren. 2020. Cd74 knockout protects against lps-induced myocardial contractile dysfunction through ampk-skp2-suv39h1-mediated demethylation of bclb. *Br. J. Pharmacol.* 177: 1881–1897.
152. Zhou, Y., H. Chen, L. Liu, X. Yu, G. K. Sukhova, M. Yang, L. Zhang, V. C. Kyttaris, G. C. Tsokos, I. E. Stillman, T. Ichimura, J. V. Bonventre, P. Libby, and G.-P. Shi. 2017. Cd74 deficiency mitigates systemic lupus erythematosus-like autoimmunity and pathological findings in mice. *J. Immunol.* 198: 2568–2577.
153. Klasen, C., K. Ohl, M. Sternkopf, I. Shachar, C. Schmitz, N. Heussen, E. Hobeika, E. Levit-Zerdoun, K. Tenbrock, M. Reth, J. Bernhagen, and O. El Bounkari. 2014. Mif promotes b cell chemotaxis through the receptors cxcr4 and cd74 and zap-70 signaling. *J. Immunol.* 192: 5273–5284.
154. Lindner, R. 2017. Invariant chain complexes and clusters as platforms for mif signaling. *Cells.* 6.
155. Mir, M. A., ed. 2015. *Developing Costimulatory Molecules for Immunotherapy of Diseases.* Elsevier Science, Burlington.
156. Mir, M. A. 2015. Chapter 1 - introduction to costimulation and costimulatory molecules. In *developing costimulatory molecules for immunotherapy of diseases.* M. A. Mir, ed. Elsevier Science, Burlington. p. 1–43.
157. Chen, L., and D. B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of t cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology.* 13: 227–242.
158. Peng, H., C. R. Geil Nickell, K. Y. Chen, J. A. McClain, and K. Nixon. 2017. Increased expression of m1 and m2 phenotypic markers in isolated microglia after four-day binge alcohol exposure in male rats. *Alcohol.* 62: 29–40.
159. Jablonski, K. A., S. A. Amici, L. M. Webb, J. d. D. Ruiz-Rosado, P. G. Popovich, S. Partida-Sanchez, and M. Guerau-de-Arellano. 2015. Novel markers to delineate murine m1 and m2 macrophages. *PloS one.* 10: e0145342.
160. Dilioglou, S., J. M. Cruse, and R. E. Lewis. 2003. Function of cd80 and cd86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* 75: 217–227.
161. Hosiawa, K. A., H. Wang, M. E. DeVries, B. Garcia, W. Liu, D. Zhou, A. Akram, J. Jiang, H. Sun, M. J. Cameron, R. Zhong, and D. J. Kelvin. 2005. Cd80/cd86 costimulation regulates acute vascular rejection. *J. Immunol.* 175: 6197–6204.
162. Miyahira, Y., M. Katae, S. Kobayashi, T. Takeuchi, Y. Fukuchi, R. Abe, K. Okumura, H. Yagita, and T. Aoki. 2003. Critical contribution of cd28-cd80/cd86 costimulatory pathway to protection from trypanosoma cruzi infection. *Infect. Immun.* 71: 3131–3137.

163. Yun, T. J., and E. A. Clark. 1998. Cooperation, mechanisms of cellular. In *encyclopedia of immunology*. P. J. Delves, ed. Acad. Press, San Diego, Calif. p. 651–656.
164. Asai, T., B. K. Choi, P. M. Kwon, W. Y. Kim, J. D. Kim, D. S. Vinay, B. M. Gebhardt, and B. S. Kwon. 2007. Blockade of the 4-1bb (cd137)/4-1bbl and/or cd28/cd80/cd86 costimulatory pathways promotes corneal allograft survival in mice. *Immunology*. 121: 349–358.
165. Costa, C., M. C. Pizzolato, Y. Shen, Y. Wang, and W. L. Fodor. 2004. Cd86 blockade in genetically modified porcine cells delays xenograft rejection by inhibiting t-cell and nk-cell activation. *Cell Transplant*. 13: 75–87.
166. Ford, M. L., A. B. Adams, and T. C. Pearson. 2014. Targeting co-stimulatory pathways: Transplantation and autoimmunity. *Nat. Rev. Nephrol*. 10: 14–24.
167. Linsley, P. S., J. L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J. A. Ledbetter, and R. Peach. 1994. Human b7-1 (cd80) and b7-2 (cd86) bind with similar avidities but distinct kinetics to cd28 and ctla-4 receptors. *Immunity*. 1: 793–801.
168. Pizarro-Cerdá, J., and P. Cossart. 2018. Listeria monocytogenes: Cell biology of invasion and intracellular growth. *Microbiol. Spectr*. 6.
169. Ramaswamy, V., V. M. Cresence, J. S. Rejitha, M. U. Lekshmi, K. S. Dharsana, S. P. Prasad, and H. M. Vijila. 2007. Listeria--review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. 40: 4–13.
170. Farber, J. M., and P. I. Peterkin. 1991. Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev*. 55: 476–511.
171. Cossart, P. 2011. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium listeria monocytogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 108: 19484–19491.
172. Rki - rki-ratgeber - listeriose. 2021. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Listeriose.html;jsessionid=3262530A1FBFECE0C62F8C9B48324836.internet072#doc2396598bodyText2](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Listeriose.html;jsessionid=3262530A1FBFECE0C62F8C9B48324836.internet072#doc2396598bodyText2). Accessed 7 February 2021.
173. Lomonaco, S., D. Nucera, and V. Filipello. 2015. The evolution and epidemiology of listeria monocytogenes in europe and the united states. *Infect. Genet. Evol*. 35: 172–183.
174. Portnoy, D. A., V. Auerbuch, and I. J. Glomski. 2002. The cell biology of listeria monocytogenes infection: The intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J. Cell Biol*. 158: 409–414.
175. Vázquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev*. 14: 584–640.
176. Monack, D. M., and J. A. Theriot. 2001. Actin-based motility is sufficient for bacterial membrane protrusion formation and host cell uptake. *Cell. Microbiol*. 3: 633–647.
177. Cameron, L. A., P. A. Giardini, F. S. Soo, and J. A. Theriot. 2000. Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 1: 110–119.
178. Pagliano, P., F. Arslan, and T. Ascione. 2017. Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: Meningitis and bacteraemia. *Infez. Med*. 25: 210–216.
179. Posfay-Barbe, K. M., and E. R. Wald. 2009. Listeriosis. *Semin. Fetal Neonatal Med*. 14: 228–233.

