



**Die Rolle von dendritischen Zellen und  
Chemokinen bei der Regulation der  
Immunantwort gegen Erreger der kutanen  
Leishmaniose**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Mario Steigerwald**

aus

Aschaffenburg

Würzburg 2004

Eingereicht am:

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Heidrun Moll
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Hacker  
der Dissertation

1. Prüfer: Frau Prof. Dr. Heidrun Moll
2. Prüfer: Herr Prof. Dr. Jörg Hacker  
der mündlichen Prüfung

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Leishmaniose — eine Übersicht</b> .....	<b>1</b>
1.2	<b>Leishmaniose — der Parasit</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	Morphologie, Physiologie und Lebenszyklus	2
1.2.2	Die Transformation von der amastigoten zur promastigoten Form im Vektor	3
1.2.3	Die Transformation von der promastigoten zur amastigoten Form im Wirt	4
1.2.3.1	Die Abwehr des Parasiten mit Hilfe des Komplementsystems	4
1.2.3.2	Mechanismen zum Überleben des Erregers im Phagosom und Phagolysosom	5
1.3	<b>Leishmaniose — der Erkrankung</b> .....	<b>10</b>
1.3.1	Klinische Erscheinungsbilder der Leishmaniose beim Menschen	10
1.3.1.1	Die viszerale Leishmaniose	11
1.3.1.2	Die mukokutane Leishmaniose	11
1.3.1.3	Die kutane Leishmaniose	12
1.3.2.	Die Immunologie bei der Entwicklung einer Suszeptibilität und Resistenz im Verlauf einer <i>L. major</i> - Infektion	13
1.3.3	Diagnose und Behandlung der Leishmaniose	15
1.4	<b>Dendritische Zellen — eine Übersicht</b> .....	<b>16</b>
1.4.1	Langerhans-Zellen	15
1.4.2	Dendritische Zellen	18
1.4.2.1	Heterogenität muriner dendritischer Zellen	19
1.5	<b>Chemokine — eine Übersicht</b> .....	<b>20</b>
1.5.1	Die Nomenklatur der Chemokine und ihrer Rezeptoren	20
1.5.2	Die Bindung eines Chemokins an seinen Rezeptor	22
1.5.3	Chemokine und dendritische Zellen	25
1.5.4.	Chemokine und dendritische Zellen bei der kutanen Leishmaniose	27
1.6	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
2.1	<b>Material</b> .....	<b>30</b>
2.1.1	Bakterienkultur	30
2.1.1.1	Bakterienstämme	30
2.1.1.2	Medien für die Bakterienkultur	30
2.1.2	Reagenzien für die Zellkultur und Plastikmaterial	31

2.1.3	Mäuse	32
2.1.4	Plasmide und Vektoren	32
2.1.5	Antibiotika	33
2.1.6	Sonstige Puffer und Lösungen	33
2.1.7	Geräte	34
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.2.1	Bakterienzucht	36
2.2.1.1	Herstellen einer Flüssigkultur	36
2.2.1.2	Herstellen einer Glycerinkultur	36
2.2.2	Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> nach Dagert und Ehrlich	37
2.2.3	Gewinnung und Kultivierung von dendritischen Zellen	37
2.2.4	Isolierung von Peritonealexsudat-Makrophagen	38
2.2.5	Präparation von Langerhans-Zellen	39
2.2.6	Agarosegele	39
2.2.7	Herstellung von Blutagarplatten	40
2.2.8	Gewinnung und Kultivierung virulenter Leishmanien	40
2.2.9	Bestimmung des Läsionsverlaufs von Mäusen	41
2.2.10	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	42
2.2.11	DNA-Transformation	43
2.2.12	Gesamt-RNA Präparation	43
2.2.13	RNase Protection Assay	44
2.2.14	Migrationstest	45
2.2.14.1	Analyse der Migrationsaktivität von dendritischen Zellen	45
2.2.14.2	Gewinnung von T-Zellen und Analyse ihres Migrationsverhaltens	46
2.2.15	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	47
2.2.15.1	Synthese der cDNA und Reverse-Transkriptase Reaktion	47
2.2.15.2	PCR	48
2.2.16	Bestimmung der Infektionsrate von Zellen mit Hilfe von Acridinorange und Ethidiumbromid	49
2.2.17	<i>In situ</i> -Hybridisierung	50
2.2.17.1	Beschichtung der Objektträger mit poly-L-Lysin	50
2.2.17.2	Herstellung von <sup>35</sup> S-markierten RNA-Sonden ( <i>In-vitro</i> -Transkription)	51
2.2.17.3	Gewebefixierung	52
2.2.17.4	Hybridisierung	53
2.2.18	FACS-Analysen	54

2.2.19	Konfokale Lasermikroskopie	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Analyse der Chemokinexpression in Hautläsionen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen .....	57
3.2	Untersuchungen zum Einfluss von CCL2/MCP-1 auf die Infektionsrate von Langerhanszellen .....	63
3.3	Analyse des Migrationsverhaltens von Langerhans-Zellen nach einer Infektion mit <i>L. major</i> .....	65
3.4	Einfluss einer Leishmanieninfektion auf die Chemokinrezeptor-Expression in dendritischen Zellen .....	67
3.5	Einfluss einer Leishmanieninfektion auf die Chemokin-Expression in dendritischen Zellen .....	74
3.6	Das Migrationsverhalten von dendritischen Zellen des Knochenmarks nach einer Leishmanieninfektion .....	79
3.7	FACS-Analyse der Chemokinrezeptorexpression infizierter und nicht infizierter dendritischer Zellen .....	83
3.8	Konfokale Lasermikroskopie-Analyse der Chemokinrezeptor-expression infizierter und nicht infizierter dendritischer Zellen.....	86
3.9	Die Wirkung von nicht infizierten und infizierten dendritischen Zellen auf das Migrationsverhalten von T-Zellen .....	89
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	<b>111</b>

<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>131</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>131</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>134</b>
	<b>Wissenschaftliche Veröffentlichungen</b>	<b>135</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>136</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>137</b>



## 1. Einleitung

### 1.1 Leishmaniose – eine Übersicht

Leishmaniose ist eine parasitäre Infektionskrankheit von Mensch und Tier, welche durch den Biss von einigen infizierten, weiblichen Sandmückenspezies der Gattung *Phlebotomus* und *Lutzomyia* übertragen wird. Der Sandmückenvektor wird hierbei von Protozoen der Gattung *Leishmania* (Familie: *Trypanosomatidae*, Ordnung: *Kinetoplastida*) infiziert. Bisher sind ca. 30 Sandfliegenspezies bekannt, welche nach der Aufnahme von Wirtsblut mit dem Erreger infiziert werden können. Als Wirte dienen hierbei der Mensch, Nagetiere und domestizierte Tiere (wie z. B. Hunde), wobei sich die meisten Leishmanienarten zoonotisch verbreiten. Derzeit sind weltweit ca. zwölf Millionen Menschen in 88 Ländern mit Leishmanien infiziert und jährlich werden etwa zwei Millionen neuer Fälle registriert (WHO, 2002).

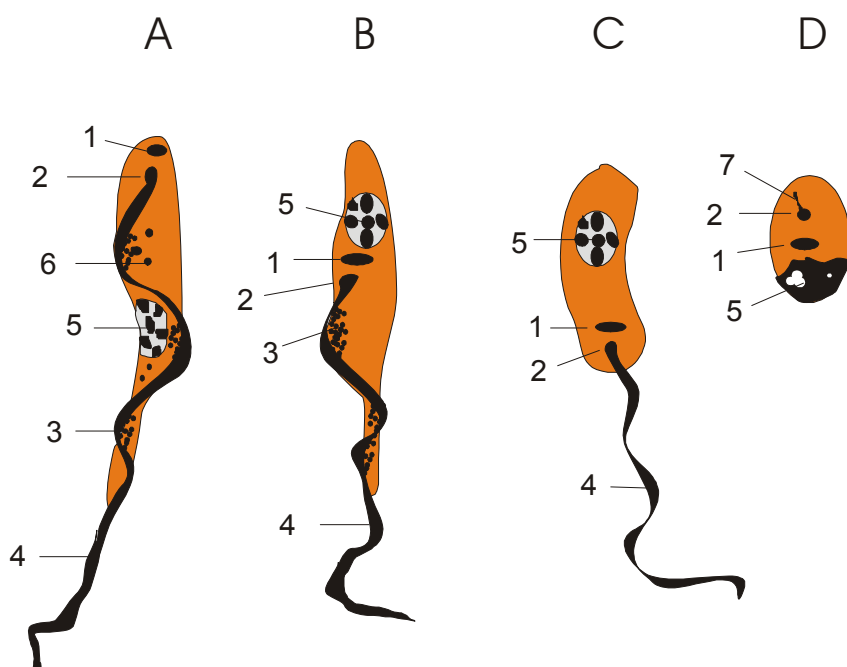
Die geographische Verbreitung der Leishmaniose wird stark von Faktoren bedingt, welche überwiegend auf die Bevölkerungsentwicklung zurückzuführen sind. So führen z. B. landwirtschaftlich orientierte Industrieprojekte die nicht immune städtische Bevölkerung in ländliche Regionen. Dammbau, Bewässerungssysteme, Brunnen sowie Abholzung tragen ebenso zur Verbreitung der Leishmaniose bei. Jedoch wird die geographische Verbreitung der Leishmaniose durch das natürliche Vorkommen der Sandfliege auf warme südliche Regionen der Erde limitiert. In diesem Zusammenhang sei jedoch erwähnt, dass das Vorkommen der Sandmücke bereits in Deutschland festgestellt wurde. So wurden im Jahre 2001 117 Sandfliege an 15 verschiedenen Stellen in elf Ortschaften (Kaiserstuhl) gefangen.

Immer mehr Bedeutung erlangt die Leishmaniose durch Co-Infektionen. Häufig kommt es bei Menschen, welche durch infizierte Sandmücken gebissen werden, nicht zum Ausbruch der Krankheit. Hingegen entwickelt sich bei immunsupprimierten Personen (z. B. als Folge einer HIV-Infektion, immunosuppressiven Behandlung bei Organ-Transplantation oder Autoimmunkrankheit) schnell das klinische Erscheinungsbild einer stark ausgeprägten Leishmaniose. Weltweit werden *Leishmania*-HIV-Co-Infektionen immer mehr zu einem sehr ernst zu nehmenden Gesundheitsproblem.

## 1.2 *Leishmania* - der Parasit

### 1.2.1 Morphologie, Physiologie und Lebenszyklus

Die Gattung *Leishmania* gehört zur Familie der *Trypanosomatidae*, welche weiterhin die Gattungen *Trypanosoma*, *Leptomonas* und *Crithidia* umfasst (Tabelle 1). Diese Flagellaten-Familie ist durch eine spindelförmige Geißel mit Basalkorn neben einem Kinetoplasten charakterisiert (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Erscheinungsformen der *Trypanosomatidae*: **A)** trypomastigote oder Trypanosomen-Form; **B)** epimastigote oder Crithidia-Form; **C)** promastigote oder Leptomonas-Form (nur bei Leishmanien); **D)** amastigote oder Leishmania-Form; **1)** Kinetoplast; **2)** Basalkorn; **3)** undulierende Membran mit Geißel; **4)** freie Geißel; **5)** Kern; **6)** Granula; **7)** Geißelrest

Als ein besonderes Merkmal der Gattung *Leishmania* gilt der Lebenszyklus. Hierbei vollzieht der Parasit sowohl einen Wirts- als auch einen Formwechsel, bei dem er verschiedene morphologische Entwicklungsstadien durchläuft, von denen man zwei Hauptformen definiert und welche zum einen im Vektor als promastigote Form mit

Flagellum und zum anderen im Wirt als amastigotes Entwicklungsstadium zu finden sind.

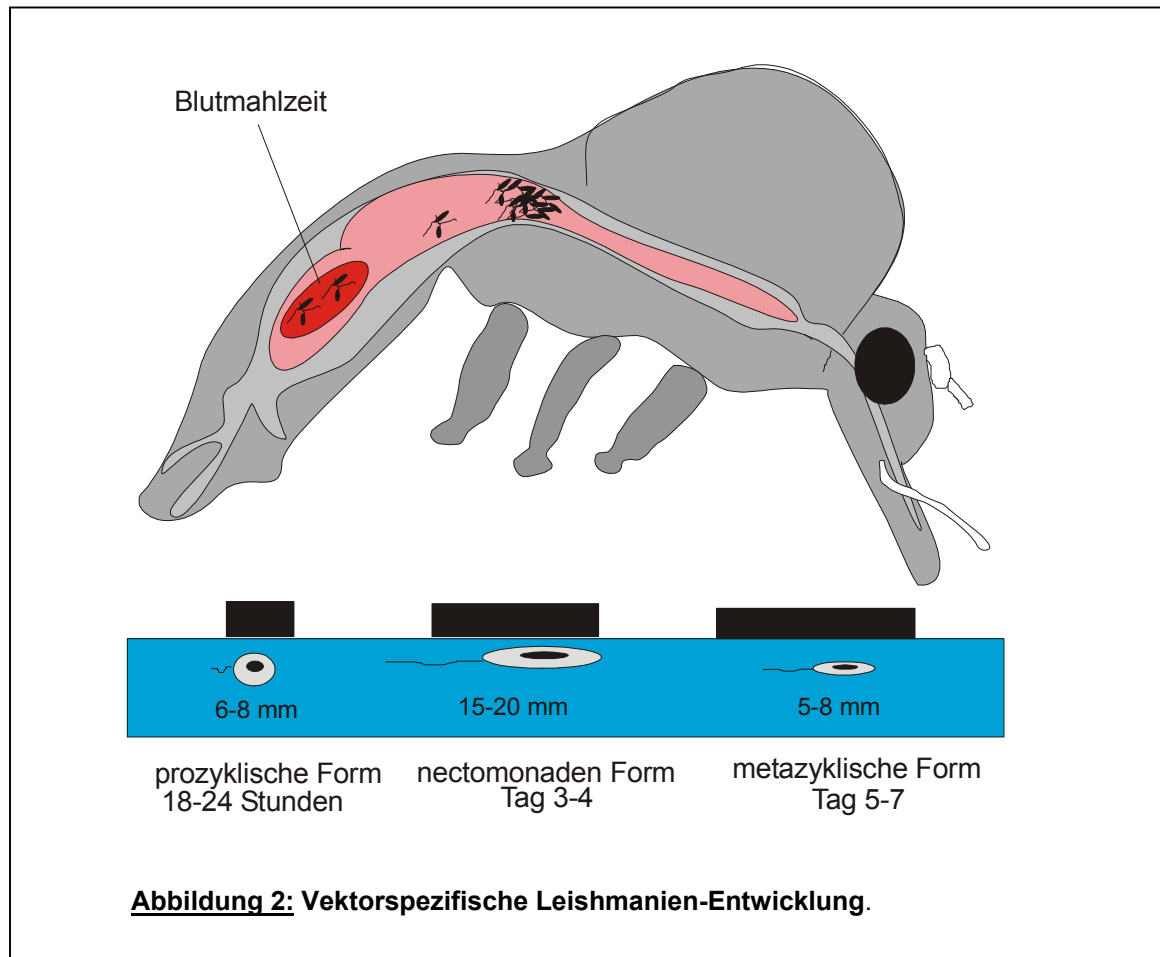
Stamm	<i>Sarcomastigophora</i>	Honigberg und Balamuth, 1963
Unterstamm	<i>Mastigophora</i>	Diesing, 1866
Klasse	<i>Zoomastigophorea</i>	Calkins, 1909
Ordnung	<i>Kinetoplastida</i>	Honigberg, 1963
Familie	<i>Trypanosomatidae</i>	Döflein, 1901
Gattung	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903

**Tabelle 1:** Taxonomische Untergliederung der Gattung *Leishmania* anhand der Klassifikation von Levine *et al.* (1980; 104).

### 1.2.2 Die Transformation von der amastigoten zur promastigoten Form im Vektor

Während der Blutmahlzeit weiblicher Schmetterlingsmücken von bereits infizierten Wirten gelangen amastigote Leishmanien der Gattung *Phlebotomus* (Alte Welt) in den Hinterdarm und die der Gattung *Lutzomyia* (Neue Welt) in den Mitteldarm des Vektors. Direkt nach der Aufnahme beginnt die Entwicklung von amastigoten zu promastigoten Protozoen. Bereits nach 18 bis 24 h entsteht eine erste bewegliche Form des Erregers mit kurzen Geißeln, welche man als prozyklische promastigote Form bezeichnet. Zwei bis drei Tage später haben sich bereits schlanke, lange Formen entwickelt (sog. nectomonade Formen), welche sich an das Darmepithel anheften und schnell proliferieren. Hierbei vermitteln Seitenketten des Lipophosphoglykans (LPG), eines Oberflächenmoleküls des Parasiten, eine Adhärenz an Lektinrezeptoren der Darmwand und verhindern somit die Exkretion der Protozoen mit den Rückständen des Blutmahls (192). Schließlich wird die verdauete Blutmahlzeit nach vier bis fünf Tagen vom Vektor ausgeschieden. Nach weiteren drei Tagen haben sich aus den 15 bis 20 µm großen nectomonaden Formen nun 5-8 µm lange metazyklische Erreger entwickelt (18). Dieser Übergang wird als Metazyklogenese bezeichnet. Metazyklische Parasiten zeichnen sich hierbei durch längere LPG-Seitenketten aus, womit eine spätere Komplementresistenz beim Erreger erreicht wird. Weiterhin sind die stark beweglichen metazyklischen promastigoten Formen, welche nun in den vorderen Darmabschnitt (Stromodeum)

der Sandmücke eingewandert sind, nicht mehr in der Lage, sich zu teilen (47, 202). Nach ca. sieben Tagen gelangen schließlich die infektiösen, metazyklischen promastigoten Formen während eines erneuten Blutmahls in den nächsten Wirt (Abbildung 2).



### 1.2.3 Die Transformation von der promastigoten zur amastigoten Form im Wirt

#### 1.2.3.1 Die Abwehr des Parasiten mit Hilfe des Komplementsystems

Nach Injektion unter die Epidermis des Wirtes gelangen im Schnitt ca. zehn bis 100 Parasiten in dessen Gewebeflüssigkeit oder Blutgefäßsystem (115). Entgegen den nicht infektiösen, prozyklischen Leishmanien sind die metazyklischen promastigoten Formen serumresistent. Eine Ursache hierfür findet sich in der spontanen Freisetzung des membranangreifenden Komplementkomplexes C5b-C9 durch den

metazyklischen Erreger. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass leishmanieneigene Proteinkinasen (LPK-1 und c-lpk2) verschiedene Komponenten des Komplementsystems (C3, C5 und C9) phosphorylieren und dadurch den klassischen und alternativen Weg dieses Abwehrsystems inhibieren (84, 163). Die auf der Oberfläche lokalisierte, 63-kDa große Metalloproteinase gp63 spielt hierbei zum einen durch ihre proteolytische Aktivität und zum anderen durch ihre Fähigkeit, die Komplementkomponente C3b in ein C3bi-ähnliches Molekül umzuwandeln, ebenso eine entscheidende Rolle. Von C3bi ist bekannt, dass es Leishmanien opsonisiert und an den Komplementrezeptor CR3 von Makrophagen bindet. Somit fördert C3bi die rezeptorvermittelte Aufnahme der metazyklischen promastigoten Form durch den Makrophagen (31). Daneben können sowohl LPG als auch gp63 direkt mit dem Mannose-Fukose-Rezeptor und dem Komplementrezeptor CR3 der Wirtszellen interagieren und somit die Phagozytose induzieren. Die multiplen Rezeptor-Liganden-Bindungen zwischen Makrophagen und Leishmanien führen zu einer Phagozytose, welche sowohl als „Zipper“-Mechanismus als auch als „Coiling“-Aufnahme erfolgen kann. Beim klassischen „Zipper“-Typ löst die initiale Bindung der Mikrobe an Rezeptoren der Wirtszelle die Rekrutierung weiterer Rezeptoren auf der Membran aus, was mit einer gleichzeitigen Neuordnung des Zytoskeletts einhergeht. Diese Neuordnung führt nun zur Bildung von Pseudopodien, welche sich reißverschlussähnlich (=„Zipper“) um den Erreger herum anlagern und ihn schließlich in einem Phagosom einschließen (180, 181). Entgegen dem symmetrischen „Zipper“-Mechanismus kommt es bei der „Coiling“-Phagozytose zur asymmetrischen Ausbildung von Pseudopodienstrukturen, welche sich mehrfach um den Erreger lagern (78, 182).

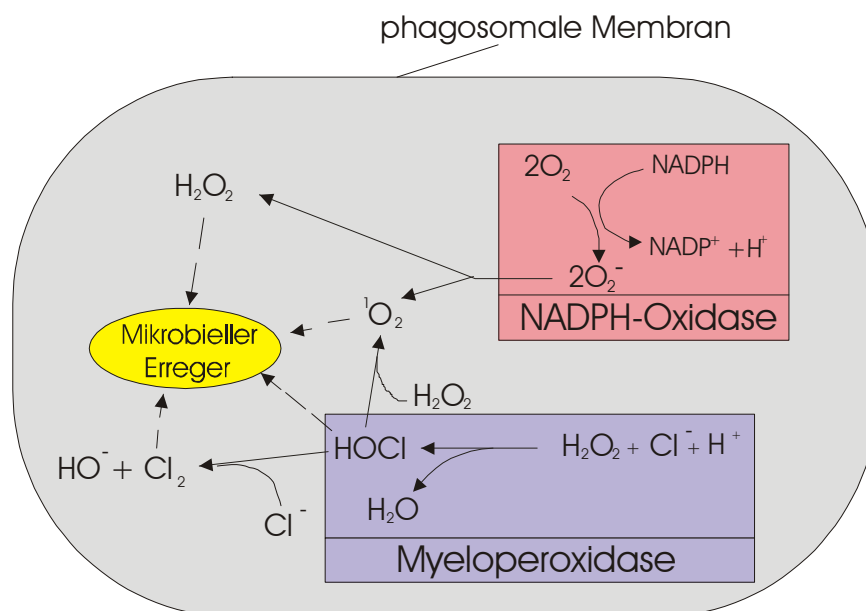
### **1.2.3.2 Mechanismen zum Überleben des Erregers im Phagosom und Phagolysosom**

Nach der Phagozytose findet eine Transformation des Erregers vom promastigoten zum amastigoten Stadium statt, welche sich über einen Spezies-spezifischen Zeitraum von zwei- bis fünf Tagen erstrecken kann (7). Innerhalb dieser Zeitspanne muss sich der Parasit einer Reihe von wirtseigenen Abwehrmechanismen erwehren. Direkt nach der Phagozytose beginnt das Phagosom, mit Lysosomen zu einem sauren und Protease-reichen Phagolysosom zu verschmelzen. Promastigote

Parasiten sind nun in der Lage, mit Hilfe ihres LPG, welches auf der Promastigotenoberfläche viel stärker als bei amastigoten Erregern exprimiert wird, eine nun folgende Phagolysosomen-Endosomen-Fusion zu inhibieren (54). Zusätzlich weisen alle *Leishmania*-Spezies die membrangebundene, zinkabhängige Metalloproteinase gp63 auf, welche eine optimale proteolytische Aktivität im neutralen bis sauren pH-Bereich besitzt und dem Parasiten durch Degradierung lysosomaler Enzyme somit das intra-phagolysosomale Überleben ermöglicht (40, 89, 209).

Leishmanien müssen sich noch gegen andere antimikrobielle Effektormechanismen der Wirtszelle erwehren. Zur Abwehr mikrobieller Erreger setzen sich nach der Aktivierung von Makrophagen spezifische Mechanismen in Gang. Für die Aktivierung benötigen Makrophagen jedoch zwei Signale. Ein Signal stammt von dem Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), das andere Signal aus zahlreichen anderen Quellen und dient der Sensibilisierung des Makrophagen gegenüber IFN- $\gamma$ . Trifft eine inflammatorische CD4-T-Zelle ( $T_H1$ -Zelle) auf einen infizierten Makrophagen, so wird sie dazu angeregt, den makrophagenaktivierenden Faktor IFN- $\gamma$  zu sezernieren und den CD40-Liganden zu exprimieren, welcher an den CD40-Rezeptor auf Makrophagen bindet und somit ein Sensibilisierungssignal gegenüber IFN- $\gamma$  hervorruft. Diese beiden neu synthetisierten  $T_H1$ -Proteine aktivieren dann zusammen den Makrophagen (94). Die Makrophagenaktivierung führt u. a. zur Bildung von äußerst aggressiven und kurzlebigen Sauerstoff-verbindungen. Dieser Vorgang wird als „oxidativer Burst“ (engl. burst = Ausbruch, Explosion) bezeichnet. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung der wirtseigenen Proteinkinase C (PKC), welche den Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasekomplex, der in der phagosomalen Membran lokalisiert ist, phosphoryliert. Der NADPH-Enzymkomplex katalysiert in dieser Form die Übertragung eines einzelnen Elektrons ( $e^-$ ) auf molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ), wobei das hochreaktive und zerstörend wirkende Superoxidanion ( $O_2^-$ ) entsteht (220). Die Protonierung des Superoxidanions führt zum Hydroperoxidradikal ( $HO_2^-$ ), das spontan mit einem anderen Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reagiert (32). Sauerstoffradikale oder auch reaktive Sauerstoffformen schädigen eine Vielzahl zellulärer Verbindungen. Da freie Elektronen danach streben, ein Elektronenpaar zu bilden, sind sie besonders reaktionsfreudig. Die Bildung weiterer Agenzien, welche ebenso an der Abtötung intrazellulärer Erreger beteiligt sind, wird von dem Enzym Myeloperoxidase

katalysiert. Hierbei entsteht nach Protonierung aus Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Chloridionen ( $\text{Cl}^-$ ) das hochreaktive Hydroxylchlorid ( $\text{HOCl}$ ), welches nun zusammen mit weiterem Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reagieren kann. Der dabei entstehende Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) kann nun seinerseits die Zellwand des Erregers angreifen (32, 220; Abbildung 3).



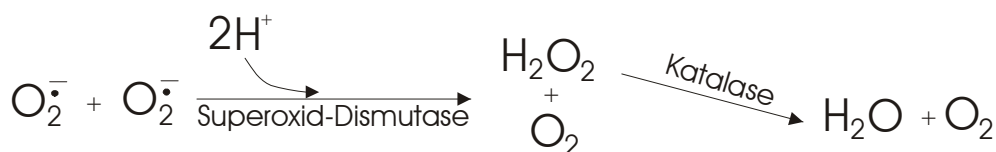
**Abbildung 3:** Die Aktionen phagozytischer Enzyme bei der Generierung toxischer Sauerstoffmetabolite.

Die intrazelluläre Umgebung innerhalb des Phagosoms besitzt zur Erregerabwehr jedoch nicht nur die toxischen Produkte des oxidativen Bursts. Aktivierte Makrophagen induzieren darüber hinaus die Synthese des Stickstoffmonoxid-Radikals ( $\text{NO}\cdot$ ). Dieses reaktive Molekül wird von dem Enzym induzierbare NO-Synthase (iNOS) gebildet, welches die Oxidation von L-Arginin zu Zitrullin und Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ) katalysiert (86). Die Synthese des Stickstoffmonoxid-Radikals ( $\text{NO}\cdot$ ) im Makrophagen wird hierbei durch Zellaktivierung mit Hilfe von  $\text{IFN-}\gamma$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ( $\text{TNF-}\alpha$ ) ausgelöst (66). Die leishmanizide Wirkung von Stickstoffmonoxid-Radikalen ( $\text{NO}\cdot$ ) konnte hierbei u. a. von Cunha *et al.* gezeigt werden (43).

Eine weitere Waffe der Makrophagen gegen Krankheitserreger ist die Aktivierung der membranständigen Protonenpumpe, welche eine Erniedrigung des intraphagosomalen pH-Wertes von unter 5.0 bewirkt. Ein niedriger pH-Wert kann für sich bereits auf mikrobielle Erreger toxisch wirken, aber zusätzlich erhöht er die

Effektivität anderer erregerabtötender Stoffe. So weisen z. B. viele lysosomale Proteine wie Hydrolasen eine optimale Aktivität bei einem niedrigen pH-Wert auf (77).

Leishmanien sind nun auf verschiedenste Art und Weise in der Lage diese erregerfeindlichen Bedingungen der Wirtszelle zu eliminieren. Die Superoxid-Dismutase (SOD) bildet hierbei die erste Antwort im Überlebenskampf gegen die wirtseigene Abwehr. Das Enzym fängt hierbei das beim oxidativen Burst entstehende Superoxidanion ab, indem es die Umwandlung zweier dieser Radikale in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff katalysiert. Das toxische Wasserstoffperoxid wird schließlich mit Hilfe der Katalase zu molekularem Sauerstoff und Wasser degradiert (220; Abbildung 4).

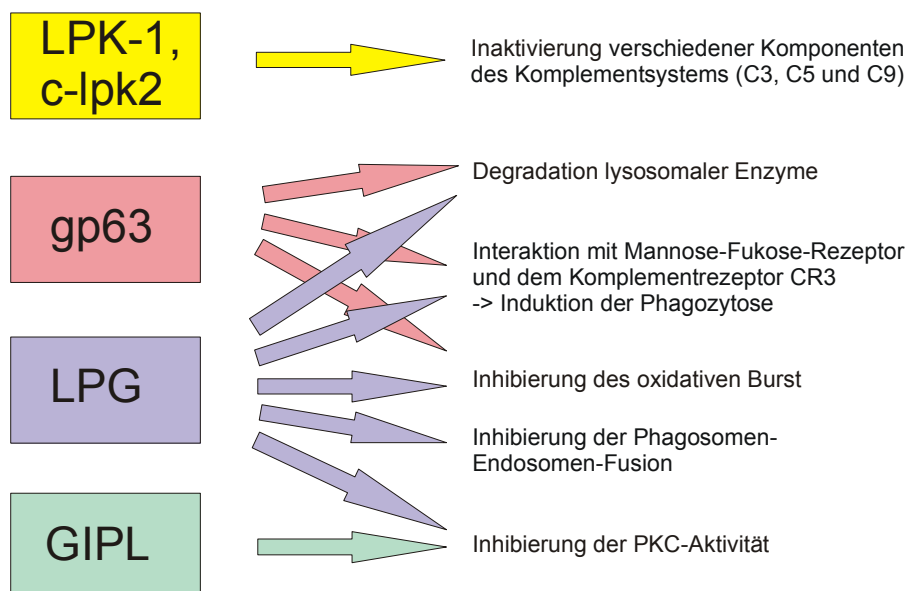


**Abbildung 4:** Die Entstehung von Wasser und Sauerstoff aus Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid.

Eine zentrale Rolle im Infektionszyklus von Leishmanien nimmt das LPG ein, welches den Hauptbestandteil der Oberflächenmoleküle von promastigoten Leishmanien bildet. LPG ist ein komplexes Glykolipid. Es besteht aus einem Polymer aus phosphorylierten Disaccharideinheiten [Gal(β1-4)Man(α1-)PO<sub>4</sub>], welche über einen Polysaccharidkern mit einem membranständigen Lipidanker verbunden sind (54). Die Expression des LPG variiert hierbei nicht nur innerhalb der einzelnen *Leishmania*-Spezies, sondern es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass LPG im amastigoten Stadium nur schwach exprimiert wird und sich die Anzahl an sich wiederholenden phosphorylierten Disaccharideinheiten innerhalb der Entwicklungsstufe vom promastigoten zum infektiösen metazyklischen Stadium nahezu verdoppelt (132, 213). Die Schlüsselfunktion von LPG innerhalb des Infektionszyklus von *Leishmania* ist hierbei vielschichtig. So führt eine Infektion von murinen oder humanen Makrophagen mit *L. major* oder *L. donovani* zu einer verminderten Produktion von O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (34, 159). Weiterhin konnte u. a. in Arbeiten von Descoteaux *et al.* ein inhibitorischer Effekt von LPG auf die Proteinkinase C von Makrophagen, welche für die Aktivierung des oxidativen Burst



essentiell ist, *in vitro* nachgewiesen werden (52). Dieser inhibitorische Effekt wurde ebenso bei Glycoinositolphospholipiden (GIPLs) demonstriert. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Glykolipiden, welche sowohl auf der pro- als auch auf der amastigoten Zellwandoberfläche von Leishmanien exprimiert werden (133). Entgegen den GIPLs besitzt LPG jedoch zusätzlich die Eigenschaft, einen Einfluss auf die Phagosomenreifung auszuüben. So konnte in Versuchen mit *L. donovani* während des frühen Infektionsstadiums eine Inhibierung der Phagosomen-Endosomen-Fusion nachgewiesen werden (54). Weiterhin ist LPG in der Lage, Kalzium, welches viele zelluläre Aktivitäten reguliert, zu binden. Diese veränderte Kalziummobilisierung durch Chelation kann zu einer veränderten Signaltransduktion führen, welche in einem Defekt bei der Aktivierung der Proteinkinase C resultiert (53). Ein anderer Virulenzfaktor von Leishmanien neben dem LPG ist gp63. Gp63, das ebenso als „Leishmanolysin“ bezeichnet wird, ist mit Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Parasitenmembran verankert (90). Das Enzym ist wie LPG in der Lage, lysosomale Enzyme zu degradieren und bildet somit einen essentiellen Bestandteil im Überlebenskampf des Erregers innerhalb des Phagolysosoms (40, 53). Eine grafische Darstellung einiger Virulenzfaktoren von Leishmanien findet sich in Abbildung 5.



**Abbildung 5:** Virulenzfaktoren von Leishmanien.

---

Mit Hilfe der Virulenzfaktoren gelingt es den Leishmanien, im Phagolysosom zu überleben und sich durch mitotische Teilungen zu vermehren. Schließlich kommt es zur Zerstörung des Zellkompartiments. Der Mechanismus des Entkommens der amastigoten Leishmanien aus dem Makrophagen ist hierbei jedoch noch unklar. Die geltende generelle wissenschaftliche Meinung hierbei ist, dass der infizierte Makrophage aufgrund der steigenden Anzahl an Protozoen birst und dadurch die Parasiten in seine nächste Umgebung entlässt. Jedoch deuten Daten von Video-Mikroskopie-Aufnahmen darauf hin, dass sich Vakuolen, welche mit amastigoten Leishmanien gefüllt sind, an der Peripherie der Zelle ansammeln und die Erreger über einen Zeitraum von einigen Stunden in einem exozytoseähnlichen Prozess nach außen freigeben (180). Im extrazellulären Raum sind die Leishmanien nun in der Lage, nach einem erneuten Stich und Blutmahl durch den Vektor von diesem aufgenommen zu werden. In ihm gelangen die amastigoten Erreger schließlich in den Verdauungstrakt, wo sie sich in die promastigote Form umwandeln und den Infektionszyklus somit schließen.

### **1.3 Leishmaniose – die Erkrankung**

#### **1.3.1 Klinische Erscheinungsbilder der Leishmaniose beim Menschen**

Leishmanien sind in der Lage, sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunabwehr des Säugetierorganismus zu unterlaufen und sich somit im Wirt erfolgreich intrazellulär zu vermehren. Aufgrund dieser Suppression des Immunsystems kann es jedoch häufig zu sekundären bakteriellen Infektionen kommen, welche im fortgeschrittenen Leishmaniosestadium nicht selten zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen bis hin zum Tod des Wirtes führen können. So wurde diesbezüglich bereits von Fällen einer Co-Infektion mit Erregern der Tuberkulose (51), Pneumonie (96), Masern (154) und anderer bakterieller Infektionen berichtet. Die parasitäre Primärinfektion bleibt hierbei jedoch oft unerkannt. Das klinische Erscheinungsbild hängt sowohl von parasitären als auch von wirtseigenen Faktoren ab. So rufen zum einen unterschiedliche *Leishmania*-Arten beim Menschen verschiedene klinische Krankheitsbilder hervor, zum anderen führt aber auch ein und derselbe Erreger in Abhängigkeit vom Wirt zu variablen Krankheitsverläufen. Das

---

klinische Erscheinungsbild der Leishmaniose weist hierbei ein großes Spektrum auf und lässt sich in drei Hauptformen unterteilen: Die viszerale Leishmaniose, die mukokutane Leishmaniose und die kutane Leishmaniose.

### **1.3.1.1 Die viszerale Leishmaniose**

Die Erreger der viszeralen Leishmaniose, welche man auch als Kala-Azar bezeichnet, sind *L. donovani*, *L. infantum* in der östliche Hemisphäre und *L. chagasi* in der westliche Hemisphäre (85). Bei dieser Form der Leishmaniose handelt es sich um die schwerwiegendste Form der Erkrankung, die unbehandelt eine Sterblichkeitsrate von fast 100 % hat (WHO). Die Bezeichnung Kala-Azar bedeutet im Hindi "schwarzes Fieber" und beschreibt das Aussehen der Haut des Patienten im Laufe der Infektion. Die amastigoten Leishmanien befallen während der Infektion Organe des retikuloendothelialen Systems wie die Milz, die Lymphknoten, die Leber und den Darm und führen hierdurch zum typischen Erscheinungsbild dieser Leishmaniose. Charakterisiert wird dieses durch unregelmäßige Fieberschübe, erheblichen Gewichtsverlust, starke Vergrößerung der Milz und der Leber, Anämie, allgemeines Unwohlsein, Ödembildung im Gesicht, blutende Schleimhäute, Atemschwierigkeiten und Diarrhöe (44, 55, 85). Die Inkubationsdauer beträgt in den meisten Fälle drei bis sechs Monate (44).

### **1.3.1.2 Die mukokutane Leishmaniose**

Die mukokutane Leishmaniose, welche in Zentral- und Südamerika vorkommt, wird von *L. braziliensis*, *L. mexicana* und *L. peruviana* verursacht. *L. mexicana* ist hierbei überwiegend für die kutane Form der Leishmaniose verantwortlich. In einigen Fällen kann *L. mexicana* jedoch auch die Schleimhautregionen des Körpers befallen. Die Primärverletzung tritt an der Hauteinstichstelle auf, jedoch weitet sich die Infektion auch über die Schleimhäute des Nasen- und Oropharyngealbereichs aus, was zur Degradation des dort befindlichen Gewebes führt. Eine Geschwürbildung tritt häufig im Bereich der Lippen, der Nase, des Gaumens und der Stimmbänder auf. Der Tod des Wirtes tritt häufig als Folge einer bakteriellen Sekundärinfektion ein.

### 1.3.1.3 Die kutane Leishmaniose

Die Erreger der kutanen Leishmaniose (CL), welche ebenso als Orient-, Delhi- oder Aleppobeule bezeichnet wird, sind *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis* und *L. mexicana*. Die Parasiten werden durch die Vektoren *Phlebotomus papatasi*, *P. sergenti*, *P. longipes*, *P. argentipes* und *P. aiasi* übertragen. Die Erkrankung tritt vorwiegend in Europa, Afrika, Mittel- und Südamerika sowie Asien auf. Nagetiere und Hunde bilden hierbei die primäre Quelle für menschliche Infektionen, welche durch *L. major* verursacht werden. Die erste klinische Beschreibung einer Hautleishmaniose wurde von Alexander Russell 1856 verfasst, und 1885 wurde von Cunningham der Leishmanienorgansimus, welchen er in fixierten histologischen Sektionen von Hautläsionen sah, exakt beschrieben (44). Bereits im Jahre 1921 fanden Sergent und Mitarbeiter heraus, dass Sandfliegen die Vektoren für die Übertragung von Leishmanien auf den Menschen sind (225). In neueren Untersuchungen konnte sogar der Einfluß des Sandfliegenspeichels (Saliva) auf das Immunsystem des Wirtes gezeigt werden, der die Infektion durch Leishmanien fördert (20, 191). Nach einer Infektion unterscheidet man bei der kutanen Leishmaniose zwei unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder: die diffus kutane Leishmaniose und die lokal kutane Leishmaniose.

Die diffuse kutane Leishmaniose kann u. a. durch *L. aethiopica* hervorgerufen werden. Häufiger wird diese Erkrankung jedoch durch den überwiegend in der „neuen Welt“ (= Zentral- und Südamerika) beheimateten Erreger *L. mexicana* verursacht (199). Der Krankheitsverlauf beginnt mit einer primären Läsion, welche sich schließlich über die Haut des ganzen Körpers ausbreitet. Diese sind hierbei jedoch nicht schmerzhaft. Die diffus kutane Leishmaniose kann zu einem chronischen Krankheitsverlauf führen und somit über viele Jahre andauern (199).

Bei der lokalen kutanen Leishmaniose kommt es an der Einstichstelle der Haut innerhalb der ersten zwei bis acht Wochen zur Bildung einer kleinen roten Papel, welche im Verlauf der Infektion durch neu entstehende Satellitenpapeln stark an Größe zunimmt. Schließlich kommt es zu einer Kraterbildung, welcher eine Ulzeration folgt. Entgegen dem chronischen und lang andauernden Verlauf der diffus kutanen Leishmaniose heilt bei der lokal kutanen Leishmaniose das Geschwür nach einem Zeitraum von drei bis 24 Monaten ab und es kommt zu einer Narbenbildung. Nach diesem Heilungsvorgang ist meist eine protektive Immunität vorhanden, welche

---

auf einer direkten Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyten und Antigen-tragenden Zellen beruht (161).

### **1.3.2 Die Immunologie bei der Entwicklung einer Suszeptibilität und Resistenz im Verlauf einer *L. major*- Infektion**

Der klinische Verlauf der kutanen Leishmaniose hängt vom Muster der von T-Helfer-Zellen produzierten Zytokine ab. Man geht davon aus, dass es zwei funktionelle Typen von T-Helfer-Zellen gibt: T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen. T<sub>H</sub>1-Zellen sind hierbei auf die Aktivierung von Makrophagen spezialisiert, während T<sub>H</sub>2-Zellen vor allem an der Aktivierung von B-Zellen mitwirken. Sowohl T<sub>H</sub>1- als auch T<sub>H</sub>2-Zellen treten hierbei mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) und des CD4-Zelloberflächenproteins mit ihren Zielzellen in Wechselwirkung. Der TCR erkennt hierbei den Antigen-MHC-Klasse-II-Komplex (MHC= Haupthistokompatibilitätskomplex) und geht mit ihm eine Wechselwirkung ein, wobei CD4 als Co-Rezeptor wirkt, indem es an die seitliche Oberfläche von MHC-Klasse-II-Molekülen bindet. Diese Bindung von TCR und Co-Rezeptor alleine reicht jedoch noch nicht aus, um naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu bewaffneten T-Effektorzellen anzuregen. Hierfür ist ein zweites, so genanntes costimulierendes Signal, erforderlich. Dieses Signal stammt von dem Glykoprotein B7, welches sich auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle befindet. Der Rezeptor für B7 auf der T-Zelle ist das Molekül CD28. Erst nach dieser Bindung erfolgt die Stimulation einer naiven T-Zelle zur aktiven T-Effektorzelle. Welche Folgen nun die Antigenerkennung durch eine CD4-T-Zelle hat, hängt hauptsächlich davon ab, welche Effektormoleküle diese aktivierte Zelle nun synthetisiert. Unter diesen Effektormolekülen, zu denen u. a. membranständige Liganden wie der CD40-Ligand gehören, lässt sich eine Gruppe von kleinen löslichen Proteinen definieren, die so genannten Zytokine, welche für die beiden unterschiedlichen CD4-T-Zelltypen spezifisch sind. So exprimieren T<sub>H</sub>1-Zellen hauptsächlich IFN- $\gamma$ , Interleukin-2 (IL-2) und TNF- $\alpha$ , während T<sub>H</sub>2-Zellen durch ein IL4-, IL-5 und IL-10-Expressionsmuster charakterisiert werden (94). Untersuchungen haben ergeben, dass die lokale kutane Leishmaniose mit einem T<sub>H</sub>1-Zytokin-Expressionsmuster und der Entstehung einer anhaltenden Immunität korreliert, während bei der chronisch verlaufenden diffusen kutanen Leishmaniose vorwiegend ein T<sub>H</sub>2-Zytokin-Expressionsmuster vorhanden ist. Das Spektrum der beim

Menschen zu beobachtenden Krankheitsformen kann durch experimentelle Infektion von Mäusen verschiedener Inzuchtstämme mit *L. major* reproduziert werden. Die selbstheilende Form dieser Erkrankung, welche mit einer  $T_H1$ -Antwort einhergeht, kann hierbei durch genetisch resistente Mäuse (z. B. C57BL/6) reproduziert werden, während bei genetisch empfänglichen Mäusen (z. B. BALB/c) eine Infektion von einer  $T_H2$ -Antwort begleitet wird und nach Viszeralisierung zum Tode führt.

Untersuchungen an *L. major*-infizierten BALB/c-Mäusen mit monoklonalen anti-IL-4-Antikörpern und Versuche an IL-4-defizienten Mäusen zeigten die Bedeutung von IL-4 bei der frühen Entwicklung einer  $Th2$ -Immunantwort, welche die protektive  $T_H1$ -Immunantwort und die daraus resultierende Sekretion von  $IFN-\gamma$  zur Aktivierung infizierter Makrophagen unterdrückt (37, 106, 191). In diesen Arbeiten konnte u. a. gezeigt werden, dass man durch Gabe eines anti-IL-4-Antikörpers in den ersten Tagen der Infektion die Aktivierung von  $T_H2$ -Zellen in BALB/c-Mäusen hemmt, indem man die Wirkung von IL-4 blockiert und somit eine Protektion gegenüber dem Erreger erzielt. In vergleichbaren Arbeiten, bei denen transgene Mäuse mit einem resistenten genetischen Hintergrund verwendet wurden, die jedoch konstitutiv IL-4 exprimierten und somit empfänglich für die Infektion wurden, konnte zudem die entscheidende Rolle der  $T_H2$ -Zytokin-Produktion bei der Entwicklung der Suszeptibilität demonstriert werden.

Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass IL-4 nicht nur beim suszeptiblen Mausstamm zu finden ist. So konnte in der frühen Phase der *L. major*-Infektion ebenso in resistenten C57BL/6-Tieren eine primäre Produktion von IL-4 und anderen Typ-2-Zytokinen im infizierten Gewebe festgestellt werden. Die Differenzierung zwischen Suszeptibilität und Resistenz ist somit eher auf andere Komponenten, welche zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion exprimiert werden, zurückzuführen. Das Zytokin IL-12, welches u. a. von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird, nimmt hierbei eine Schlüsselfunktion ein. So konnte in Untersuchungen von Heinzl *et al.* (82, 83) und Sypek *et al.* (223) gezeigt werden, dass rekombinantes IL-12 in *L. major*-infizierten BALB/c-Mäusen die Ausbildung einer Resistenz in diesen Tieren vermittelt. Des Weiteren führte in diesen Arbeiten eine Behandlung genetisch resistenter Mäuse mit anti-IL-12-Antikörpern zu einer verstärkten  $Th2$ -Immunantwort in diesen Tieren.

Inzwischen geht man davon aus, dass das Ausbleiben der IL-12-Immunantwort im Verlauf der Infektion in BALB/c-Mäusen zum charakteristischen Krankheitsverlauf in

diesen Tieren führt. Im Gegensatz dazu wird die frühe Entwicklung der T<sub>H</sub>2-Immunantwort bei genetisch resistenten Tieren durch die Expression von IL-12 von dendritischen Zellen und Makrophagen im Verlauf der Infektion in eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort umgelenkt. Dies führt im Folgenden zu einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Produktion durch T<sub>H</sub>1-Zellen, welches Makrophagen zur intrazellulären Erregerabwehr aktiviert (94, 127, 248). Die Bedeutung von IFN- $\gamma$  in der Ausbildung einer Immunität gegen eine Infektion mit *L. major* konnte bereits im Tiermodell unter Verwendung neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen IFN- $\gamma$  demonstriert werden (21). Die in diesem Tierversuch verwendeten Mäuse waren nach wöchentlicher Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers nicht in der Lage, die Infektion unter Kontrolle zu halten. Ähnliche Ergebnisse konnten mit Mäusen erzielt werden, bei denen ein homologer Defekt im IFN- $\gamma$ -kodierenden Gen vorlag (241).

### 1.3.3 Diagnose und Behandlung der Leishmaniose

Die Diagnose der unterschiedlichen Leishmaniosen wird durch das klinische Erscheinungsbild erleichtert. Die genauere Spezifizierung des Erregers geschieht jedoch sehr häufig durch Mikroskopie und andere gängige Labortechniken, wie z. B. dem Nachweis der parasitenspezifischen Desoxyribonukleinsäure (DNS) mittels Hybridisierung (Dot Blot) oder Polymeraseketten-Reaktion (PCR; 48, 50, 200, 242), serologischen Tests und Färbetechniken mittels monoklonaler Antikörper (44, 75, 170). Im Fall der kutanen Leishmaniose wird häufig eine Gewebeprobe aus dem Randbezirk des Hautgeschwürs entnommen und der Parasit zum einen direkt als Amastigot in einer Giemsa-Färbung und zum anderen nach einer drei bis zehn Tage andauernden Kultivierungsdauer in einem speziellen Nährmedium mikroskopisch als promastigote Kultur nachgewiesen. Diese Nachweismethode wird hingegen bei der viszeralen Leishmaniose nicht angewandt. Hierbei müssen Lymphknoten oder Knochenmark punktiert werden. Da diese Verfahren invasiv sind, wird meist die Serologie zur Abklärung vorgezogen.

Die Behandlung der Leishmaniose bei Mensch und Tier erfolgt häufig mit Antimonpräparaten (wie z. B. Glucantime®, Pentostam® u. a.) (85, 146), wobei die Verabreichung von Glucantime® oft in Kombination mit anderen Medikamenten, wie

z. B. Allopurinol, Aminosidin und Azolen (derzeit Itraconazol) erfolgt (3, 49, 85). Glucantime® und Pentostam® inhibieren hierbei den Abbau von Glucose durch Hemmung glykolytischer Enzyme sowie den Fettsäurekatabolismus der Leishmanien. Dies führt zu einer verminderten ATP-Synthese seitens des Parasiten, welcher nun nicht mehr seinen lebensnotwendigen Energiehaushalt aufrecht erhalten kann (22). Zur Behandlung der viszerale Leishmaniose kommt häufig liposomales Amphotericin B (AmBisome®) zum Einsatz, das aufgrund seiner liposomalen Zubereitung weniger toxisch als andere Amphotericin-B-Präparate ist. Es wird von den wirtseigenen Makrophagen gezielt aufgenommen und reichert sich in Leber und Milz an, so dass der Wirkstoff somit direkt an den Ort der Infektion gelangt (126).

## **1.4 Dendritische Zellen – eine Übersicht**

### **1.4.1 Langerhans-Zellen**

Leishmanien sind obligat intrazelluläre Parasiten, welche nach Infektion des Wirtes in Makrophagen eindringen, um dort der humoralen Immunantwort zu entgehen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nicht nur Makrophagen in der Lage sind, Leishmanien zu phagozytieren, sondern diese Fähigkeit ebenso bei dendritischen Zellen, insbesondere bei epidermalen Langerhans-Zellen (LC), zu finden ist (26, 140, 141). Langerhans-Zellen wurden 1868 von Paul Langerhans entdeckt und beschrieben und gehören zur Familie der dendritischen Zellen (110, 207). Sie stammen von Vorläuferzellen des Knochenmarks ab, die während ihrer Ontogenese in die Epidermis wandern (64, 99). Es konnte gezeigt werden, dass der „Transforming growth factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) und der Chemokinligand 20 (CCL20), welcher auch als Makrophagen-inflammatorisches Protein-3 $\alpha$  (MIP-3 $\alpha$ ) bezeichnet wird, chemotaktisch auf Langerhans-Zellen wirken und somit deren Migrationverhalten stark beeinflussen (157). So konnte in TGF- $\beta$ -defizienten Mäusen keine Einwanderung von Langerhans-Zellen in die Haut beobachtet werden (30, 88, 206). Seit der Zuordnung der Langerhans-Zellen zur Familie der dendritischen Zellen wurden sie als bevorzugtes Modell zur Erforschung dendritischer Zellbiologie verwendet (188). So konnte mit ihnen die Umstrukturierung des Zelloberflächenphänotyps (112, 186, 207), die Regulation Antigen-prozessierender Vorgänge (185), Modifikationen in den Phagozytoseeigenschaften (173) und die



Translokation von MHC-Klasse-II-Molekülen zur Zelloberfläche reifender Langerhans-Zellen (160) demonstriert werden. In Versuchen von Blank *et al.* (26) und Will *et al.* (242) wurde bereits gezeigt, dass Langerhans-Zellen nicht nur *in vivo* und *in vitro* als Wirtszellen der Parasiten dienen, sondern *in vitro* weiterhin zu einer starken Stimulation der *L. major*-spezifischen T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion führen. Hierbei konnte ebenso demonstriert werden, dass die Parasitenlast in Langerhans-Zellen weitaus geringer ist, als dies bei Makrophagen der Fall ist (26). Entgegen Makrophagen sind Langerhans-Zellen zudem in der Lage, lebende Parasiten zum dränierenden Lymphknoten zu transportieren, um dort den T-Zellen Antigen zu präsentieren (141, 142, 144, 187). Aufgrund ihrer Fähigkeit, persistierende Leishmanien über einen längeren Zeitraum zu beherbergen und erfolgreich zu präsentieren, dienen sie nicht nur der Entwicklung einer initialen, T-Zell-vermittelten Immunantwort, sondern werden ebenso für die Aufrechterhaltung einer andauernden Immunität gegen diesen Erreger benötigt (143). Langerhans-Zellen besitzen jedoch auch ganz andere charakteristische Merkmale, welche sie von anderen antigenpräsentierenden Zellen unterscheidet: So genannte Birbeck-Granula und den Langerin-Rezeptor (24, 231).

Die Birbeck-Granula stellen möglicherweise eine Art Phagosom dar und sind wahrscheinlich an der Antigenpräsentierung beteiligt (33, 79, 219). Da sie ausschließlich in Langerhans-Zellen vorkommen, kann man diese Zellen gut von anderen Zellarten unterscheiden (105). Eng verbunden an die Birbeck-Granula ist der Langerin-Rezeptor (230). Das Langerin/CD207-Molekül ist ein Mannose-spezifisches Typ-C-Lektin und wird neben der Expression als Zelloberflächenmolekül auch intrazellulär synthetisiert (231). Die intrazelluläre Expression ist jedoch stark an das Vorhandensein von Birbeck-Granula gekoppelt (231). So konnte gezeigt werden, dass, immer wenn Birbeck-Granula synthetisiert werden, es zu einer Expression von Langerin kommt (230).

#### **1.4.2 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen bilden eine heterogene Gruppe von Zellen, welche sich durch die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle, ihre anatomische Lokalisierung und ihre Funktion voneinander unterscheiden. Trotz ihrer großen Heterogenität weisen jedoch alle dendritischen Zellen bestimmte Gemeinsamkeiten auf. So

wandern dendritische Vorläuferzellen, welche von CD34-positiven Stammzellen des Knochenmarks abstammen, über den Blutstrom in das Gewebe ein, um dort zu unreifen dendritische Zellen, einschließlich Langerhans-Zellen und interstitiellen Zellen, zu differenzieren (16, 17). In diesem Stadium sind dendritische Zellen in der Lage, mit Hilfe der so genannten Toll-like Rezeptoren (TLR) gängige Strukturen von Mikroorganismen, z. B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), zu erkennen und somit Informationen über die Natur der infektiösen Erreger zu gewinnen.

Ein gemeinsames Merkmal dendritischer Zellen ist die Aufnahme von Antigenen im unreifen Stadium sowie deren Prozessierung innerhalb endozytischer Vesikel und der Präsentation dieser Antigene mit Hilfe des MHC-Klasse-II-Komplexes im reifen Stadium (135). Die Wanderung zu den dränierenden Lymphknoten und die darauffolgende Interaktion mit CD4-T-Zellen zur Erzeugung einer initialen Immunantwort haben ebenso alle dendritischen Zellen gemein (13, 16, 144). Alle dendritische Zellen weisen in ihrem reifen Stadium eine hohe Oberflächenexpression an MHC-Klasse-II-Molekülen auf, welche den CD4-T-Zellen das Antigen präsentieren (39, 104, 135). Dendritische Zellen sind die Initiatoren der spezifischen Immunantwort und polarisieren durch Produktion von Zytokinen die T-Zell-vermittelte Immunantwort. So sind dendritische Zellen in der Lage, durch die Sekretion von IL-12 eine  $T_H1$ -Zell-vermittelte Immunantwort zu induzieren, während eine Unterdrückung der IL-12-Sekretion zu einer Th2-Immunantwort führt (124, 236).

#### **1.4.2.1 Heterogenität muriner dendritischer Zellen**

Im murinen System werden zwei unterschiedliche Entwicklungslinien für dendritische Zellen definiert, welche man in myeloid und lymphoid unterteilt. Der Nachweis für eine myeloide Abstammung leitet sich zum Teil aus Differenzierungsstudien an Mensch und Maus ab, in denen dendritische Zellen von Monozyten oder von myeloiden Zwischenvorläufern erzeugt wurden (92, 205). Es konnte jedoch zudem gezeigt werden, dass dendritische Zellen aus lymphoiden Vorläuferzellen generiert werden können (8, 246). Sowohl myeloide als auch lymphoide dendritische Zellen unterscheiden sich in ihrem Phänotyp, ihrem Vorkommen und ihrer Funktion. Einige Unterschiede bezüglich der Expression von Oberflächenmarkern und Lokalisierung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Subtypen muriner dendritischer Zellen				
CD4 <sup>+</sup> 8α <sup>-</sup>	CD4 <sup>-</sup> 8α <sup>+</sup>	CD4 <sup>-</sup> 8α <sup>+</sup>	CD4 <sup>-</sup> 8α <sup>-</sup>	CD4 <sup>-</sup> 8α <sup>+</sup>
CD11c CD11b CD80 CD86 CD40 (schwach) MHC-Klasse-II DEC205 (schwach) F4/80	CD11c CD80 CD86 CD40 (schwach) MHC-Klasse-II DEC205	CD11c CD11b CD80 CD86 CD40 (schwach) MHC-Klasse-II DEC205 (schwach) F4/80	CD11c CD80 CD86 CD40 MHC-Klasse-II DEC205	CD11c CD80 CD86 CD40 MHC-Klasse-II DEC205
Lokalisation: Milz	Lokalisation: Lymphknoten	Lokalisation: Milz	Lokalisation: Lymphknoten	Lokalisation: Thymus

**Tabelle 2: Subtypen dendritischer Zellen in Milz, Lymphknoten und Thymus.**  
Die Zusammenfassung entstammt einem Artikel von Lipscomb und Masten (117).

Neben diesen Oberflächenmarkern, welche die Definition unterschiedlicher Subtypen erlauben, weisen dendritische Zellen zudem eine Heterogenität in der Ausbildung ihrer membranständige Rezeptoren auf, die in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes der Zelle unterschiedlich exprimiert werden und die dendritischen Zellen somit an verschiedene Stellen im Körper dirigieren (131). So wandern Vorläufer dendritischer Zellen aus dem Blut in das periphere Gewebe ein, um dort in ihrem unreifen Stadium Antigene aufzunehmen (233). In diesem Stadium werden dendritische Zellen durch eine starke phagozytische Aktivität und das Fehlen von co-stimulatorischen Oberflächenmolekülen charakterisiert (16). Die Aufnahme eines Antigens führt zu einer Reifung dendritischer Zellen (16, 17). Hierbei verlieren sie ihre phagozytische Aktivität, bilden co-stimulatorische Oberflächenmoleküle aus und wandern zum dränierenden Lymphknoten (198). Dort sind sie nun in der Lage, den T-Zellen das Antigen zu präsentieren (218, 221). Diese zielgerichteten Migrationen hängen jedoch sehr stark vom Aktivierungszustand der dendritischen Zelle ab und der daraus resultierenden Sensitivität auf eine Reihe von zellgebundenen und löslichen Proteinen, den Chemokinen.

---

## 1.5 Chemokine – eine Übersicht

### 1.5.1 Die Nomenklatur der Chemokine und ihrer Rezeptoren

Chemokine sind kleine, chemotaktische Zytokine mit einem Molekulargewicht von acht bis 14 Kilodalton (kDa) und einer Peptidlänge von 70 bis 130 Aminosäuren. Chemokine interagieren mit ihren Zielzellen durch Bindung an einen Transmembranrezeptor, welcher strukturell aus einem Sieben-Helix-Motiv besteht und mit einem G-Protein gekoppelt ist (189). Auf diese Art und Weise sind Chemokine und ihre Rezeptoren an einer Vielzahl biologischer Aktivitäten beteiligt, so z. B. der Wundheilung, der  $T_H1/T_H2$ -Entwicklung, der Zellrekrutierung, der Inflammation, der Entwicklung lymphoider Organe, der Angiogenese und dem Migrationsverhalten von Leukozyten (69, 73, 121, 189, 224). Die Klassifizierung der Chemokine erfolgt jedoch nicht nach funktionellen Eigenschaften sondern aufgrund ihrer Aminosäurestruktur. So wurde, basierend auf einer bestimmten Anordnung von konservierten Cysteinresten, die Familie der Chemokine in vier Klassen unterteilt, welche man als CXC, CC, C und  $CX_3C$  bezeichnet (C= Cystein; X=beliebige Aminosäure) oder alternativ auch als  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  definieren kann (257). Zur Gruppe der CXC-Chemokine gehören 17, zur Gruppe der CC-Chemokinen 26 und zur Gruppe der C-Chemokine zwei chemotaktische Zytokine. Die Gruppe der  $CX_3C$  Chemokine weist lediglich ein einzelnes Chemokin auf. Kodiert werden die Chemokine von Genen, welche man als *SCYa*, *SCYb*, *SCYc* und *SCYd* bezeichnet (SCY= small secreted cytokines).

Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren, welche man als CXCR, CCR, CR und  $CX_3CR$  bezeichnet, basiert auf der Klassendefinition der Chemokine (Tabelle 3).

<b>CXC, CC, C und CX<sub>3</sub>C Chemokine/Rezeptor Familien</b>			
<b>Systematischer Name</b>	<b>Humaner Ligand</b>	<b>Muriner Ligand</b>	<b>Chemokinrezeptor</b>
<b>CXC Chemokin/Rezeptor Familie</b>			
CXCL1	GRO $\alpha$ /MIP-2	GRO/MIP-2	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	GRO $\beta$	GRO	CXCR2
CXCL3	GRO $\gamma$	GRO	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	unbekannt
CXCL5	ENA-78	LIX	CXCR2
<b>CXC, CC, C und CX<sub>3</sub>C Chemokine/Rezeptor Familien</b>			
<b>Systematischer Name</b>	<b>Humaner Ligand</b>	<b>Muriner Ligand</b>	<b>Chemokinrezeptor</b>
<b>CXC Chemokin/Rezeptor Familie</b>			
CXCL6	GCP-2	CK $\alpha$ -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL8	IL-8	unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	unbekannt	CXCR3
CXCL12	SDF-1 $\alpha/\beta$	SDF-1	CXCR4
CXCL13	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	BRAK	BRAK	unbekannt
CXCL15	unbekannt	Lungkine	unbekannt
CXCL16	small inducible cytokine	small inducible cytokine	CXCR6
	B6	B6	
<b>CC Chemokin/Rezeptor Familie</b>			
CCL1	I-309	TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1	JE/MCP-1	CCR2
CCL3	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 $\beta$	MIP-1 $\beta$	CCR5
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	unbekannt	MRP-1	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	MARC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	MCP-2	CCR1, CCR3, CCR5
CCL9/10	unbekannt	MRP-2/MIP-1 $\gamma$	CCR1
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
CCL12	unbekannt	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4	unbekannt	CCR1, CCR3, CCR5

**Tabelle 3 (Teil 1): Nomenklatur der Chemokine und Chemokinrezeptoren**

<b>CXC, CC, C und CX<sub>3</sub>C Chemokine/Rezeptor Familien</b>			
<b>Systematischer Name</b>	<b>Humaner Ligand</b>	<b>Muriner Ligand</b>	<b>Chemokinrezeptor</b>
<b>CC Chemokin/Rezeptor Familie</b>			
CCL14	HCC-1	unbekannt	CCR1
CCL15	HCC-2	unbekannt	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4/Lkn-1/MIP-1 $\delta$	LCC-1	CCR1
CCL17	TARC	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK1	unbekannt	unbekannt
CCL19	MIP-3 $\beta$ /LARC/Exodus-3	MIP-3 $\beta$ /LARC/Exodus-3	CCR7
CCL20	MIP-3 $\alpha$ /LARC-Exodus-1	MIP-3 $\alpha$ /LARC-Exodus-1	CCR6
CCL21	6Ckine/SLC/Exodus-2	6Ckine/SLC/Exodus-2	CCR7
CCL22	MDC	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	unbekannt	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxin	unbekannt	CCR3
CCL25	TECK	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	unbekannt	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC	CCR2, CCR3, CCR10
CCL28	CCL28/MEC	CCL28	CCR3, CCR10
<b>C Chemokin/Rezeptor Familie</b>			
XCL1	Lymphotaktin	Lymphotaktin	XCR1
XCL2	SCM-1 $\beta$	unbekannt	XCR1
<b>CX<sub>3</sub>C Chemokin/Rezeptor Familie</b>			
CX3CL1	Fraktalkin	Neurotaktin	CX3CR1

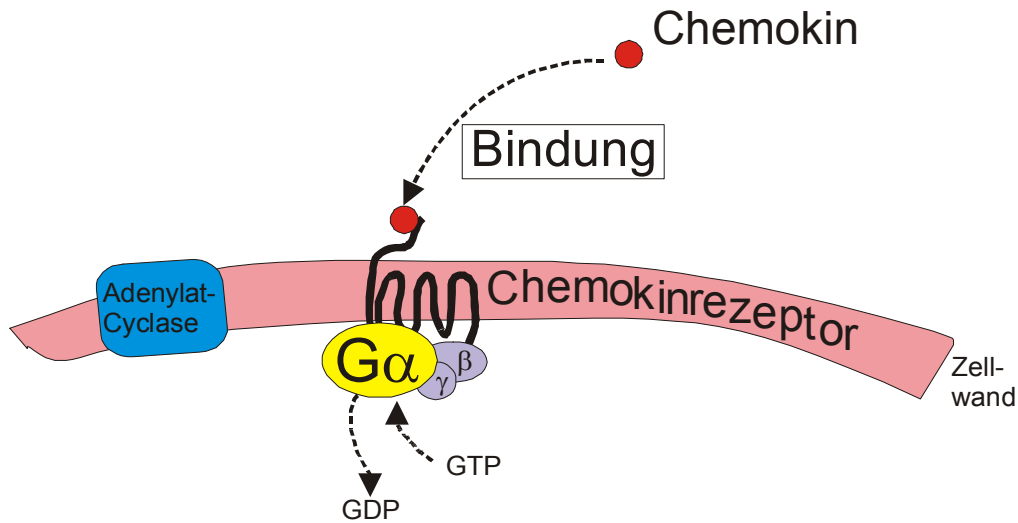
**Tabelle 3 (Teil 2): Nomenklatur der Chemokine und Chemokinrezeptoren**

### 1.5.2. Die Bindung eines Chemokins an seinen Rezeptor

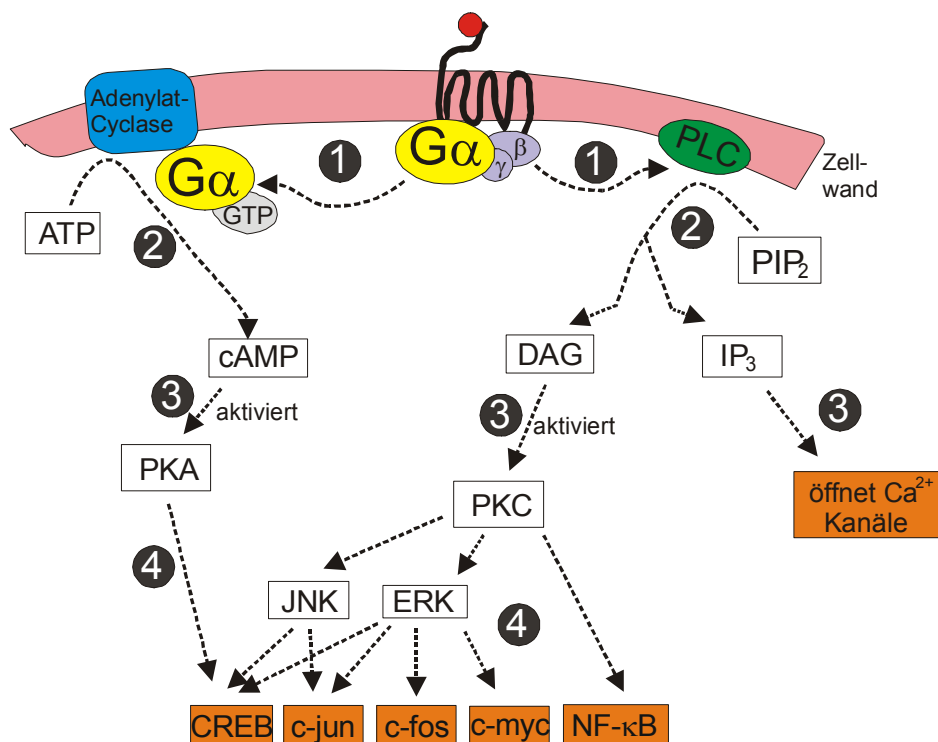
Chemokine vermitteln ihre biologische Wirkung durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die besondere Eigenschaft dieser Chemokinrezeptoren liegt in ihrer Fähigkeit, nicht nur ein spezifisches Chemokin selektiv zu binden. Vielmehr sind viele Rezeptoren in der Lage, mehrere Chemokine mit hoher Affinität zu binden. So binden z. B. insgesamt elf Chemokine an CCR1: CCL3, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16 und CCL23. Gleichzeitig fungieren individuelle Chemokine als Ligand unterschiedlicher Rezeptoren. CCL27 bindet z. B. an drei unterschiedliche Rezeptoren: CCR2, CCR3 und CCR10. Trotz dieser

---

diversen Chemokin-Rezeptor-Bindungen und ihrer daraus resultierenden unterschiedlichen biologischen Funktionen gibt es jedoch eine Gemeinsamkeit: Die Ligand-Rezeptor-Bindungen lösen alle intrazelluläre, durch das G-Protein vermittelte Signalübertragungsprozesse aus. Hierbei bindet zunächst der Ligand an die Bindungstasche des Sieben-Helix-Rezeptors, welcher eine Konformationsänderung durchläuft und somit das intrazellulär lokalisierte G-Protein aktiviert. Bei dieser Aktivierung katalysiert der Rezeptor den Austausch von gebundenem Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP), was schließlich zu einer Dissoziation des G-Proteins zu  $G\alpha$ -GTP- und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten führt. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist nun in der Lage, durch Bindung an die membranständige Adenylat-Cyclase diese zu aktivieren und somit die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP zu bewirken. Zyklisches AMP stimuliert nun die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten vieler Zielproteine durch die Proteinkinase A (PKA). Durch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-response element binding protein) können hierbei spezifische Gene exprimiert werden. Zusätzlich zu der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins spielen auch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit eine entscheidende Rolle.  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten können zum einen die Aktivität der PKA hemmen, zum anderen können sie jedoch auch zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führen. Diese katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat ( $PIP_2$ ), wobei Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) entstehen.  $IP_3$  bewirkt die Öffnung von Calciumkanälen, wodurch Calciumionen aus intrazellulären Speichern (z. B. endoplasmatischem Retikulum) freigesetzt und somit eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse ausgelöst werden können. DAG aktiviert hingegen die PKC, welche zum einen direkt durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und zum anderen indirekt über die ERK- und die Jun-Kinase einen Einfluss auf die Transkription und die Translation nehmen kann (ERK= extracellular signal-regulate; Abbildung 6a, b).



**Abbildung 6a:** Die Bindung eines Chemokins an seinen Rezeptor und die daraus resultierende Aktivierung des G-Proteins.



**Abbildung 6b: Signaltransduktion innerhalb der Zelle.** Schritt 1- die Aktivierung der Adenylat-Cyclase durch aktiviertes  $G\alpha$  und die Aktivierung der Phospholipase C durch die  $\beta/\gamma$ - Untereinheit. Schritt 2 – Bildung intrazellulärer Botenstoffe. Schritt 3 – Aktivierung der Protein-Kinase A und Protein-Kinase C sowie der Öffnung der Calcium-Kanäle durch IP<sub>3</sub>. Schritt 4 – Aktivierung von Transkriptionsaktivatoren.



### 1.5.3. Chemokine und dendritische Zellen

Die Lokalisierung im Gewebe und die Wanderung zu lymphatischen Organen ist ein entscheidender Schritt in der Immunbiologie von dendritischen Zellen. Chemokine spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Gemäß ihrer Funktion werden Chemokine hierbei in zwei Gruppen unterteilt: inflammatorische und lymphoide Chemokine. Inflammatorische Chemokine werden im akuten Zustand (Krankheit oder Verletzung) im betroffenen Gewebe synthetisiert, um zelluläre Infiltrate an den Ort der Verletzung oder Infektion zu dirigieren. Lymphoide Chemokine, welche in der Literatur ebenso als homeostatische Chemokine beschrieben werden, werden hingegen überwiegend in lymphatischen Organen konstitutiv exprimiert. Dort spielen sie u. a. eine entscheidende Rolle bei der Migration von Lymphozyten innerhalb des Thymus, der Aufrechterhaltung der lymphoiden Organstruktur und der Migration dendritischer Zellen in sekundäre lymphatische Organe (5, 6, 60, 187, 194).

Sehr viele Gene, welche für Chemokinrezeptoren kodieren, werden von Zellen konstitutiv exprimiert. So konnte z. B. gezeigt werden, dass der Rezeptor CXCR4, welcher u. a. von dendritischen Zellen exprimiert wird, in einer Häufigkeit von etwa 1000 Rezeptoren pro Zelle vorkommt (118). Die Expression von CXCR4 ist jedoch nicht vom Aktivierungszustand der dendritischen Zellen abhängig und bei unreifen wie auch bei reifen dendritischen Zellen festgestellt worden (131). Sehr oft führt jedoch eine Reifung von dendritischen Zellen zu einer Veränderung der Chemokinrezeptorexpression und bestimmt somit das physiologische Ziel dieser Zelle. Unreife dendritische Zellen weisen z. B. eine Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 und CXCR4 auf (131). Eine Stimulation der dendritischen Zellen mit LPS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder CpG führt hingegen zu einer Reifung der dendritischen Zellen und damit zum einen zu einer Herunterregulation einer Reihe von inflammatorischen Chemokinrezeptoren (CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2) und zum anderen zu einer erhöhten Oberflächenexpression des lymphoiden Chemokinrezeptors CCR7 (131). So konnte die Rolle von CCR7 bei der Migration dendritischer Zellen in Mausstämmen (*plt*-Mäuse) demonstriert werden, welche kein CCL19/MIP-3 $\beta$  und nur geringe Mengen von CCL21/6CKine, beides Liganden für CCR7, exprimieren (76). Hierbei konnten Gunn *et al.* zeigen, dass *plt*-Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp eine um 50-60% verringerte Anzahl an dendritischen Zellen in peripheren Lymphknoten aufweisen

und gleichzeitig eine um 75% geringere Migrationsrate von dendritischen Zellen zum dränierenden Lymphknoten zu verzeichnen ist (76). Die Rolle des Chemokinrezeptors CCR7 bei der Wanderung von dendritischen Zellen zu den dränierenden Lymphknoten wurde ebenfalls in Studien mit CCR7-defizienten Tieren demonstriert. In diesen Versuchen konnte keine Migration von aktivierten dendritischen Zellen zu den Lymphknoten festgestellt werden (61).

Die Rolle inflammatorischer Chemokine und ihrer korrespondierenden Rezeptoren, wie z. B. CCR1, CCR2 und CCR5, ist hingegen eine andere. Sie dienen u. a. der zielgerichteten Bewegung von unreifen dendritischen Zellen zur inflammatorischen Stelle. Nach Infektion produzieren Makrophagen, welche sich an der Entzündungsstelle befinden, eine Reihe von inflammatorischen Chemokine, wie z. B. CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES (RANTES= Regulated on activation of normal T cell expressed and secreted) und CXCL8/IL-8 (214). Dendritische Zellen sind nun in der Lage, durch ihre Rezeptoren diese Liganden zu binden und in Richtung der Entzündungsstelle zu wandern, um dort ihrer spezifischen Funktion, z. B. der Antigenaufnahme, nachzukommen (14, 233, 234, 258). Neben ihrer Eigenschaft, in unterschiedlichen Reifungsstadien auf verschiedene Chemokine zu reagieren, sind dendritische Zellen jedoch auch in der Lage, selbst als Produzenten von Chemokinen zu fungieren. So konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen die Chemokine CCL22/MDC (MDC= Macrophage-derived chemokine), CCL9/MIP-1 $\gamma$  (MIP= Macrophage inflammatory protein), CCL18/MIP-4 und CCL25/TECK (TEK= Thymus-expressed chemokine) zwar konstitutiv exprimieren, die Synthese von CCL17/TARC (TARC= Thymus and activation-regulated chemokine), CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL19/MIP-3 $\beta$ , CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8 und CX3CL1/Fraktalkin hingegen erst nach Zugabe von LPS, TNF, CD40L oder Pathogenen erfolgt (4). Dendritische Zellen sind demnach nicht nur ein passiver Bestandteil des Chemokinsystems, sondern sind auch aktiv daran beteiligt, sowohl durch konstitutive als auch induzierte Expression von Chemokinen, welche wiederum auf andere Zellen, wie z. B. T- und B-Lymphozyten, wirken (91, 93, 98, 197, 240).

#### 1.5.4 Chemokine und dendritische Zellen bei der kutanen Leishmaniose

Basierend auf dem Wissen über die dendritische Zellbiologie und dem Wirken von Chemokinen kann man postulieren, dass Chemokine nicht nur eine entscheidende Rolle in verschiedenen Reifungsstadien von dendritischen Zellen spielen, sondern ebenso eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Funktion dieser Zellen, wie z. B. der Erregerabwehr bei Infektionskrankheiten, einnehmen. Bei der Regulation von Immunantworten, wie z. B. bei der kutanen Leishmaniose, spielen Chemokine somit eine vielfältige Rolle.

Nach dem Eindringen der Erreger in den Wirt kommt es aufgrund des Speichels des Vektors zu einer Infiltration u. a. von Makrophagen an den Ort der Einstichstelle. Diese gerichtete Migration ist chemokinunabhängig (255), jedoch essentiell für den Erreger, da dieser die Makrophagen als Wirtszellen benutzt, um der humoralen Immunantwort zu entgehen. Aus *In-vitro*-Studien ist bekannt, dass infizierte Monozyten das Chemokin CCL2/MCP-1 exprimieren und damit in der Lage sind, andere Zellen, wie z. B. NK-Zellen, welche den Chemokinrezeptor CCR2 besitzen, an den Infektionsort zu locken (184).

Dort angekommen reagieren NK-zellen auf das von infizierten Makrophagen und dendritischen Zellen exprimierte IL-12 mit der Sekretion von IFN- $\gamma$  (82, 83). Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass auch lebende promastigote Erreger in der Lage sind, eine Sekretion von IFN- $\gamma$  in NK-Zellen zu bewirken (155). Neben dem aktivierenden Effekt von IFN- $\gamma$  auf Makrophagen ist dieses Zytokin ebenso in der Lage, die Sekretion von CCL2/MCP-1 in nichtinfizierten Makrophagen zu induzieren und somit weitere CCR2-positive Zellen zum Infektionsort zu locken (41). CCL2/MCP-1 induziert zudem neben einem „respiratorischen burst“ die Sekretion lysosomaler Enzyme durch Makrophagen und liefert deshalb im Verlauf der Leishmaniose nicht nur einen entscheidenden Beitrag bei der Chemoattraktion immunologisch wichtiger Zellen (wie z. B. NK-Zellen und dendritische Zellen), sondern spielt aufgrund seiner leishmaniziden Aktivität ebenso eine bedeutende Rolle im Verlauf dieser Erkrankung.