180. Marie, C., and W. A. Petri. 2014. Regulation of virulence of entamoeba histolytica. *Annu. Rev. Microbiol.* 68: 493–520.
181. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Redaktion Deutsches Ärzteblatt. 2004. Epidemiologie, diagnostik und therapie der amöbiasis. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/44171/Epidemiologie-Diagnostik-und-Therapie-der-Amoebiasis>. Accessed 22 January 2021.
182. Tannicht, E. 1998. Entamoeba histolytica and e. Dispar: Comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92: 593–596.
183. Baxt, L. A., and U. Singh. 2008. New insights into entamoeba histolytica pathogenesis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21: 489–494.
184. Cdc - dpdx - amebiasis - laboratory diagnosis. 2021. <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/dx.html>. Accessed 3 March 2021.
185. 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: 729–733.
186. Bercu, T. E., W. A. Petri, and W. Behm, JR. 2007. Amebic colitis: New insights into pathogenesis and treatment. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 9: 429–433.
187. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Redaktion Deutsches Ärzteblatt. 2004. Epidemiologie, diagnostik und therapie der amöbiasis. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/44171/Epidemiologie-Diagnostik-und-Therapie-der-Amoebiasis>. Accessed 3 March 2021.
188. Meyer, M., H. Fehling, J. Matthiesen, S. Lorenzen, K. Schuldt, H. Bernin, M. Zaruba, C. Lender, T. Ernst, H. Ittrich, T. Roeder, E. Tannich, H. Lotter, and I. Bruchhaus. 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 pathogens.* 12: e1005853.
189. Campos-Rodríguez, R., M. Gutiérrez-Meza, R. A. Jarillo-Luna, M. E. Drago-Serrano, E. Abarca-Rojano, J. Ventura-Juárez, L. M. Cárdenas-Jaramillo, and J. Pacheco-Yeppez. 2016. A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. *Parasite.* 23: 6.
190. Velazquez, C., M. Shibayama-Salas, J. Aguirre-Garcia, V. Tsutsumi, and J. Calderon. 1998. Role of neutrophils in innate resistance to entamoeba histolytica liver infection in mice. *Parasite Immunol.* 20: 255–262.
191. França-Botelho, A. C., J. L. França, F. M. S. Oliveira, E. L. Franca, A. C. Honório-França, M. V. Caliari, and M. A. Gomes. 2011. Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis. *Parasit. Vectors.* 4: 62.
192. Campbell, D., and K. Chadee. 1997. Survival strategies of entamoeba histolytica: Modulation of cell-mediated immune responses. *Parasitology Today.* 13: 184–190.
193. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Redaktion Deutsches Ärzteblatt. 1996. Amöbenruhr und amöbenleberabszeß. Accessed 19 February 2021.
194. Helk, E., H. Bernin, T. Ernst, H. Ittrich, T. Jacobs, J. Heeren, F. Tacke, E. Tannich, and H. Lotter. 2013. Tnf $\alpha$ -mediated liver destruction by kupffer cells and ly6chi monocytes during entamoeba histolytica infection. *PLoS pathogens.* 9: e1003096.
195. Okunnu, B. M., and R. E. Berg. 2019. Neutrophils are more effective than monocytes at phagosomal containment and killing of listeria monocytogenes. *ImmunoHorizons.* 3: 573–584.

196. Pamer, E. G. 2004. Immune responses to listeria monocytogenes. *Nature reviews. Immunology*. 4: 812–823.
197. Harty, J. T., A. R. Tinnereim, and D. W. White. 2000. Cd8+ t cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology*. 18: 275–308.
198. Olivos-García, A., J. C. Carrero, E. Ramos, M. Nequiz, E. Tello, I. Montfort, and R. Pérez-Tamayo. 2007. Late experimental amebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and n-acetylcysteine. *Exp. Mol. Pathol.* 82: 310–315.
199. Noll, J., E. Helk, H. Fehling, H. Bernin, C. Marggraff, T. Jacobs, S. Huber, P. Pelczar, T. Ernst, H. Ittrich, B. Otto, H.-W. Mittrücker, C. Hölscher, F. Tacke, I. Bruchhaus, E. Tannich, and H. Lotter. 2016. Il-23 prevents il-13-dependent tissue repair associated with ly6c(lo) monocytes in entamoeba histolytica-induced liver damage. *J. Hepatol.* 64: 1147–1157.
200. Lischke, T., K. Heesch, V. Schumacher, M. Schneider, F. Haag, F. Koch-Nolte, and H.-W. Mittrücker. 2013. Cd38 controls the innate immune response against listeria monocytogenes. *Infect. Immun.* 81: 4091–4099.
201. Estrada-Figueroa, L. A., Y. Ramírez-Jiménez, C. Osorio-Trujillo, M. Shibayama, F. Navarro-García, C. García-Tovar, and P. Talamás-Rohana. 2011. Absence of cd38 delays arrival of neutrophils to the liver and innate immune response development during hepatic amoebiasis by entamoeba histolytica. *Parasite Immunol.* 33: 661–668.
202. Goossens, P. L., and G. Milon. 1992. Induction of protective cd8+ t lymphocytes by an attenuated listeria monocytogenes acta mutant. *International immunology*. 4: 1413–1418.
203. Giladi, A., L. K. Wagner, H. Li, D. Dörr, C. Medaglia, F. Paul, A. Shemer, S. Jung, S. Yona, M. Mack, A. Leutz, I. Amit, and A. Mildner. 2020. Cxcl10+ monocytes define a pathogenic subset in the central nervous system during autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* 21: 525–534.
204. Mildner, A., M. Mack, H. Schmidt, W. Brück, M. Djukic, M. D. Zabel, A. Hille, J. Priller, and M. Prinz. 2009. Ccr2+ly-6chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain*. 132: 2487–2500.
205. Combadière, C., S. Potteaux, J.-L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E. J. Lee, P. Debré, A. Tedgui, P. M. Murphy, and Z. Mallat. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in cx3cr1/apolipoprotein e double knockout mice. *Circulation*. 107: 1009–1016.
206. Channappanavar, R., A. R. Fehr, R. Vijay, M. Mack, J. Zhao, D. K. Meyerholz, and S. Perlman. 2016. Dysregulated type i interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in sars-cov-infected mice. *Cell Host Microbe*. 19: 181–193.
207. Fehr, T., G. Schoedon, B. Odermatt, T. Holtschke, M. Schneemann, M. F. Bachmann, T. W. Mak, I. Horak, and R. M. Zinkernagel. 1997. Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthase for protection against murine listeriosis. *J. Exp. Med.* 185: 921–931.
208. Ko, J., A. Gendron-Fitzpatrick, and G. A. Splitter. 2002. Susceptibility of ifn regulatory factor-1 and ifn consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *J. Immunol.* 168: 2433–2440.
209. Gariglio, M., M. de Andrea, M. Lembo, M. Ravotto, C. Zappador, G. Valente, and S. Landolfo. 1998. The murine homolog of the hin 200 family, ifi 204, is constitutively expressed in myeloid cells and selectively induced in the monocyte/macrophage lineage. *J. Leukoc. Biol.* 64: 608–614.

- 
210. Subramanian, G., R. Chakravarti, and S. Chattopadhyay. 2018. Ifi204/p204, a new piece in the sepsis puzzle. *Ann. Transl. Med.* 6: S12.
211. Roy, S., R. Guler, S. P. Parihar, S. Schmeier, B. Kaczkowski, H. Nishimura, J. W. Shin, Y. Negishi, M. Ozturk, R. Hurdal, A. Kubosaki, Y. Kimura, M. J. L. de Hoon, Y. Hayashizaki, F. Brombacher, and H. Suzuki. 2015. Batf2/irf1 induces inflammatory responses in classically activated macrophages, lipopolysaccharides, and mycobacterial infection. *J. Immunol.* 194: 6035–6044.
212. Guler, R., S. Roy, H. Suzuki, and F. Brombacher. 2015. Targeting batf2 for infectious diseases and cancer. *Oncotarget.* 6: 26575–26582.
213. Shang, Y., M. Coppo, T. He, F. Ning, L. Yu, L. Kang, B. Zhang, C. Ju, Y. Qiao, B. Zhao, M. Gessler, I. Rogatsky, and X. Hu. 2016. The transcriptional repressor hes1 attenuates inflammation by regulating transcription elongation. *Nat. Immunol.* 17: 930–937.
214. Kato, T., M. Sakata-Yanagimoto, H. Nishikii, M. Ueno, Y. Miyake, Y. Yokoyama, Y. Asabe, Y. Kamada, H. Muto, N. Obara, K. Suzukawa, Y. Hasegawa, I. Kitabayashi, K. Uchida, A. Hirao, H. Yagita, R. Kageyama, and S. Chiba. 2015. Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through flt3 repression. *Leukemia.* 29: 576–585.
215. Kim, H. 2017. The transcription factor mafb promotes anti-inflammatory m2 polarization and cholesterol efflux in macrophages. *Scientific reports.* 7: 7591.
216. Liu, T.-M., H. Wang, D.-N. Zhang, and G.-Z. Zhu. 2019. Transcription factor mafb suppresses type i interferon production by cd14+ monocytes in patients with chronic hepatitis c. *Front. Microbiol.* 10: 1814.
217. Sevilla, L. M., and P. Pérez. 2019. Glucocorticoids and glucocorticoid-induced-leucine-zipper (gilz) in psoriasis. *Front. Immunol.* 10: 2220.
218. Hanna, R. N., L. M. Carlin, H. G. Hubbeling, D. Nackiewicz, A. M. Green, J. A. Punt, F. Geissmann, and C. C. Hedrick. 2011. The transcription factor nr4a1 (nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of ly6c- monocytes. *Nat. Immunol.* 12: 778–785.
219. Hilgendorf, I., L. M. S. Gerhardt, T. C. Tan, C. Winter, T. A. W. Holderried, B. G. Chousterman, Y. Iwamoto, R. Liao, A. Zirlik, M. Scherer-Crosbie, C. C. Hedrick, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, and F. K. Swirski. 2014. Ly-6chigh monocytes depend on nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circulation research.* 114: 1611–1622.
220. Lücke, K., I. Yan, S. Krohn, A. Volmari, S. Klinge, J. Schmid, V. Schumacher, O. M. Steinmetz, S. Rose-John, and H.-W. Mittrücker. 2018. Control of listeria monocytogenes infection requires classical il-6 signaling in myeloid cells. *PLoS one.* 13: e0203395.
221. Maldonado-Bernal, C., C. J. Kirschning, Y. Rosenstein, L. M. Rocha, N. Rios-Sarabia, M. Espinosa-Cantellano, I. Becker, I. Estrada, R. M. Salazar-González, C. López-Macías, H. Wagner, J. Sánchez, and A. Isibasi. 2005. The innate immune response to entamoeba histolytica lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol.* 27: 127–137.
222. Ngoben, R., M. M. Abhyankar, N. M. Jiang, L. A. Farr, A. Samie, R. Haque, and S. N. Moonah. 2017. Entamoeba histolytica-encoded homolog of macrophage migration inhibitory factor contributes to mucosal inflammation during amebic colitis. *J. Infect. Dis.* 215: 1294–1302.
223. Moonah, S. N., M. M. Abhyankar, R. Haque, and W. A. Petri. 2014. The macrophage migration inhibitory factor homolog of entamoeba histolytica binds to and immunomodulates host macrophages. *Infect. Immun.* 82: 3523–3530.