Ein wichtiger Schritt bei der Erregerabwehr ist das Anlocken unreifer dendritischer Zellen zum Infektionsherd, denn diese repräsentieren ein Bindeglied zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem. Im unreifen Stadium exprimieren dendritische Zellen u. a. den Chemokinrezeptor CCR2 und sind somit in der Lage,

---

gegen den CCL2/MCP-1-Chemokingradienten ins infiltrierte Gewebe einzuwandern, um dort die Erreger aufzunehmen (233). Neben CCR2 werden ebenso andere Chemokinrezeptoren, wie z. B. CCR1, CCR5 und CXCR1, von unreifen dendritischen Zellen exprimiert, mit deren Hilfe sie auf eine Reihe weiterer Chemokine reagieren können und somit in der Lage sind, sich an Infektionsorten anzusammeln. Hierzu zählen u. a. die Chemokine CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES und CXCL8/IL-8, welche nach Aktivierung durch mikrobielle Stimuli von Makrophagen freigesetzt werden (131). In der aktuellen Literatur wird eine starke Beteiligung von Chemokinen bei der Ausbildung einer T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Immunantwort im Verlauf der kutanen Leishmaniose diskutiert (179). Hierin geht man davon aus, dass Monozyten, welche in Läsionen von Patienten mit einer lokalen kutanen Leishmaniose in CCL2/MCP-1- oder CCL3/MIP-1 $\alpha$ -reichen Arealen lokalisiert sind, die Ursache für eine polarisierte T<sub>H</sub>1-Immunantwort bewirken, indem sie Chemokine (z. B. CXCL10/IP-10 und CXCL9/MIG) exprimieren, die chemotaktisch auf CXCR3-positive T<sub>H</sub>1-Zellen wirken. Diese wiederum setzen zusätzliches IFN- $\gamma$  frei und aktivieren somit nicht nur Makrophagen zur intrazellulären Erregerabwehr, sondern induzieren auch die CCL2/MCP-1-Sekretion in diesen und locken dadurch neue unreife Monozyten und Makrophagen an die Infektionsstelle. Dort angekommen bewirkt IFN- $\gamma$  ein Stoppsignal für diese unreifen Zellen, da es zu einer Aktivierung und als direkte Konsequenz zu einer Herunterregulation von CCR2 in diesen Zellen führt (179). Entgegen der lokalen kutanen Leishmaniose kommt es bei der diffusen kutanen Leishmaniose zu einer verstärkten Synthese von IL-4 im infizierten Gewebe. Dies wiederum könnte ein Grund für die geringe Expression von CCL2/MCP-1 sein und somit die unkontrollierte Replikation von Parasiten fördern. Wie aus diesem Beispiel der kutanen Leishmaniose ersichtlich, sind Chemokine maßgeblich an der Regulation der Immunantwort bei Infektionskrankheiten beteiligt und bilden ein essentielles Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort.

## 1.6 Zielsetzung

Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten erstmals, dass der klinische Verlauf der humanen kutanen Leishmaniose nicht nur mit dem Muster der Produktion von Lymphokinen, sondern auch mit der Verteilung von chemotaktischen Zytokinen (Chemokinen) in den betroffenen Hautarealen korreliert (178). So konnte u. a. die leishmanizide Wirkung des Chemokins CCL2/MCP-1 auf humane Monozyten und das Zusammenspiel dieses Chemokins mit Th1/Th2-Zytokinen demonstriert werden (177). Zudem konnte gezeigt werden, dass nicht nur Makrophagen sondern auch dendritische Zellen Leishmanien aufnehmen und als akzessorische Zellen in der Lage sind Immunantworten zu regulieren (11). Inzwischen gibt es keinen Zweifel mehr, dass die Interaktion von Chemokinen und dendritischen Zellen eine essentielle Funktion für das Immunsystem einnimmt (131). Ziel dieser Arbeit war es nun, die Rolle von dendritischen Zellen und Chemokinen bei der Regulation der Immunantwort gegen Erreger der kutanen Leishmaniose zu bestimmen. Dabei waren folgende Arbeitspunkte von zentraler Bedeutung:

1. Erstellung einer Kinetik zur Expression von verschiedenen Chemokinen im Verlauf von Leishmanieninfektionen.
2. Untersuchungen zum Einfluss von Chemokinen auf die Infiltration von dendritischen Zellen in das infizierte Gewebe sowie die Infektionsrate und immunologische Aktivität dieser Zellen.
3. Analyse zum Effekt einer Infektion von dendritischen Zellen mit Leishmanien auf die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienkultur

##### 2.1.1.1 Bakterienstämme

Zur Gewinnung ausreichender Mengen an DNA, welche für die Konstruktion von RNA-Sonden im Verlauf der In-situ-Hybridisierung eingesetzt wurden, wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 $\alpha$  eingesetzt. Die genaue Beschreibung des Genotyps sowie dessen Herkunft ist in Tabelle 4 angeführt.

Stamm	Beschreibung/Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80/ $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, recA1, endA1, hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), supE44, $\lambda$ <sup>-</sup> , thi-1, gyrA, relA1	Gibco BRL

**Tabelle 4:** Beschreibung des Genotyps von *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

##### 2.1.1.2 Medien für die Bakterienkultur

Für die Kultivierung der Bakterienkultur wurde Luria Bertani-Medium (LB-Medium) hergestellt. Hierfür wurden 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid (NaCl) in 1000 ml destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) gegeben und im Autoklaven während der Sterilisation gelöst. Eine Sterilisation der Medien wurde durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120°C erreicht. Die Zugabe von Antibiotika als Selektionsmarker erfolgte nach dem Abkühlen der Medien auf ca. 50°C.

---

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurde ein Medium verwendet, welches aus 50 ml 100% Glycerin und 2,9 g NaCl bestand und schließlich mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt wurde.

### **2.1.2 Reagenzien für die Zellkultur und Plastikmaterial**

Für die Kultivierung von dendritischen Zellen wurde Click-RPMI 1640 [Biochrom AG, Berlin, Deutschland] verwendet. Diesem wurden 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum [FCS; PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich], 2 mM L-Glutamin [Biochrom], 10 mM HEPES-Puffer [Biochrom], 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin G [Sigma, Taufkirchen, Deutschland], 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamycin [Sigma] und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol [Sigma] zugegeben. Die Hitzeinaktivierung des FCS erfolgte hierbei durch ein Auftauen des FCS über Nacht bei 4°C und anschließender Inkubation im 56°C warmen Wasserbad für 30 min. Sterile Phosphat-gepufferte Saline (PBS) stammte von Invitrogen [Karlsruhe, Deutschland]. Das Zählen der lebenden Zellen wurde mit Hilfe von 0,4% Trypan Blau [Invitrogen] durchgeführt. Die bei diesen Methoden verwendeten Plastikröhrchen mit den Größen 15 ml und 50 ml stammten von der Firma Sarstedt [Nürnberg, Deutschland]. Ebenso wurden hierbei 0,5 ml und 1,5 ml Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen der Firma Eppendorf [Hamburg, Deutschland] verwendet. Petrischalen [60 x 15 mm und 90 x 16 mm] und Zellschaber stammten von Greiner [Kremsmünster, Österreich]. Kulturplatten mit 6, 12, 24, und 96 Kompartimenten sowie Plastikpipetten wurden von der Firma Corning [New York, USA] produziert. 5 ml- und 10 ml-Spritzen, welche zur Gewinnung von murinen Peritonealmakrophagen verwendet wurden, stammten von Henkes Sass Wolf GmbH

[Tuttlingen, Deutschland]. Zellschaber wurden von BD Biosciences Pharmingen [Heidelberg, Deutschland] bezogen.

### 2.1.3 Mäuse

Weibliche BALB/c- und C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River Breeding Laboratories [Sulzfeld, Deutschland] erworben. Bis zu einem Alter von vier bis sechs Wochen wurden die Tiere in einer pathogenarmen Umgebung gehalten und danach für Versuche eingesetzt.

### 2.1.4. Plasmide und Vektoren

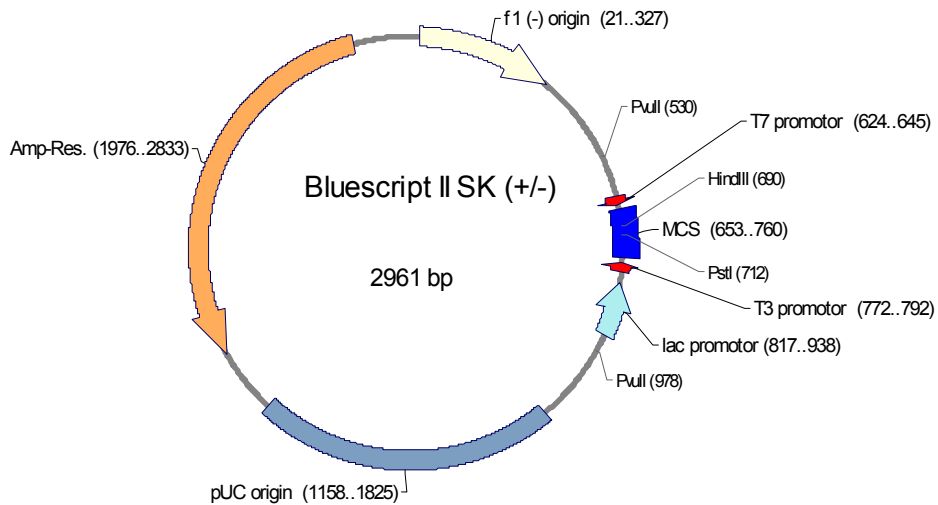
Zur Herstellung von homologen RNA-Sequenzen für die *In-situ*-Hybridisierung wurden die Vektoren Bluescript II SK mMCP-1 und Bluescript II SK mMIP-1 verwendet, welche auf dem Vektor Bluescript II SK +/- (Abbildung 7) der Firma Stratagene ® [Heidelberg, Deutschland] basierten. Eine genaue Charakterisierung der Insertionsschnittstellen innerhalb dieser Vektoren ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Vektor-bezeichnung	Insertion	Kloniert über Schnittstellen	Herstellung der Sonden	entstehende Fragment-größe
Bluescript II SK mMCP-1	mMCP-1	Hind III und Pst I	<u>Antisense:</u> Sal I und T3 <u>Sense:</u> Pst I und T7	700 Bp
Bluescript II SK mMIP-1	mMIP-1 $\alpha$	EcoR I und Xho I	<u>Antisense:</u> Xho I und T3 <u>Sense:</u> Pst I und T7	276 Bp

Bp = Basenpaare  
 mMCP-1 = murines Monozyten chemotaktisches Protein-1  
 mMIP-1 $\alpha$  = murines Makrophagen inflammatorisches Protein-1 $\alpha$

**Tabelle 5:** Charakterisierung der Insertionsschnittstellen von Bluescript II SK mMCP-1 und Bluescript II SK mMIP-1.





**Abbildung 7:** Skizze des Bluescript II SK- Vektors von Stratagene®.

### 2.1.5 Antibiotika

Zur Selektion positiv transformierter Bakterienklonen sowie für die Zellkultur wurden Antibiotika eingesetzt. Alle verwendeten Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Zugabe von Antibiotika zu Agar erfolgte bei maximal  $50^{\circ}\text{C}$ . Verwendete Antibiotika waren hierbei:

100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin [Sigma, Taufkirchen, Deutschland], 30  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin [Sigma], 5  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin [Sigma], 50  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  Gentamycin [Sigma].

### 2.1.6 Sonstige Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von Agarosegelen wurde 50x TAE-Puffer und TE-Puffer hergestellt. Zur Herstellung von 50x TAE wurden 242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA in 1000 ml destilliertes Wasser gegeben und auf einen pH-Wert von

8,0 eingestellt. Die 0,5 M EDTA-Lösung wurde hierbei hergestellt, indem man 93,1 g EDTA in steriles Wasser gab und dieses auf ein Endvolumen von 500 ml auffüllte. Nach dieser Synthese wurde der pH-Wert dieser Lösung auf 8,0 eingestellt.

TE-Puffer wurde mit Hilfe von 60 mg 10 mM Tris-HCl und 18,6 mg 1 mM EDTA synthetisiert. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Salzsäure (HCl) auf einen Wert von 7,5 eingestellt. Zur DNA-Aufreinigung und Fällung wurde 3 M Natrium-Acetat (NaAc) benötigt. Dieses wurde hergestellt, indem man 24,61 g NaAc in destilliertes Wasser gab und dieses auf 100 ml auffüllte. Der pH-Wert wurde anschließend mit Hilfe von Essigsäure auf einen Wert von 4,8 eingestellt. Die Fällung erfolgte schließlich indem man 2 µl 3 M NaAc zusammen mit 50 µl 95% EtOH auf den DNA-Ansatz gab, diesen zehn Minuten auf Eis inkubierte und im Anschluss daran 30 sec. in der Tischzentrifuge bei 14 000 Upm zentrifugierte. Danach wurde der Überstand verworfen, 250 µl 70% Ethanol auf das Pellet gegeben und in der Tischzentrifuge zehn Sekunden lang zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge zum Trocknen gebracht. Im letzten Schritt wurde das Pellet in destilliertem Wasser aufgenommen. Für die *In-situ*-Hybridisierung wurden u. a. folgende Puffer verwendet: 10% Sodiumdodecylsulfat (SDS) und 10% Ammoniumperoxidsulfat (APS). Hierbei wurden jeweils 10 g der Substanz in steriles Wasser gegeben und dieses auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

### **2.1.7 Geräte**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, wie z. B. *In-situ*-Hybridisierung, FACS-Analyse, RNase Protection Assay, wurden diverse Geräte eingesetzt, welche in Tabelle 6 aufgeführt sind:

Gerät	Firma, Ort
Autoklaven	H+p Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland
Autoradiographie Kassetten	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg, Deutschland
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Brutschrank	WTC Binder, Tuttlingen, Deutschland
Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Elektrophoresenetzteile	Bio-Rad, München, Deutschland
Elisa reader	Dynatech Laboratories, Stuttgart, Deutschland
FACs calibur	Beckton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Gel Trockner	BioRad, Richmond CA., USA
Heizblock	Axon lab AG, Baden-Dättwil, Schweiz
konfokales Lasermikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kühlzentrifugen	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Mikropipetten	Corning, New York, USA
Netzgeräte	Biorad, München, Deutschland
PCR-Thermocycler:	Eppendorff, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Inolab/WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Eppendorff, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Inolab/WTW, Weilheim, Deutschland
Röntgenfilmentwickler	Agfa, Köln, Deutschland
Schüttelinkubator	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Scintillationszähler 1600TR	PerkinElmer LAS GmbH, Jügesheim, Deutschland
Sterilbank	Nuair, Plymouth, USA
Tischzentrifugen	Kendro, Asheville, NC., USA
UV-Leuchttisch	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Videoprinter	Biorad München, Deutschland
Vortexer	Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Waagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad-Inkubator	Haake
Zellkulturzentrifuge	Heraeus Langenselbold, Deutschland

**Tabelle 6:** Alphabetische Auflistung der in dieser Doktorarbeit verwendeten Geräte.

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterienzucht

Der in dieser Doktorarbeit verwendete Stamm *E. coli*-DH5 $\alpha$  wurde auf Luria Bertani (LB)-Platten oder in LB-Flüssigkultur gezogen. Für die Anzucht der jeweiligen rekombinanten Stämme wurde das Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin [Sigma] versetzt, um somit einen Selektionsdruck auf die Kultur zu erzeugen. Die Bakterien konnten hierbei für etwa zwei Monate auf entsprechenden Festmedien (Agarplatten) bei 4°C gehalten werden, sollten aber idealerweise etwa alle vier Wochen auf neuen Agarplatten ausgestrichen werden.

#### 2.2.1.1 Herstellen einer Flüssigkultur

Hierbei wurde mit Hilfe einer sterilen Impföse eine Einzelkultur von einer Agarplatte abgenommen und in einen mit bis zu 100 ml RPMI-Medium gefüllten Kolben, welches zusätzlich mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin [Sigma] versehen wurde, angeimpft. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln bei etwa 180 Upm inkubiert.

#### 2.2.1.2 Herstellen einer Glycerinkultur

Eine Glycerinkultur dient zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen. Hierbei wurden 500  $\mu$ l einer Lösung mit über Nacht kultivierten Bakterien mit 500  $\mu$ l Medium für Glycerinkulturen (50 ml 100% Glycerin, 2,9 g NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> ad 100 ml) auf Eis in ein zuvor beschriftetes Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach kurzem Mixen wurde die Kultur bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. In diesem Zustand sind die Bakterienzellen über mehrere Jahre haltbar. Bei Bedarf wurde, ohne die Glycerinkultur vollständig aufzutauen, ein wenig Zellmaterial abgenommen und zunächst ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatte angefertigt. Am nächsten Tag wurde schließlich eine Einzelkolonie mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers gepickt und zur Herstellung einer Flüssigkultur weiterverwendet.

### 2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* nach Dagert und Ehrlich (46)

Hierbei wurden zunächst 100 ml LB-Medium mit 300-500 µl einer Lösung mit über Nacht kultivierten Bakterien angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 1,0 angezogen. Danach wurde die Kultur für 15 Min. auf Eis inkubiert, in zwei vorgekühlte Röhrchen überführt und in der Zentrifuge bei 4°C für 10 Min. und einer Umdrehung von 4000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die entstandenen Zellpellets in 1/5 Vol. eiskalter 0,1 M  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 10 Min. bei 4000 Upm und 4°C abzentrifugiert und in je 5 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  + 20% Glycerin aufgenommen. Abschließend wurden die kompetenten Zellen in 250 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C eingefroren.

### 2.2.3 Gewinnung und Kultivierung von dendritischen Zellen

Die Gewinnung und Generierung von dendritischen Zellen richtete sich nach dem Protokoll von M. Lutz *et al.* (123). Hierbei wurden Femur und Tibia einer Maus freigelegt, indem das sie umgebende Muskelgewebe vorsichtig entfernt wurde. Die Knochen wurden im Anschluss daran 2-3 Min. in 70% Ethanol gelegt. Nach dieser Desinfektion wurden die Knochen in ein PBS-Bad gegeben und jeweils beide Knochenenden abgetrennt. Die Gewinnung des Knochenmarks erfolgte mit Hilfe einer Spritze, welche die Knochen durchspülte. Die somit gewonnene Zellsuspension wurde im Anschluss daran für 5 Min. bei 1600 Upm zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Danach wurden die gewonnenen Zellen in Click-RPMI 1640, welches mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES-Puffer, 60 µg/ml Penicillin G, 20 µg/ml Gentamycin und 0,05 mM 2-Mercapto-ethanol versehen wurde (= Click-RPMI-Kulturmedium), aufgenommen, wobei  $2 \times 10^6$  Zellen/Petrischale zur weiteren Kultivierung eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde das Medium mit 200 U/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) [Peprotech, London, England] versetzt. An den Tagen drei, sechs und acht wurden den Zellen jeweils 5 ml frisches Medium mit 200 U/ml GM-CSF verabreicht. An Tag zehn

---

wurden die Zellen abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung in Click-RPMI-Kulturmedium aufgenommen.

#### **2.2.4 Isolierung von Peritonealexsudat-Makrophagen**

Für die Gewinnung von Peritonealexsudat-Makrophagen wurde eine sterile 2,5 %ige Thioglycolatlösung [Difco] in PBS hergestellt. Im Anschluss daran wurde die Thioglycolatlösung im Autoklaven erhitzt. Bei diesem Schritt ging das Thioglykolat in Lösung, welches fortan zur Gewinnung der Makrophagen eingesetzt werden konnte. In einer Spritze wurden nun 2 ml der Thioglykolatlösung gefüllt und intraperitoneal in BALB/c- und C57BU6-Mäuse gespritzt. Nach vier bis fünf Tagen wurden die Tiere getötet und das Peritoneum mit Hilfe eines Skalpells freigelegt. Nach Desinfektion der Bauchdecke mit 70 % Ethanol wurde in die Bauchhöhle mit Hilfe einer Spritze 6-8 ml kaltes RPMI-Medium gefüllt und die Peritonealexsudat-Makrophagen vorsichtig herausgewaschen. Die Zellsuspension wurde im Anschluss daran sofort auf Eis gestellt und schließlich bei 1500 Upm für 10 Min. zentrifugiert. Nun wurden die im Pellet enthaltenen Zellen mit Hilfe von Trypanblau gefärbt und die Zellzahl der Makrophagen mikroskopisch bestimmt.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml wurden in Petrischalen gegeben und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O-Sättigung für drei bis vier Stunden inkubiert. Nach dieser Zeitdauer adhärten die Makrophagen an der Zellkulturschalenwand und konnten somit von nicht-adhären Zellen durch Entfernen des Überstandes sehr leicht selektioniert werden. Die Makrophagen wurden nun in der Petrischale zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen. Mit Hilfe von kaltem PBS wurden schließlich die Makrophagen vorsichtig vom Petrischalenboden gelöst und erneut bei 1600 Upm für 10 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml warmem RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl erneut mit Hilfe einer Trypanblaufärbung bestimmt. Die Weiterkultivierung der Makrophagen für weitere Versuche wurde im Brutschrank durchgeführt.

### 2.2.5 Präparation von Langerhans-Zellen

Zur Präparation von Makrophagen wurden BALB/c- und C57BL/6-Mäusen durch zervikale Dislokation getötet und anschließend die Ohren der Tiere abgeschnitten. Die Ohren wurden nun in einem 100%igen Ethanolbad desinfiziert und bei Raumtemperatur zum Trocknen gebracht. Nun wurden die Ohren mit Hilfe einer Pinzette in eine dünne dorsale Hälfte und eine dickere ventrale Hälfte geteilt, wobei schließlich beide Hälften mit der Schnittseite nach unten in eine Petrischale mit einer 20 ml 1% Trypsin/PBS-Lösung gegeben wurden. Der daraus resultierende Trypsinverdau wurde für die dünneren Gewebehälften bei 37°C und 45 Min. durchgeführt, wohingegen der Verdau der dickeren Ohrschichten bei gleicher Temperatur 90 Min. andauerte. Nach Entfernung des Trypsins mit Hilfe einer Pipette wurde eine Hautschicht von den jeweiligen Gewebehälften gelöst und diese dann auf ein steriles Sieb in einer Petrischale mit RPMI-Medium gelegt. Auf diesem Sieb wurden die Gewebehälften für 4 Min. geschüttelt was zu der Freigabe der Zellen führte. Danach wurde das Medium mit den Zellen in der Petrischale abgenommen und bei 1600 Upm 10 Min. zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Pellet in RPMI-Medium aufgenommen und die Suspension auf eine Zellzahl von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 2.2.6 Agarosegele

Zur Analyse von DNA-Fragmenten und Gesamt-RNA wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurde 1 g RNase-freie Agarose in 100 ml H<sub>2</sub>O gegeben und in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Auflösen der Agarose wurde das Reaktionsgefäß auf einen Rührer gestellt und die Lösung auf ca. 30-40°C abgekühlt. Während dieser Zeit wurden der Agaroselösung 2 ml 50x TAE-Puffer und 20 µl Ethidiumbromid (Stammlösung 1 mg/ml) zugegeben. Im Anschluss daran wurde die Lösung in den Schlitten einer horizontalen Gelkammer gegossen, welche bereits mit Gelkämmen versehen war. Nachdem das Gel sich abgekühlt hatte und somit fest war, wurde in die Kammer Laufpuffer (1x TAE-Puffer) gegeben und erst dann die Kämme vorsichtig herausgezogen, um damit einer Luftblasenbildung in den Taschen vorzubeugen. Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden nun im Verhältnis 6:1 mit DNA-Probenpuffer

---

gemischt, auf das Gel aufgetragen und in einem elektrischen Feld (5-10 V/cm) aufgetrennt. Die DNA- oder RNA-Banden wurden durch UV-Illumination sichtbar gemacht und mit einem Video-Copy-Prozessor dokumentiert.

### **2.2.7 Herstellung von Blutagarplatten**

Für die Kultivierung von Leishmanien wurden Blutagarplatten aus Kaninchenblut [Froschek, Labordiagnostik-Tierblutspezialitäten GmbH, Mühlheim] hergestellt. Hierbei wurden 6 g Hirn-Herz-Infusionsagar [Difco, Detroit, Michigan, USA] in 100 ml sterilem Wasser gelöst und im Autoklaven auf 120°C erhitzt. Im Anschluss daran wurden die Platten unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Rührfisches auf 45°C abgekühlt und mit 50 ml defibriertem Kaninchenblut, 50 ml 0,9% NaCl-Lösung, 90 µg/ml Penicillin [Sigma] und 150 µg/ml Streptomycin [Sigma] versetzt. Nun wurden jeweils 50 µl pro Napf in das noch flüssige Agargemisch in Mikrotiterplatten [Greiner, Frickenhausen] gefüllt, welche zuvor in einem ca. 45° Winkel in Stellung gebracht wurden. In dieser Stellung wurden die Platten bis zum vollständigen Erkalten des Blutagars arretiert und schließlich im Kühlschrank bei 4°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

### **2.2.8 Gewinnung und Kultivierung virulenter Leishmanien**

Die für die Versuche benötigten virulenten Leishmanien (MHOM/IL/81/FE/BNI) wurden aus infizierten Mäusen gewonnen. Dazu wurden promastigote Leishmanien, welche zuvor auf Blutagarplatten kultiviert wurden, nach der sechsten Passage geerntet und für 10 Min. bei 4000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Leishmanien in sterilem PBS aufgenommen und  $1 \times 10^7$  Leishmanien durch subkutane Injektion in die Rückenhaut nahe der Schwanzwurzel von BALB/c-Mäusen injiziert. Nach vier Wochen wurde die somit entstandene Hautläsion entnommen und durch ein steriles Sieb gerieben, welches sich zusammen mit RPMI-Medium in einer Petrischale befand. Hierbei wurden Haare und Haut der Maus von den Parasiten getrennt. Mit Hilfe einer anschließenden Zentrifugation für 10 Min. bei 1500 Upm wurden restliche Gewebekomponenten von den Leishmanien separiert. Eine zweite



Zentrifugation für 10 Min. bei 4000 Upm führte schließlich zu einer Sedimentation der Leishmanien. Das somit entstandene, Leishmanien enthaltende Pellet wurde in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen und für weitere Versuche mit Leishmanien eingesetzt. Ein Teil der Leishmaniensuspension wurde auf Kaninchenblut-Schrägagarplatten überführt. Diese wurden bei 28°C, 5% CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Nach fünf bis sechs Tagen wurden die im Überstand vorliegenden stationären Leishmanien geerntet. Hierbei wurde das Medium von den Agarplatten abgenommen und bei 4000 Upm für 10 Min. zentrifugiert. Nach dem Waschen des Pellets in PBS und erneuter Zentrifugation bei 4000 Upm für 10 Min. wurden die somit gewonnenen Parasiten erneut auf Blutagarplatten überführt und die entstandene Passage im Brutschrank inkubiert. Für den Versuch wurden schließlich promastigote Leishmanien in der stationären Phase von der sechsten Passage einer Blutagarplatte geerntet, mit PBS bei 4000 Upm gewaschen und in einem Verhältnis von 1:10 auf die Zellen gegeben. Die Infektionsdauer betrug hierbei 24 h. Das Parasitenlysat wurde ebenfalls aus der sechsten Passage frisch geernteter Leishmanien gewonnen. Hierbei wurden die Parasiten in PBS gewaschen und schließlich durch wiederholtes Einfrieren bei -80°C und Auftauen bei 90°C lysiert. Für den Versuch wurden 30 µl dieses Lysats, was einem Verhältnis von 30 Parasiten pro Zelle entspricht, zu 1 x 10<sup>6</sup> Zellen gegeben.

### **2.2.9 Bestimmung des Läsionsverlaufs von Mäusen**

Die für diesen Versuch gewonnenen Leishmanien wurden in der stationären Phase aus der vierten Passage von Blutagarplatten gewonnen. Hierzu wurden die Leishmanien von der Blutagarplatte mit PBS (GIBCO) aufgenommen und für 10 Min. bei 4000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml PBS aufgenommen. Danach erfolgten 2 Waschschrte mit PBS für 10 Min. bei 4000 Upm. Schließlich wurde das Pellet in 20 ml PBS aufgenommen und die darin befindliche Leishmanienkonzentration am Mikroskop bestimmt. Je 0.5 x 10<sup>6</sup> Leishmanien/50 µl wurden nun beidseitig an der Schwanzwurzel der Maus injiziert. Der Läsionsverlauf wurde nun wöchentlich beobachtet. Hierzu wurde folgende Definition für Läsionsgrößen von Mitchel *et al.* (137) übernommen: 1 = kleine Schwellung, 1.5 = diffuse Schwellung aber keine Läsion, 2 = große Schwellung oder

Läsion < 5 mm im Durchmesser, 3 = Läsion mit einem Durchmesser von 5 bis 10 mm, 4 = Läsion größer als 10 mm.

### **2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der Plasmid-DNA-Purification-Kit von Quiagen [Hilden] verwendet. Hierbei wird eine 500 ml Bakterienkultur, welche über Nacht bei 37°C unter aeroben Bedingungen gewachsen war, bei 4000 Upm und 4°C für 12 Min. abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Zellpellet in 10 ml Puffer P1 aufgenommen. Dieser Puffer stammt vom Hersteller und dient der Lyse der Bakterienzelle. Danach wurde Puffer P2 hinzugefügt, welcher Natriumhydroxid beinhaltet und zum Fällen der DNA dient. Der Puffer wurde hierbei durch vorsichtiges Schwenken in einem 50-ml-Röhrchen verteilt und das Reaktionsgemisch für 5 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun wurde Puffer P3 zugegeben, welcher die Präzipitation verstärkte. Nach Invertieren des Röhrchens wurde die Lösung für 15 Min. auf Eis gestellt und schließlich bei 12000 Upm und 4°C für 30 Min. zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und erneut bei 12000 Upm und 4°C für 20 Min. zentrifugiert. Nun wurde der Überstand vom Pellet, welches aus genomischer DNA, Proteinen und Zelltrümmern bestand, getrennt und auf eine Säule (Quiagen-tip 500), die zuvor mit Hilfe von Puffer QBT präequilibriert wurde, gegeben. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit jeweils 30 ml Puffer QC, wurde die in der Säule gebundene DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Nun wurde das Eluat mit 10,7 ml Isopropanol versetzt und für 30 Min. und 4°C bei 12000 Upm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur zum Trocknen gebracht. Nachdem das restliche Ethanol vollständig verdunstet war, wurde das Pellet in 200 µl destilliertem Wasser aufgenommen. Zur Kontrolle der Plasmidisolierung wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym PstI durchgeführt, welches das Plasmid lediglich an einer Stelle schneiden kann. Nach dieser Linearisierung wurde das Spaltprodukt auf einem 1% Agarosegel aufgetragen und anhand des somit entstandenen Gelbilds überprüft.

### **2.2.11 DNA-Transformation**

1-2 µg Plasmid-DNA wurden zu 210 µl kompetenten Bakterien, welche langsam auf Eis aufgetaut wurden, gegeben. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 2 Min. bei 42°C und für weitere 8 Min. bei 37°C erwärmt. Nach Zugabe von 1 ml sterilem LB-Medium wurde der Ansatz zur Expression der plasmidkodierten Resistenzgene für 45 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und nach dem Entfernen des Überstands bis auf ein Endvolumen von etwa 100 µl in konzentrierter Form ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden nach dem Ausplattieren bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Transformanten wurden im Anschluss daran mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und mit Hilfe der Restriktionsanalyse überprüft.

### **2.2.12 Gesamt-RNA Präparation**

Die Präparation der Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Midi Kits [Qiagen, Hilden, Deutschland]. Hierbei wurden die Zellen für 10 Min. bei 1600 Upm pelletiert. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe des RLT-Puffers, welcher im Kit enthalten war, bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 2 ml 70% Ethanol zum homogenisierten Lysat wurde die Lösung über eine RNeasy-Filtersäule gegeben. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 4 ml Puffer RW1, gefolgt von einer 5 Min. Zentrifugation bei 4000 Upm. Danach wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 2,5 ml RPE-Puffer gewaschen. Zur Elution der Gesamt-RNA wurden 150 µl RNase-freies Wasser über die Säule gegeben und für 3 Min. bei 4000 Upm zentrifugiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde schließlich in einem 1% Agarosegel überprüft.

### 2.2.13 RNase Protection Assay

Die Expression und Analyse von Chemokinen und Chemokinrezeptoren wurde mit Hilfe des Riboquant Ribonuclease Protection Assay Kit „RIBOQUANT“ durchgeführt [BD Biosciences Pharmingen]. Hierbei wurden folgende Template Sets verwendet:

- mCK-5, welches die murinen Chemokine XCL1/Lymphotaktin, CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin, CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CXCL1/MIP-2, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, und CCL1/TCA-3 detektiert.
- mCK-5 Custom Template Set, welches zusätzlich zu den in mCK-5 aufgelisteten Chemokinen noch CCL19/MIP-3 $\beta$  und CCL20/MIP-3 $\alpha$  quantifizieren kann.
- mCR-5, welches die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR1b, CCR3, CCR4, CCR5 und CCR2 detektiert.
- mCR-5 Custom Template Set, welches zusätzlich zu den in mCR-5 aufgelisteten noch DNA-Fragmente zur Detektion von CCR7, CCR6 und CXCR3 besitzt.

Die Experimente zur Analyse der Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubation mit verschiedenen Stimuli wurde die Gesamt-RNA infizierter und nicht infizierter dendritischer Zellen mit Hilfe des RNeasy Kits [Quiagen] isoliert. Die Gesamt-RNA wurde hierbei unter RNase-freien Bedingungen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Synthese der radioaktiven Probe wurde [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP, RNase-Inhibitor, DTT (100 mM), 5X Transkriptionspuffer, T7 RNA-Polymerase (20 U/ $\mu$ l) und ein Nukleotid-Mix (40 U/ $\mu$ l) verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde wurde die Probensynthese mit Hilfe von DNase (1 U/ $\mu$ l) gestoppt. Die Zugabe von EDTA (20 mM), Tris-gesättigtem Phenol, Chloroform-Isoamylalkohol (50:1) und Hefe-tRNA (2 mg/ml) erfolgte nach einstündiger Inkubation bei 37°C. Die Probe wurde anschließend 5 Min. bei 14000 Upm zentrifugiert. Danach wurde die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und es erfolgte die Zugabe von Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis: 50:1). Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 Upm wurde die wässrige

Phase entnommen und mit Hilfe von Ammoniumazetat (4 M) und Ethanol (100%) für 30 Min. bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gefällt. Im Anschluss daran wurde das Pellet nach 30 Min. Zentrifugation und Abnahme des Überstandes in 30  $\mu\text{l}$  RNasefreiem Hybridisierungspuffer resuspendiert.

Zur Quantifizierung des radioaktiven Einbaus wurde ein Szintillationszähler verwendet. Nach Messung der Radioaktivität wurden die Proben auf eine Konzentration von  $3 \times 10^5$  counts/ $\mu\text{l}$  eingestellt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die anschließende Hybridisierungsreaktion wurden 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA und  $3 \times 10^5$  counts/ $\mu\text{l}$  von der radioaktiven Probe pro Ansatz verwendet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei  $56^{\circ}\text{C}$ . Im Anschluss daran wurde ein RNase-Verdau für 45 Min. bei  $30^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Ein anschließender Proteinase K-Verdau für 15 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  stoppte den RNase-Verdau ab. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die Probe in 10  $\mu\text{l}$  Probenpuffer resuspendiert und auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Analyse des Gels wurde dieses auf Whatman-Papier geblottet, getrocknet und über Nacht mit Hilfe eines Röntgenfilms exponiert. Die Auswertung des Gels erfolgte auf halblogarithmischem Papier.

## **2.2.14 Migrationstest**

### **2.2.14.1 Analyse der Migrationsaktivität von dendritischen Zellen**

Die Migrationsaktivität von dendritischen Zellen wurde mit Hilfe von Zellkulturplatten der Firma Costar [Schiphol-Rijk, Niederlande] bestimmt. In das obere Kompartiment der Transwellkammer wurden  $1 \times 10^6$  Zellen, welche in 0,5 ml RPMI-Kulturmedium resuspendiert wurden, pipettiert. Dem unteren Kompartiment wurden 1,5 ml RPMI-Medium und entweder CCL2/MCP-1 (50 ng/ml) oder CCL3/MIP-1 $\alpha$  (50 ng/ml) zugegeben. Im Kontrollansatz wurde auf die Zugabe von Chemokinen verzichtet. Die in diesem Migrationsaktivitätstest verwendete Porengröße der Transwellkammer betrug 8  $\mu\text{m}$ . Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurde die Zellsuspension des unteren Kompartimentes abgenommen und für 10 Min. bei 1600 Upm zentrifugiert. Nun wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 100  $\mu\text{l}$  RPMI-

Medium aufgenommen. Im Anschluss daran wurde die Gesamtzellpopulation mit Hilfe von Trypanblau gefärbt und mikroskopisch die Zellzahl bestimmt.

#### **2.2.14.2 Gewinnung von T-Zellen und Analyse ihres Migrationsverhaltens**

Zur Untersuchung der Migrationsaktivität von T-Zellen wurden ebenfalls Transwellplatten der Firma Costar verwendet. Für diesen Versuch wurden Zellen aus fünf Wochen infizierten suszeptiblen und resistenten Tieren gewonnen. Dazu wurden die Tiere mit  $1 \times 10^7$  Leishmanien an der Schwanzwurzel infiziert und die Entnahme der Milz und der dränierenden Lymphknoten fünf Wochen nach Infektion vorgenommen. Die Organe wurden durch einen Filter gerieben und die so entstehende Zellsuspension bei 1600 Upm für 10 Min. zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Medium und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 40  $\mu$ l Puffer (entgastes PBS, 0,5% BSA und 2 mM EDTA) pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Im Anschluss daran wurde ein biotinylierter Antikörpercocktail, welcher aus monoklonalen Antikörpern gegen CD11b (Mac-1) (IgG2b aus der Ratte), CD45R (B220) (IgG2a aus der Ratte), DX5 (IgM aus der Ratte) und Ter-119 (IgG2b aus der Ratte) besteht, hinzugefügt. Der Antikörpercocktail wurde hierbei dem Pan-T-Isolation-Kit [Miltenyi Biotec GmbH, Germany] entnommen. Die Lösung wurde gemischt (Vortexer) und 10 Min. bei 4°C inkubiert. Danach wurden erneut 30  $\mu$ l des entgasten Puffers zur Lösung pipettiert und 20  $\mu$ l Anti-Biotin-MicroBeads pro  $10^7$  Zellen hinzugefügt. Die so entstandene Suspension wurde für 15 Min. auf dem Vortex geschüttelt und anschließend für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Danach wurden 2 ml PBS-Puffer hinzupipettiert und bei 1600 Upm für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt und die Zellen in 500  $\mu$ l entgastem Puffer resuspendiert. Nun wurde die Zellsuspension in ein MACS-Röhrchen [Miltenyi Biotec, Gladbach, Deutschland], welches sich in einer Magnetvorrichtung befand und zuvor mit entgastem Puffer kalibriert wurde, pipettiert. Die Technologie basiert auf dem Gebrauch von MACS-MicroBeads, speziellen MACS-Röhrchen und dem MACS-Separator. MACS-MicroBeads sind superparamagnetische Partikel, welche an spezifischen monoklonalen Antikörpern angelagert sind. Diese werden benutzt, um die Zielzellen magnetisch zu markieren. Aufgrund der geringen Größe der MicroBeads ist daher ein starkes magnetisches

Feld notwendig, um eine Separation zu bewirken. Dieses wird durch einen äußeren Magneten erzeugt, welcher seine Kraft auf eine Matrix innerhalb der MACS-Röhrchen überträgt. Spezifisch markierte Zellen bleiben nun aufgrund magnetischer Wechselwirkungen beim Durchfließen der Säule an der Matrix hängen und werden so von nicht markierten Zellen separiert. Das Prinzip des Pan-T-Isolation-Kits besteht nun aus einer negativen Selektion der T-Zellen, welche ungehindert die Säule passieren können. Andere Zellen, wie z. B. Makrophagen oder dendritische Zellen werden aufgrund des Antikörpercocktails markiert und daher positive selektioniert. Nach der negativen Selektion der T-Zellen wurde die Säule noch zweimal mit jeweils 500 µl entgastem Puffer gewaschen und das Eluat bei 1600 Upm für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde schließlich mikroskopisch bestimmt und  $5 \times 10^6$  T-Zellen in das obere Kompartiment der Transwellkammer gegeben. In die untere Kammer wurde Überstand von 24 Stunden infizierten bzw. nicht-infizierten dendritischen Zellen gegeben. Im Anschluss daran wurde die Transwell-Platte bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Zellsuspension abgenommen und bei 1600 Upm für 10 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen und die Anzahl der Zellen nach Färbung mit Trypanblau mikroskopisch bestimmt.

### **2.2.15 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die RT-PCR eignet sich zum Nachweis von Transkripten ohne eine cDNA Bibliothek konstruieren zu müssen. Der erste Schritt ist die Synthese einer sogenannten „first-strand“ cDNA, daran schließt sich eine PCR mit den gewünschten Primern an.