224. Lejeune, M., F. Moreau, and K. Chadee. 2011. Prostaglandin e2 produced by entamoeba histolytica signals via ep4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions. *Am. J. Pathol.* 179: 807–818.
225. Irmer, H., M. Tillack, L. Biller, G. Handal, M. Leippe, T. Roeder, E. Tannich, and I. Bruchhaus. 2009. Major cysteine peptidases of entamoeba histolytica are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity. *Mol. Microbiol.* 72: 658–667.
226. Hellberg, A., R. Nickel, H. Lotter, E. Tannich, and I. Bruchhaus. 2001. Overexpression of cysteine proteinase 2 in entamoeba histolytica or entamoeba dispar increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell. Microbiol.* 3: 13–20.
227. Leippe, M. 1997. Amoebapores. *Parasitology Today.* 13: 178–183.
228. Bermeo, G., A. Ibarra, E. García, A. Flores-Romero, G. Rico-Rosillo, R. Marroquín, H. Mestre, C. Flores, F. Blanco-Favela, and R. Silva-García. 2013. Monocyte locomotion inhibitory factor produced by e. Histolytica improves motor recovery and develops neuroprotection after traumatic injury to the spinal cord. *Biomed Res. Int.* 2013: 340727.
229. Choy, S. L., H. Bernin, T. Aiba, E. Bifeld, S. C. Lender, M. Mühlenpfordt, J. Noll, J. Eick, C. Marggraff, H. Niss, N. G. Roldán, S. Tanaka, M. Kitamura, K. Fukase, J. Clos, E. Tannich, Y. Fujimoto, and H. Lotter. 2017. Synthetic analogs of an entamoeba histolytica glycolipid designed to combat intracellular leishmania infection. *Scientific reports.* 7: 9472.
230. Jiang, Z., P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, M. Huber, C. Kalis, S. Keck, C. Galanos, M. Freudenberg, and B. Beutler. 2005. Cd14 is required for myd88-independent lps signaling. *Nat. Immunol.* 6: 565–570.
231. Anas, A., T. van der Poll, and A. F. de Vos. 2010. Role of cd14 in lung inflammation and infection. *Crit. Care.* 14: 209.
232. Delgado, M., J. Leceta, C. Abad, C. Martinez, D. Ganea, and R. P. Gomariz. 1999. Shedding of membrane-bound cd14 from lipopolysaccharide-stimulated macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *J. Neuroimmunol.* 99: 61–71.
233. Pedron, T., R. Girard, and R. Chaby. 1995. Variation of lps-binding capacity, epitope expression, and shedding of membrane-bound cd14 during differentiation of human monocytes. *J. Immunol.* 155: 1460–1471.
234. Fedele, G., L. Frasca, R. Palazzo, E. Ferrero, F. Malavasi, and C. M. Ausiello. 2004. Cd38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in cd83 expression and il-12 induction. *Eur. J. Immunol.* 34: 1342–1350.
235. Amici, S. A., N. A. Young, J. Narvaez-Miranda, K. A. Jablonski, J. Arcos, L. Rosas, T. L. Papenfuss, J. B. Torrelles, W. N. Jarjour, and M. Guerau-de-Arellano. 2018. Cd38 is robustly induced in human macrophages and monocytes in inflammatory conditions. *Front. Immunol.* 9: 1593.
236. Lande, R., F. Urbani, B. Di Carlo, G. Sconocchia, S. Deaglio, A. Funaro, F. Malavasi, and C. M. Ausiello. 2002. Cd38 ligation plays a direct role in the induction of il-1 $\beta$ , il-6, and il-10 secretion in resting human monocytes. *Cell. Immunol.* 220: 30–38.
237. Fumey, W., J. Koenigsdorf, V. Kunick, S. Menzel, K. Schütze, M. Unger, L. Schriewer, F. Haag, G. Adam, A. Oberle, M. Binder, R. Fliegert, A. Guse, Y. J. Zhao, H. Cheung Lee, F. Malavasi, F. Goldbaum, R. van Hegelsom, C. Stortelers, P. Bannas, and F. Koch-Nolte. 2017. Nanobodies effectively