#### **2.2.15.1 Synthese der cDNA und Reverse-Transkriptase Reaktion**

Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Midi Kits [Quiagen]. Im Anschluss daran wurde diese einem DNase-Verdau unterzogen, indem sie für 60

Min. bei 37°C mit der RNase-freien DNase 1 [Pharmacia Biotech, St. Albans, England] inkubiert wurde, um dadurch Kontaminationen durch genomische DNA zu entfernen. Danach erfolgte die Synthese der cDNA. Hierbei wurde der Omniscript-RT-Kit [Quiagen] verwendet, wobei ein Mastermix bestehend aus 2 µg Gesamt-RNA, 2 µl 10x Puffer, 2 µl dNTP Mix (5 mM), 1 µl Oligo-dT Primer (10 µM), 1 µl RNase-Inhibitor (10 Units/µl), 1 µl Omniscript, 1 µl Reverse Transkriptase (0,5 Units/µl) und RNase freiem H<sub>2</sub>O zusammengestellt wurde. Nach dieser Zusammenstellung erfolgte die Zugabe der RNA-Probe und ein anschließender 60 Min. Inkubationsschritt bei 37°C. Die Reaktion wurde schließlich durch Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase abgestoppt (5 Min. bei 93°C) und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.15.2 PCR

Für die anschließende RT-PCR wurden folgende Primerpaare konstruiert:

#### CCR2:

CCR2FOW 5'-GAAGCAAATTGGAGCTTGGA-3'  
CCR2REV 5'-AACCAATGTGATAGAGCCCT-3'

#### CCR5:

CCR5FOW 5'-ACTTGGGTGGTGGCTGTGTTT-3'  
CCR5REV 5'-TTGTCTTGCTGGAAAATTGAA-3'

#### CCR7:

CCR7FOW 5'-ACAGCGGCCTCCAGAAGAAG-3'  
CCR7REV 5'-TGACGTCATAGGCAATGTTGA-3'

#### β-actin:

ACTFOW 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'  
ACTREV 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGACCCT-3'

Mit jedem Primerpaar wurde nun eine spezifische PCR durchgeführt. Hierbei wurden je 1 µl Primer [25 pmol/µl] eines Primerpaares, 4 µl dNTP [2,5 mM], 5 µl 10x Puffer (Tris pH 8,3 [200 mM]), MgCl<sub>2</sub> [15 mM], KCl [250 mM] und Tween 0,5 %), 4 µl MgCl<sub>2</sub>,



---

0,25 µl Tag-Polymerase, 5µl cDNA und 29 µl H<sub>2</sub>O in ein 50 µl Eppendorff-Reaktionsgefäß gegeben. Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Basierend auf den verschiedenen Sequenzen der jeweiligen Primer wurden unterschiedliche PCR-Protokolle verwendet. So wurde zur Amplifikation der cDNA mit Hilfe der Primerpaare β-Aktin, CCR2 und CCR5 das gleiche Protokoll gewählt. Dieses bestand aus einem initialen Aktivierungsschritt für 120 Sek. bei 94°C. Schritt zwei bestand aus dem Denaturierungsschritt bei 95°C für 60 Sek., dem Annealingschritt bei 58°C für 60 Sek. und dem Elongationsschritt bei 72°C für 60 Sek. Schritt zwei umfasste hierbei 30 Zyklen. Als letzter Schritt wurde eine Elongation bei 72°C für 600 Sek. durchgeführt. Das Protokoll zur Amplifikation spezifischer CCR7-Fragmente unterschied sich von dem vorangegangenen Protokoll lediglich in der Annealingtemperatur, welche bei 69°C für 60 Sek. durchgeführt wurde. Alle anderen Schritte des Protokolls waren hierbei identisch. Zur Überprüfung der PCR wurden ke 5 µl der amplifizierten Proben mit 2 µl Probenpuffer (50% Glycerol, 0,04% Bromphenolblau, 1 mM EDTA) versetzt, auf ein 1%iges TAE/Agarosegel aufgetragen und für 60 Min. bei 100V aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss daran mit Ethidiumbromid gefärbt und die Banden unter UV-Licht fotografiert.

#### **2.2.16 Bestimmung der Infektionsrate von Zellen mit Hilfe von Acridinorange und Ethidiumbromid**

Bei der Bestimmung der Infektionsrate von dendritischen Zellen und Makrophagen wurde eine Differenzierung zwischen intrazellulären vitalen Leishmanien und toten Erregern vorgenommen. Hierbei wurden die Kulturen infizierter Langerhans-Zellen und peritonealer Makrophagen mit einer Ethidiumbromid-Acridinorange-Lösung 10 Min. bei 37°C auf einer Heizplatte inkubiert. Bei Ethidiumbromid und Acridinorange handelt es sich um DNA-Interkalatoren, die nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge (450-490 nm) sichtbar gemacht werden können. Die Simultanfärbung mit Ethidiumbromid und Acridinorange hat den Vorteil, dass lebende und tote Zellen unterschieden werden können, denn das grün leuchtende Acridinorange dringt zwar

sowohl in lebende wie auch tote Zellen ein, wird aber im Falle von toten Zellen vom rot leuchtenden Ethidiumbromid überlagert. Nachdem man nun die Zellen mit der Ethidiumbromid-Acridinorange-Lösung 10 Min. bei 37°C auf einer Heizplatte inkubiert hatte, wurde anschließend das überschüssige Ethidiumbromid und das Acridinorange mit 1x PBS (10 Min., 37°C) vorsichtig gewegewaschen. Nach einer Formaldehydfixierung (4% Formaldehyd in 1x PBS), welche über einen Zeitraum von 10 Min. bei 37°C durchgeführt wurde, wurden die intrazellulären Leishmanien unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 455 nm gezählt. Hierbei wurde die Anzahl von lebenden grün gefärbten Leishmanien in 100 infizierten Zellen und die daraus resultierende Infektionsrate in Prozent ermittelt.

## **2.2.17 *In-situ*-Hybridisierung**

Die *In-situ*-Hybridisierung ist eine überaus nützliche Methode, um DNA- und RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen bis hin zu einzelnen Chromosomen zu lokalisieren. Im Gegensatz zur Nucleinsäureanalyse durch eine Southern- oder Northern-Blot-Hybridisierung wird bei dieser Technik das Hybridisierungssignal nicht auf einer festen Trägermembran, sondern direkt im biologischen Präparat (*in situ*) sichtbar. Die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Methoden zur *in situ*-Hybridisierung wurden dem Buch „*In situ*-Hybridisierung“ entnommen (113)

### **2.2.17.1 Beschichtung der Objektträger mit poly-L-Lysin**

Während der *In-situ*-Hybridisierung ist es notwendig Gewebeschnitte auf dem Objektträger zu waschen. Aus diesem Grund war es unerlässlich die Adhärenz des Gewebes auf den Objektträgern mit Hilfe einer poly-L-Lysin-Beschichtung zu verstärken. Die Objektträger wurden hierfür für 24 Std. in 5% PBS-Detergenzlösung [Roth] inkubiert. Im Anschluss daran wurde mit ca. 50°C warmen RNase-freiem H<sub>2</sub>O gespült. Eine zweimalige Nachspülung mit destilliertem Wasser sollte restliche Detergenzienbestandteile entfernen. Die Objektträger wurden schließlich für 4 Std. bei 200°C gebacken, um somit RNase-Kontaminationen zu entfernen. Nach einem

Abkühlschritt wurde eine poly-L-Lysin-Beschichtung der Objektträger durchgeführt. Hierfür wurden die Objektträger in eine 0,01 M Tris-HCl-Lösung (pH 8,0) [Boehringer] mit 50 µg/ml poly-L-Lysin [Sigma] getaucht. Das anschließende Trocknen wurde bei 37°C auf einem Heizblock durchgeführt. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Objektträger unter RNase-freien Bedingungen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

#### **2.2.17.2 Herstellung von <sup>35</sup>S-markierten RNA-Sonden (*In-vitro*-Transkription)**

DNA-Sequenzen weist man gewöhnlich mit markierten DNA-Sonden nach, während RNA-Sequenzen entweder mit DNA- oder RNA-Sonden nachgewiesen werden. In dieser Doktorarbeit wurden RNA-Sequenzen mit Hilfe von RNA-Sonden nachgewiesen. Im Vergleich zu DNA-RNA-Hybriden weisen RNA-RNA-Hybride eine größere Stabilität auf (113). Zur Herstellung von RNA-Sonden wurden Vektoren verwendet, welche zum einen die zu bestimmende Chemokinsequenz in kodierter Form vorwies und zum anderen die Transkriptionsstartpunkte für RNA-Polymerasen enthielten. An diesen Stellen kann in Gegenwart markierter Nukleotide *in vitro* die Transkription initiiert werden. Auf diese Weise erhält man einzelsträngige RNAs, welche als Ribosonden bezeichnet werden. Zur Synthese dieser Ribosonden wurden die Plasmide unter Verwendung von Restriktionsenzymen, welche das Plasmid nur an einer Stelle in der Vektorsequenz spalten konnten, linearisiert. Die radioaktive Markierung der Nukleinsäure erfolgte nun durch den enzymatischen Einbau von <sup>35</sup>S-markierten Nukleotiden [<sup>35</sup>S-UTP]. Hierbei wurden 2 µl der zuvor entstandenen linearisierten Sequenz (1 µg/µl) zusammen mit 12 µl Polymeraselösung A für 45 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Polymeraselösung bestand hierbei aus 20 µl 5x Polymerasepuffer, 10 µl 5 mg/ml BSA [Sigma], 2 µl 50 U/µl RNase-Inhibitor [Boehringer], 1 µl Sp6-, T3- oder T7-Polymerase [Boehringer], 14,6 µl H<sub>2</sub>O und 3,5 µl <sup>35</sup>S-UTP 800 Ci/mMol [Amersham]. Nach Zugabe einer zweiten Polymeraselösung, welche 2 µl 5x Polymerasepuffer, 7 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Sp6-, T3- oder T7-RNA-Polymerase [Boehringer] enthielt, erfolgte ein erneuter Inkubationsschritt für 30 Min. bei 37°C. Ein anschließender DNase-Verdau mit 2 µl DNase-Lösung zur Entfernung der Vektor-DNA wurde für weitere 15 Min. bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgte das Fällern der Probe mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gefolgt von einer Chloroform-Isoamylalkohol

(24:1) -Extraktion. Nach Zugabe des gleichen Volumens 4 M Ammoniumacetat und des 2,5fachen Volumens 100% Ethanol wurde die RNA 1 Std. bei  $-80^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Im Anschluss daran wurde die Probe bis auf Raumtemperatur wieder erwärmt und 100 Min. bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen, das Pellet mit 0,5 ml 70% Ethanol gewaschen und 5 Min. bei 14000 Upm zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgenommen und das Sediment getrocknet. Anschließend wurde eine alkaline Hydrolyse durchgeführt, da die Sonden eine Länge von 200 Basenpaaren (Bp) überschritten. Hierfür wurde das Sediment in 50  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser resuspendiert und 50  $\mu\text{l}$  2x Carbonatpuffer zugegeben. Mit Hilfe der nachstehenden Gleichung wurde die Dauer des folgenden alkalinen Hydrolyseschrittes bei  $60^{\circ}\text{C}$  errechnet:

$$t = \frac{(L_i - L_f)}{K \times L_i \times L_f}$$

Nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  10%iger Essigsäure, 10  $\mu\text{l}$  3 M Natriumacetat, 250  $\mu\text{l}$  100%igem Ethanol und 30  $\mu\text{l}$  tRNA (2 mg/ml) [Boehringer] wurde die Probe präzipitiert, gewaschen und schließlich bei Raumtemperatur getrocknet. Das Sediment wurde im Anschluss daran in 20  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser resuspendiert und es erfolgte die Bestimmung des radioaktiven Einbaus mit Hilfe des Szintillationszählers. Nach Messung der Radioaktivität der Probe wurde diese auf eine Endkonzentration von  $2 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{l}$  eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.17.3 Gewebefixierung

Der Erfolg einer *In-situ*-Hybridisierung hängt nicht zuletzt von der Konservierung des Ausgangsmaterials ab, bei der die Zielsequenzen und Gewebemorphologie erhalten bleiben. Außerdem muss das konservierte Gewebe für die radioaktive Sonde und Nachweisreagenzien permeabel sein. Aus diesem Grund wurde das Hautgewebe, welches nach der Entnahme in OCT-Compound-Medium [Sakura, Niederlande] eingebettet und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, nach dem Schneiden mit

Hilfe des Kryostaten in 4-5 µm dicken Schnitten rasch fixiert, um die Aktivitäten endogener Nukleasen und anderer abbauender Enzyme möglichst gering zu halten. Hierbei wurden die Schnitte auf Lysin-beschichteten Objektträgern platziert und für 1 Std. bei 45°C auf einem Heizblock getrocknet. Die anschließende 20 Min. Fixierung des Gewebes erfolgte mit 4% Paraformaldehyd in 1x PBS. Die fixierten Schnitte wurden nun für jeweils 5 Min. in eine absteigende PBS-Reihe (3x PBS, 2x PBS und 1x PBS) und schließlich in einem H<sub>2</sub>O-Bad getaucht. Die anschließende Dehydrierung der Proben erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 60%, 80%, 95%, 100%) bis zur vollständigen Trocknung der Probe in der Luft bei Raumtemperatur.

#### 2.2.17.4 Hybridisierung

Nach Präparation der Gewebeproben konnte nun mit der Herstellung des Hybridisierungsgemisches begonnen werden, welches immer erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden sollte. Es setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 100% Formamid
- 50% Dextransulfat: Das Dextransulfat wurde zuvor in DEPC-behandeltem Wasser gelöst, durch einen Mikrofilter (0,22 µm) gefiltert und portionsweise bei -20°C gelagert.
- 10x Salze: Hierbei handelte es sich um ein Gemisch bestehend aus 3 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,8) und 50 mM EDTA in DEPC-behandeltem Wasser.
- tRNA: 100 mg/ml nucleasfreie tRNA in DEPC-behandeltem Wasser.
- 100x Denhardt-Lösung: 2% Rinderserumalbumin, 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon in Wasser.

Pro Objektträger wurde nun das Hybridisierungsgemisch, bestehend aus 16 µl 100% Formamid, 8 µl 50% Dextransulfat, 4 µl 10x Salze, 0,4 µl tRNA, 0,4 µl 100x Denhardt-Lösung und 3,2 µl Wasser, angesetzt. Nach Fertigstellung des Hybridisierungsgemisches wurde die radioaktive RNA-Sonde für 2 Min. bei 80°C denaturiert und im Anschluss daran 8 µl davon zu 32 µl Hybridisierungslösung

zugegeben. Auf jeden Objektträger wurden nun 40 µl des Gemischs gegeben und mit RNase-freien Deckgläsern versehen. Es folgte nun ein Inkubationsschritt der Objektträger bei 46°C über Nacht in einer Feuchtkammer, welche mit 50% Formamid und 2x Natriumchlorid-Zitronensäure-Puffer (SSC) getränktem Saugpapier ausgelegt wurde. Danach wurden die Objektträger unter leichtem Schütteln zweimal für 90 Min. in einer 50°C warmen Formamidwaschlösung (50% Formamid in 2x SSC) gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Objektträger zweimal für jeweils 5 Min. in NTE-Puffer (0,5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) gewaschen. Zur Entfernung nicht hybridisierter Proben wurden die Objektträger für 30 Min. bei 37°C in einer RNase A enthaltenden Lösung (20 µg/ml RNase A in NTE-Puffer) inkubiert und anschließend erneut in NTE-Puffer (RNase-frei) für 5 Min. gewaschen. Unter leichtem Schütteln wurden die Objektträger erneut für 90 Min. bei 50°C in der Formamidwaschlösung inkubiert und danach für 5 Min. in SSC gewaschen. Für den autoradiographischen Nachweis wurden die Proben in einer Dunkelkammer mit einer NTB-2-Fotoemulsion beschichtet und in lichtgeschützten Boxen, welchen Kieselgel zugegeben wurde, gepackt. Die Lagerung dieser Boxen erfolgte im Kühlschrank bei 4°C für vier bis sechs Wochen. Nach diesem Exponierungszeitraum wurden die Boxen in der Dunkelkammer geöffnet und die Objektträger mit Entwickler D19 und Fixierer [Unifix, Kodak] entwickelt. Die Präparate wurden anschließend mikroskopisch ausgewertet.

### **2.2.18 FACS-Analysen**

Die Durchflusszytometrie-Analyse (FACS steht für Fluorescence-Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet und dabei gemessen. Für die Durchführung der FACS-Analyse wurde eine Einzelzellsuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Hierfür wurden aus dem Knochenmark generierte dendritische Zellen am Tag 10 der *In-vitro*-Kultur geerntet und für 10 Min. bei 1600 Upm und 4°C zentrifugiert. Danach erfolgte ein Waschschriff mit PBS für 10 Min. bei 1600 Upm.

Anschließend wurde die Konzentration der Zellen mit RPMI-Medium auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 1 ml davon in ein 10 ml-FACS-Röhrchen gegeben, worin die FACS-Färbung vollzogen wurde. Hierfür wurden die Zellen zunächst erneut für 10 Min. bei 1600 Upm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in FACS-Puffer (1 ml Na-Azid, 10 ml FCS, PBS ad 500 ml) gewaschen. Danach erfolgte das Abblocken unspezifischer Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche entweder durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  eines 1:50-verdünnten anti-CD16/anti-CD32-Antikörpers [BD Biosciences Pharmingen] oder durch Zugabe von Ziegen-Serum. Die Zellsuspension wurde nun für 15 Min. auf Eis gestellt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers (Ratte anti-Maus CCR2 bzw. Ratte anti-Maus CCR5), gefolgt von einem Inkubationsschritt im Kühlschrank für 30 Min. Danach wurde die Probe mit FACS-Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Nun erfolgte die Zugabe eines zweiten Antikörpers. Bei diesem handelte es sich um einen R-Phycoerytrin [PE]-markierten Antikörper aus der Ziege, welcher sich spezifisch an den ersten Antikörper anlagerte. Erneut erfolgte ein Inkubationsschritt im Kühlschrank für 30 Min. Danach wurde wieder mit FACS-Puffer gewaschen, der Überstand verworfen und das Pellet in 500  $\mu\text{l}$  Fixierpuffer (2 g Paraformaldehyd in 200 ml PBS; pH 7,2-7,4) aufgenommen. Nun erfolgte die FACS-Analyse am FACS-Calibur [BD Biosciences Pharmingen].

### **2.2.19 Konfokale Lasermikroskopie**

Für die konfokale Lasermikroskopie-Analyse wurden dendritische Zellen am Tag 10 geerntet, mehrmals mit PBS gewaschen und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Zunächst wurden die Zellen mit Ziegen-Serum für 15 Min. im Eisbad inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers (Ratte anti-Maus CCR2 bzw. Ratte anti-Maus CCR5). Im Anschluss daran wurden die Zellen für 30 Min. in den Kühlschrank gestellt. Nach 30 Min. wurden die Zellen herausgenommen und für 10 Min. bei 1600 Upm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugationsschritt verworfen und es erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers (PE-konjugierter Ziege anti-Ratte). Erneut wurden die Zellen für 30 Min. in den Kühlschrank gestellt. Danach wurden die Zellen für 10 Min. bei 1600 Upm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Nach dieser extrazellulären

Färbung erfolgte nun die Färbung intrazellulärer Leishmanien. Hierfür wurde die Zellen in PBS aufgenommen, welches zudem noch Serum und Saponin beinhaltete (0.2% Saponin, 10% Serum in PBS). Das Saponin bewirkt hierbei die Durchlässigkeit der Zellen, welche für eine intrazelluläre Färbung unerlässlich ist. Anschließend wurden 100  $\mu$ l des PBS-Saponin-Puffergemischs mit 2  $\mu$ l Kaninchen-Antiserum, welches aus Leishmanien-infizierten Tieren gewonnen wurde, versehen und für 30 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Schließlich erfolgte die Zugabe eines Fluorescein-Isothiocyanat [FITC]-markierten Antikörpers (Hamster anti-Kaninchen) für 30 Min bei Raumtemperatur. Zum Abschluss dieser Färbung wurden die Zellen noch dreimal mit jeweils 500  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen und in 50  $\mu$ l PBS aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension auf einen Objektträger pipettiert und die Infektion am konfokalen Lasermikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm [Zeiss] analysiert.



### 3. Ergebnisse

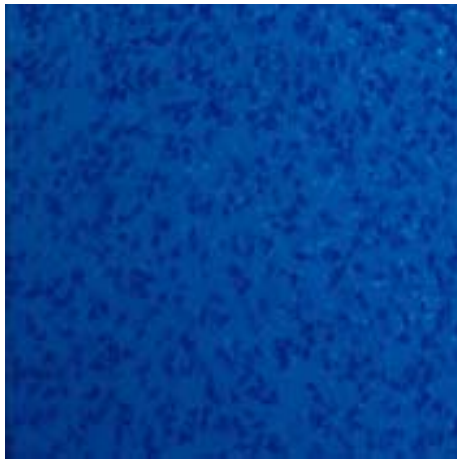
#### 3.1 Analyse der Chemokinexpression in Hautläsionen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen

In vorangegangenen Arbeiten, bei denen Biopsien aus Hautläsionen von Patienten mit kutaner Leishmaniose analysiert wurden, konnte erstmals gezeigt werden, dass die Verteilung von Chemokinen mit der Schwere des Krankheitsbildes korreliert (175, 176, 178). Diese Studien demonstrierten, dass in Läsionen von Patienten mit der selbstheilenden Form der lokalen kutanen Leishmaniose (LCL) eine erhöhte Expression des Chemokins CCL2/MCP-1 zu verzeichnen war. Patienten mit der chronisch verlaufenden Form der diffusen kutanen Leishmaniose (DCL) wiesen hingegen eine gesteigerte Expression des Chemokins CCL3/MIP-1 $\alpha$  in den betroffenen Hautarealen auf. Weiterhin ergaben diese Studien, dass CCL2/MCP-1 eine leishmanizide Wirkung besitzt, welche mit der Produktion von Superoxid-Ionen innerhalb der Wirtszelle korreliert (177). Darüber hinaus konnte eine Interaktion der Chemokine mit dem Netzwerk der von T-Zellen freigesetzten Lymphokine festgestellt werden, bei der CCL2/MCP-1 mit dem Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  synergistisch wirkt und die Heilung der LCL-Läsionen fördert. Das Th2-Zytokin IL-4 hemmt hingegen die CCL2/MCP-1-Produktion und fördert somit die unkontrollierte Replikation von Parasiten in DCL-Läsionen (177). Diese Studien beschränkten sich jedoch auf das humane System, bei dem es aus praktischer Sicht kaum möglich ist, die Kinetik der Chemokinexpression im gesamten Verlauf der Infektion zu verfolgen. Ein Grund hierfür liegt in dem oft nicht genügend zur Verfügung stehenden Biopsiematerial von infizierten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion. Aus diesen Gründen wurde das Mausmodell der experimentellen Leishmaniose eingesetzt, um eine detailliertere Analyse der Expression von Chemokinen und ihren Rezeptoren unter kontrollierten Bedingungen (konstante Infektionsdosis und -art, kontrollierte Infektionsdauer, Verwendung von klonierten Parasiten, einheitlicher genetischer Hintergrund des Wirts) vorzunehmen.

Während die Rolle der Zytokine bei der experimentellen Leishmaniose sehr gut charakterisiert ist, gibt es nur wenig Information über das Expressionsmuster der Chemokine. Daher wurden in dieser Arbeit BALB/c- und C57BL/6-Mäuse an der

Schwanzwurzel intradermal mit  $1 \times 10^7$  *L. major* infiziert und den Tieren nach unterschiedlichen Zeiträumen (1, 2, 4 und 7 Wochen) Hautbiopsien entnommen. Aus diesem Gewebematerial wurden anschließend Gefrierschnitte angefertigt und *In-situ*-Hybridisierungen mit  $^{35}\text{S}$ -markierten Antisense-RNA-Sonden durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Läsionsverlauf mit Hilfe des sog. Läsionsindex beobachtet und festgehalten. Die Ergebnisse zeigten hierbei über einen Zeitraum von sieben Wochen einen stetigen Anstieg der Expression von CCL2/MCP-1 in Hautläsionen von resistenten C57BL/6-Mäusen, während die Expression von CCL3/MIP-1 $\alpha$  weder in Hautläsionen von BALB/c- noch in denen von C57BL/6-Mäusen festgestellt wurde (Abbildung 8a-c).

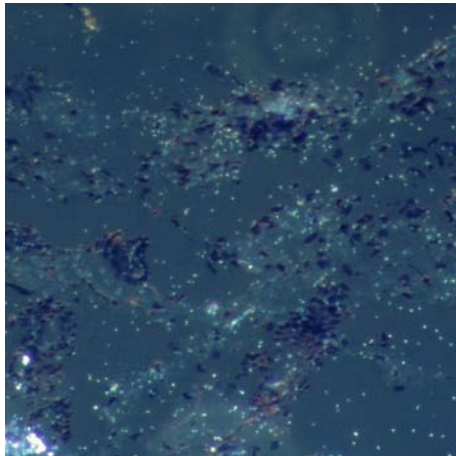
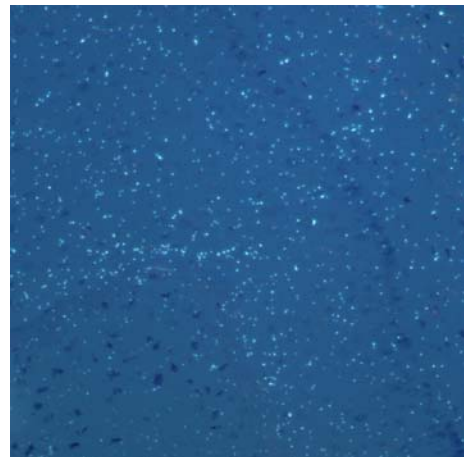
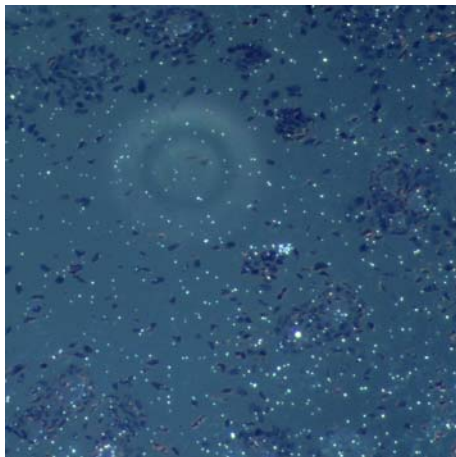
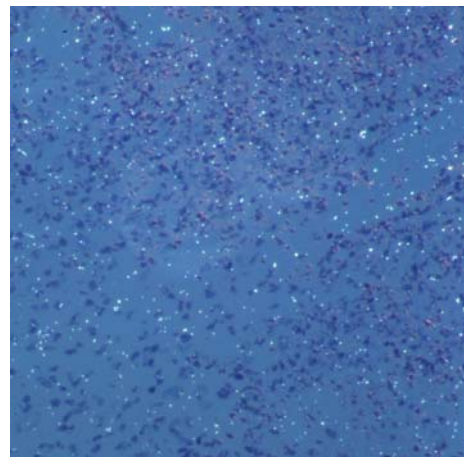
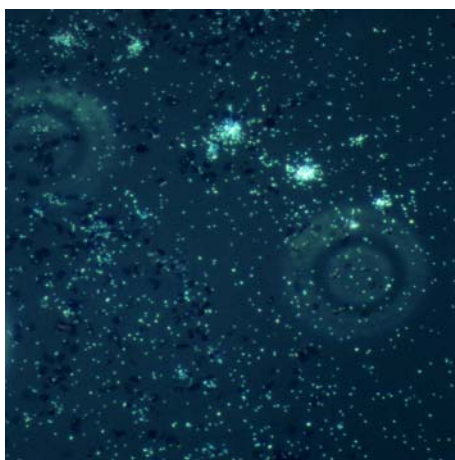
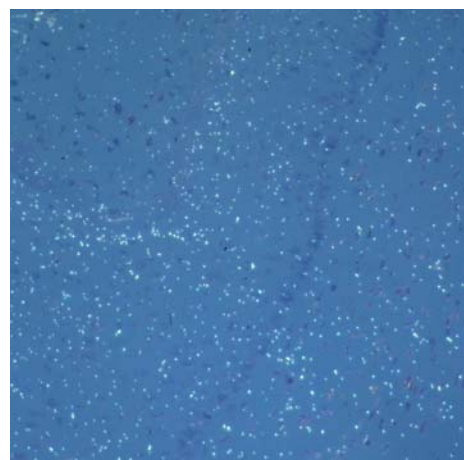
**C57BL/6: nicht infiziert**



**BALB/c: nicht infiziert**

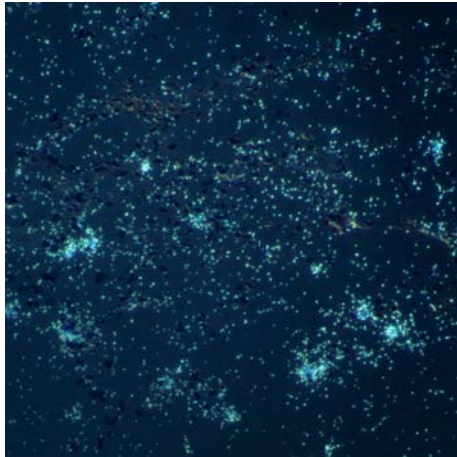


**Abbildung 8a:** *In-situ*-Hybridisierungen zum Nachweis von CCL2/MCP-1-mRNA in Hautläsionen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen unter Verwendung von  $^{35}\text{S}$ -UTP-markierten Antisense-mRNA-Proben. Die Bilder zeigen *In-situ*-Hybridisierungen nicht infizierter Hautareale.

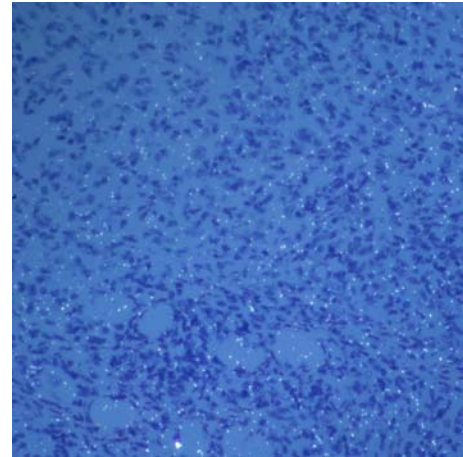
**C57BL/6: 1 Woche p. I.****BALB/c: 1 Woche p. I.****C57BL/6: 2 Wochen p. I.****BALB/c: 2 Wochen p. I.****C57BL/6: 4 Wochen p. I.****BALB/c: 4 Wochen p. I.**

**Abbildung 8b:** *In-situ*-Hybridisierungen zum Nachweis von CCL2/MCP-1-mRNA in Hautläsionen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen unter Verwendung von  $^{35}\text{S}$ -UTP-markierten Antisense-mRNA-Proben. Die Bilder zeigen *In-situ*-Hybridisierungen zum Zeitpunkt 1, 2 und 4 Wochen post Infektion (p.i.).

C57BL/6: 7 Wochen p. I.



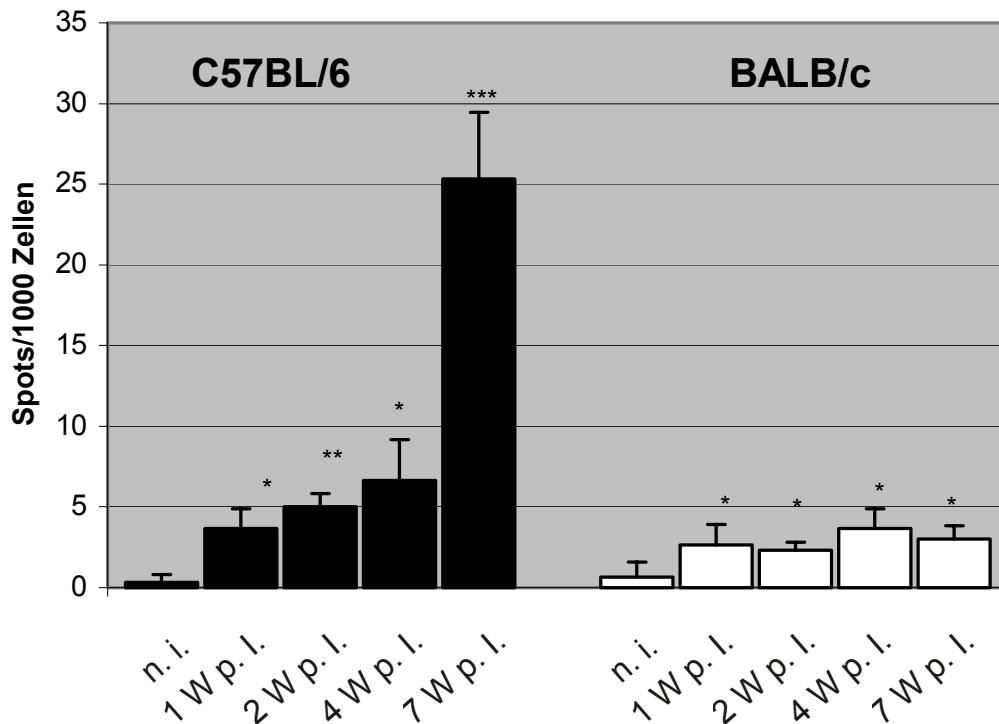
BALB/c: 7 Wochen p. I.



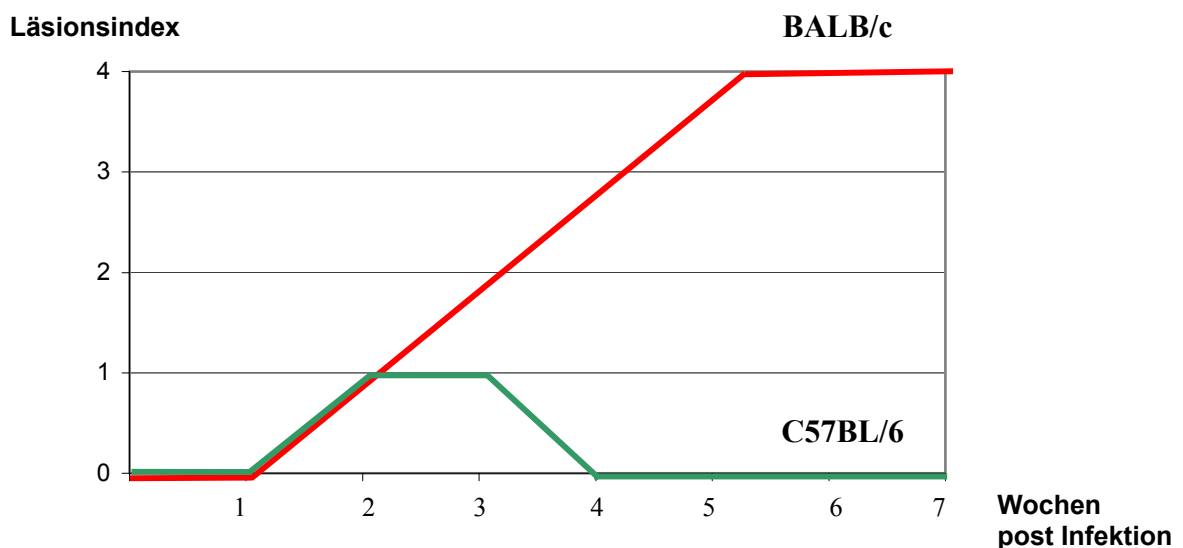
**Abbildung 8c:** *In-situ*-Hybridisierungen zum Nachweis von CCL2/MCP-1-mRNA in Hautläsionen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen unter Verwendung von  $^{35}\text{S}$ -UTP-markierten Antisense-mRNA-Proben. Die Bilder zeigen *In-situ*-Hybridisierungen zum Zeitpunkt 1, 2 und 4 Wochen post Infektion (p. I.).

Anhand der *In-situ*-Hybridisierungsbilder der Abbildungen 8 a-c wird der Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen hinsichtlich der CCL2/MCP-1-Expression überaus deutlich. So ist auf diesen Bildern eine Zunahme der Anzahl radioaktiver Signale im Laufe der Infektion in Hautläsionen infizierter C57BL/6-Mäuse zu sehen. Im Vergleich dazu ist keine Zunahme an Signalen im Verlauf der kompletten Infektionsdauer bei BALB/c-Mäusen zu erkennen. Um jedoch eine genauere Aussage über die Kinetik der Chemokinexpression im infizierten Gewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen treffen zu können, wurden die Gewebeproben lichtmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde am Mikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung die Anzahl radioaktiver Signale aus 1000 Zellen bestimmt und in einem Balkendiagramm gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 9).

Parallel zur *In-situ*-Hybridisierung wurde der Läsionsindex in resistenten und empfänglichen Tieren gemessen, um das Krankheitsbild mit den CCL2/MCP-1-mRNA-Expressionsdaten der Haut, welche aus der *In-situ*-Hybridisierung gewonnen wurden, zu vergleichen (Abbildung 10a). Die Werte des Läsionsindex basieren auf der von Mitchell *et al.* (137) definierten Skala zur Läsionsindexbestimmung.



**Abbildung 9: Kinetik der Expression von CCL2/MCP-1 in der *L. major*-infizierten Haut von resistenten C57BL/6- und empfänglichen BALB/c-Mäusen.** Der Nachweis der mRNA erfolgte mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung (Verwendung von  $^{35}\text{S}$ -markierten RNA-Sonden) von Gefrierschnitten. \*\*\*,  $p < 0.0005$ , \*\*,  $p < 0.005$  und \*,  $p < 0.05$ , verglichen mit der nicht-infizierten Gewebeprobe. W = Wochen; p. i. = post Infektion; n. i. = nicht infiziert



**Abbildung 10a: Läsionsindex Leishmanien-infizierter Mäuse.** Sowohl BALB/c- als auch C57BL/6-Mäuse wurden mit  $1 \times 10^7$  Leishmanien subkutan infiziert und die Läsion mit Hilfe des Läsionsindexes bestimmt: 1 = kleine Schwellung; 1.5 = diffuse Schwellung, aber keine Läsion; 2 = große Schwellung oder Läsion  $< 5$  mm im Durchmesser; 3 = Läsion 5-10 mm; 4 = Läsion  $> 10$  mm.

Die Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung belegen deutlich den Unterschied zwischen resistentem und suszeptiblem Mausstamm. Während bei BALB/c-Mäusen im kompletten Verlauf der Infektion lediglich eine marginale CCL2/MCP1-mRNA-Expression in Hautläsionen festgestellt werden konnte, wurde beim resistenten Mausstamm C57BL/6 eine stärkere Synthese der mRNA dieses Chemokins bereits zwei Wochen nach Infektion detektiert. Die durchschnittliche Expressionsrate von CCL2/MCP1 im gesamten Verlauf der Infektionsstudie betrug im suszeptiblen Mausstamm ca. 2,4 Signalpunkte pro 1000 Zellen. Beim resistenten Mausstamm konnten hingegen 8,1 Signalpunkte pro 1000 Zellen festgestellt werden. Somit wurde während des gesamten Verlaufs der Infektion durchschnittlich eine um den Faktor 3,4 höhere mRNA-Expression dieses Chemokins im resistenten Mausstamm nachgewiesen. Dieser Unterschied im Expressionsmuster war bereits nach vier Wochen stark ausgeprägt, und so konnten zu diesem Zeitpunkt nahezu doppelt so viele Signalpunkte beim resistenten Mausstamm nachgewiesen werden (6,66 Spots pro 1000 Zellen) als beim empfänglichen Stamm zu einem vergleichbaren Zeitpunkt (3,66 Spots pro 1000 Zellen).

Der vier Wochen nach Infektion von C57BL/6-Mäusen beobachtete starke Anstieg von CCL2/MCP-1 verstärkte sich weiterhin, so dass nach sieben Wochen ein Wert von 25,33 Spots pro 1000 Zellen gemessen werden konnte. So konnte in der Zeitspanne von einer Woche bis vier Wochen nach Beginn der Infektionsstudie ein stetiger Anstieg der CCL2/MCP1-Expression um den Faktor 1,3 beobachtet werden, welcher jedoch ab diesem Zeitrahmen um das 3,8-fache anstieg. Eine vergleichbare gesteigerte Expression blieb beim empfänglichen Mausstamm aus. Während der gesamten Infektionsstudie wurde daher lediglich eine marginale CCL2/MCP-1-Expression in BALB/c-Mäusen festgestellt.