- modulate the enzymatic activity of cd38 and allow specific imaging of cd38+ tumors in mouse models in vivo. *Sci Rep.* 7: 14289.
238. Shubinsky, G., and M. Schlesinger. 1997. The cd38 lymphocyte differentiation marker: New insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. *Immunity.* 7: 315–324.
239. Sandoval-Montes, C., and L. Santos-Argumedo. 2005. Cd38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature t cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J. Leukoc. Biol.* 77: 513–521.
240. Choe, C., K. Lardong, M. Gelderblom, P. Ludewig, F. Leyboldt, F. Koch-Nolte, C. Gerloff, and T. Magnus. 2011. Cd38 exacerbates focal cytokine production, postischemic inflammation and brain injury after focal cerebral ischemia. *PloS one.* 6: e19046.
241. Kang, J., K.-H. Park, J.-J. Kim, E.-K. Jo, M.-K. Han, and U.-H. Kim. 2012. The role of cd38 in fcy receptor (fcyr)-mediated phagocytosis in murine macrophages. *The Journal of biological chemistry.* 287: 14502–14514.
242. Schneider, M., V. Schumacher, T. Lischke, K. Lücke, C. Meyer-Schwesinger, J. Velden, F. Koch-Nolte, and H.-W. Mittrücker. 2015. Cd38 is expressed on inflammatory cells of the intestine and promotes intestinal inflammation. *PloS one.* 10: e0126007.
243. Korver, W., M. Carsillo, J. Yuan, N. Idamakanti, M. Wagoner, P. Shi, C. Q. Xia, G. Smithson, L. McLean, J. Zalevsky, and E. R. Fedyk. 2019. A reduction in b, t, and natural killer cells expressing cd38 by tak-079 inhibits the induction and progression of collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 370: 182–196.
244. Smeets, T. J. M., R. J. E. M. Dolhain, F. C. Breedveld, and P. P. Tak. 1998. Analysis of the cellular infiltrates and expression of cytokines in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *J. Pathol.* 186: 75–81.
245. Mestas, J., and C. C. W. Hughes. 2004. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172: 2731–2738.
246. Pinto, B. F., N. I. Medeiros, A. Teixeira-Carvalho, S. M. Eloi-Santos, T. C. M. Fontes-Cal, D. A. Rocha, W. O. Dutra, R. Correa-Oliveira, and J. A. S. Gomes. 2018. Cd86 expression by monocytes influences an immunomodulatory profile in asymptomatic patients with chronic chagas disease. *Front. Immunol.* 9: 454.
247. Boncompain, G., B. Schneider, C. Delevoye, O. Kellermann, A. Dautry-Varsat, and A. Subtil. 2010. Production of reactive oxygen species is turned on and rapidly shut down in epithelial cells infected with chlamydia trachomatis. *Infect. Immun.* 78: 80–87.
248. Alfadda, A. A., and R. M. Sallam. 2012. Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 936486.
249. Tsutsumi, V., R. Mena-Lopez, F. Anaya-Velazquez, and A. Martinez-Palomo. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117: 81–91.
250. Jarillo-Luna, R., R. Campos-Rodríguez, and V. Tsutsumi. 2002. Entamoeba histolytica: Immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Experimental Parasitology.* 101: 40–56.
251. Pillich, H., M. Puri, and T. Chakraborty. 2017. Acta of listeria monocytogenes and its manifold activities as an important listerial virulence factor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 399: 113–132.

- 
252. Appelberg, R., and I. S. Leal. 2000. Mutants of *listeria monocytogenes* defective in in vitro invasion and cell-to-cell spreading still invade and proliferate in hepatocytes of neutropenic mice. *Infect. Immun.* 68: 912–914.
253. Souza, V. C. A. de, D. M. N. Moura, M. C. A. B. de Castro, P. T. Bozza, L. de Almeida Paiva, C. J. B. Fernandes, R. L. C. Leão, J. P. Lucena, R. E. de Araujo, A. J. de Melo Silva, R. C. B. Q. Figueiredo, and S. A. de Oliveira. 2019. Adoptive transfer of bone marrow-derived monocytes ameliorates schistosoma mansoni - induced liver fibrosis in mice. *Sci Rep.* 9: 6434.
254. Parsa, R., P. Andresen, A. Gillett, S. Mia, X.-M. Zhang, S. Mayans, D. Holmberg, and R. A. Harris. 2012. Adoptive transfer of immunomodulatory m2 macrophages prevents type 1 diabetes in nod mice. *Diabetes.* 61: 2881–2892.
255. Garcia-Bonilla, L., D. Brea, C. Benakis, D. A. Lane, M. Murphy, J. Moore, G. Racchumi, X. Jiang, C. Iadecola, and J. Anrather. 2018. Endogenous protection from ischemic brain injury by preconditioned monocytes. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience.* 38: 6722–6736.
256. Kolb-Mäurer, A., U. Kämmerer, M. Mäurer, I. Gentschev, E.-B. Brähler, P. Rieckmann, and E. Kämpgen. 2003. Production of il-12 and il-18 in human dendritic cells upon infection by *listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 255–262.
257. Clark, S. E., R. L. Schmidt, D. S. McDermott, and L. L. Lenz. 2018. A batf3/nlrp3/il-18 axis promotes natural killer cell il-10 production during *listeria monocytogenes* infection. *Cell Rep.* 23: 2582–2594.
258. Lochner, M., K. Kastenmüller, M. Neuenhahn, H. Weighardt, D. H. Busch, W. Reindl, and I. Förster. 2008. Decreased susceptibility of mice to infection with *listeria monocytogenes* in the absence of interleukin-18. *Infect. Immun.* 76: 3881–3890.
259. Pfaff, A. W., A. K. Kirch, W. H. Hoffmann, M. Banla, H. Schulz-Key, S. M. Geiger, and P. T. Soboslay. 2003. Regulatory effects of il-12 and il-18 on onchocerca volvulus- and entamoeba histolytica-specific cellular reactivity and cytokine profiles. *Parasite Immunol.* 25: 325–332.
260. Que, X., S.-H. Kim, M. Sajid, L. Eckmann, C. A. Dinarello, J. H. McKerrow, and S. L. Reed. 2003. A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18. *Infect. Immun.* 71: 1274–1280.
261. Tomura, M., S. Maruo, J. Mu, X. Y. Zhou, H. J. Ahn, T. Hamaoka, H. Okamura, K. Nakanishi, S. Clark, M. Kurimoto, and H. Fujiwara. 1998. Differential capacities of cd4+, cd8+, and cd4-cd8- t cell subsets to express il-18 receptor and produce ifn-gamma in response to il-18. *J. Immunol.* 160.
262. Sousa, L. M., M. B. Carneiro, L. M. dos Santos, C. C. Natale, M. E. Resende, D. M. Mosser, and L. Q. Vieira. 2015. Il-18 contributes to susceptibility to leishmania amazonensis infection by macrophage-independent mechanisms. *Cytokine.* 74: 327–330.
263. Zalinger, Z. B., R. Elliott, and S. R. Weiss. 2017. Role of the inflammasome-related cytokines il-1 and il-18 during infection with murine coronavirus. *J. Neurovirol.* 23: 845–854.