Die Ergebnisse des klinischen Erscheinungsbildes (Abbildung 10a), welche parallel zur *In-situ*-Hybridisierung aufgezeichnet und analysiert wurden, zeigen bereits drei Wochen nach Beginn der Infektionsstudie einen Unterschied im Krankheitsbild zwischen resistentem und empfänglichem Mausstamm. Während zu Beginn der Untersuchungen an der Infektionsstelle eine vergleichbare Schwellung in beiden Mausstämmen vorherrschte, entwickelte sich die Leishmaniose im BALB/c-Mausstamm weiter. Die Schwellung wurde in diesem Mausstamm im Laufe der Infektionsdauer immer ausgeprägter und entwickelte sich schließlich zu zunehmend größer werdenden offenen Hautläsionen. Im Gegensatz zum empfänglichen

Mausstamm bildete sich die Schwellung bei C57BL/6-Mäusen bereits drei Wochen nach Versuchsbeginn zurück und die Injektionsstelle war ab einem Zeitpunkt von vier Wochen post Infektion nicht mehr lokalisierbar.

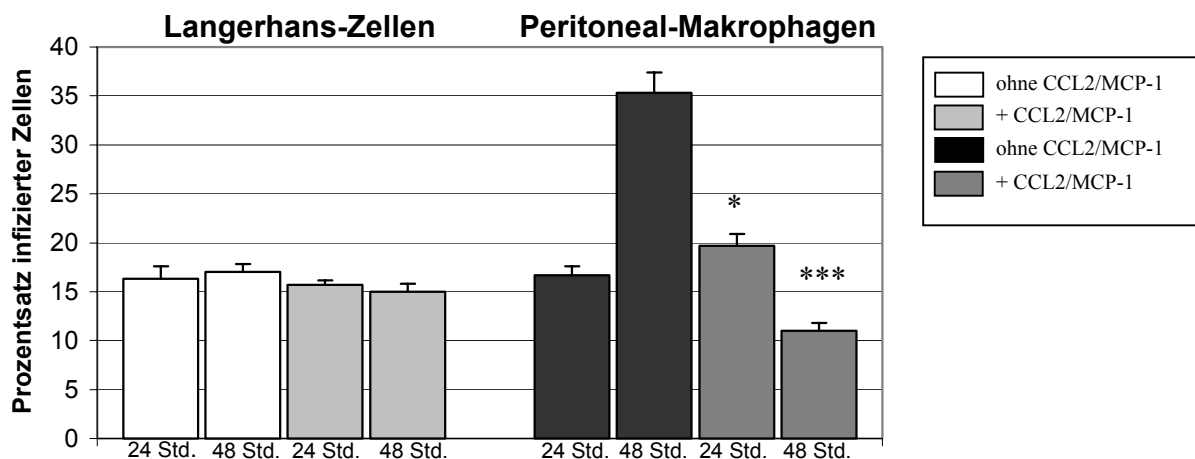
### **3.2 Untersuchungen zum Einfluss von CCL2/MCP-1 auf die Infektionsrate von Langerhans-Zellen**

Die bisher dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass im Mausmodell die Entwicklung der Resistenz gegenüber einer *L. major*-Infektion mit einer deutlich erhöhten CCL2/MCP-1-Expression in den infizierten Hautarealen korreliert. Studien der Arbeitsgruppe hatten zuvor ergeben, dass dieser Befund ebenso in humanen Hautbiopsien beobachtet werden konnte (178). In diesen *in vitro*-Studien konnte zudem eine leishmanizide Wirkung von CCL2/MCP-1 in humanen Monozyten festgestellt werden (177). Da bei einer Infektion mit den Parasiten neben Makrophagen ebenso dendritische Zellen in der Lage sind, Leishmanien aufzunehmen (26, 138, 140), stellte sich nun innerhalb dieser Arbeit die Frage, ob das Chemokin CCL2/MCP-1 auch in murinen dendritischen Zellen die Abtötung von intrazellulären Leishmanien stimuliert. Aus diesem Grund wurden Langerhans-Zellen, die dendritischen Zellen der Haut, aus der Epidermis von nicht infizierten Mäusen isoliert und in Gegenwart oder Abwesenheit von CCL2/MCP-1 mit *L. major* infiziert. Parallel dazu wurde dasselbe Experiment mit murinen Peritoneal-Makrophagen durchgeführt. Das Verhältnis von dendritischen Zellen oder Makrophagen zu Parasiten betrug hierbei 1:10. Nach einer Infektionsdauer von 24 oder 48 Stunden wurden die Zellen mit Acridinorange und Ethidiumbromid gefärbt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um DNA-Interkalatoren, welche nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge (450 bis 490 nm) sichtbar gemacht werden können. Die Simultanfärbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid bietet den Vorteil der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Hierbei dringt Acridinorange sowohl in lebende als auch tote Zellen ein, wird aber im Falle von toten Zellen vom rot leuchtenden Ethidiumbromid überlagert (Abbildung 11). Auf diese Weise konnten sowohl infizierte Zellen als auch die Zahl der Parasiten pro Wirtszelle fluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden (Abbildung 3.2b).





**Abbildung 11:** Acridinorange- und Ethidiumbromid-Färbung infizierter Langerhans-Zellen. Der Pfeil markiert eine Zelle, welche sowohl lebende (grün) als auch tote Leishmanien (rot/orange) beherbergt.



**Abbildung 12:** Einfluss von CCL2/MCP-1 auf die Infektionsrate von Langerhans-Zellen und peritonealen Makrophagen. Die Zellen wurden mit *L. major* infiziert und für 24 bzw. 48 Stunden in Gegenwart oder Abwesenheit von CCL2/MCP-1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Acridinorange und Ethidiumbromid gefärbt und der Prozentsatz infizierter Zellen nach fluoreszenzmikroskopischer Auswertung bestimmt. \*\*\*,  $p < 0.0005$  und \*,  $p < 0.05$ , verglichen mit Zellen, welche bei einem vergleichbaren Zeitpunkt nicht mit CCL2/MCP-1 inkubiert wurden. Std. = Stunden, p. I.= post Infektion.

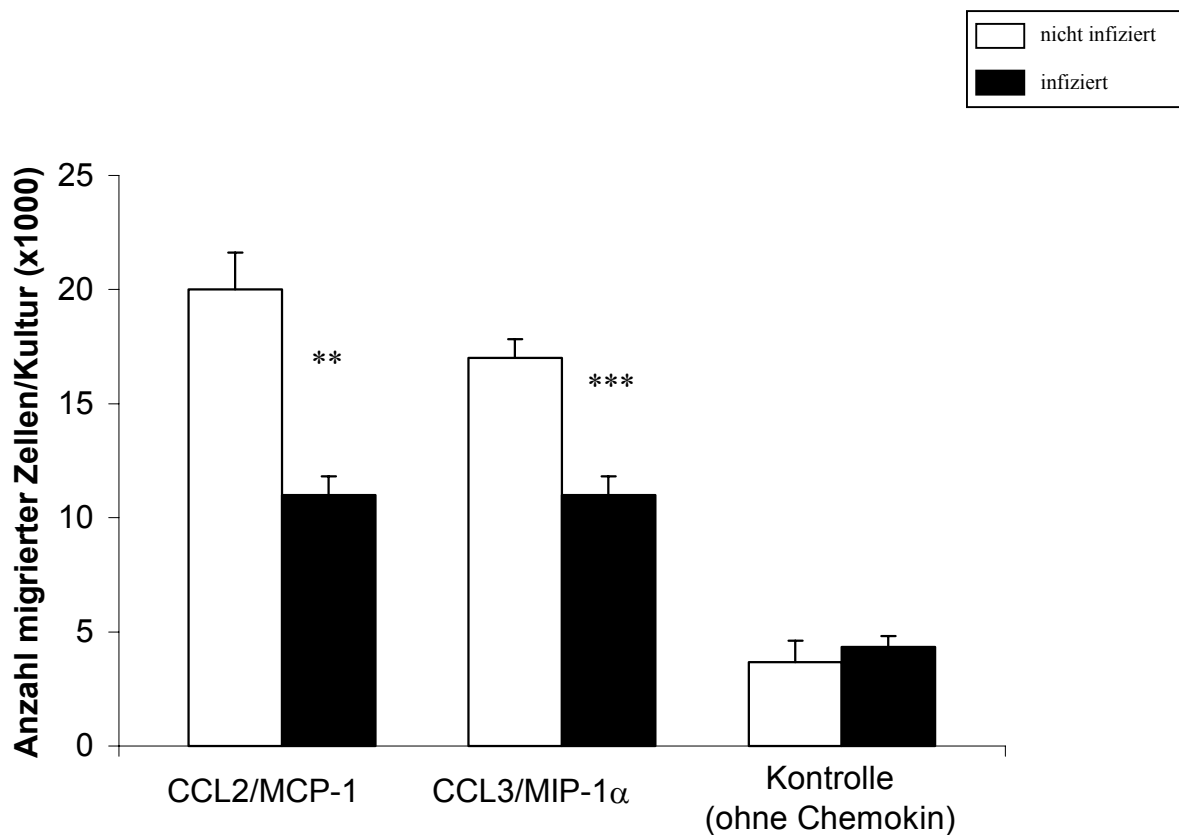
Die Ergebnisse zeigten, dass CCL2/MCP-1 keinen Einfluss auf die Infektionsrate von Langerhans-Zellen hat. Der Prozentsatz infizierter Zellen lag hierbei konstant bei 15 bis 17% (Abbildung 12). Die erzielten Ergebnisse mit murinen Peritoneal-



Makrophagen konnten hingegen die vorangegangenen Beobachtungen mit humanen Monozyten bestätigen (175, 177). So zeigte sich 48 Stunden nach Infektion von peritonealen Makrophagen, welche ohne CCL2/MCP-1 kultiviert wurden, eine Verdopplung der Infektionsrate gegenüber dem 24-Stunden-Wert. Bei Peritoneal-Makrophagen, welche mit CCL2/MCP-1 kultiviert wurden, konnte 48 Stunden nach der Infektion eine Verringerung der Infektionsrate um den Faktor 1,78 im Vergleich zum 24-Stunden-Wert festgestellt werden. Verglichen mit dem 48-Stunden-Wert der unbehandelten Kontrolle konnte sogar eine signifikante Reduktion der Infektionsrate um den Faktor 3,2 festgestellt werden.

### **3.3 Analyse des Migrationsverhaltens von Langerhans-Zellen nach einer Infektion mit *L. major***

Von CCL2/MCP-1 und CCL3/MIP-1 $\alpha$  ist bekannt, dass sie durch Bindung an die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR3 das Migrationsverhalten von dendritischen Zellen beeinflussen (131). Bislang gibt es jedoch keine Informationen, inwiefern eine Leishmanieninfektion einen Einfluss auf das CCL2/MCP-1-induzierte Wanderungsverhalten von dendritischen Zellen hat. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde das Transwell-Migrations-System gewählt. Bei dieser *in vitro*-Analyse wurden  $2 \times 10^5$  infizierte bzw. nicht infizierte Langerhans-Zellen in das obere Kompartiment der Transwellkammer gegeben. Das untere Kompartiment enthielt entweder Medium mit CCL2/MCP-1 oder CCL3/MIP-1 $\alpha$ . Beide Kompartimente wurden von einer Membran mit einer Porengröße von 8  $\mu\text{m}$  voneinander getrennt. Das Prinzip dieses Versuchs bestand nun darin, dass Zellen aus dem oberen Kompartiment durch die Membran in das untere Kompartiment chemotaktisch wandern. Die Migrationsrate wurde schließlich nach 24 Stunden anhand der Anzahl an Zellen, welche in das untere Kompartiment migriert sind, bestimmt (Abbildung 13).



**Abbildung 3.3: Untersuchung des Einflusses einer Leishmanieninfektion auf das CCL2/MCP-1-induzierte Migrationsverhalten von Langerhans-Zellen.** Die Infektion mit *L. major* reduziert die Chemokin-induzierte Migration von Langerhans-Zellen. In die oberen Kammern von Transwell-Kulturkammern wurden  $2 \times 10^5$  Langerhans-Zellen gegeben, die unteren Kammern wurden mit den Chemokinen CCL2/MCP-1 und CCL3/MIP-1 $\alpha$  beschickt. Nach 24 Stunden wurde die Zellzahl der in die unteren Kammern gewanderten Zellen bestimmt. n. i. = nicht infizierte Langerhans-Zellen, i. = infizierte Langerhans-Zellen. \*\*\*,  $p < 0.0005$ , \*\*,  $p < 0.005$ , bei einem Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei nicht infizierten als auch infizierten Langerhans-Zellen durch eine CCL2/MCP-1 und CCL3/MIP-1 $\alpha$  induzierte Migration festzustellen ist. Verglichen mit nicht infizierten Zellen ohne Chemokin wurde nach Zugabe von CCL2/MCP-1 bei nicht infizierten Langerhans-Zellen eine Erhöhung der Migrationsrate um den Faktor 5,5 festgestellt. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der CCL3/MIP-1 $\alpha$  induzierten Migration festgestellt. So betrug die Steigerung der Migrationsrate in diesem Versuchsaufbau nach Zugabe des Chemokins bei nicht infizierten Zellen 4,6. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass eine Infektion mit *L. major* die Migrationsrate von Langerhans-Zellen negativ beeinflusst. Die Rate der CCL2/MCP-1 induzierten Migration von Langerhans-Zellen reduzierte sich signifikant bei infizierten Zellen um den Faktor 1,8. Die Verringerung der Migrationsrate betrug bei der CCL3/MIP-1 $\alpha$  induzierten Migration nach Infektion 1,5. Somit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Infektion von murinen Langerhans-Zellen mit *L. major* zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsrate, welche durch CCL2/MCP1 oder CCL3/MIP1 $\alpha$  induziert wird, führt.

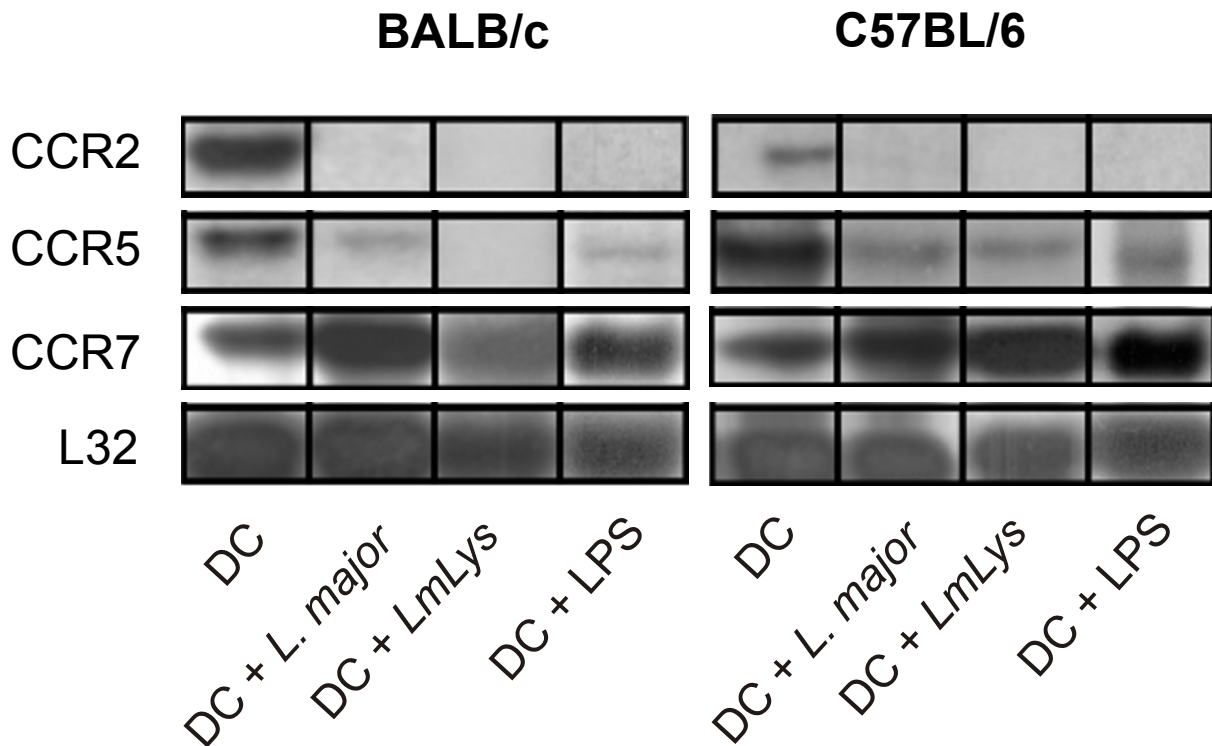
### **3.4 Einfluss einer Leishmanieninfektion auf die Chemokinrezeptor-Expression in dendritischen Zellen**

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass eine Infektion von murinen dendritischen Zellen mit *L. major* zu einer verminderten Migrationsrate, welche durch die Chemokine CCL2/MCP-1 und CCL3/MIP1 $\alpha$  induziert wurde, führt. Eine mögliche Ursache für diesen Befund könnte hierbei in der unterschiedlichen Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren in verschiedenen Reifungsstadien der Langerhans-Zellen zu finden sein, denn aus der Literatur ist bereits bekannt, dass dendritische Zellen als Reaktion auf äußere Stimuli, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und LPS, ein unterschiedliches Expressionsmuster an Chemokinrezeptoren exprimieren. So zeigen dendritische Zellen im Laufe ihrer Reifung eine verminderte Synthese der Chemokinrezeptoren CCR6, CCR1, CCR2, während CCR7 verstärkt exprimiert wird (198, 214, 234). Die in den vorangegangenen Experimenten nach Infektion mit *L. major* festgestellte verminderte CCL2/MCP-1- und CCL3/MIP1 $\alpha$ -induzierte Migration

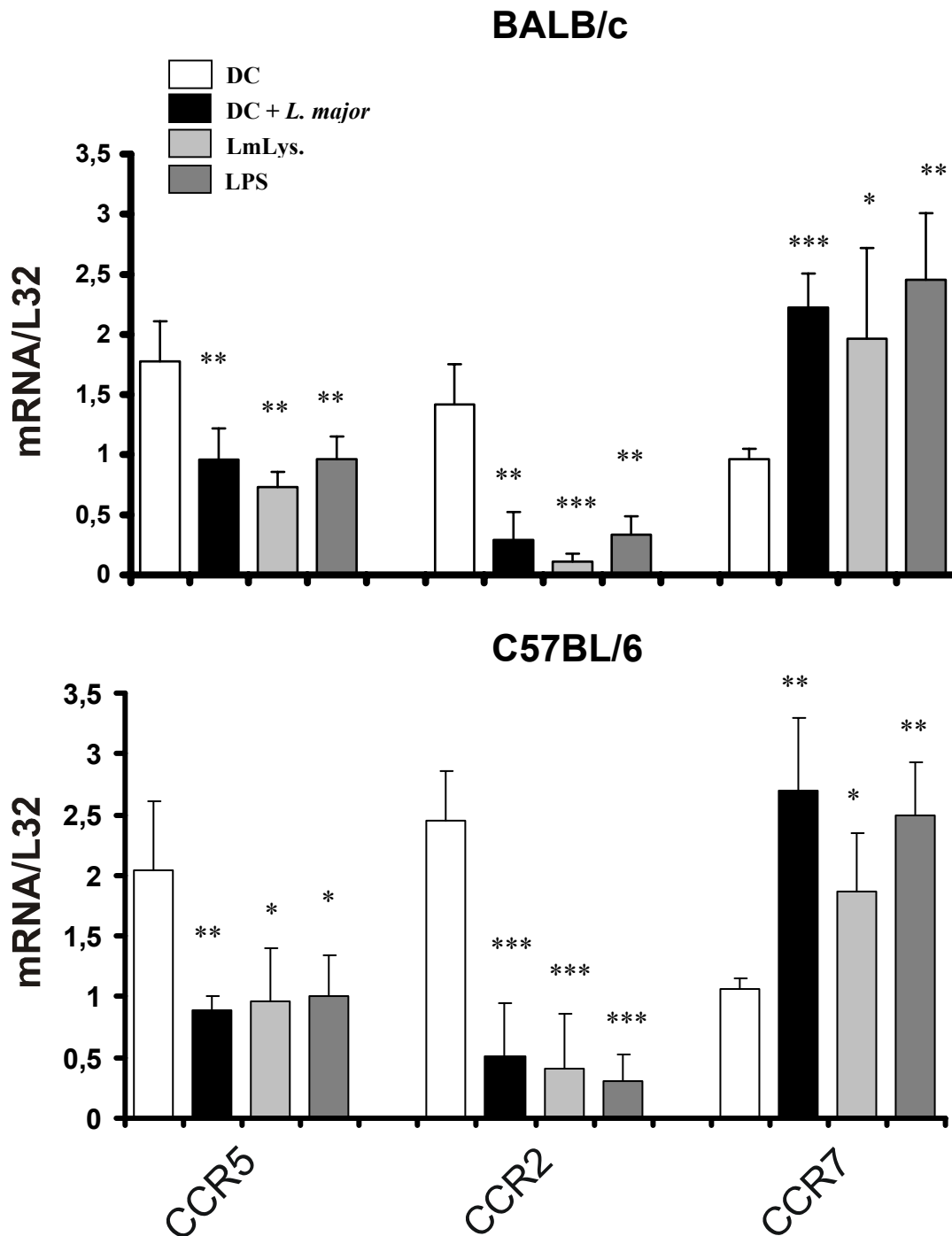
könnte somit in dem Expressionsmuster unterschiedlicher Chemokinrezeptoren begründet sein.

Da CCL2/MCP-1 ein Ligand des Chemokinrezeptors CCR2 und CCL3/MIP1 $\alpha$  ein Ligand des Chemokinrezeptors CCR5 ist, galt es nun zu überprüfen, ob die nach einer Infektion beobachtete Veränderung der Migrationsrate auf einer unterschiedlichen Expression dieser Rezeptoren basiert. Des Weiteren sollte ebenso die mRNA-Expression von CCR7 untersucht werden, da aus der Literatur keine Daten bezüglich des Einflusses einer *L. major*-Infektion auf die Expression dieses Rezeptors bei dendritischen Zellen existierten. Aus diesem Grund wurde im folgenden die Expression von Chemokinrezeptoren im Verlauf einer Leishmanieninfektion auf mRNA-Ebene untersucht. Als Methode wurde hierbei der „RNase Protection Assay“ gewählt. Dieser erlaubt durch seine Sensitivität und durch die Möglichkeit zur simultanen Quantifizierung mehrerer RNA-Proben die Analyse eines breiten Spektrums von definierten Chemokinen und Chemokinrezeptoren. Die Untersuchungen wurden hierbei mit dendritischen Zellen, welche aus dem Knochenmark generiert wurden, durchgeführt. Diese haben gegenüber Langerhans-Zellen den Vorteil, dass sie in größeren Mengen, welche zur Durchführung einer erfolgreichen RNase Protection Assay-Analyse unerlässlich sind, generiert werden können. Zudem stellen dendritische Zellen aus dem Knochenmark eine homogenere Population als epidermale Langerhans-Zellen dar, denn in der Epidermalzellsuspension sind neben Langerhans-Zellen u. a. Makrophagen und Keratinozyten zu finden. Die Generierung dendritischer Zellen erfolgte durch Kultur von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark resistenter oder suszeptibler Mäuse in Gegenwart von GM-CSF über einen Zeitraum von zehn Tagen *in vitro*. Nach diesem Zeitraum wurden die Zellen über Nacht mit einem zehnfachen Überschuss des Parasiten *L. major* infiziert oder mit 30  $\mu$ l Lysat aus promastigoten Leishmanien, was einem Verhältnis von 30 Parasiten pro Zelle entspricht, inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde schließlich mit diesen Zellen eine Gesamt-RNA-Isolierung durchgeführt. Nach Konzentrationsbestimmung der RNA wurde eine Chemokinrezeptorexpressions-Analyse mit Hilfe des RNase Protection Assays der Firma PharMingen durchgeführt. Als Kontrolle diente hierbei Gesamt-RNA aus nicht infizierten dendritischen Zellen. Zur Analyse des Expressionsmusters wurden die Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe eines Röntgenfilms entwickelt (Abbildung 14). Zur besseren Quantifizierung der Banden wurden diese

eingescannt und unter Verwendung der Software „ImageMaster“ der Firma Amersham Biosciences, welche die Intensität der jeweiligen Bande misst, ausgewertet (Abbildung 15).



**Abbildung 14: Repräsentative Analyse der Chemokinrezeptor-mRNA von dendritischen Zellen des Knochenmarks.** Die dendritischen Zellen wurden aus dem Knochenmark von *L. major*-empfindlichen BALB/c- und *L. major*-resistenten C57BL/6 Mäusen als Vorläuferzellen isoliert und mit Hilfe von GM-CSF *in vitro* generiert. Die dendritischen Zellen wurden danach mit *L. major* infiziert oder mit *L. major*-Lysat (LmLys) über Nacht inkubiert. Die Analyse diente der Untersuchung der Expression der Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5 und CCR7. Als Positiv-Kontrolle wurde hierbei RNA des ribosomalen Proteins L32 verwendet, welches konstitutiv exprimiert wird. DC = dendritische Zellen, LmLys = *L. major*-Lysat



**Abbildung 15:** Analyse der Chemokinrezeptor-mRNA von dendritischen Zellen des Knochenmarks. Die dendritischen Zellen wurden aus dem Knochenmark von *L. major*-empfindlichen BALB/c- und *L. major*-resistenten C57BL/6 Mäusen als Vorläuferzellen isoliert und mit Hilfe von GM-CSF *in vitro* generiert. Die dendritischen Zellen wurden danach mit *L. major* infiziert oder mit *L. major*-Lysat (LmLys) über Nacht inkubiert. Die Analyse, welche für die Chemokinrezeptoren CCR5, CCR2 und CCR7 durchgeführt wurde, wurde mit Hilfe der „ImageMaster“-Software der Firma Amersham Biosciences erstellt. \*\*\*,  $p < 0.0005$ , \*\*,  $p < 0.005$  und \*,  $p < 0.05$ , verglichen mit unbehandelten dendritischen Zellen. DC= dendritische Zellen, LmLys= *L. major*-Lysat, LPS= Lipopolysaccharid

Die Ergebnisse der RNase Protection Assays zeigen, dass sowohl die Infektion von dendritischen Zellen als auch eine Inkubation dendritischer Zellen mit *L. major*-Lysat einen Einfluss auf die Chemokinrezeptorexpression haben. So konnte gezeigt werden, dass die CCR2-mRNA-Expression in dendritischen Zellen sowohl nach Infektion mit *L. major* als auch nach Inkubation mit *Leishmania*-Lysat signifikant reduziert wird. Des Weiteren konnte, verglichen mit der nicht infizierten Kontrolle, eine um ca. 80% verringerte Expression der CCR2-mRNA in dendritischen Zellen beider Mausstämme nachgewiesen werden. Ähnliche signifikante Ergebnisse konnten in dendritischen Zellen beider Mausstämme nach Inkubation mit Lysat festgestellt werden.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass infizierte dendritische Zellen aus BALB/c-Mäusen verglichen mit der nicht infizierten Kontrollgruppe eine um ca. 46% reduzierte Expression der CCR5-mRNA-Expression vorweisen. Ähnlich signifikante Ergebnisse konnten bei einer Inkubation der Zellen mit *Leishmania*-Lysat festgestellt werden. Dendritische Zellen aus C57BL/6-Mäusen zeigten eine vergleichbare Reaktion auf diesen externen Stimuli. So konnte nach Infektion der dendritischen Zellen dieses Mausstammes eine um ca. 56% geringere CCR5-mRNA-Expression als bei nicht infizierten Zellen festgestellt werden. Auch in diesem Mausstamm zeigte eine Inkubation der Zellen mit *L. major*-Lysat verglichen mit den Werten der Infektion ähnlich signifikante Ergebnisse.

Im Gegensatz zur CCR2- und CCR5-mRNA-Synthese, bei der im Versuch eine deutliche Reduktion festgestellt wurde, konnte sowohl nach Infektion als auch nach Inkubation mit Lysat aus promastigoten Erregern eine starke Hochregulation der CCR7-mRNA-Expression detektiert werden. Die Infektion von dendritischen Zellen aus suszeptiblen Mäusen mit *L. major* führte zu einer 2,3-fach höheren CCR7-mRNA-Expressionsrate als dies bei der nicht infizierten Kontrollgruppe der Fall war. Eine Inkubation der Zellen mit Lysat bewirkte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der CCR7-mRNA-Synthese. Ein vergleichbares Expressionsmuster konnte bei dendritischen Zellen, welche aus dem resistenten Mausstamm gewonnen wurden, festgestellt werden. Hierbei führte eine Infektion mit *L. major* zu einer 2,5-fach höheren Expressionsrate der CCR7-mRNA. Die Inkubation mit *L. major*-Lysat führte ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der CCR7-mRNA-Synthese.

Im Rahmen der RNase Protection-Analyse wurden die Expressionsraten weiterer Rezeptoren dendritischer Zellen aus resistenten bzw. empfänglichen Tieren sowohl nach einer Leishmanieninfektion als auch nach Inkubation mit *L. major*-Lysat untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Expression der CCR1- und CCR6-mRNA nach einer Infektion mit *L. major* bzw. Inkubation mit Lysat nicht verändert. Es konnte sogar keine Expression der Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4 und CXCR3 festgestellt werden (Tabelle 4)

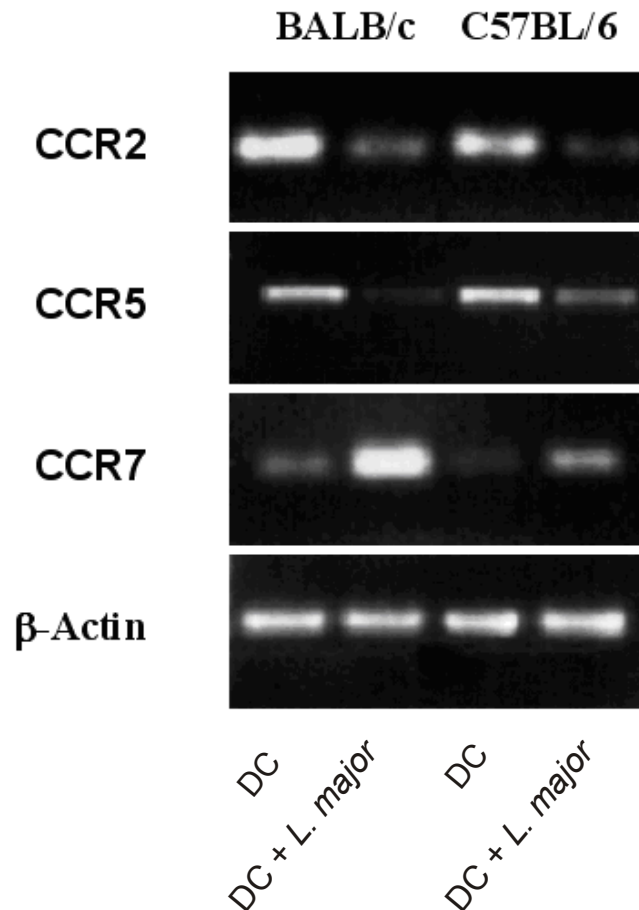
RNase Protection Assay-Analyse	Chemokinrezeptor
<b><u>Chemokinrezeptoren</u>, welche nach Interaktion dendritischer Zellen aus resistenten und suszeptiblen Mäusen mit Leishmanien, <u>nicht moduliert</u> wurden:</b>	CCR1 CCR6
<b><u>Chemokinrezeptoren</u>, welche nach Interaktion dendritischer Zellen aus resistenten und suszeptiblen Mäusen mit Leishmanien, <u>nicht exprimiert</u> wurden:</b>	CCR3 CCR4 CXCR3

**Tabelle 4:** Chemokinrezeptorexpression von infizierten und nicht infizierten dendritischen Zellen resistenter und suszeptibler Tiere.

Die beobachteten Expressionsmuster des RNase-Protection-Assays konnten mit der Methode der Reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) bestätigt werden. Diese Methode wurde angewandt, da sie ein weitaus sensitiveres Ergebnis unter Verwendung einer geringeren Gesamt-RNA-Menge liefert (Abbildung 16). Hierbei wurden wiederum die Expressionsraten der Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5 und



CCR7 untersucht, die nach einer Infektion von dendritischen Zellen aus resistenten C57BL/6- bzw. suszeptiblen BALB/c-Mäusen mit *L. major* auftreten. Eine Amplifikation des „Housekeeping“-Gens  $\beta$ -Aktin diene als Positivkontrolle.



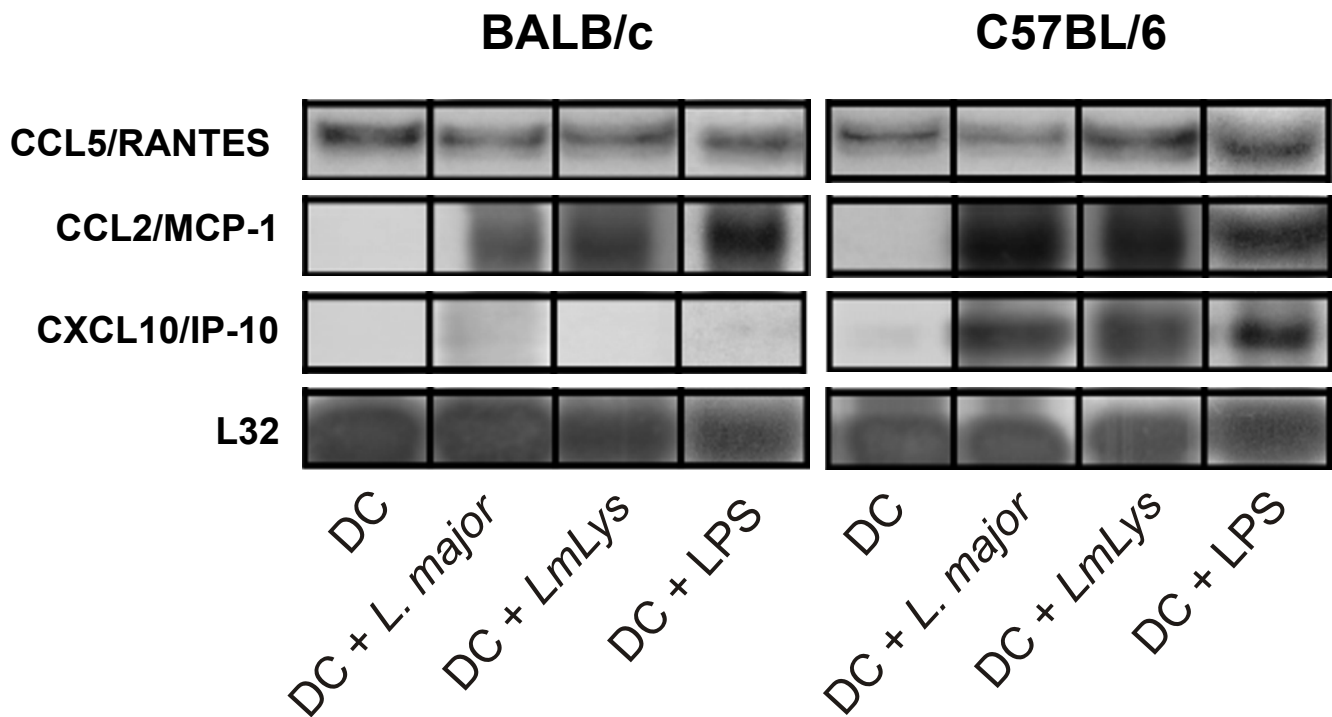
**Abbildung 16: RT-PCR aus Gesamt-RNA dendritischer Zellen.** Repräsentative RT-PCR-Analyse der Chemokinrezeptor-mRNA von dendritischen Zellen. Die dendritischen Zellen wurden aus dem Knochenmark von *L. major*- empfänglichen BALB/c- und *L. major*-resistenten C57BL/6 Mäusen als Vorläuferzellen isoliert und mit Hilfe von GM-CSF generiert. Die dendritischen Zellen wurden danach mit *L. major* infiziert oder mit *L. major*-Lysat (LmLys) über Nacht inkubiert Als Positiv-Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin-mRNA amplifiziert.

Vergleicht man die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse (Abbildung 16) mit jenen der RNase Protection-Analyse (Abbildung 14 und 15), findet man durchweg Übereinstimmungen hinsichtlich der veränderten Expressionsraten der untersuchten RNA-Proben aus infizierten und nicht infizierten dendritischen Zellen. In dendritischen Zellen sowohl aus C57BL/6- als auch aus BALB/c-Mäusen konnte

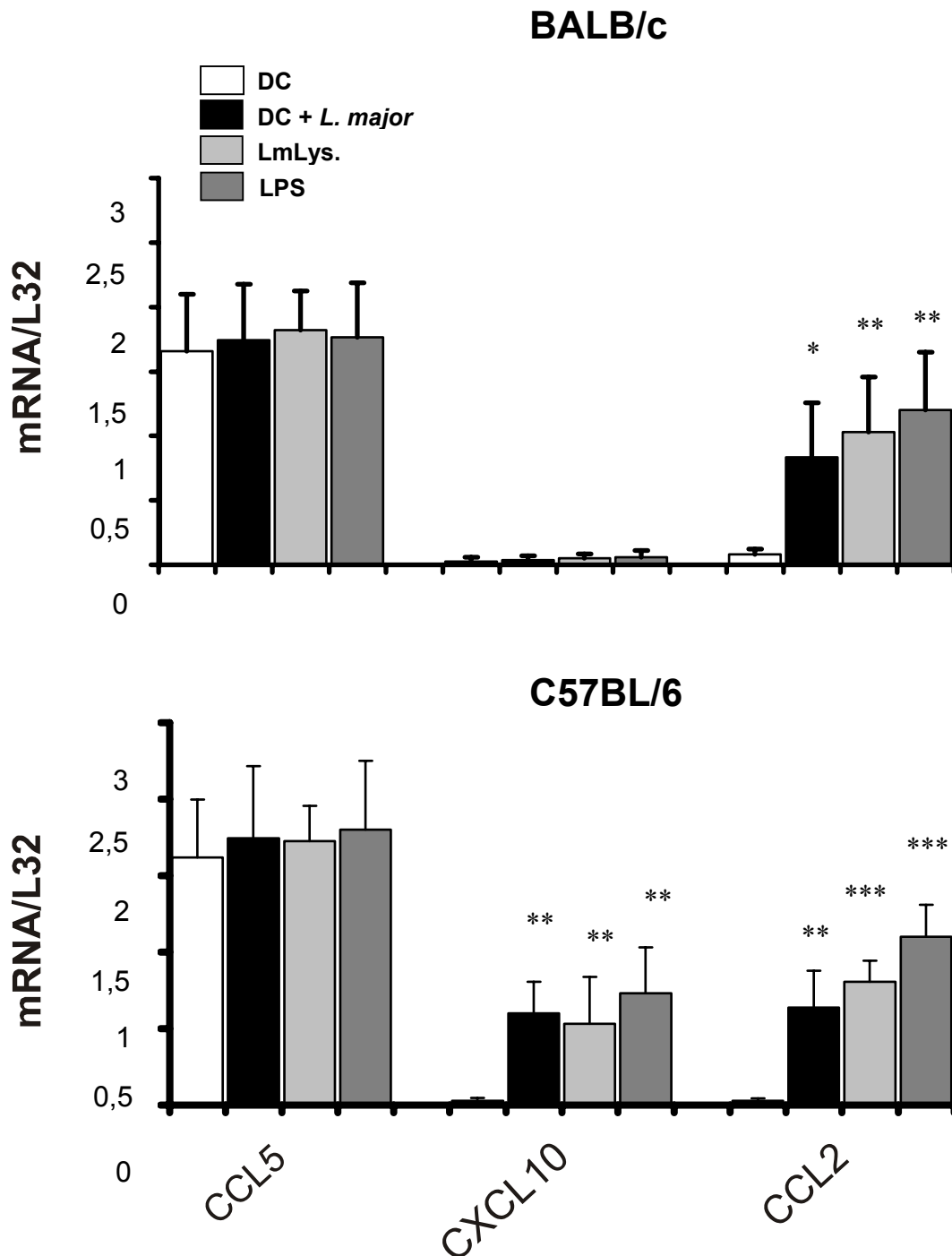
nach Infektion mit *L. major* erneut eine Herunterregulation der CCR2- sowie der CCR5-mRNA festgestellt werden, während die Synthese der CCR7-mRNA deutlich zunimmt.