---

## Publikationen

**Fehling H, Choy SL, Ting F**, Landschulze D, Bernin H, Lender SC, Mühlenpfordt M, Bifeld E, Eick J, Marggraff C, Kottmayr N, Groneberg M, **Hoenow S**, Sellau J, Clos J, Meier C, Lotter H.; Antileishmanial Effects of Synthetic EhPIb Analogs Derived from the Entamoeba histolytica Lipopeptidephosphoglycan.; Antimicrob Agents Chemother. 2020 Jun 23;64(7):e00161-20. doi: 10.1128/AAC.00161-20

**Sellau J**, Groneberg M, Fehling H, Thye T, **Hoenow S**, Marggraff C, Weskamm M, Hansen C, Stanelle-Bertram S, Kuehl S, Noll J, Wolf V, Metwally NG, Hagen SH, Dorn C, Wernecke J, Ittrich H, Tannich E, Jacobs T, Bruchhaus I, Altfeld M, Lotter H. Androgens predispose males to monocyte-mediated immunopathology by inducing the expression of leukocyte recruitment factor CXCL1; Nat Commun. 2020 Jul 10;11(1):3459. doi: 10.1038/s41467-020-17260-y

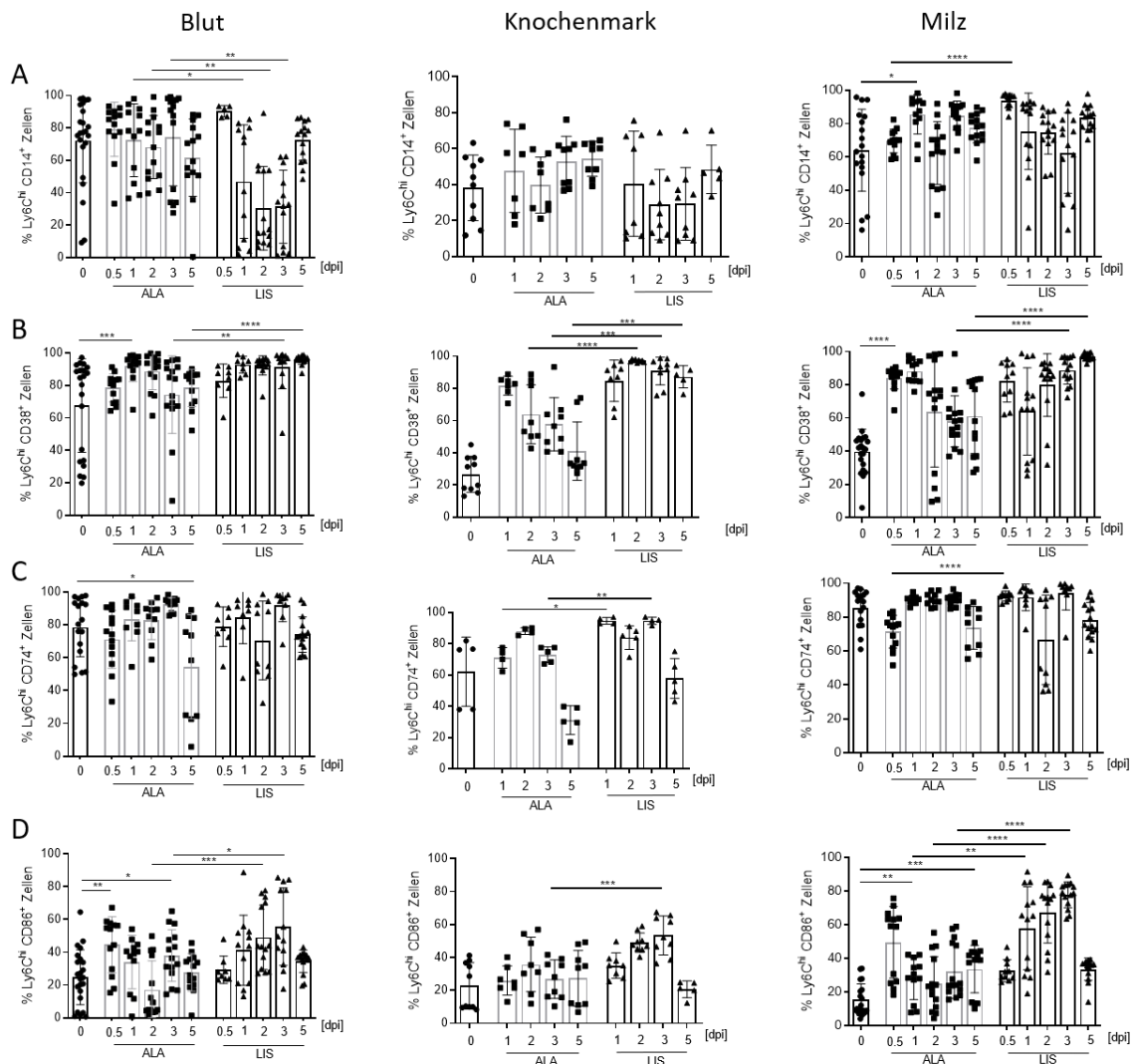
**Tuku B**, Stanelle-Bertram S, Sellau J, Beck S, Bai T, Kouassi NM, Preuß A, **Hoenow S**, Renné T, Lotter H, Gabriel G.; Testosterone Protects Against Severe Influenza by Reducing the Pro-Inflammatory Cytokine Response in the Murine Lung; Front Immunol. 2020 Apr 22; 11:697. doi: 10.3389/fimmu.2020.00697