### **3.5 Einfluss einer Leishmanieninfektion auf die Chemokin-Expression in dendritischen Zellen**

Durch die Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde erstmals belegt, dass neben dem Lymphokinmuster, welches mit der Schwere des Krankheitsbildes der kutanen Leishmaniose korreliert, ebenso zwischen der Verteilung von Chemokinen in Biopsien aus Hautläsionen von Patienten mit kutaner Leishmaniose und dem klinischen Erscheinungsbild ein direkter Zusammenhang besteht (175, 177). Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass dendritische Zellen nicht nur auf Chemokine reagieren, sondern diese Proteine selbst produzieren und sezernieren. So konnte bereits gezeigt werden, dass zum einen dendritische Zellen Chemokine wie CCL18/PARC, CCL22/MDC und CCL17/TARC konstitutiv exprimieren (2, 71, 198, 204), zum anderen jedoch die Expression bestimmter Chemokine mit der Reifung dendritischer Zellen einhergeht (163, 198). Es galt daher zu überprüfen, ob eine Infektion von dendritischen Zellen mit *L. major* das Chemokinexpressionsmuster dieser Zellen beeinflusst. Als Methode wurde hierbei erneut der RNase-Protection-Assay gewählt. Zur Herstellung dendritischer Zellen wurde das gleiche Protokoll verwendet, welches bereits bei der RNase Protection-Analyse der Chemokinrezeptoren beschrieben wurde (siehe Kapitel 3.4). Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurden die Expressionsraten der Chemokine CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES und CXCL10/IP-10 sowohl nach Infektion mit *L. major* als auch nach Inkubation mit *L. major*-Lysat untersucht und mit der Expression in nicht infizierten dendritischen Zellen verglichen. Als Kontrolle wurde die Expression von L32herangezogen, welche sich nach Behandlung der dendritischen Zellen nicht ändert (Abbildung 17). Zur Quantifizierung der Banden wurden diese eingescannt und unter Verwendung der Software „ImageMaster“ der Firma Amersham Biosciences ausgewertet (Abbildung 18).



**Abbildung 17: Repräsentative Analyse der Chemokin-mRNA von dendritischen Zellen des Knochenmarks.** Die dendritischen Zellen wurden aus dem Knochenmark von *L. major*- empfänglichen BALB/c- und *L. major*-resistenten C57BL/6 Mäusen als Vorläuferzellen isoliert und mit Hilfe von GM-CSF *in vitro* generiert. Die dendritischen Zellen wurden danach mit *L. major* infiziert oder mit *L. major*-Lysat (LmLys) über Nacht inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde hierbei RNA des ribosomalen Proteins L32 verwendet, welches konstitutiv exprimiert wird. DC = dendritische Zellen, LmLys = *L. major*-Lysat.



**Abbildung 18: Analyse der Chemokin-mRNA von dendritischen Zellen des Knochenmarks.** Die dendritischen Zellen wurden aus dem Knochenmark von *L. major*- empfänglichen BALB/c- und *L. major*-resistenten C57BL/6 Mäusen als Vorläuferzellen isoliert und mit Hilfe von GM-CSF *in vitro* generiert. Die dendritischen Zellen wurden danach mit *L. major* infiziert oder mit *L. major*-Lysat (LmLys) über Nacht inkubiert. Die Analyse wurde mit Hilfe der „ImageMaster“-Software erstellt. \*\*,  $p < 0.005$  und \*,  $p < 0.05$ , verglichen mit unbehandelten dendritischen Zellen. DC = dendritische Zellen, LmLys = *L. major*-Lysat, LPS= Lipopolysaccharid

Die Ergebnisse des RNase-Protection-Assays zeigen, dass die mRNA-Expression des Chemokins CCL2/MCP-1 nach Infektion dendritischer Zellen von resistenten sowie von empfänglichen Mäusen mit *L. major* signifikant gesteigert wird. So konnte bei dendritischen Zellen aus BALB/c-Mäusen nach Infektion eine Steigerung der CCL2/MCP-1-mRNA um ca. das zehnfache verglichen mit dem Wert aus nicht infizierten Zellen festgestellt werden. Diese Steigerung betrug nach Infektion bei dendritischen Zellen aus resistenten Mäusen sogar das 31-fache verglichen mit der nicht infizierten Kontrolle. Eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression konnte in beiden Mausstämmen jedoch nicht nur nach Infektion mit *L. major*, sondern ebenso nach Inkubation mit Leishmanien-Lysat festgestellt werden. So führte die Inkubation mit Lysat zu einer 12,8-fachen Steigerung der mRNA-Expression bei BALB/c-Mäusen und sogar zu einer 40-fachen Steigerung der mRNA-Expression bei C57BL/6-Mäusen.

Entgegen den Ergebnissen zur CCL2/MCP-1-mRNA-Expression konnte bei der Analyse der CCL5/RANTES-mRNA weder nach Infektion mit *L. major* noch nach Inkubation mit *L. major*-Lysat ein Expressions-Unterschied in dendritischen Zellen aus BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäusen festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Studie wurden die Expressionsraten weiterer Chemokine dendritischer Zellen aus resistenten sowie empfänglichen Mäusen nach Leishmanieninfektion bzw. Inkubation mit *L. major*-Lysat untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Modulation der mRNA-Expression der Chemokine CXCL1/MIP-2, CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL1/TCA3 und CCL24/Eotaxin ausbleibt, während die Chemokine CCL19/MIP-3 $\beta$  und CXCL1/Lymphotaktin weder in infizierten noch in nicht infizierten dendritischen Zellen exprimiert werden (Tabelle 5).

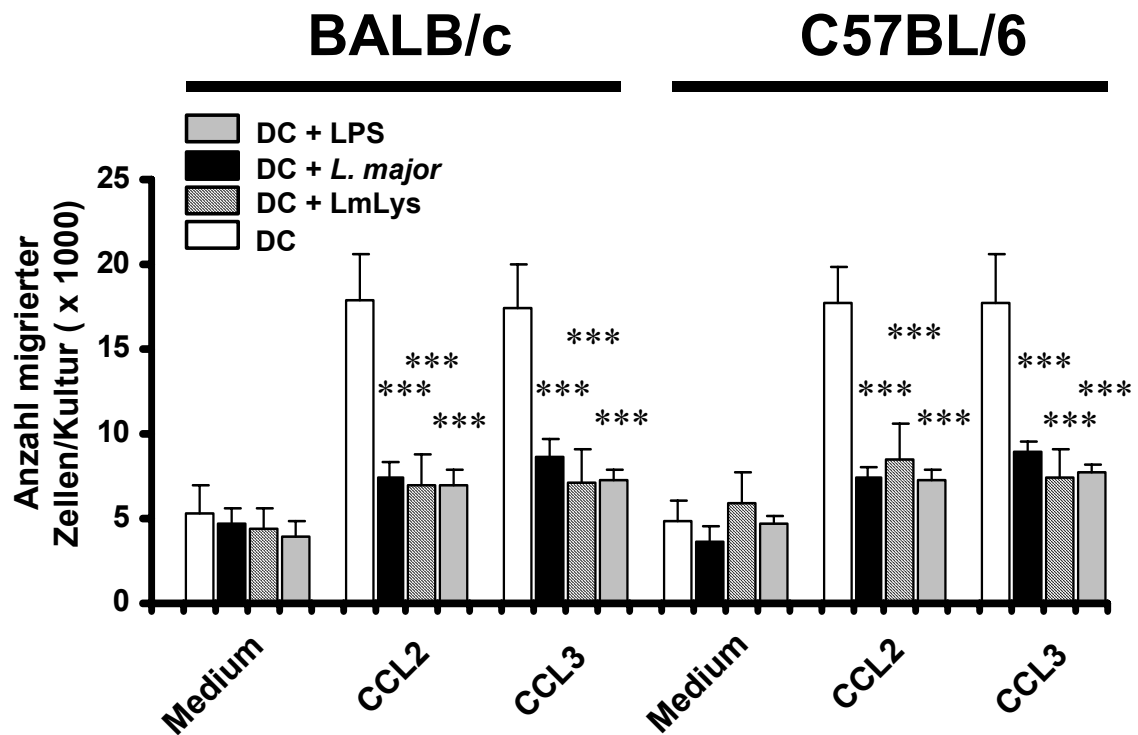
Ein Unterschied in der mRNA-Synthese zwischen suszeptiblen und resistenten Tieren konnte hingegen beim Chemokin CXCL10/IP-10 festgestellt werden. Die mRNA dieses Chemokins wurde lediglich in dendritischen Zellen des resistenten Mausstammes, welche zum einen mit *L. major* infiziert wurden, zum anderen aber auch mit Leishmanien-Lysat inkubiert wurden, verstärkt synthetisiert. So konnte verglichen mit nicht infizierten dendritischen Zellen eine 25-fache Steigerung der mRNA-Expression nach Infektion der Zellen und eine 30-fache Steigerung der mRNA-Expression nach Inkubation mit Lysat festgestellt werden.

RNase Protection Assay-Analyse	Chemokinrezeptor
<p><b>Chemokine, welche in dendritischen Zellen aus resistenten bzw. suszeptiblen Mäusen nach Interaktion mit Leishmanien nicht moduliert wurden:</b></p>	<p>CCL5/RANTES  CXCL1/MIP-2  CCL20/MIP-3<math>\alpha</math>  CCL3/ MIP-1<math>\alpha</math>  CCL4/MIP-1<math>\beta</math>  CCL1/TCA3  CCL24/Eotaxin</p>
<p><b>Chemokine, welche in dendritischen Zellen aus resistenten bzw. suszeptiblen Mäusen nicht exprimiert wurden:</b></p>	<p>CCL19/ MIP-3<math>\beta</math>  XCL1/Lymphotaktin</p>

**Tabelle 5: Chemokinexpression von infizierten und nicht infizierten dendritischen Zellen resistenter und suszeptibler Tiere.**

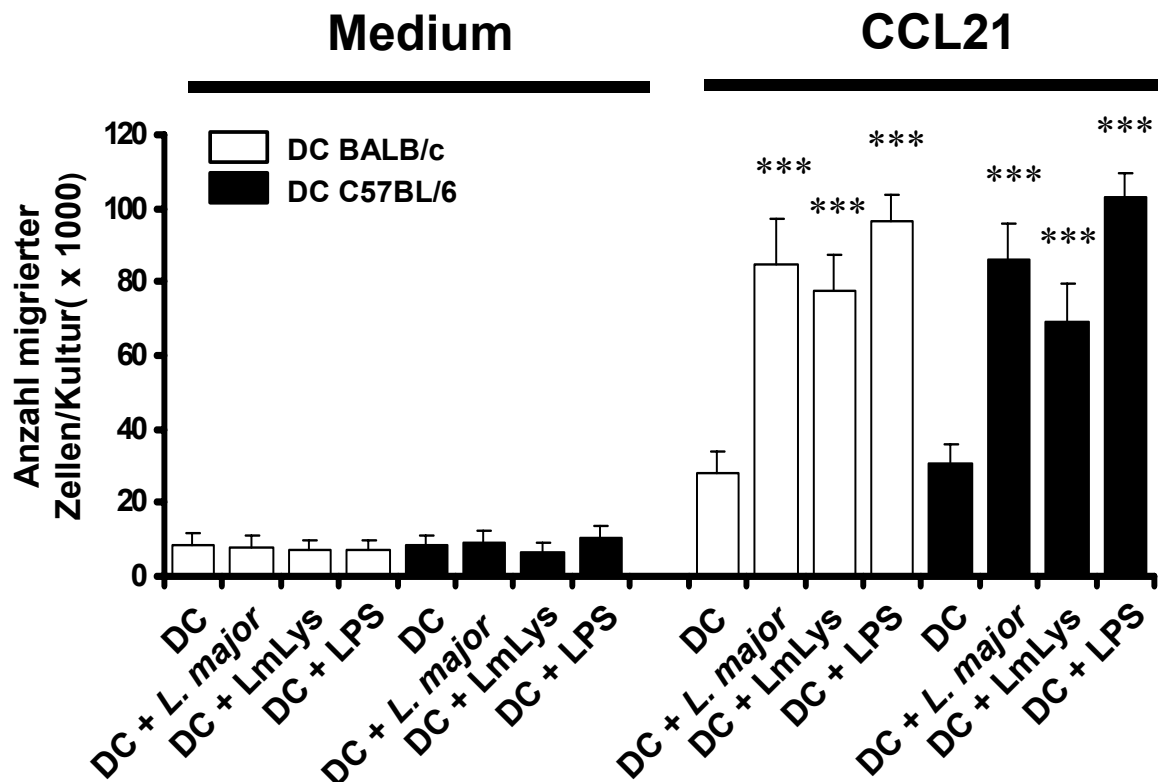
### 3.6 Das Migrationsverhalten von dendritischen Zellen des Knochenmarks nach einer Leishmanieninfektion

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass eine Leishmanieninfektion einen Einfluss auf die Chemokin- und Chemokinrezeptor-mRNA-Expression in dendritischen Zellen hat. Daher galt es nun herauszufinden, ob die Modulationen, welche anhand des RNase Protection Assays festgestellt wurden, mit Veränderungen des chemotaktischen Migrationsverhaltens dieser Zellen korrelieren. Aus diesem Grund wurde die Wanderungsfähigkeit dendritischer Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen als Reaktion auf bestimmte chemotaktische Stimuli in einem Transwell-Migrations-Test untersucht. Hierbei wurden die Chemokine CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  und CCL21/6CKine gewählt, da sie als Liganden der Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5 und CCR7 fungieren (201, 228, 251). Für diesen Versuch wurden dendritische Zellen mit Hilfe des bereits beschriebenen Standardprotokolls von M. Lutz *et al.* (123) bis zum Tag zehn kultiviert, dann geerntet und ausgezählt. Im Anschluss daran wurden die Zellen entweder mit *L. major* infiziert oder mit *L. major*-Lysat für 24 Stunden inkubiert. Für die anschließende Analyse der Migration in Transwell-Kammern wurden die Zellen gewaschen, ausgezählt und in das obere Kompartiment des Transwells  $1 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml Medium gegeben. In das untere Kompartiment, welches von dem oberen durch eine permeable Membran mit 8  $\mu\text{m}$  Porengröße getrennt war, wurden jeweils die betreffenden Chemokine in einer Konzentration von 50 ng/ml in 1,5 ml Medium gegeben. Als Kontrolle, welche zur Bestimmung der Basismigration fungierte, wurde Medium ohne Chemokin verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von ca. 12 Stunden wurden die Zellen, welche in das untere Kompartiment gewandert waren, geerntet und mit biotinylierten, monoklonalen Antikörpern gegen MHC-Klasse-II (anti-I-A<sup>d</sup> bzw. anti-I-A<sup>b</sup>), welche mit Streptavidin-konjugiertem FITC versehen wurden, markiert. Im Anschluss daran erfolgte die Auszählung MHC-Klasse-II-positiver Zellen unter dem Lichtmikroskop. Die Ergebnisse des Transwell-Migrations-Tests sind in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt.



**Abbildung 19:** Transwell-Migrations-Test von *L. major*-behandelten dendritischen Zellen. Der Transwell-Migrations-Test mit dendritischen Zellen wurde in Abwesenheit von Chemokinen oder in Gegenwart von CCL2/MCP-1 bzw. CCL3/MIP-1 $\alpha$  analysiert. Dendritische Zellen wurden zu diesem Zweck mit *L. major* infiziert oder mit *L. major*-Lysat für jeweils 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten hierbei unbehandelte dendritische Zellen. Die Resultate repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus fünf verschiedenen Experimenten. \*\*\*,  $p < 0.0005$ , verglichen mit der nicht infizierten Kontrollgruppe des jeweiligen Mausstammes. DC = dendritische Zellen, LmLys = *L. major*-Lysat





**Abbildung 20:** Transwell-Migrations-Test von *L. major*-behandelten dendritischen Zellen. Der Transwell-Migrations-Test mit dendritischen Zellen wurde in Abwesenheit von Chemokinen oder in Gegenwart von CCL21/6Ckine analysiert. Dendritische Zellen wurden zu diesem Zweck mit *L. major* infiziert oder mit *L. major*-Lysat für jeweils 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten hierbei unbehandelte dendritische Zellen. Die Resultate repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus fünf verschiedenen Experimenten. \*\*\*,  $p < 0.0005$ , verglichen mit der nicht infizierten Kontrollgruppe des jeweiligen Mausstammes. DC = dendritische Zellen, LmLys = *L. major*-Lysat

Die Ergebnisse der Transwell-Migrations-Tests zeigen, dass eine Infektion mit *L. major* oder eine Inkubation mit *L. major*-Lysat das Wanderungsverhalten von dendritischen Zellen in Gegenwart der Chemokine CCL2/MCP-1, CCL3-MIP-1 $\alpha$  und

CCL21/6Ckine signifikant moduliert. So konnte bei der CCL2/MCP-1-Transwell-Migrations-Analyse gezeigt werden, dass bei infizierten dendritischen Zellen aus BALB/c-Mäusen die Migrationsrate um den Faktor 2,3 geringer war als bei der nicht infizierten Kontrolle. Ein ähnlich signifikantes Ergebnis konnte bei dendritischen Zellen, welche mit Lysat inkubiert wurden, ermittelt werden. Hierbei wurde eine Reduktion der Migrationsrate um den Faktor 2,5 beobachtet. Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Wirkung von CCL2/MCP-1 wurden bei dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen festgestellt. Nach Infektion mit *L. major* verringerte sich die Migrationsrate dieser Zellen um den Faktor 2,4. Bei der Transwell-Analyse mit Lysat konnte ein ähnlich signifikantes Wanderungsverhalten von dendritischen Zellen beobachtet werden. So wurde eine Reduktion der Migrationsrate um den Faktor 2,1 festgestellt.

Das Migrationsverhalten sowohl von infizierten und nicht infizierten Zellen als auch von dendritischen Zellen, welche mit Lysat inkubiert wurden, zeigte unter Verwendung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  als chemotaktischem Lockstoff ähnlich signifikante Ergebnisse, wie dies bereits bei der CCL2/MCP-1-Transwell-Migrations-Analyse festgestellt wurde. So bewirkte eine Infektion von dendritischen Zellen sowohl aus BALB/c-Mäusen als auch aus C57BL/6-Mäusen mit *L. major* eine Reduktion der Migration um den Faktor 1,8. Auch in diesem Migrations-Assay führte eine Inkubation dendritischer Zellen aus beiden Mausstämmen mit Lysat zu ähnlich signifikanten Ergebnissen, da sowohl bei dendritischen Zellen aus BALB/c-Mäusen als auch bei dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen eine Reduktion der Migration um den Faktor 2,3 gemessen wurde.

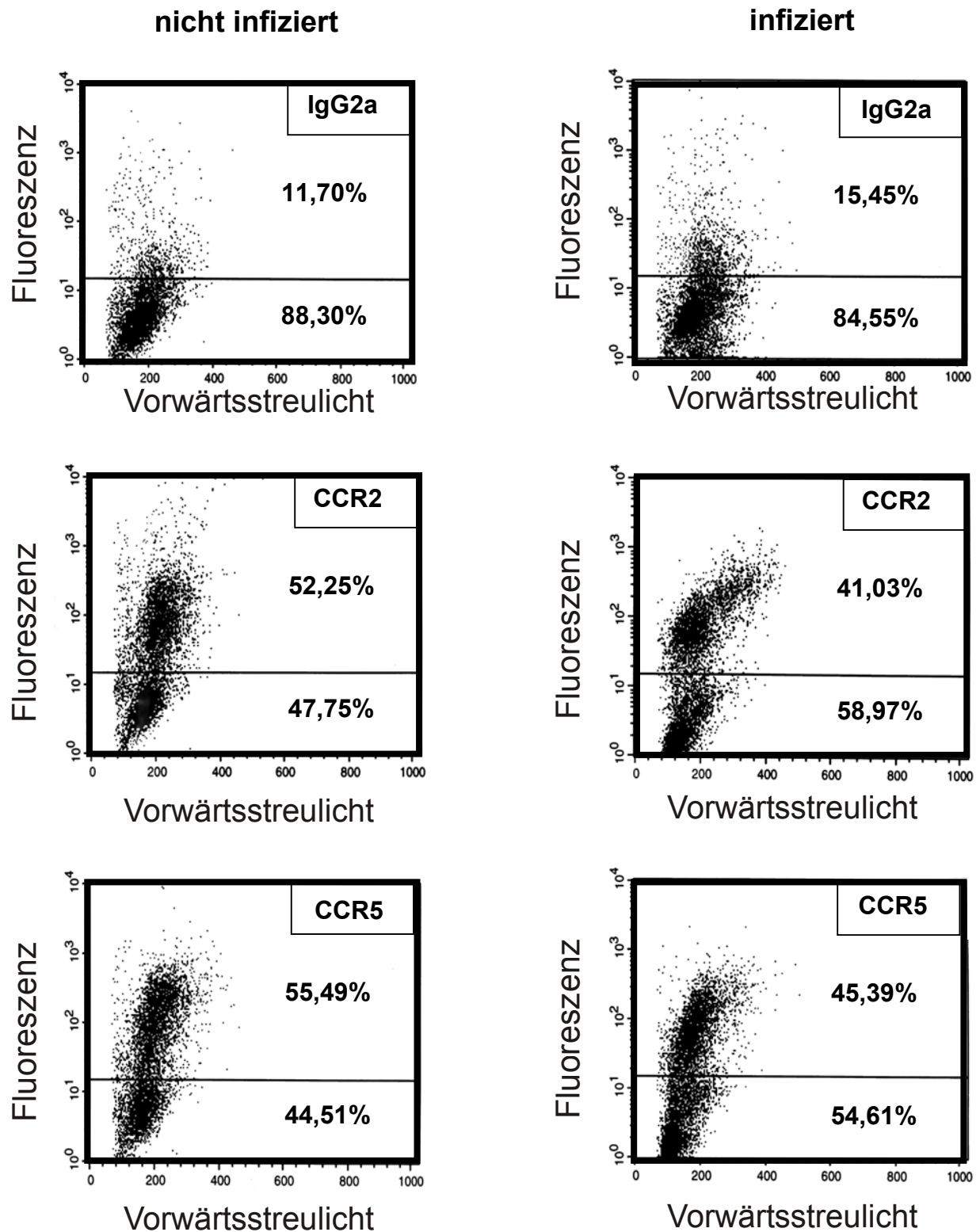
Interessanterweise ist dieser Effekt der Reduktion nach Infektion oder Inkubation mit Lysat bei der CCL21/6Ckine-Transwell-Migrations-Test nicht festzustellen gewesen. Die Wanderungsrate von Zellen, welche entweder mit *L. major* infiziert wurden oder mit Lysat inkubiert wurden, erhöhte sich sogar im Vergleich zu der nicht infizierten Kontrolle dieser antigenpräsentierenden Zellen. So wurde eine Steigerung der Migrationsrate dendritischer Zellen von BALB/c-Mäusen nach Infektion um den Faktor 3,0 und nach Inkubation mit Lysat um den Faktor 2,9 festgestellt. Vergleichbare Werte wurden hierbei mit dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen ermittelt, denn nach Infektion dieser Zellen mit Parasiten konnte eine Steigerung der Wanderungsrate um das 2,8-fache und nach Inkubation mit Lysat um das 2,3-fache gemessen werden. Zu erwähnen sei hierbei, dass die nicht infizierte Kontrolle

innerhalb des Chemokin-Transwell-Migrations-Tests eine ca. dreifach höhere Basismigration gegenüber Zellen aufwies, welche in dem Assay ohne Chemokin verwendet wurden.

### **3.7 FACS-Analyse der Chemokinrezeptorexpression infizierter und nicht infizierter dendritischer Zellen**

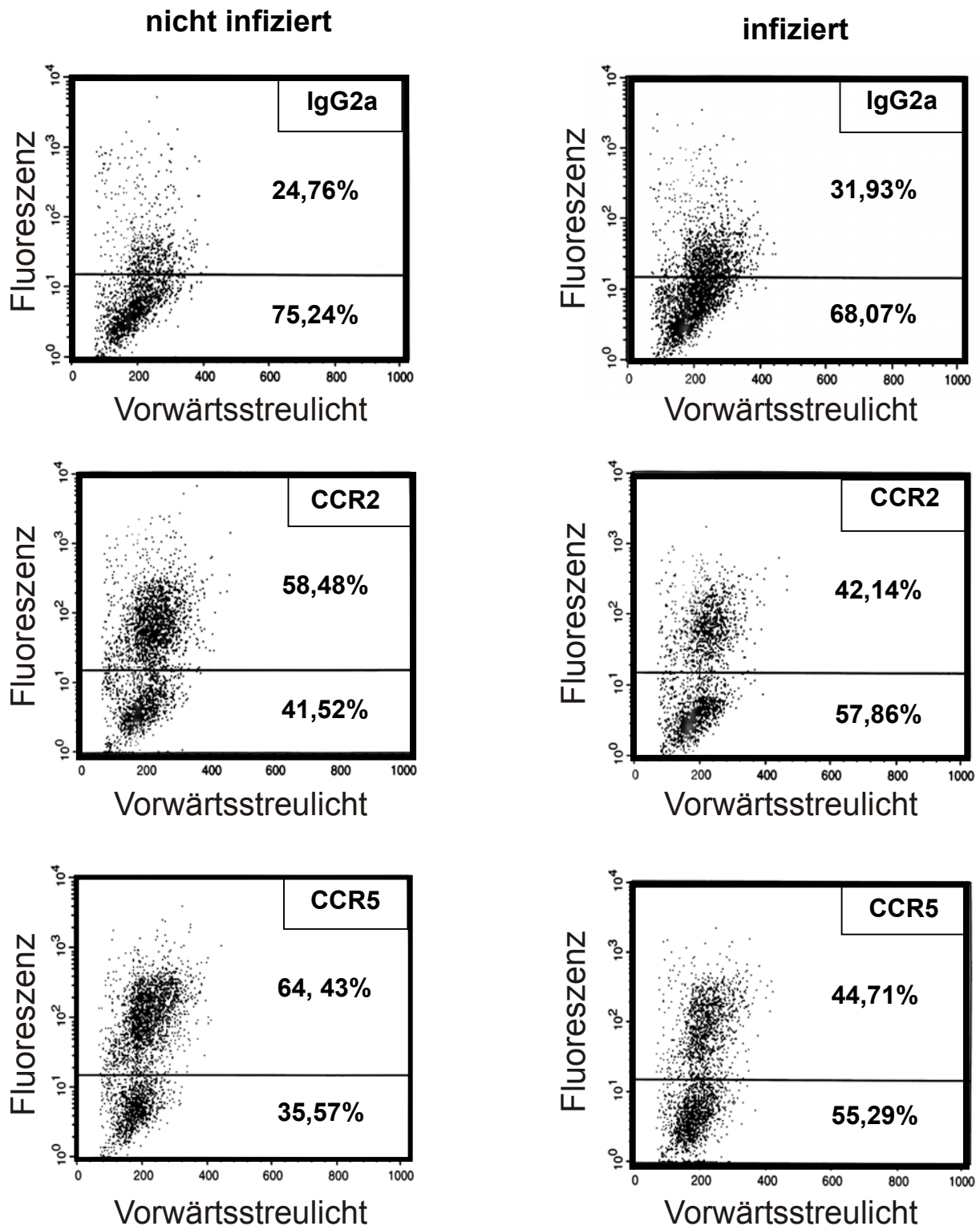
Basierend auf den vorangegangenen Daten des Transwell-Migrations-Tests, bei der ein Einfluss von *L. major* auf die Wanderungsrate dendritischer Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen festgestellt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob diese Beobachtung auch mit einer Modulation der Expression bestimmter Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von dendritischen Zellen korreliert. Aus diesem Grund wurden dendritische Zellen des Knochenmarks, welche aus empfänglichen und resistenten Tieren gewonnen wurden, zunächst über einen Zeitraum von 24 Stunden mit *L. major* infiziert und anschließend mit anti-CCR2- und anti-CCR5-Antikörpern markiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Primärantikörpers aus Ratten, welcher sich an die Chemokinrezeptoren der Maus anlagert, und eines PE-markierten sekundären Antikörpers aus der Ziege, welcher an den primären Antikörper aus der Ratte bindet. Im Anschluss an den Färbeschritt wurde die dendritischen Zellen im FACS-Gerät analysiert (Abbildung 21 und 22).

## BALB/c-Mäuse



**Abbildung 21:** FACS-Analyse der CCR2 und CCR5-Chemokinrezeptorexpression bei infizierten und nicht infizierten dendritischen Zellen aus BALB/c-Mäusen. Dendritische Zellen wurden zu diesem Zweck über einen Zeitraum von 24 Stunden mit *L. major* infiziert und die Chemokinrezeptoren anschließend mit PE-markiertem Antikörper spezifisch gefärbt.

## C57BL/6-Mäuse

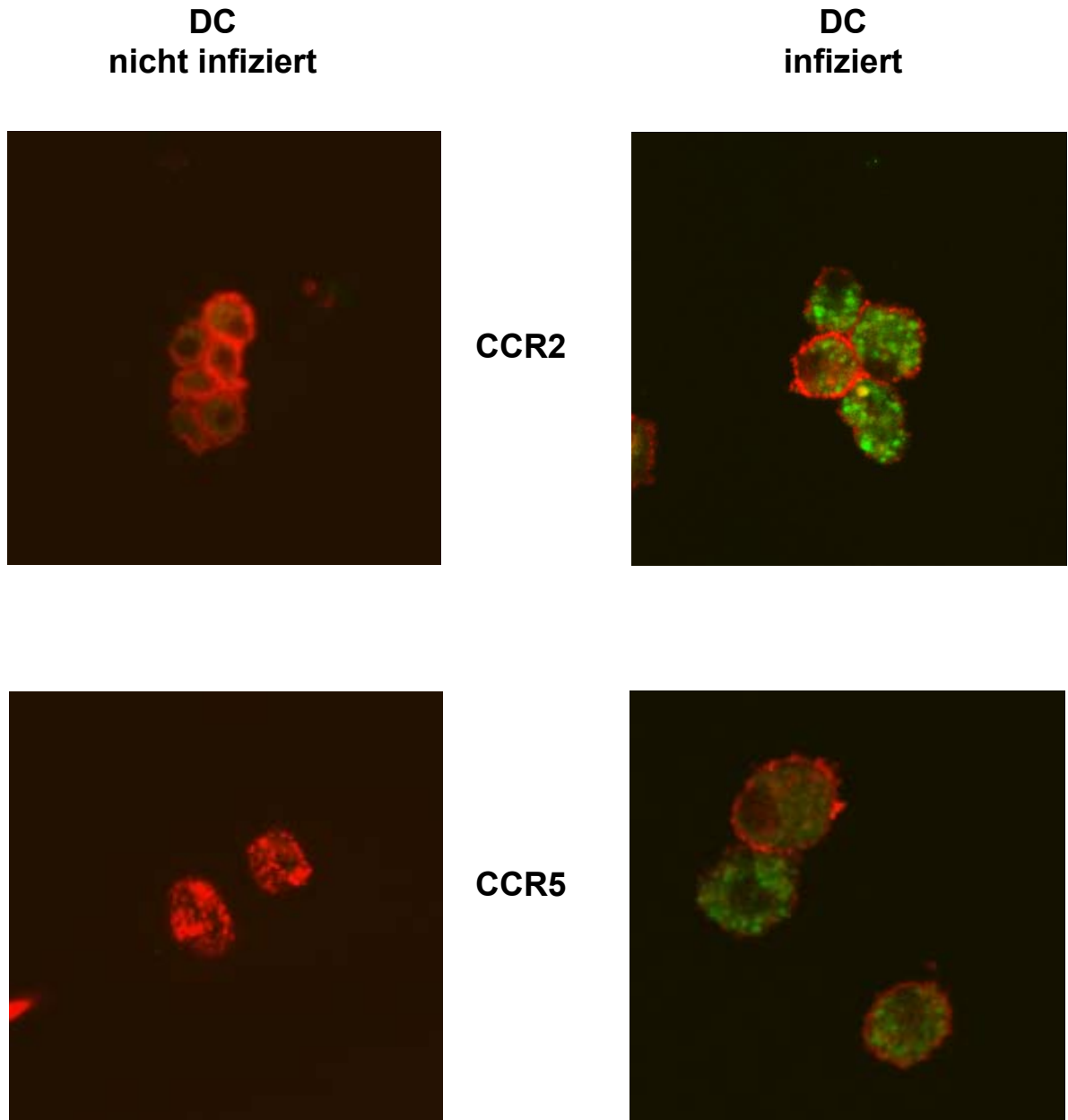


**Abbildung 22:** FACS-Analyse der CCR2 und CCR5-Chemokinrezeptorexpression bei infizierten und nicht infizierten dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen. Dendritische Zellen wurden zu diesem Zweck über einen Zeitraum von 24 Stunden mit *L. major* infiziert und anschließend mit PE-markiertem Antikörper spezifisch gefärbt.

Die Ergebnisse von dendritischen Zellen aus BALB/c- sowie aus C57BL/6-Mäusen sind vergleichbar und bestätigen somit die RNase Protection Assay-Analysen. Es wird ersichtlich, dass bei gleichbleibender Fluoreszenzintensität die Anzahl gemessener Zellen nach einer Infektion mit *L. major* verglichen mit der nicht infizierten Kontrolle nach der Färbung mit anti-CCR2- bzw. mit anti-CCR5-Antikörpern abnimmt.

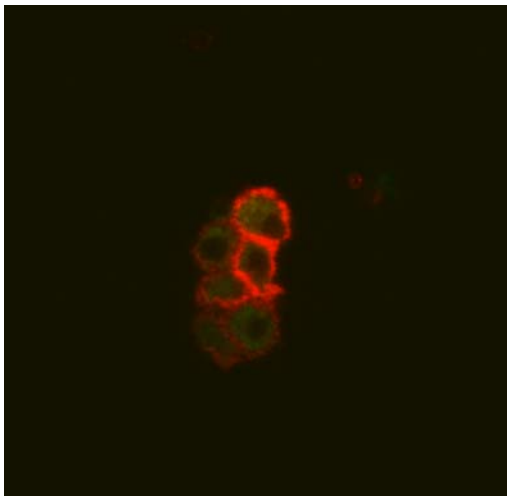
### **3.8 Analyse der Chemokinrezeptorexpression infizierter und nicht infizierter dendritischer Zellen mit konfokaler Lasermikroskopie**

Basierend auf den vorangegangenen Daten der FACS-Analyse, bei der lediglich ein geringer Einfluss von *L. major* auf die Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren dendritischer Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen festgestellt werden konnte, sollte nun mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie überprüft werden, ob sich diese Beobachtung hierin bestätigt. Aus diesem Grund wurden erneut dendritische Zellen des Knochenmarks, welche aus empfänglichen und resistenten Tieren gewonnen wurden, zunächst über einen Zeitraum von 24 Stunden mit *L. major* infiziert und anschließend mit anti-CCR2- und anti-CCR5-Antikörpern markiert. Die Färbung wurde hierbei mit dem Protokoll aus Versuch 3.7 durchgeführt. Im Anschluss an diesen Färbeschritt wurden die dendritischen Zellen permeabilisiert und die intrazellulären Leishmanien mit Hilfe eines Antikörpers, welcher aus einem Kaninchen stammte markiert. Als letzter Schritt wurde ein FITC-markierter Antikörper hinzugegeben, welcher sich an den Leishmanien-spezifischen Antikörper anlagerte. Im Anschluss an diese Färbeschritte wurden die dendritischen Zellen im konfokalen Lasermikroskop analysiert (Abbildungen 23 und 24).

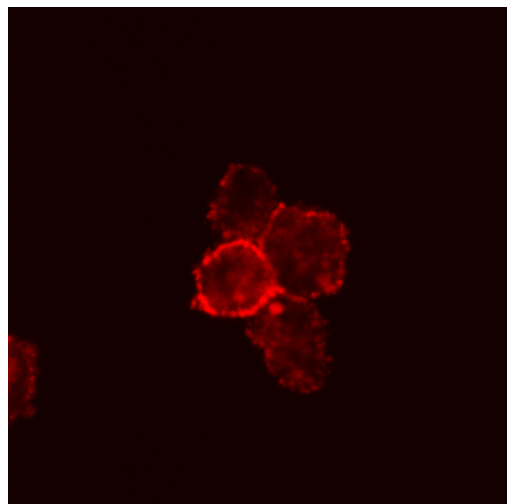
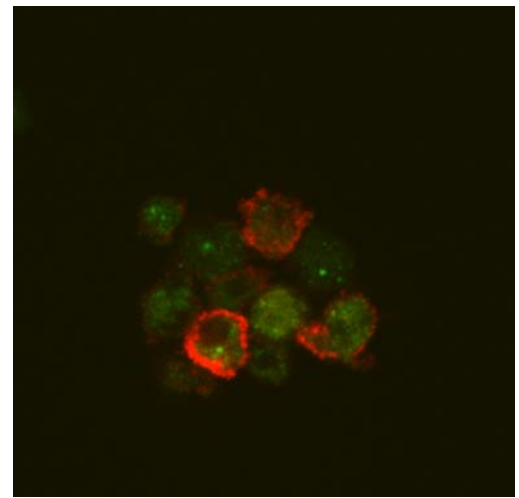
**BALB/c-Mäuse**

**Abbildung 23: Konfokale Lasermikroskopie infizierter und nicht infizierter dendritischer Zellen aus BALB/c-Mäusen.** Dendritische Zellen wurden zu diesem Zweck über einen Zeitraum von 24 Stunden mit *L. major* infiziert und anschließend mit PE-markiertem Antikörper spezifisch gefärbt. Rot = PE-markierter Chemokinrezeptor, grün = FITC-markierte Leishmanien.

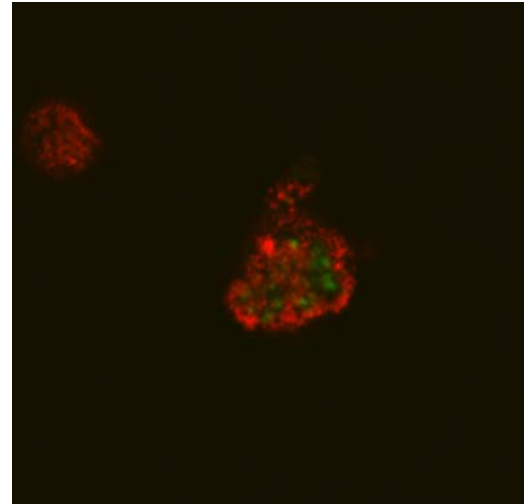
## C57BL/6-Mäuse

DC  
nicht infiziert

CCR2

DC  
infiziert

CCR5



**Abbildung 24:** Konfokale Lasermikroskopie infizierter und nicht infizierter dendritischer Zellen aus C57BL/6-Mäusen. Dendritische Zellen wurden zu diesem Zweck über einen Zeitraum von 24 Stunden mit *L. major* infiziert und anschließend mit PE-markiertem Antikörper spezifisch gefärbt. Rot = PE-markierter Chemokinrezeptor, grün = FITC-markierter Leishmanien.

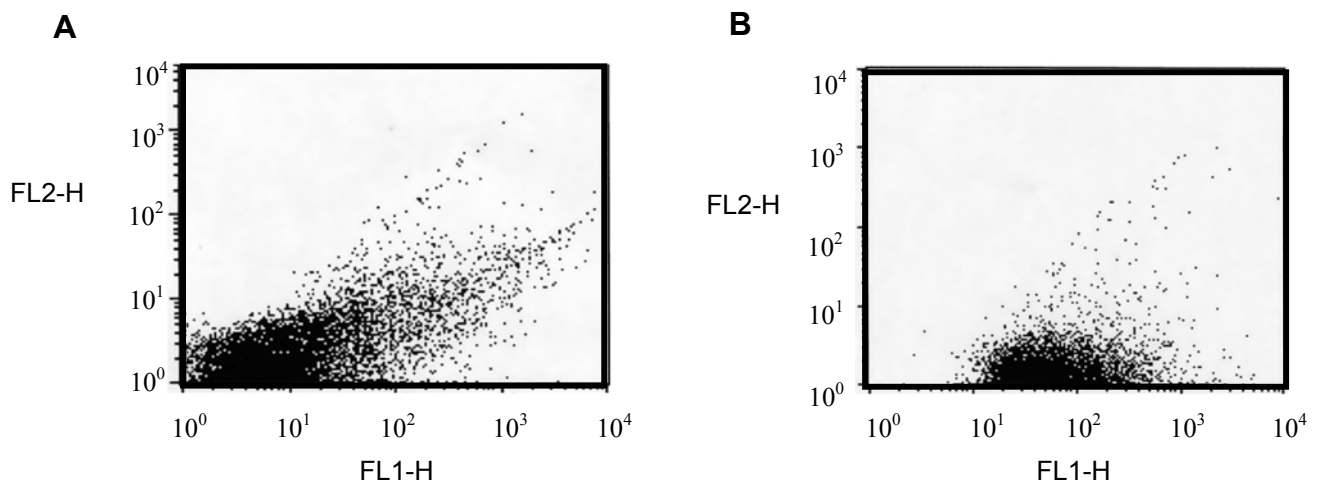


Leider konnte keine exakte Quantifizierung der gefärbten Zellen unter dem konfokalen Lasermikroskop vorgenommen werden, da unter dem Einfluss der Laserbestrahlung die Zellen in einem Zeitraum von weniger als 5 Sek. ihre Fluoreszenz verloren. Die Bilder der konfokalen Lasermikroskopie zeigen jedoch sehr deutlich die Spezifität der zuvor im FACS verwendeten Antikörper (Abschnitt 3.7).