**Stanelle-Bertram S**, Walendy-Gnirß K, Speiseder T, Thiele S, Asante IA, Dreier C, Kouassi NM, Preuß A, Pilnitz-Stolze G, Müller U, Thanisch S, Richter M, Scharrenberg R, Kraus V, Dörk R, Schau L, Herder V, Gerhauser I, Pfankuche VM, Käufer C, Walzl I, Moraes T, Sellau J, **Hoenow S**, Schmidt-Chanasit J, Jansen S, Schattling B, Ittrich H, Bartsch U, Renné T, Bartenschlager R, Arck P, Cadar D, Friese MA, Vapalahti O, Lotter H, Benites S, Rolling L, Gabriel M, Baumgärtner W, Morellini F, Hölter SM, Amarie O, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Löscher W, Calderon de Anda F, Gabriel G. Male offspring born to mildly ZIKV-infected mice are at risk of developing neurocognitive disorders in adulthood.; Nat Microbiol. 2018 Oct;3(10):1161-1174. doi: 10.1038/s41564-018-0236-1

---

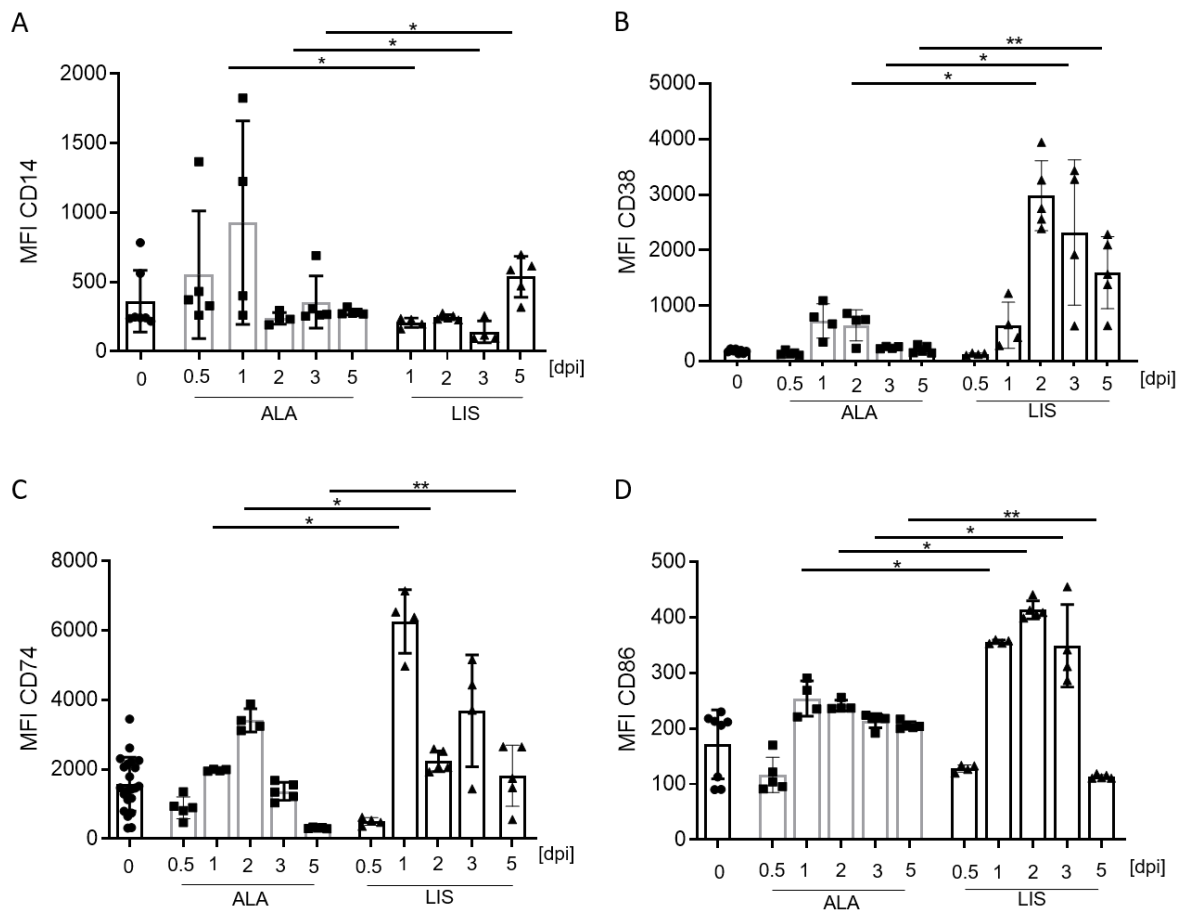
**Fehling H**, Niss H, Bea A, Kottmayr N, Brinker C, **Hoenow S**, Sellau J, Gilberger TW, Ting F, Landschulze D, Meier C, Clos J, Lotter H.; High Content Analysis of Macrophage-Targeting EhPIb-Compounds against Cutaneous and Visceral Leishmania Species; *Microorganisms*. 2021 Feb 18;9(2):422. doi: 10.3390/microorganisms9020422