### **3.9 Die Wirkung von nicht infizierten und infizierten dendritischen Zellen auf das Migrationsverhalten von T-Zellen**

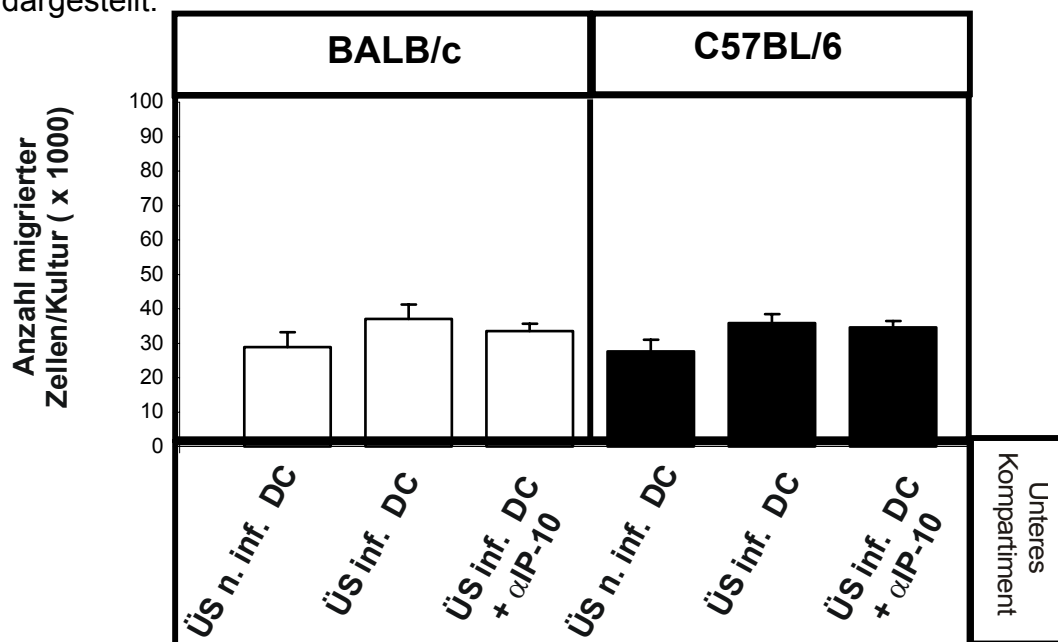
In der vorangegangenen mRNA-Expressionsstudie des RNase-Protection-Assays (Kapitel 3.5) konnte gezeigt werden, dass bei infizierten dendritischen Zellen aus resistenten Mäusen eine verstärkte mRNA-Expression von CXCL10/IP-10 zu verzeichnen war. Diese konnte hingegen beim suszeptiblen Mausstamm nicht festgestellt werden. Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass der Chemokinrezeptor CXCR3, welcher den Liganden CXCL10/IP-10 bindet, auf der Zelloberfläche aktivierter Th1-Zellen exprimiert wird (28, 118, 166, 195). Daher galt es nun in einem funktionellen Assay zu überprüfen, ob dendritische Zellen, welche mit *L. major* infiziert wurden, einen Einfluss auf das Wanderungsverhalten von T-Zellen ausüben. Zu diesem Zweck wurden dendritische Zellen mit *L. major* über Nacht infiziert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen, bei 4000 Upm zentrifugiert und in das untere Kompartiment der Transwellkammer gegeben. Nun wurden T-Zellen aus Lymphknoten von infizierten Mäusen mit Hilfe des Pan-T-Isolierungs-Kits [Miltenyi Biotec] isoliert. Dieser Kit beruht auf einem indirekten magnetischen Markierungsverfahren, um T-Zellen zu isolieren. Hierbei werden alle anderen Zellen außer T-Zellen, wie z. B. B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten mit Hilfe eines Antikörpercocktails, bestehend aus den Antikörpern gegen CD45R (B220), CD49b (DX5), CD11b (Mac-1) and Ter-119 und Anti-Biotin-MikroBeads, markiert. Anschließend wird die Zellsuspension über eine Säule gegeben, welche durch ein magnetisches Feld fließt. Somit verweilen die markierten Zellen innerhalb der Säule, hingegen T-Zellen durch diese Methode

ungehindert durch die Säule fließen. Dieses Verfahren wird als negative Selektion bezeichnet. Aus der Literatur ist bekannt, dass CD3-Moleküle überwiegend auf Oberflächen von T-Zellen exprimiert werden, wo sie den CD3-Komplex bilden und mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert sind (94). Daher wurden zur Kontrolle dieser Aufreinigung sowohl die Zellen, welche ungehindert durch das Magnetfeld und somit durch die Säule flossen, als auch die Zellen, welche mit Hilfe der Antikörper magnetisch an der Säule gebunden waren, mit anti-CD3-Antikörpern markiert und im FACS-Gerät analysiert (Abbildung 25).



**Abbildung 25: FACS-Analyse von Gesamtzellen des Lymphknotens infizierter Mäuse, welche mit anti-CD3-Antikörpern markiert wurden. A:** Zellsuspension, welche positiv selektioniert wurde. **B:** Zellsuspension, welche ungehindert durch das Magnetfeld floss. FL1-H: FITC-markierte CD3-positive Zellen; FL2-H: Eigenfluoreszenz der Zellen.

Wie aus Abbildung 25 ersichtlich ist, konnte mit Hilfe des Pan-T-Isolierungs-Kits eine homogene Population an CD3-positiven Zellen gewonnen werden, welche für den Transwell-Migrations-Assay verwendet wurde. In das obere Kompartiment der Transwellkammer wurden  $1 \times 10^6$  CD3-positive Zellen gegeben. In das untere Kompartiment wurde der Überstand von infizierten oder nicht infizierten dendritischen Zellen, die zum einen aus BALB/c- und zum anderen aus C57BL/6-Mäusen isoliert wurden, gegeben. In eine Transwell-Kammer wurde zusätzlich der Überstand infizierter dendritischer Zellen einschließlich anti-IP-10-Antikörper gegeben. Die Zugabe dieses Antikörpers hatte eine neutralisierende Funktion und sollte im Falle einer CXCL10/IP-10-induzierten Migration diese inhibieren. Es galt nun zu überprüfen, ob eine Infektion von dendritischen Zellen mit *L. major* eine Modulation des Wanderungsverhaltens von T-Zellen bewirkt. Nach 24 Stunden wurden lichtmikroskopische Auswertungen zur Messung der Anzahl migrierter Zellen vorgenommen. Die Ergebnisse der Transwell-Analyse sind in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26:** Transwell-Migrations-Analyse CD3-positiver Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Die untere Transwell-Kammer wurde entweder mit Überstand aus nicht infizierten dendritischen Zellen (= ÜS n. inf. DC), mit Überstand aus infizierten dendritischen Zellen (= ÜS inf. DC) oder mit Überstand aus infizierten dendritischen Zellen einschließlich monoklonalem Antikörper gegen IP-10 (=ÜS inf. DC +  $\alpha$ IP-10) versetzt. Nach 24 Stunden wurden die in das untere Kompartiment gewanderten Zellen mikroskopisch ausgewertet. Die Porengröße bei diesem Transwell-Migrations-Assay betrug  $3 \mu\text{m}$ . DC = dendritische Zellen, n. inf. = nicht infiziert, inf. = infiziert, ÜS = Überstand.

Wie aus Abbildung 26 ersichtlich konnte keine signifikante Modulation des Migrationsverhaltens von T-Zellen festgestellt werden, die unterschiedlichen Überstanden aus nicht infizierten und infizierten Zellen ausgesetzt waren. Die Werte der migrierten Zellen schwankten hierbei zwischen  $28,8 \times 10^3$  und  $37 \times 10^3$  Zellen pro Zellkulturschale.

#### 4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Rolle von Chemokinen sowie ihrer Rezeptoren bei der Regulation der Immunantwort gegen Erreger der kutanen Leishmaniose im Mausmodell zu untersuchen. Aus der Literatur ist bekannt, dass der klinische Verlauf von Leishmanieninfektionen vom Typ der sich differenzierenden CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen und dem daraus resultierenden Lymphokinmuster abhängig ist. So korreliert die selbstheilende Form der Leishmaniose mit der Entwicklung IFN- $\gamma$ -produzierender Th1-Zellen, während beim chronischem Verlauf der Erkrankung Th2-Zellen, die u. a. IL-4 und IL-10 sezernieren, die Ausbreitung der Erreger fördern (36, 58, 162, 171). In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass auch die Expression von Chemokinen den Verlauf des Krankheitsbildes reflektierten. CCL2/MCP-1, welches Makrophagen zur intrazellulären Erregerabwehr aktiviert, ist hierbei überwiegend in Hautläsionen der selbstheilenden Leishmaniose zu finden. Im Gegensatz dazu wurde bei der diffusen kutanen Leishmaniose in humanen Hautbiopsien eine gesteigerte Expression des Chemokins CCL3/MIP-1 $\alpha$  festgestellt (175, 177, 178). Im Humansystem ist es jedoch praktisch nicht möglich, die Kinetik der Chemokinexpression über den gesamten Infektionsverlauf zu verfolgen. Deshalb wurde die experimentelle Leishmanieninfektion von Inzuchtmäusen herangezogen, um die Kinetik der Chemokinexpression und deren Korrelation mit dem Verlauf der kutanen Leishmaniose zu bestimmen. Dazu wurden genetisch resistente C57BL/6- und genetisch empfängliche BALB/c-Mäuse intradermal mit *L. major* infiziert. Die entstandenen Hautläsionen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und die Chemokinexpression mit *In-situ*-Hybridisierung unter Verwendung von <sup>32</sup>S-markierten RNA-Sonden untersucht. In diesem Versuch konnte ein deutlicher Unterschied zwischen BALB/c- und C57BL/6-Mäusen festgestellt werden, wobei resistente Mäuse entgegen empfänglichen Tieren eine vielfach höhere Expression von CCL2/MCP-1 vorwies. Zusammen mit der beobachteten Kinetik des Läsionsindex in beiden Mausstämmen, bei der ein Unterschied in der Läsionsgröße zwischen suszeptiblen und resistenten Tieren im Verlauf der Infektion festgestellt wurde, zeigten diese Daten, dass ebenso wie im humanen System bei der experimentellen Leishmaniose in der Maus die Fähigkeit zur Abwehr des Erregers mit einer verstärkten Expression von CCL2/MCP-1 korreliert.

Interessanterweise konnte eine Expression von CCL3/MIP-1 $\alpha$  weder bei BALB/c- noch bei C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass das murine System nur bedingt mit dem humanen System vergleichbar ist. So könnte ein Grund für die unterschiedliche CCL3/MIP-1 $\alpha$ -Expression in der Haut z. B. in dem unterschiedlichen Vorkommen CCL3/MIP-1 $\alpha$ -produzierender Zellen (T-Zellen, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, Epithelzellen) in der Haut liegen.

Leider konnten aufgrund des teilweise stark nekrotischen Zustandes des Gewebes und der großen Anzahl an Haarfollikeln keine Serienschnitte von murinen Hautläsionen zur Klassifizierung des Typs CCL2/MCP-1-exprimierender Zellen angefertigt werden. Diese seriellen Schnitte bieten den Vorteil, mit einer Gewebeprobe eine *In-situ*-Hybridisierung und mit dem darauffolgenden Gewebeschnitt den Zelltyp mit Hilfe immunhistologischer Färbemethoden bestimmen zu können. Aus der Literatur ist aber bereits bekannt, dass Keratinozyten in der Lage sind CCL2/MCP-1 zu synthetisieren (70, 153). Die vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass beim Menschen neben CD68<sup>+</sup>-Makrophagen ebenso Monozyten als Produzenten dieses Chemokins fungieren (175, 177). In einer Arbeit von Racoosin und Beverly (168) konnte weiterhin gezeigt werden, dass *in vitro* eine Infektion mit promastigoten Leishmanien zu einer verstärkten Synthese der CCL2/MCP-1-mRNA in murinen Makrophagen führt. Interessanterweise konnte in dieser Studie ebenso keine Expression von CCL3/MIP-1 $\alpha$  nach einer *L. major*-Infektion festgestellt werden. Wenngleich während der *In-situ*-Hybridisierung-Studie mit Gewebeproben der Haut ein breiteres Spektrum an Zellen untersucht wurde (Makrophagen, dendritische Zellen, Keratinozyten usw.), so konnte der Befund von Racoosin und Beverly (168) zumindest in Bezug auf murine Makrophagen, welche ebenfalls Bestandteil der murinen Haut sind, bestätigt werden.

Neuere *in vitro*-Infektionsstudien von Bhattacharyya (23) mit *L. donovani* zeigten, dass CCL2/MCP-1 und CCL3/MIP-1 $\alpha$  in peritonealen Makrophagen eine leishmanizide Wirkung induzieren. Hierbei konnte nach Stimulation *L. donovani*-infizierter Makrophagen mit diesen beiden Chemokinen eine verstärkte Synthese von TNF- $\alpha$ , Nitrit und der mRNA der induzierbaren NO-Synthase nachgewiesen werden. Das in dieser Doktorarbeit festgestellte Ausbleiben der mRNA-Expression von CCL3/MIP-1 $\alpha$  nach Infektion mit *L. major* und die gleichzeitige Entwicklung einer

Resistenz gegen eine *L. major*-Infektion, welche mit einer verstärkten Expression von CCL2/MCP-1 in der infizierten Haut von Mäusen einhergeht, deuten daher umso mehr auf die wichtige protektive Funktion von CCL2/MCP-1 während einer Infektion mit diesem Erreger hin.

In den Studien von Ritter und Moll (177) konnte zusätzlich zu dem Befund, dass die Expression von CCL2/MCP-1 mit der selbstheilenden Form der kutanen Leishmaniose beim Menschen assoziiert ist (178), nach Infektion von humanen Monozyten *in vitro* eine Abtötung von intrazellulären Leishmanien durch CCL2/MCP-1 nachgewiesen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass nicht nur Makrophagen, sondern ebenso dendritische Zellen in der Lage sind Leishmanien aufzunehmen (26, 139, 143, 208, 239). Daher wurden in dieser Doktorarbeit zur Untersuchung der Wirkung von CCL2/MCP-1 *L. major*-Infektionsstudien mit Langerhans-Zellen und peritonealen Makrophagen durchgeführt. Hierdurch konnte die CCL2/MCP-1-induzierte leishmanizide Wirkung auf Makrophagen bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch kein vergleichbarer Effekt dieses Chemokins auf Langerhans-Zellen. Dies kann u. a. darauf zurückzuführen sein, dass Langerhans-Zellen und Makrophagen voneinander unterschiedliche Zelltypen sind und unterschiedliche immunologischen Funktionen erfüllen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Langerhans-Zellen eine bedeutende Rolle im Verlauf der initialen Phase der Entwicklung einer protektiven Immunantwort gegen Erreger der Leishmaniose spielen (144, 145, 238). So konnte bereits gezeigt werden, dass Langerhans-Zellen effektiv Leishmanien aufnehmen können und im Zuge ihrer Reifung zum dränierenden Lymphknoten wandern, um dort den T-Zellen das Antigen zu präsentieren (11). Diese Fähigkeit zur Induktion einer primären T-Zell-vermittelten Immunantwort konnte jedoch bei Makrophagen nicht festgestellt werden. Zudem ist deren Fähigkeit zur Antigenpräsentierung nach einer Leishmanieninfektion stark beeinträchtigt (65, 101). Des Weiteren unterscheiden sich beide Zelltypen durch ihre unterschiedliche leishmanizide Aktivität voneinander. So konnte in der Arbeit von Blank *et al.* (25) bereits gezeigt werden, dass sowohl Makrophagen als auch Langerhans-Zellen in der Lage sind, Leishmanien aufzunehmen. Eine multiple Replikation des Erregers innerhalb von Makrophagen bleibt jedoch bei Langerhans-Zelle aus. Weitere Untersuchungen ergaben hierbei, dass eine Infektion lediglich bei Makrophagen eine Expression der induzierbaren NO-Synthase bewirkt, während dieser Effekt nach Infektion von Langerhans-Zellen ausbleibt. Aus diesem Grund scheint ein NO-unabhängiger Mechanismus für die

Kontrolle der Leishmanienreplikation in Langerhans-Zellen verantwortlich zu sein. Gerade diese unterschiedliche Erregerabwehr könnte ein Grund für die in dieser Arbeit beobachtete unterschiedliche Wirkung von CCL2/MCP-1 auf diese Zellen sein, da Makrophagen und Langerhans-Zellen verschiedene Funktionen innerhalb des Immunsystems des Wirtes ausüben.

In dieser im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Infektionsstudie konnte weiterhin beobachtet werden, dass innerhalb eines Tages eine Verdopplung der Erregerzahl in peritonealen Makrophagen zu verzeichnen war. Dieser Effekt blieb bei Langerhans-Zellen, in denen im gleichen Zeitraum keine Replikation des Erregers festgestellt wurde, aus. Somit konnte diese Beobachtung die Ergebnisse von Blank *et al.* (25) bestätigen.

Die bisher dargestellten Versuche in dieser Arbeit zeigten, dass eine verstärkte Expression von CCL2/MCP-1 in den infizierten Hautarealen von Mäusen mit der Entwicklung einer Resistenz gegenüber einer Leishmaniose korreliert. Aus der Literatur ist bekannt, dass CCL2/MCP-1 u. a. chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen wirkt (62, 95, 128, 234). Zu Beginn der Doktorarbeit gab es jedoch noch nur wenig Informationen über den Einfluss einer Leishmanien-Infektion auf die CCL2/MCP-1-induzierte Migration von Langerhans-Zellen. Gerade Langerhans-Zellen spielen jedoch nicht nur eine zentrale Rolle in der Initiation, sondern ebenso in der Regulation einer Immunantwort gegen diesen Erreger (11, 26, 143, 144). Aus diesem Grund wurde eine Transwell-Migrations-Analyse durchgeführt, welche den Einfluss einer Leishmanien-Infektion auf das CCL2/MCP-1-induzierte Wanderungsverhalten von Langerhans-Zellen untersuchen sollte. So konnte gezeigt werden, dass Langerhans-Zellen chemotaktisch auf CCL2/MCP-1 reagieren, eine Infektion dieser Zellen mit *L. major* diese Wanderungsrate jedoch stark herabsetzt. Nakamura *et al.* (153) konnten bereits 1995 eine CCL2/MCP-1-induzierte Migration von Langerhans-Zellen nachweisen. Die Reduktion der Migrationsrate nach einer *L. major*-Infektion wurde jedoch erstmalig in dieser Doktorarbeit gezeigt und ist ein weiterer Hinweis für das außergewöhnliche Potential des Erregers, Immunantworten modulieren zu können.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Infektionsstudie konnte zudem zeigen, dass eine Infektion von murinen Langerhans-Zellen mit *L. major* nicht nur zu einer verringerten CCL2/MCP-1-abhängigen Migrationsrate dieser Zellen führt, sondern ebenso zu



einer Reduktion der CCL3/MIP-1 $\alpha$ -induzierten Migration. Aus der Literatur ist bekannt, dass CCL3/MIP-1 $\alpha$  als Ligand der Rezeptoren CCR1 und CCR5 fungiert (253, 257). Während CCR1 überwiegend auf Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird, ist der Rezeptor CCR5 u. a. bei Langerhans-Zellen zu finden (150, 253). Die in der Doktorarbeit erzielten Ergebnisse zeigen daher, dass der Erreger eine bislang nicht beschriebene Strategie im Zusammenspiel mit dendritischen Zellen entwickelt hat, indem er die Modulation der Migrationsrate beeinflusst.

Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurde die Chemokinrezeptor-Expression im Laufe einer *L. major*-Infektion anhand von RNase Protection Assays untersucht. Von CCR2 ist aus der Literatur bekannt, dass er auf dendritischen Zellen, Makrophagen, Neutrophilen, B- und T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert wird und in der Lage ist, das Chemokin CCL2/MCP-1 effektiv zu binden (63, 107, 151, 167, 211, 257). Die zentrale Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR2 während einer Leishmaniose spiegelt sich in Arbeiten von Sato *et al.* (203) wieder, in denen ein direkter Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer Empfänglichkeit gegenüber einer Leishmaniose und dem Fehlen dieses Chemokinrezeptors bei CCR2-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte. So zeigten diese Studien einen Defekt im Wanderungsverhalten von Langerhans-Zellen zum dränierenden Lymphknoten. Weiterhin konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass in CCR2-defizienten Mäusen die Einwanderung von Monozyten/Makrophagen und Langerhans-Zellen in das inflammatorische Gewebe der Haut verringert ist (120, 136). Von CCR5 ist bekannt, dass er von Monozyten, Makrophagen, T- und B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert wird (131, 150, 169, 174). In einer Arbeit von Zhou *et al.* (256) konnte zudem ein direkter Bezug zwischen CCR5 und der Fähigkeit zur Abwehr von *Listeria monocytogenes* hergestellt werden. In dieser Arbeit zeigten CCR5-defiziente Mäuse verglichen mit dem Wildtyp eine verminderte Abwehr von *L. monocytogenes*. Sowohl CCR2 als auch CCR5 nehmen somit eine wichtige Stellung bei der Abwehr infektiöser Erreger ein. Aus diesem Grund galt es nun in dieser Doktorarbeit zu überprüfen, ob eine Infektion von dendritischen Zellen mit *L. major* zu einer Modulation der CCR2- und CCR5-mRNA-Chemokinrezeptorexpression führt.

In mehreren Publikationen wurde berichtet, dass eine Inkubation dendritischer Vorläuferzellen und unreifer dendritischer Zellen mit verschiedenen Stimuli, wie z. B. LPS, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und CpG, in diesen Zellen zu einer Herunterregulation der Rezeptoren CCR2 und CCR5 führt (131, 214, 234). Die in dieser Doktorarbeit bei

dendritischen Zellen festgestellte verminderte Synthese der CCR2- und CCR5-mRNA nach Infektion mit *L. major* sowie nach einer Inkubation mit *L. major*-Lysat geht somit mit dem Reifungsprozess dieser Zellen einher.

Interessanterweise zeigte sich jedoch nach Infektion mit *L. major* sowie nach Inkubation mit *L. major*-Lysat, im Gegensatz zur Reduktion der CCR2- und CCR5-Expression, eine verstärkte mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CCR7. CCR7 spielt im Immunsystem nicht nur eine entscheidende Rolle bei der korrekten Positionierung von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und dendritischen Zellen in den sekundären lymphatischen Organen, sondern auch beim sogenannten „Homing“ dieser Zellen (1, 45, 61, 108, 131, 214, 217, 257). So konnte in Arbeiten von Förster *et al.* (61) gezeigt werden, dass in CCR7-defizienten Mäusen, zusätzlich zum Defekt der B- und T-Zell-Migration in die sekundären lymphatischen Organe, eine verminderte Wanderung von aktivierten dendritischen Zellen in die dränierenden Lymphknoten zu verzeichnen war. Diese zielgerichtete Migration dendritischer Zellen zu den dränierenden Lymphknoten wird von den beiden Chemokinen CCL21/SLC und CCL19/ELC induziert, welche CCR7 mit hoher Affinität binden und konstitutiv im Lymphknoten exprimiert werden (57, 122, 151, 244, 250, 256). In der Literatur wird daher sowohl die Herunterregulation von CCR2 und CCR5 als auch die Hochregulation von CCR7 nach Aktivierung und Heranreifung dendritischer Zellen und der damit verbundenen Empfänglichkeit gegenüber CCL21/SLC und CCL19/ELC als essentieller Bestandteil der Migration dieser Zellen zu den dränierenden Lymphknoten angesehen (131). Die in der vorliegenden Arbeit nach Infektion von dendritischen Zellen mit *L. major* sowie nach Inkubation mit *L. major*-Lysat festgestellte verstärkte Expression von CCR7-mRNA deckt sich mit den Daten der aktuellen Literatur zu heranreifenden dendritischen Zellen.

Interessanterweise waren die beobachteten Modulationen der mRNA-Chemokinrezeptorexpressionen von CCR2, CCR5 und CCR7 sowohl bei dendritischen Zellen aus suszeptiblen als auch bei dendritischen Zellen aus resistenten Tieren miteinander vergleichbar. Die Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild der beiden Mausstämme sind daher nicht auf die Höhe der Expression dieser Rezeptoren zurückzuführen. Interessanterweise konnte jedoch in neueren *in vivo*- und *in vitro*-Studien von Ato *et al.* (12) festgestellt werden, dass eine Infektion dendritischer Zellen mit *L. donovani*, dem Erreger der viszeralen Leishmaniose, zu einer Inhibition der CCR7-Expression führt. Ferner konnte keine

Wanderung dieser Zellen zu den sekundären lymphatischen Organen festgestellt werden. Die Daten aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit zeigen demnach, dass es eine Leishmanien-spezies-spezifische Modulation der CCR7-Expression gibt.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Doktorarbeit zwar eine Expression der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR6 bei dendritischen Zellen beobachtet werden, jedoch blieb eine Modulation der Rezeptorexpression auf RNA-Ebene sowohl nach Infektion als auch nach Inkubation mit *L. major*-Lysat aus. Von CCR1 ist bekannt, dass dieser Rezeptor von Makrophagen, NK-Zellen, unreifen dendritischen Zellen und Neutrophilen exprimiert wird und in der Lage ist, CCL8/MCP-1, CCL15/MIP-5, CCL7/MCP-3, CCL5/RANTES und CCL2/MIP-1 $\alpha$  zu binden (4, 214). CCR1 wird bislang in der Literatur hauptsächlich als Rezeptor für die Wanderung von Monozyten, dendritischen Vorläuferzellen und unreifen dendritischen Zellen in das inflammatorische Gewebe angesehen (4, 200). In diesen Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, daß eine Stimulation dieser Zellen mit z. B. LPS, CD40L und IL-1/TNF, zu einer Herunterregulation des Rezeptors führt. Bislang sind jedoch noch keine Daten bezüglich einer Modulation dieses Rezeptors bei dendritischen Zellen nach einer *L. major*-Infektion bekannt. Es ist daher anzunehmen, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Infektion mit *L. major* oder Inkubation mit *L. major*-Lysat nicht für eine Modulation des Rezeptors CCR1 bei dendritischen Zellen ausreicht.

Ähnliche Ergebnisse wurden in dieser Doktorarbeit mit der Expression des Chemokinrezeptors CCR6 erzielt, dessen Expression bei dendritischen Zellen ebenfalls weder nach Infektion mit *L. major* noch nach Inkubation mit Lysat moduliert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass CCR6 hauptsächlich von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, von unreifen dendritischen Zellen des Knochenmarks und Langerhans-Zellen exprimiert wird (4, 150). CCR6 ist der bislang einzig bekannte Rezeptor für CCL20/MIP-3 $\alpha$ , einem Chemokin, welches von aktivierten Makrophagen, dendritischen Zellen und Endothelzellen sekretiert wird (15). Der Chemokinrezeptor CCR6 hilft somit immunologisch wichtigen Zellen, zur inflammatorischen Stelle zu gelangen (150). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass weder eine Infektion von dendritischen Zellen mit *L. major* noch eine Inkubation dieser Zellen mit *L. major*-Lysat zu einer Modulation dieses Rezeptors führen. Daher wird davon ausgegangen, dass, ähnlich des Ergebnisses der CCR1-Expressionsstudie,

eine Stimulation mit *L. major* nicht ausreicht, um eine signifikante Modulation dieses Rezeptors zu bewirken.

Eine Expression der Rezeptoren CCR3, CXCR3 und CCR4 konnte in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene weder bei nicht infizierten noch bei infizierten dendritischen Zellen des Knochenmarks festgestellt werden. Sowohl CCR3 als auch CXCR3 sind Rezeptoren, welche nicht auf dendritischen Zellen exprimiert werden. Im Gegensatz dazu konnten Heath *et al.* (80) eine Expression des Rezeptors CCR3 auf eosinophilen Zellen nachweisen, so dass CCR3 als wichtiger Rezeptor bei allergischen Inflammationen angesehen wird. Des Weiteren ist der Rezeptor auf basophilen Zellen, Mastzellen und Th2-T-Lymphozyten zu finden (156, 196). Die in dieser Doktorarbeit festgestellte fehlende Expression von CCR3 bei nicht infizierten wie infizierten dendritischen Zellen deckt sich daher mit den aktuellen Daten aus der Literatur. Ein vergleichbares Ergebnis konnte hinsichtlich der Expression des Rezeptors CXCR3 festgestellt werden. Mit CXCR3 wurde erstmals ein Chemokinrezeptor beschrieben, der von aktivierten T-Zellen exprimiert wird (150). Als Liganden von CXCR3 sind bislang CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC identifiziert worden (150, 172, 212). In der Doktorarbeit konnte weder in nicht infizierten noch in infizierten dendritischen Zellen eine CXCR3-Expression festgestellt werden. Das Ergebnis konnte somit die aktuellen Daten aus der Literatur bestätigen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Daten zur mRNA-Rezeptoranalyse von CCR4 konnten ebenso aktuelle Literaturdaten bestätigen. So konnte in dieser Doktorarbeit *in vitro* weder in nicht infizierten noch in *L. major*-infizierten oder mit *L. major*-Lysat inkubierten dendritischen Zellen eine mRNA-Expression dieses Rezeptors nachgewiesen werden. Von CCR4 ist bekannt, dass er ein Marker für Th2-T-Lymphozyten ist und nach Aktivierung des T-Zellrezeptors hochreguliert wird (28, 150, 247). In Studien von Sozzani *et al.* (214) konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl unreife wie reife dendritische Zellen eine durch CCL22/MDC induzierte Migration durchführen, wobei der einzige bisher bekannte Rezeptor dieses Chemokins hierbei CCR4 ist (150). Es konnte jedoch weder bei unreifen noch bei reifen dendritischen Zellen eine mRNA-Expression dieses Rezeptors festgestellt werden, so dass die Daten der CCR4-Expression in diesen Zellen lediglich auf Transwell-Migrations-Analysen basieren (214). Es ist hierbei nicht auszuschließen, dass CCL22/MDC in der Lage ist, an einen bislang unbekanntem Rezeptor zu binden.

Die Daten dieser Doktorarbeit konnten somit die auf mRNA-Studien basierenden Daten von Sozzani *et al.* (214) bestätigen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass dendritische Zellen nicht nur als Rezipienten, sondern ebenso als Produzenten von Chemokinen fungieren (62, 131, 152, 257). Die in dieser Doktorarbeit mit Hilfe des RNase Protection Assays an nicht infizierten, infizierten und mit *L. major*-Lysat inkubierten dendritischen Zellen des Knochenmarks durchgeführten Chemokinexpressionstudien konnten dies belegen. So ist von CCL2/MCP-1 bislang bekannt, dass es überwiegend von Monozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert wird (35, 149, 165, 176). In neueren Studien wurde eine Korrelation zwischen der Reifung von dendritischen Zellen nach Stimulation mit LPS und CD40L und der CCL2/MCP-1-Expression dieser Zellen nachgewiesen (152). Nagorsen *et al.* (152) zeigten, dass eine Reifung dendritischer Zellen zu einer um den Faktor 2,4 gesteigerten CCL2/MCP-1-Expression führt. Auch in dieser Doktorarbeit konnte eine marginale CCL2/MCP-1-mRNA-Synthese in unreifen dendritischen Zellen beobachtet werden, welche nach Infektion dieser Zellen mit *L. major* oder Inkubation mit *L. major*-Lysat sogar stark zunahm. In der vorliegenden Doktorarbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die mRNA von CCL2/MCP-1 nach Infektion bzw. nach Inkubation mit Lysat verstärkt synthetisiert wird. Ein Unterschied in der CCL2/MCP-1-mRNA-Expression zwischen dendritischen Zellen von suszeptiblen und resistenten Tieren konnte jedoch nicht festgestellt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass CCL2/MCP-1 vorwiegend in Lymphknoten resistenter Mäuse exprimiert wird (254). Ebenso konnte gezeigt werden, dass beim Menschen in Hautläsionen der selbstheilenden lokalen kutanen Leishmaniose dermale Makrophagen CCL2/MCP-1 synthetisieren, welches einen leishmaniziden Effekt in Monozyten bewirkt (177, 178). Entgegen der wirtsspezifischen CCL2/MCP-1-Expression von Makrophagen, welche mit der Fähigkeit zur Eliminierung der Erreger korreliert, ist die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Leishmanien-induzierte Expression von CCL2/MCP-1 bei murinen dendritischen Zellen wirtsunspezifisch und scheint der Rekrutierung unreifer dendritischer Zellen und anderer CCR2-positiver Zellen zum Infektionsort zu dienen.

Interessanterweise wurde in dieser Doktorarbeit eine verstärkte Expression von CXCL10/IP-10 sowohl nach Infektion dendritischer Zellen aus C57BL/6-Mäusen mit *L. major* als auch nach Inkubation dieser Zellen mit *L. major*-Lysat festgestellt. Eine Expressionserhöhung konnte hingegen bei dendritischen Zellen aus suszeptiblen

Tieren nicht festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten von Vester *et al.* (235) mit Zellen der dränierenden Lymphknoten beobachtet werden. So zeigten diese Zellen aus *L. major*-infizierten C57BL/6-Mäusen eine erhöhte mRNA-Expression von CXCL10/IP-10. In Lymphknotenzellen von infizierten BALB/c-Mäusen jedoch die mRNA-Expression dieses Chemokins nicht festgestellt werden. Von CXCL10/IP-10 ist bislang bekannt, dass es an den Rezeptor CXCR3 bindet und von Monozyten, Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und neutrophilen Zellen nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  exprimiert wird (29, 59, 67, 129, 131). CXCR3 wird hierbei neben NK-Zellen ebenso von aktivierten T-Zellen exprimiert (28, 119, 166). Studien von Müller *et al.* (148), bei denen rekombinantes CXCL10/IP-10 subkutan in *L. major*-infizierte BALB/c-Mäuse injiziert wurde, konnten zudem zeigen, dass dieses Chemokin zu einer Aktivierung von NK-Zellen in den dränierenden Lymphknoten der Mäuse führte. CXCL10/IP-10 scheint daher nicht nur eine Rolle bei der Migration sondern auch bei der Aktivierung immunologisch wichtiger Zellen zu spielen. Die in dieser Doktorarbeit erstmals festgestellte Expression von CXCL10/IP-10 bei infizierten dendritischen Zellen aus resistenten Mäusen könnte daher ein weiteres Indiz für die Ausbildung einer Resistenz gegenüber dem Erreger der Leishmaniose sein. In Versuchen von Lande *et al.* (109) konnte gezeigt werden, dass humane dendritische Zellen, welche *in vitro* mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert wurden, IFN- $\alpha/\beta$  exprimieren, das wiederum in einem autokrinen Mechanismus die Induktion von CXCL10/IP10 bewirkt. In diesen Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass IFN- $\alpha$  ausreicht, um eine CXCL10/IP10-Expression in dendritischen Zellen zu induzieren. In IFN- $\alpha/\beta$ -neutralisierenden Experimenten konnte des Weiteren eine verminderte CXCL10/IP10-Produktion von dendritischen Zellen festgestellt werden. Die Expression von CXCL10/IP10 in *M. tuberculosis*-infizierten dendritischen Zellen ist demnach von der Typ I-Interferonproduktion abhängig. Diese Typ I-Interferon-abhängige Expression von CXCL10/IP10 könnte nun ein Grund für den in der vorliegenden Doktorarbeit festgestellten Unterschied zwischen infizierten dendritischen Zellen aus suszeptiblen und resistenten Tieren sein, denn C57BL/6-Mäuse besitzen das *If-1<sup>h</sup>* Allel, welches eine zehnfach höhere IFN- $\alpha/\beta$ -Produktion bewirkt, als dies bei *L. major*-suszeptiblen BALB/c-Mäusen, welche das gering exprimierte *If-1<sup>l</sup>* Allel besitzen, der Fall ist (210). IFN- $\alpha/\beta$ -neutralisierende Experimente zur Untersuchung dieser wurden jedoch im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt.

Eine Modulation der Chemokinexpression von CCL5/RANTES, CXCL1/MIP-2, CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL1/TCA3 und CCL24/Eotaxin in dendritischen Zellen konnte weder nach einer *L. major*-Infektion noch nach einer Inkubation mit *L. major*-Lysat festgestellt werden. Interessanterweise konnte jedoch von Foti *et al.* (62) gezeigt werden, dass eine Reifung dendritischer Zellen zu einer verstärkten Expression der Chemokine CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 $\alpha$  und CCL4/MIP-1 $\beta$  führt, was im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit zu stehen scheint. Diese Studien wurden jedoch mit der dendritischen Zelllinie D1DC durchgeführt, die im Unterschied zu dieser Doktorarbeit verwendeten dendritischen Zellen des Knochenmarks, aus der Milz stammen und somit ein unterschiedliches Protein- und Rezeptorexpressionsprofil vorweisen könnten (8, 9, 244). Die Ergebnisse von Foti *et al.* (62) sind somit nicht im direkten Widerspruch zu den in dieser Doktorarbeit gewonnenen Daten zu sehen, welche erstmals eine Chemokinexpressionsstudie von dendritischen Zellen des Knochenmarks aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach einer *L. major*-Infektion repräsentieren.

Entgegen der Expression der zuvor genannten Chemokine konnte in der vorliegenden Doktorarbeit keine Expression der mRNA von CCL19/MIP-3 $\beta$  festgestellt werden. Von CCL19/MIP-3 $\beta$  ist aus der Literatur bekannt, dass es überwiegend im Thymus und den Lymphknoten exprimiert wird und stark chemotaktisch auf B- und T-Zellen, aber auch auf dendritische Zellen wirkt (38, 102, 103). Eine Expression dieses Chemokins bei dendritischen Zellen konnte jedoch bislang nicht festgestellt werden. Somit bestätigen die Daten der Doktorarbeit die bereits publizierten Ergebnisse. Des Weiteren konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Expression von XCL1/Lymphotaktin bei dendritischen Zellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt ebenso die Literaturdaten, durch die gezeigt werden konnte, dass XCL1/Lymphotaktin außer von NK-Zellen auch von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert wird (68, 81, 158).

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Effekt einer Infektion mit *L. major* auf die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei dendritischen Zellen zu untersuchen. In den bisher dargestellten Studien konnte nach einer Infektion von dendritischen Zellen mit *L. major* eine Modulation bestimmter Chemokine und Chemokinrezeptoren auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Daher galt es nun, die identifizierten differentiell exprimierten Chemokine und Chemokinrezeptoren bezüglich ihrer funktionellen Bedeutung bei der Immunabwehr einer

Leishmanieninfektion zu untersuchen. Für diesen Aspekt der Doktorarbeit wurde das Transwell-Migrationssystem gewählt. Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Chemokine die Migration sowohl reifer als auch unreifer dendritischer Zellen induzieren. So konnte in Studien mit transgenen Mäusen, welche CCL2/MCP-1 unter der Kontrolle des Keratinpromotors überexprimieren, gezeigt werden, dass eine lokale Akkumulation von Zellen mit dendritischer Zellmorphologie in der Epidermis zu verzeichnen war (153). Ebenso konnte in einer Studie von Vecchi *et al.* (234) gezeigt werden, dass eine Inkubation dendritischer Zellen mit TNF- $\alpha$  zu einer dosisabhängigen Reduktion der CCL2/MCP-1- sowie CCL3/MIP-1 $\alpha$ -induzierten Migrationsrate führt. Allerdings gab es bislang keine Informationen über den Einfluss einer Leishmanieninfektion auf das durch CCL2/MCP-1 und CCL3/MIP-1 $\alpha$  modulierte Wanderungsverhalten von dendritischen Zellen. In dieser Doktorarbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass eine *L. major*-Infektion zu einer Verringerung der CCL2/MCP-1- sowie der CCL3/MIP-1 $\alpha$ -abhängigen Migrationsrate dendritischer Zellen führt. Interessanterweise konnte mit humanen dendritischen Zellen, welche ebenfalls den CCR2-Rezeptor exprimieren und in der Lage sind, CCL2/MCP-1 zu binden, keine oder lediglich eine geringe chemotaktische Antwort auf dieses Chemokin festgestellt werden (215, 216, 249). Die Chemokin-induzierte Migration spiegelt somit die außergewöhnlich spezifische Funktion dendritischer Zellen bei verschiedenen Spezies wieder.