## Anhang



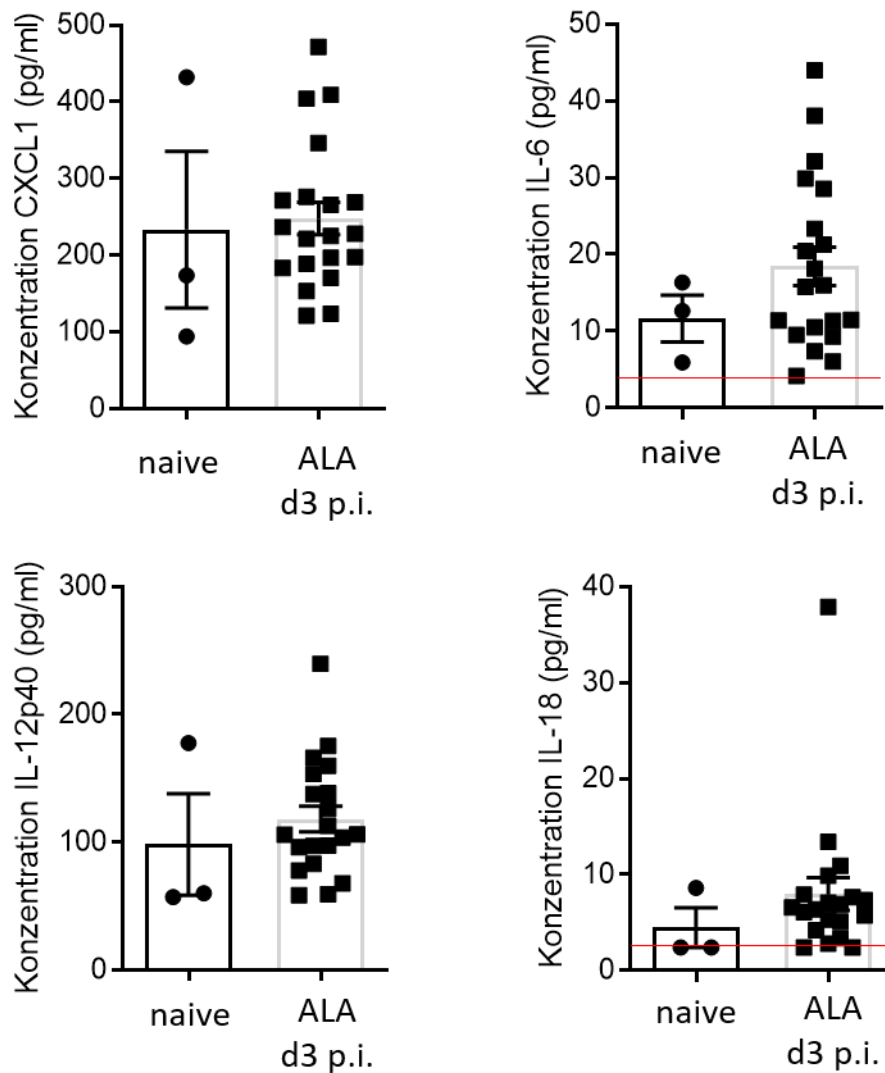
**Anhang 34: Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf pro-inflammatorischen Monozyten im Knochenmark, der Milz und dem Blut im Zeitverlauf beider Infektionsmodelle**

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, zu den indizierten Zeitpunkten wurde das Blut, das Knochenmark und die Milz entnommen und die Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten durchflusszytometrisch analysiert; Darstellung der positiv angefärbten Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in % für (A) CD14, (B) CD38, (C) CD74 und (D) CD86 im Verlauf beider Infektionsmodelle (ALA = Quadrate; LIS = Dreiecke) und im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe (Kreise); Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}}=27$ ,  $n_{\text{infiziert}}=12-19$ ; Für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) bestimmt.



### Anhang 35: Analyse des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) auf pro-inflammatorischen Monozyten aus der Leber im Zeitverlauf beider Infektionsmodelle

Die Infektionen wurden nach 2.2.1.3 und 2.2.1.5 durchgeführt, zu den indizierten Zeitpunkten wurde die Leber entnommen und die Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten durchflusszytometrisch analysiert; Darstellung des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) der Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten für (A) CD14, (B) CD38, (C) CD74 und (D) CD86 im Verlauf beider Infektionsmodelle (ALA = Quadrate; LIS = Dreiecke) und im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe (Kreise); Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt;  $n_{\text{naiv}}=27$ ,  $n_{\text{infiziert}}=12-19$ ; Für alle Gruppen erfolgte ein Normalverteilungstest; Signifikanzwerte wurden entweder mittels Mann-Whitney-Test (Nicht-Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) oder mittels Students-T-Test (Normalverteilung) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) bestimmt.



### Anhang 36: Zytokinkonzentration im Serum nach Infektion mit *E. histolytica*

Männliche C57Bl/6 Wildtyp Mäuse wurde intrahepatisch mit *E. histolytica* ( $2 \times 10^5$ ) infiziert, zu den indizierten Zeitpunkten wurde das Blut entnommen, Serum gewonnen und aus diesem die Zytokinkonzentrationen mittels Multizytokin-Assay (Legendplex, BioLegend) determiniert. (A) CCL2, (B) IL-10, (C) CCL3 und (D) IFN $\gamma$  Konzentrationen im Leberlysat von *E. histolytica* oder *L. monocytogenes* infizierten Mäusen; n=5; gezeigt ist eins von drei repräsentativen Experimenten; rote Linie = Nachweisgrenze; Daten sind als Median  $\pm$  SD dargestellt; Signifikanzwerte wurden mittels Mann-Whitney-Test bestimmt (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).