Die verstärkte Expression der Chemokinrezeptor-mRNA von CCR7 im Zuge der dendritischen Zellreifung spielt bei der Migration dieser Zellen zu den sekundären lymphatischen Organen und der anschließenden Lokalisierung in den T-Zell-Arealen eine essentielle Rolle (131, 198). In CCR7-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen der Haut eine verminderte Fähigkeit zur Migration zu den dränierenden Lymphknoten besitzen (76). Wie aus den Daten des RNase Protection Assays der vorliegenden Arbeit ersichtlich, konnte ein Einfluss einer *L. major*-Infektion auf die CCR7-mRNA-Expression in dendritischen Zellen des Knochenmarks festgestellt werden. Daher galt es in einem funktionellen Test zu überprüfen, ob die verstärkte Expression der mRNA dieses Chemokinrezeptors einen Einfluss auf das Migrationsverhalten dieser Zellen hat. Die Ergebnisse des Transwell-Migrations-Assays zeigten eine Erhöhung der CCL21/6CKine-abhängigen Migrationsrate dendritischer Zellen sowohl nach Infektion mit *L. major* als auch nach Inkubation mit *L. major*-Lysat. Diese Zunahme der Migrationsrate ist wahrscheinlich



auf eine verstärkte Oberflächenexpression von CCR7 zurückzuführen, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass CCL21/6CKine lediglich an diesen Chemokinrezeptor bindet (257). Des Weiteren konnte bereits in Studien von Vecchi *et al.* (234) gezeigt werden, dass dendritische Zellen eine gesteigerte CCL19/MIP-3 $\beta$ -induzierte Migrationsrate nach Inkubation mit LPS, TNF- $\alpha$  oder CD40L besitzen. Da sowohl CCL19/MIP-3 $\beta$  als auch CCL21/6CKine Liganden des Chemokinrezeptors CCR7 sind und diese im Lymphknoten konstitutiv exprimiert werden, wird in der Literatur die Hochregulation von CCR7 bei dendritischen Zellen nicht nur als gewöhnlicher Teil des Reifungsprozesses, sondern auch als essentieller Bestandteil der Induktion einer adaptiven Immunantwort angesehen (183, 194, 244, 257). Die in dieser Doktorarbeit festgestellte Zunahme der CCL21/6CKine-induzierten Migrationrate nach *L. major*-Infektion oder Inkubation mit *L. major*-Lysat ist daher wahrscheinlich ebenso auf den Reifungsprozess dieser Zellen zurückzuführen.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Infektion mit *L. major* zu einer gesteigerten mRNA-Expression von CXCL10/IP-10 in dendritischen Zellen aus resistenten Tieren führt. In einem funktionellen Assay mit Überstand aus Leishmanien-infizierten dendritischen Zellen und CD3<sup>+</sup>-Zellen konnte jedoch keine Modulation der Migrationsrate dieser Zellen festgestellt werden. Ein Grund hierfür könnte wahrscheinlich in der Größe der Porenöffnungen der permeablen Membran zu finden sein, welche möglicherweise zu groß waren, um einen Unterschied zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen detektieren zu können. Eine Membran mit kleineren Porenöffnungen ist jedoch käuflich nicht erhältlich. Außerdem könnte ebenso eine zu geringe Konzentration von CXCL10/IP-10 im unteren Kompartiment des Transwell-Migrations-Systems vorgelegen haben, denn bereits in Studien von Vester *et al.* (235), in denen *L. major*-infizierten BALB/c-Mäusen rekombinantes CXCL10/IP-10 injiziert wurde, entwickelte sich keine Resistenz gegen diesen Erreger. Als mögliche Ursache wurde in dieser Studie ebenfalls die bereits von Sallusto *et al.* (195) festgestellte dosisabhängige Wirkung von CXCL10/IP-10 in Betracht gezogen.

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen die murinen Rezeptoren CCR2 und CCR5 (125), sollten nun die bei der mRNA- und Transwell-Migrations-Analyse nach einer *L. major*-Infektion festgestellten Unterschiede der Chemokinrezeptorexpression untersucht werden. Die FACS-Daten zeigten, dass eine Infektion dendritischer Zellen mit *L. major* zu einer Reduktion der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 führt, und

bestätigten somit die aus den RNase-Protection-Assays gewonnenen Ergebnisse. Leider war eine Auswertung bei der konfokalen Lasermikroskopie nicht möglich, da die Fluoreszenz bei Aufnahmen mit der angewandten Färbemethode zu schnell ausgeblichen ist und somit kein aussagekräftiges Bild zu erhalten war.

Aufgrund der in der Literatur verfügbaren und der in der vorliegenden Arbeit gewonnen und bereits diskutierten Daten kann ein Modell bezüglich der Rolle von dendritischen Zellen und Chemokinen bei der Regulation der Immunantwort gegen eine Infektion mit *L. major* aufgestellt werden, mit dem die komplexen Funktionen dendritischer Zellen besser verstanden werden können (Abbildung 27). Aus der Literatur ist bekannt, dass nach dem Eindringen des Erregers in die Haut des Wirtes dieser sowohl von Makrophagen als auch von Langerhans-Zellen aufgenommen wird (26, 144, 238, 243). Weiterhin ist bekannt, dass, entgegen Langerhans-Zellen, welche nach Aufnahme der Erreger zum Lymphknoten wandern, Makrophagen nach der Infektion in der Haut verweilen und u. a. als Folge der Infektion CCL2/MCP-1 und CCL3/MIP-1 $\alpha$  sezernieren (23, 42, 175, 177). In der Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass unreife dendritische Zellen des Knochenmarks sowohl CCR2 als auch CCR5 exprimieren, mit welchen sie die Chemokine CCL2/MCP-1 sowie CCL3/MIP-1 $\alpha$  binden können. Deshalb wird in diesem hypothetischen Modell angenommen, dass unreife dendritische Zellen dem Chemokingradienten folgend in das inflammatorische Gewebe einwandern, um dort Leishmanien aufzunehmen. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem festgestellt werden, dass dendritische Zellen nach einer *L. major*-Infektion CCR2- und CCR5-mRNA nur in geringen Mengen synthetisieren und als Folge dessen nur noch eine reduzierte CCL2/MCP-1- und CCL3/MIP-1 $\alpha$ -abhängige Migrationsrate aufweisen. Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine Zunahme der mRNA-Expression von CCR7 als auch eine signifikante Erhöhung der CCL21/6CKine-induzierten Migration nach Infektion beobachtet werden. Von CCR7 ist aus der Literatur bekannt, dass er sowohl CCL19/ELC als auch CCL21/6CKine bindet und eine essentielle Rolle bei der Migration dendritischer Zellen zu den dränierenden Lymphknoten spielt (76, 131, 183, 194).

Des Weiteren konnte in dieser Doktorarbeit in infizierten dendritischen Zellen von C57BL/6-Mäusen eine verstärkte Expression von CXCL10/IP-10 beobachtet werden. Dieses Chemokin bindet an den Chemokinrezeptor CXCR3, welcher u. a. von T-Zellen exprimiert wird und bei der Anlagerung von T-Zellen an antigenpräsentierende

---

Zellen und somit der Ausbildung einer adaptiven Immunantwort gegen den Erreger der Leishmaniose eine entscheidende Rolle spielt. Leider konnte in dieser Arbeit keine CXCL10/IP-10-induzierte Migration von T-Zellen nachgewiesen werden. Bei der Expression dieses Chemokins konnten jedoch im Mausmodell Unterschiede zwischen dendritischen Zellen von resistenten Mäusen und jenen von suszeptiblen Mäusen festgestellt werden. Die genauere Bedeutung der CXCL10/IP-10-Expression könnte z. B. durch Versuche an CXCL10/IP-10-defizienten Mäusen untersucht werden. Ebenso wären Versuche mit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen CXCL10/IP-10 denkbar, welche den Krankheitsverlauf einer kutanen Leishmaniose beeinflussen könnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es bei der Interaktion von dendritischen Zellen mit Leishmanien zu einer Mausstamm-unabhängigen Basisreaktion dieser antigenpräsentierenden Zellen kommt. Hierzu zählt die Modulation der Chemokinrezeptorexpression von CCR2, CCR5 und CCR7 bei suszeptiblen sowie resistenten Mäusen. Andererseits wurden aber auch Reaktionen beobachtet, die für resistente C57BL/6-Mäuse bzw. für suszeptible BALB/c-Mäuse spezifisch sind. Hierzu zählen z. B. die verstärkte Expression von CCL2/MCP-1 in der Leishmanien-infizierten Haut *in vitro* und die mRNA-Expression von CXCL10/IP-10 in dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen. Um jedoch eine spezifischere Aussage über die Rolle von Chemokinen und dendritischen Zellen bei der kutanen Leishmaniose treffen zu können, sind neuere Arbeitsmethoden, zu denen u. a. die DNA-Chip-Array- und die Proteom-Analyse gehören, unerlässlich, da mit Hilfe dieser Methoden ein umfassenderes Bild der Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression während der Leishmaniose in immunologisch wichtigen Organen getroffen werden kann.

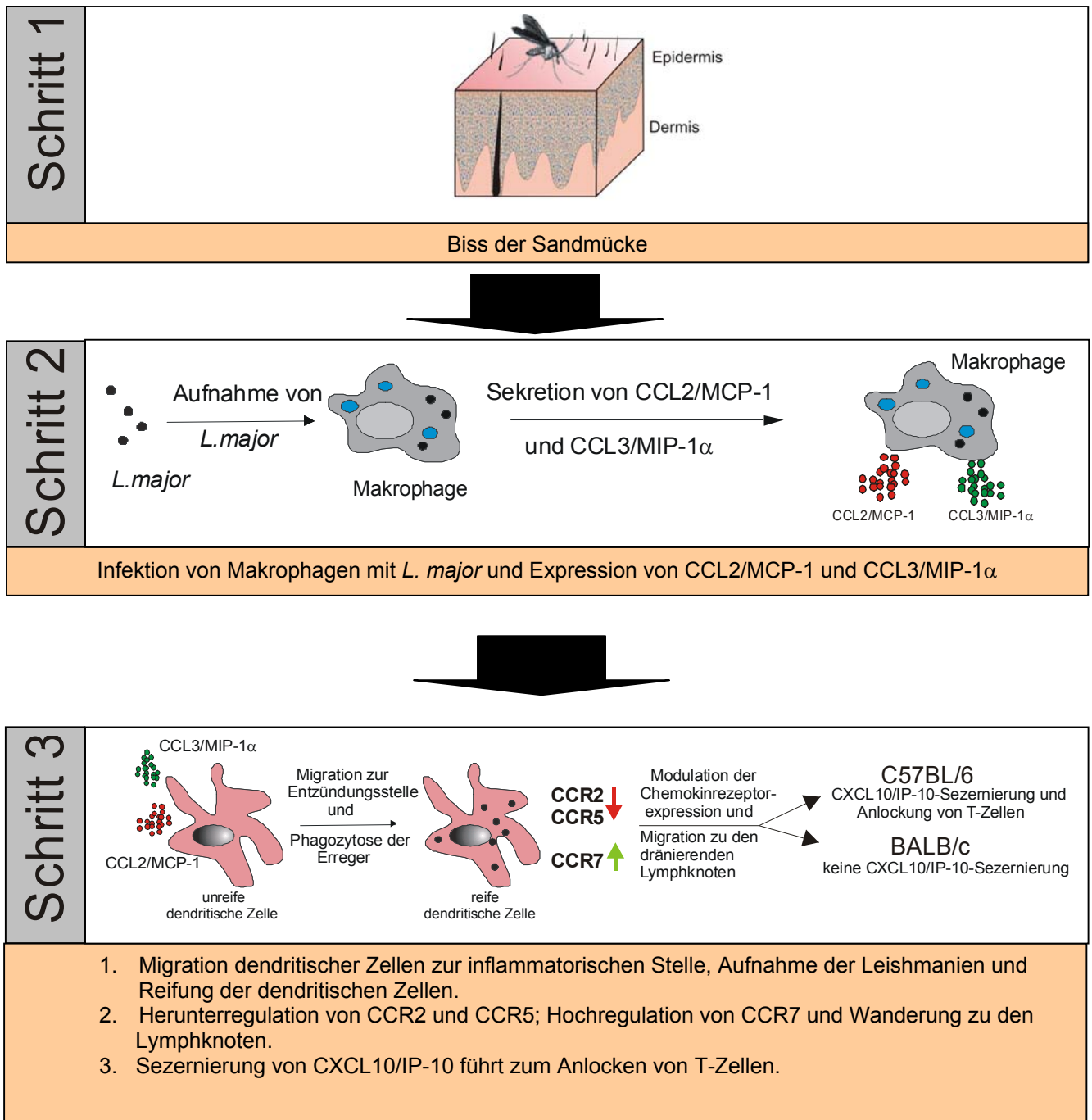


Abbildung 27:

**Hypothetisches Modell der Rolle von dendritischen Zellen und Chemokinen bei der kutanen Leishmaniose.**

## 5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen stellen ein essentielles Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Sie stammen aus dem Knochenmark und bilden ein Netzwerk von heterogenen Zellpopulationen. In peripheren Geweben liegen sie als unreife Zellen mit einem hohen Potential zur Aufnahme und Prozessierung von Mikroorganismen vor. Nach der Aufnahme von eindringenden Mikroorganismen beginnen dendritische Zellen jedoch, sich von einem prozessierenden in ein präsentierendes Stadium zu differenzieren, und wandern zu den sekundären lymphatischen Organen, um dort den naiven T-Zellen die mikrobiellen Antigene zu präsentieren. Die gerichtete Wanderung von dendritischen Zellen ist hierbei ein zentraler Bestandteil der immunstimulatorischen und -modulatorischen Funktion dieser Zellen. Eine essentielle Rolle bei diesem Migrationsverhalten spielen chemotaktische Zytokine (Chemokine). Chemokine sind Proteine mit einem niedermolekularen Gewicht (8-10 kDa), welche anhand ihres strukturellen Cysteinmotifs in vier Gruppen unterteilt und entweder als CXC-, CC-, C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine oder als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - und  $\gamma$ -Chemokine bezeichnet werden.

Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe am Modell der kutanen Leishmaniose haben jedoch gezeigt, dass die Funktion von Chemokinen weitaus mehr umfasst, als lediglich die zielgerichtete Steuerung der Migration immunologisch wichtiger Zellen. So konnte in diesen Studien nicht nur gezeigt werden, dass das Muster der Expression von Chemokinen mit der Schwere des Krankheitsbildes korreliert, sondern auch, dass das Chemokin CCL2/MCP-1 in der Lage ist, einen direkten Einfluss auf die intrazelluläre Erregerabwehr zu nehmen. Diese Arbeiten bezogen sich jedoch auf humane Hautbiopsien und aus Humanblut isolierten Zellen. Eine detaillierte Analyse des Infektionsverlaufes unter definierten Bedingungen (konstante Infektionsdosis und -art, kontrollierte Infektionsdauer, Verwendung von klonierten Parasiten, einheitlicher genetischer Hintergrund des Wirts) ist bei Patienten jedoch nicht möglich. Deshalb wurde die experimentelle Leishmanieninfektion von Inzuchtmäusen (suszeptible BALB/c- und resistente C57BL/6-Mäuse) herangezogen, um die Kinetik der Chemokinexpression und deren Korrelation mit dem Verlauf der kutanen Leishmaniose zu bestimmen.

Die Arbeiten dieser Doktorarbeit zeigen erstmals, dass ebenso wie im humanen System bei der experimentellen Leishmaniose in der Maus die Fähigkeit zur Abwehr dieses Erregers mit einer verstärkten Expression von CCL2/MCP-1 in der infizierten

Haut korreliert. Des Weiteren konnte zwar eine CCL2/MCP-1-induzierte leishmanizide Wirkung in murinen Makrophagen festgestellt werden, ein vergleichbarer Effekt blieb bei Langerhans-Zellen, den dendritischen Zellen der Haut, jedoch aus.

Weiterhin sollte der Einfluss einer Leishmanieninfektion auf das CCL2/MCP-1-induzierte Wanderungsverhalten von Langerhans-Zellen untersucht werden, da aus der Literatur bekannt ist, dass das Chemokin CCL2/MCP-1 die Migration dendritischer Zellen induziert. Die Studien der Doktorarbeit ergaben hierbei, dass eine Infektion mit *Leishmania major* zu einer signifikanten Verminderung der durch CCL2/MCP-1 oder CCL3/MIP-1 $\alpha$  induzierten Migration von Langerhans-Zellen führt. Eine mögliche Ursache für dieses Resultat war hierbei in dem Einfluss einer Infektion mit Leishmanien auf die Expression von Chemokinrezeptoren in dendritischen Zellen zu finden. Anschließende Untersuchungen der mRNA-Expression dieser Rezeptoren konnten diese Vermutung bestätigen. So wurde nach einer Infektion von dendritischen Zellen mit *L. major* eine Reduktion der mRNA-Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 festgestellt. Anschließende FACS-Analysen und Studien mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops führten zu einem ähnlichen Resultat. Interessanterweise bewirkt die Infektion mit *L. major* andererseits eine Hochregulation der mRNA-Expression von CCR7 in dendritischen Zellen. Von diesem Rezeptor ist bekannt, dass er die Chemokine CCL19/MIP-3 $\beta$  und CCL21/6CKine, welche im Lymphknoten konstitutiv exprimiert werden, mit großer Affinität bindet und für die zielgerichtete Migration dendritischer Zellen in dieses Organ essentiell ist.

Weitere Versuche ergaben zudem eine verstärkte CXCL10/IP-10-mRNA-Expression in dendritischen Zellen aus *L. major*-resistenten C57BL/6-Mäusen, welche bei dendritischen Zellen aus BALB/c-Mäusen nicht festgestellt worden ist. Zusammenfassend konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass eine Infektion dendritischer Zellen mit *L. major* sowohl bei suszeptiblen als auch bei resistenten Mäusen zu einer Modulation der Expression von Chemokinrezeptoren führt, die sowohl für die Lokalisation der Zellen in den entzündeten Hautarealen verantwortlich sind (CCR2 und CCR5), als auch ihre Wanderung in die Lymphknoten steuern (CCR7). Darüber hinaus lässt die wirtsspezifische Modulation des Chemokins CXCL10/IP-10 in resistenten Tieren vermuten, dass sie zur Kontrolle der Infektion beiträgt.

## 6. Summary

Dendritic cells (DC) represent an essential link between innate and adaptive immunity. DC are bone marrow-derived and form a network of heterogeneous cell populations. In peripheral tissue they are in an immature state, with a high potential for taking up and processing microorganisms. After taking up invading pathogens, DC differentiate from a “processing” into a “presenting” stage, while migrating to the secondary lymphoid organs in order to present microbial antigens to naïve T cells. The directed migration of dendritic cells is a central component in the immunostimulatory and modulatory function of these cells. Chemotactic cytokines (chemokines) are critical for these migratory pathways. Chemokines are proteins of low molecular weight (8-10 kDa) and can be classified into four groups on the basis of a cysteine structural motif, known as either the CXC, CC, C and CX<sub>3</sub>C or the  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$  subfamilies. Studies using the model of cutaneous leishmaniasis have shown, however, that the function of chemokines is much wider than only to control the migratory pathway of immunologically relevant cells. These previous studies demonstrated not only the correlation between the chemokine expression pattern and the course of the infection, but also the direct influence of the chemokine CCL2/MCP-1 on the intracellular defence of pathogens. However, these studies were based on skin lesions from patients and human monocytes. A more detailed analysis of the infection process under more defined conditions (constant infection dose, defined duration of infection, use of cloned parasites, uniform genetic background of the host) is not possible with human material. Therefore, the experimental *Leishmania* model with inbred mice (susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice) was used to determine the kinetics of the chemokine expression and their correlation with the course of cutaneous leishmaniasis.

The studies of this work demonstrated for the first time that the expression of CCL2/MCP-1 during experimental infection with *Leishmania major* in mice correlates with the capability to control this pathogen. Moreover, a CCL2/MCP-1 induced leishmanicidal effect on murine macrophages could be determined, but a comparable effect was not observed with Langerhans cells, the dendritic cells of the skin. Furthermore, in this work the influence of an infection with *Leishmania* on the CCL2/MCP-1-induced migration of Langerhans cells were examined, since it is known from the literature that CCL2/MCP-1 induces dendritic cell migration. The studies of this work demonstrated that an infection of Langerhans cells with *L. major*

---

leads to a significant reduction of the CCL2/MCP-1- or CCL3/MIP-1 $\alpha$ -induced migration rate of these cells. A possible reason for this result may be the influence of an infection with *Leishmania* on the chemokine receptor expression by dendritic cells. Further investigations of the mRNA expression of these receptors could confirm this assumption. They demonstrated reductions in the mRNA expression of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 after an infection of dendritic cells with *L. major*. Moreover, FACS analysis and studies using confocal laser microscopy led to similar results and showed that the *L. major*-induced alterations in mRNA expression correlate with those at the protein level. Interestingly, a strong upregulation of CCR7 mRNA expression could be detected after infection of dendritic cells. This receptor is well known for binding the chemokines CCL19/MIP-3 $\beta$  and CCL21/6CKine, which both are constitutively expressed on the lymph node, with high affinity. Moreover, this receptor is essential for a directed movement of dendritic cells to that organ.

Further studies also showed an upregulation of the CXCL10/IP-10-mRNA expression in dendritic cells from *L. major*-resistant C57BL/6 mice, whereas it could not be detected in dendritic cells from susceptible BALB/c mice.

In summary, this work demonstrated that an *L. major*-infection of dendritic cells from resistant mice as well as susceptible mice leads to a modulation in the expression of chemokine receptors that are responsible for the localisation of those cells into the inflammatory tissue (CCR2 and CCR5) and the migration of dendritic cells to the lymph node (CCR7). Moreover, the host-specific modulation of the chemokine CXCL10/IP-10 in resistant animals seems to play a role in the control of the infection.



## 7. Literaturverzeichnis

1. **Adachi, S., T. Kuwata, M. Miyaike, and M. Iwata.** 2001. Induction of CCR7 expression in thymocytes requires both ERK signal and Ca<sup>2+</sup> signal. *Biochem Biophys Res Commun* **288**:1188-93.
2. **Adema, G. J., F. Hartgers, R. Verstraten, E. de Vries, G. Marland, S. Menon, J. Foster, Y. Xu, P. Nooyen, T. McClanahan, K. B. Bacon, and C. G. Figdor.** 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* **387**:713-7.
3. **Adinolfi, L. E., P. F. Bonventre, M. Vander Pas, and D. A. Eppstein.** 1985. Synergistic effect of glucantime and a liposome-encapsulated muramyl dipeptide analog in therapy of experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* **48**:409-16.
4. **Allavena, P., A. Sica, A. Vecchi, M. Locati, S. Sozzani, and A. Mantovani.** 2000. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev* **177**:141-9.
5. **Annunziato, F., P. Romagnani, L. Cosmi, E. Lazzeri, and S. Romagnani.** 2001. Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends Immunol* **22**:277-81.
6. **Ansel, K. M., and J. G. Cyster.** 2001. Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol* **13**:172-9.
7. **Antoine, J.-C., E. Prina, T. Lang, and N. Courret.** 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* **6**:392-401.
8. **Ardavin, C.** 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **3**:582-90.
9. **Ardavin, C., G. Martinez del Hoyo, P. Martín, F. Anjuère, C. F. Arias, A. R. Marín, S. Ruiz, V. Parrillas, and H. Hernández.** 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* **22**:691-700.
10. **Ardavin, C., L. Wu, C. L. Li, and K. Shortman.** 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**:761-3.
11. **Arnoldi, J., and H. Moll.** 1998. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$ , and macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$ . *Dev Immunol* **6**:3-11.
12. **Ato, M., S. Stäger, C. R. Engwerda, and P. M. Kaye.** 2002. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* **3**:1185-91.
13. **Austyn, J. M.** 1996. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* **183**:1287-92.
14. **Ayehunie, S., E. A. Garcia-Zepeda, J. A. Hoxie, R. Horuk, T. S. Kupper, A. D. Luster, and R. M. Ruprecht.** 1997. Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine coreceptors. *Blood* **90**:1379-86.
15. **Baba, M., T. Imai, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, K. Hieshima, H. Nomiyama, and O. Yoshie.** 1997. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem* **272**:14893-8.

16. **Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.-J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**:767-811.
17. **Banchereau, J., and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-52.
18. **Bates, P. A.** 1994. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* **79**:215-8.
19. **Belkaid, Y.** 2003. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther* **3**:875-85.
20. **Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro, and D. L. Sacks.** 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* **188**:1941-53.
21. **Belosevic, M., D. S. Finbloom, P. H. Van Der Meide, M. V. Slayter, and C. A. Nancy.** 1989. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol* **143**:266-74.
22. **Berman, J. D.** 1988. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis* **10**:560-86.
23. **Bhattacharyya, S., S. Ghosh, B. Dasgupta, D. Mazumder, S. Roy, and S. Majumdar.** 2002. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect Dis* **185**:1704-8.
24. **Birbeck, M. S., Breathnach, A.S. and Everall, J.D.** 1961. An electron microscope study of basal monocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* **37**:51-63.
25. **Blank, C., C. Bogdan, C. Bauer, K. Erb, and H. Moll.** 1996. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. *Eur J Immunol* **26**:792-6.
26. **Blank, C., H. Fuchs, K. Rappersberger, M. Röllinghoff, and H. Moll.** 1993. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* **167**:418-25.
27. **Bogdan, C., M. Röllinghoff, and A. Diefenbach.** 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* **173**:17-26.
28. **Bonecchi, R., G. Bianchi, P. P. Bordignon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P. A. Gray, A. Mantovani, and F. Sinigaglia.** 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* **187**:129-34.
29. **Boorsma, D. M., J. Flier, S. Sampat, C. Ottevanger, P. de Haan, L. Hooft, R. Willemze, C. P. Tensen, and T. J. Stoof.** 1998. Chemokine IP-10 expression in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **290**:335-41.
30. **Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr, and M. C. Udey.** 1996. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* **184**:2417-22.
31. **Brittingham, A., C. J. Morrison, W. R. McMaster, B. S. McGwire, K. P. Chang, and D. M. Mosser.** 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* **155**:3102-11.

32. **Brock, T. D.** 1994. *Biology of Microorganisms*, 7 ed. Prentice-Hall International.
33. **Bucana, C. D., C. G. Munn, M. J. Song, K. Dunner, Jr., and M. L. Kripke.** 1992. Internalization of Ia molecules into Birbeck granule-like structures in murine dendritic cells. *J Invest Dermatol* **99**:365-73.
34. **Buchmüller-Rouiller, Y., and J. Mauël.** 1987. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect Immun* **55**:587-93.
35. **Bußfeld, D., M. Nain, P. Hofmann, D. Gemsa, and H. Sprenger.** 2000. Selective induction of the monocyte-attracting chemokines MCP-1 and IP-10 in vesicular stomatitis virus-infected human monocytes. *J Interferon Cytokine Res* **20**:615-21.
36. **Caceres-Dittmar, G., F. J. Tapia, M. A. Sanchez, M. Yamamura, K. Uyemura, R. L. Modlin, B. R. Bloom, and J. Convit.** 1993. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* **91**:500-5.
37. **Chatelain, R. Varkila, K. & Coffman, R.L.** 1992. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol.* **148**: 1182-1187
38. **Caux, C., S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. de Bouteiller, M.-C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik, and A. Vicari.** 2000. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* **22**:345-69.
39. **Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia.** 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**:782-7.
40. **Chaudhuri, G., and K. P. Chang.** 1988. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **27**:43-52.
41. **Colotta F, A. Borre, J.M. Wang, M. Tattanelli, F. Maddalena, N. Polentarutti, G. Peri, A. Mantovani.** 1992. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol.* **148**(3):760-5.
42. **Cotterell, S. E. J., C. R. Engwerda, and P. M. Kaye.** 1999. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *Eur J Immunol* **29**:203-14.
43. **Cunha FQ, J. Assreuy, D. Xu, I. Charles, F.Y. Liew, S. Moncada.** 1993. Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol.* **23**:1385-8.
44. **Cunningham, A. C.** 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* **72**:132-41.
45. **Cyster, J. G.** 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286**:2098-102.
46. **Dagert, M., and S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**:23-8.
47. **Davies, C. R., A. M. Cooper, C. Peacock, R. P. Lane, and J. M. Blackwell.** 1990. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* **110**:337-43.

48. **de Andrade, A. S. R., R. F. Gomes, O. Fernandes, and M. N. de Melo.** 2001. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* **78**:261-7.
49. **de la Cruz Amoros, E., N. Lambruschini Ferri, J. M. Rodriguez Miguelez, and J. M. Torres Simon.** 1988. Glucantime and allopurinol in the treatment of persistent infantile visceral leishmaniasis. *An Esp Pediatr* **29**:77-9.
50. **de Oliveira, C. I., A. Báfica, F. Oliveira, C. B. Favali, T. Correa, L. A. R. Freitas, E. Nascimento, J. M. Costa, and A. Barral.** 2003. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* **37**:e149-53.
51. **Delobel, P., P. Launois, F. Djossou, D. Sainte-Marie, and R. Pradinaud.** 2003. American cutaneous leishmaniasis, lepromatous leprosy, and pulmonary tuberculosis coinfection with downregulation of the T-helper 1 cell response. *Clin Infect Dis* **37**:628-33.
52. **Descoteaux, A., G. Matlashewski, and S. J. Turco.** 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* **149**:3008-15.
53. **Descoteaux, A., and S. J. Turco.** 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1455**:341-52.
54. **Desjardins, M., and A. Descoteaux.** 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185**:2061-8.
55. **Dickerhoff, R., A. Müller, and U. Bode.** 1990. Visceral leishmaniasis. Personal observation and review of epidemiology, clinical aspects and therapy. *Klin Padiatr* **202**:347-51.
56. **Diefenbach, A., H. Schindler, N. Donhauser, E. Lorenz, T. Laskay, J. MacMicking, M. Röllinghoff, I. Gresser, and C. Bogdan.** 1998. Type 1 interferon (IFN $\alpha/\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* **8**:77-87.
57. **Dieu, M.-C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J.-M. Bridon, E. Oldham, S. Aït-Yahia, F. Brière, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux.** 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* **188**:373-86.
58. **Erb, K., C. Blank, U. Ritter, H. Bluethmann, and H. Moll.** 1996. *Leishmania major* infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8<sup>+</sup> T cells do not mediate a protective immune response. *Immunobiology* **195**:243-60.
59. **Finbloom, D. S., A. C. Lerner, Y. Nakagawa, and D. L. Hoover.** 1993. Culture of human monocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor results in enhancement of IFN- $\gamma$  receptors but suppression of IFN- $\gamma$ -induced expression of the gene IP-10. *J Immunol* **150**:2383-90.
60. **Fleming, M. D., J. L. Pinkus, M. V. Fournier, S. W. Alexander, C. Tam, M. Loda, S. E. Sallan, K. E. Nichols, D. F. Carpentieri, G. S. Pinkus, and B. J. Rollins.** 2003. Coincident expression of the chemokine receptors CCR6 and CCR7 by pathologic Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* **101**:2473-5.
61. **Förster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Müller, E. Wolf, and M. Lipp.** 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**:23-33.
62. **Foti, M., F. Granucci, D. Aggujaro, E. Liboi, W. Luini, S. Minardi, A. Mantovani, S. Sozzani, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 1999. Upon dendritic

- cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int Immunol* **11**:979-86.
63. **Frade, J. M., M. Mellado, G. del Real, J. C. Gutierrez-Ramos, P. Lind, and A. C. Martinez.** 1997. Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. *J Immunol* **159**:5576-84.
  64. **Frelinger, J. G., L. Hood, S. Hill, and J. A. Frelinger.** 1979. Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* **282**:321-3.
  65. **Fruth, U., N. Solioz, and J. A. Louis**1993. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol* **150**:1857-64.
  66. **Gantt, K. R., T. L. Goldman, M. L. McCormick, M. A. Miller, S. M. B. Jeronimo, E. T. Nascimento, B. E. Britigan, and M. E. Wilson.** 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* **167**:893-901.
  67. **Gasperini, S., M. Marchi, F. Calzetti, C. Laudanna, L. Vicentini, H. Olsen, M. Murphy, F. Liao, J. Farber, and M. A. Cassatella.** 1999. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-g (MIG), IFN-inducible T cell a chemoattractant (I-TAC), and IFN-g-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* **162**:4928-37.
  68. **Giancarlo, B., S. Silvano, Z. Albert, A. Mantovani, and P. Allavena.** 1996. Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin. *Eur J Immunol* **26**:3238-41.
  69. **Gillitzer, R., and M. Goebeler.** 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* **69**:513-21.
  70. **Gillitzer, R., K. Wolff, D. Tong, C. Müller, T. Yoshimura, A. A. Hartmann, G. Stingl, and R. Berger.** 1993. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol* **101**:127-31.
  71. **Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A. Mantovani, and P. W. Gray.** 1997. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* **185**:1595-604.
  72. **Gramiccia, M., L. Gradoni, and S. Orsini.** 1992. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol* **86**:613-20.
  73. **Greaves, D. R., and T. J. Schall.** 2000. Chemokines and myeloid cell recruitment. *Microbes Infect* **2**:331-6.
  74. **Guilbride, D. L., and P. T. Englund.** 1998. The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid species. *J Cell Sci* **111**:675-9.
  75. **Guillén Llera, J. L., M. L. López García, E. Martín Reinoso, and R. De Vivar González.** 2002. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Vet Parasitol* **109**:185-90.
  76. **Gunn, M. D., S. Kyuwa, C. Tam, T. Kakiuchi, A. Matsuzawa, L. T. Williams, and H. Nakano.** 1999. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* **189**:451-60.
  77. **Haas, A., and W. Goebel.** 1992. Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radic Res Commun* **16**:137-57.

78. **Handman, E., and D. V. Bullen.** 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* **18**:332-4.
79. **Hashimoto, K.** 1971. Langerhans' cell granule. An endocytotic organelle. *Arch Dermatol* **104**:148-60.
80. **Heath, H., S. Qin, P. Rao, L. Wu, G. LaRosa, N. Kassam, P. D. Ponath, and C. R. Mackay.** 1997. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* **99**:178-84.
81. **Hedrick, J. A., V. Saylor, D. Figueroa, L. Mizoue, Y. Xu, S. Menon, J. Abrams, T. Handel, and A. Zlotnik.** 1997. Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells *in vivo*. *J Immunol* **158**:1533-40.
82. **Heinzel FP, R.M. Rerko, F. Ahmed, E. Pearlman.** 1995. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol.* **155**:730-9.
83. **Heinzel, F. P. Schoenhaut, S. Rerko, R. M. Rosser, L. E. Gately, M. K.** 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* **177**:1505-9
84. **Hermoso, T., Z. Fishelson, S. I. Becker, K. Hirschberg, and C. L. Jaffe.** 1991. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *Embo J* **10**:4061-7.
85. **Herwaldt, B. L.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet* **354**:1191-9.
86. **Hevel, J. M., and M. A. Marletta.** 1992. Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochemistry* **31**:7160-5.
87. **Homans, S. W., A. Mehlert, and S. J. Turco.** 1992. Solution structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry* **31**:654-61.
88. **Homey, B., M.-C. Dieu-Nosjean, A. Wiesenborn, C. Massacrier, J.-J. Pin, E. Oldham, D. Catron, M. E. Buchanan, A. Müller, R. deWaal Malefyt, G. Deng, R. Orozco, T. Ruzicka, P. Lehmann, S. Lebecque, C. Caux, and A. Zlotnik.** 2000. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3  $\alpha$ /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* **164**:6621-32.
89. **Ilg, T., D. Harbecke, and P. Overath.** 1993. The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS Lett* **327**:103-7.
90. **Ilgoutz, S. C., and M. J. McConville.** 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* **31**:899-908.
91. **Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P. W. Gray, K. Matsushima, and O. Yoshie.** 1999. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* **11**:81-8.
92. **Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman.** 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**:1693-702.
93. **Ishikawa, S., T. Sato, M. Abe, S. Nagai, N. Onai, H. Yoneyama, Y.-y. Zhang, T. Suzuki, S.-i. Hashimoto, T. Shirai, M. Lipp, and K. Matsushima.** 2001. Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine

- (BLC/CXCL13) by C11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. *J Exp Med* **193**:1393-402.
94. **Janeway, C. C.** 2002. *Immunologie*, 5 ed. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
95. **Jiang, Y., D. I. Beller, G. Frendl, and D. T. Graves.** 1992. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* **148**:2423-8.
96. **Kadivar, M. R., T. Z. Kajbaf, A. Karimi, and A. Alborzi.** 2000. Childhood visceral leishmaniasis complicated by bacterial infections. *East Mediterr Health J* **6**:879-83.
97. **Kaisho, T., and S. Akira.** 2002. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* **1589**:1-13.
98. **Katou, F., H. Ohtani, T. Nakayama, K. Ono, K. Matsushima, A. Saaristo, H. Nagura, O. Yoshie, and K. Motegi.** 2001. Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue. *Am J Pathol* **158**:1263-70.
99. **Katz, S. I., K. Tamaki, and D. H. Sachs.** 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* **282**:324-6.
100. **Kaufmann, A., R. Salentin, D. Gemsa, and H. Sprenger.** 2001. Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 $\alpha$  during differentiation of human monocytes to macrophages. *J Leukoc Biol* **69**:248-52.
101. **Kaye, P. M., N. J. Rogers, A. J. Curry, and J. C. Scott.** 1994. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol* **24**:2850-4.
102. **Kim, C. H., and H. E. Broxmeyer.** 1999. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* **65**:6-15.
103. **Kim, C. H., L. M. Pelus, J. R. White, and H. E. Broxmeyer.** 1998. Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood* **91**:4434-43.
104. **Kleijmeer, M. J., M. A. Ossevoort, C. J. van Veen, J. J. van Hellemond, J. J. Neefjes, W. M. Kast, C. J. Melief, and H. J. Geuze.** 1995. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* **154**:5715-24.
105. **Kobayashi, M., and T. Hoshino.** 1979. Cytological and functional differences between Birbeck granule-containing cells (Langerhans cells) and dermal macrophages in the mouse. *J Electron Microsc (Tokyo)* **28**:285-94.
106. **Kopf, M., F. Brombacher, G. Köhler, G. Kienzle, K. H. Widmann, K. Lefrang, C. Humborg, B. Ledermann and W. Solbach.** 1996. IL-4-deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **184**: 1127-1136
107. **Kurihara, T., G. Warr, J. Loy, and R. Bravo.** 1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* **186**:1757-62.
108. **Kwan, J., and N. Killeen.** 2004. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol* **172**:3999-4007.
109. **Lande R, E. Giacomini, T. Grassi, M. E. Remoli, E. Iona, M. Miettinen, I. Julkunen and E. M. Coccia.** 2003. IFN- $\alpha/\beta$  released by *Mycobacterium tuberculosis*-infected human dendritic cells induces the expression of

- CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol* **170**:1174-82.
110. **Langerhans, P.** 1868. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch [A]*:325-37.
111. **Launois P., T. Ohteki, K. Swihart, H.R. MacDonald, and J.A. Louis.** 1995. In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4<sup>+</sup> T cells which are NK1.1<sup>-</sup>. *Eur J Immunol* **25**:3298-307
112. **Lee, M. G., T. A. Borkowski, and M. C. Udey.** 1993. Regulation of expression of B7 by murine Langerhans cells: a direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* **101**:883-6.
113. **Leitch, A.R., T. Schwarzacher, D. Kackson, and I. J. Leitch.** 1994. *In situ-Hybridisierung*“. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
114. **Levine, N. D., J. O. Corliss, F. E. Cox, G. Deroux, J. Grain, B. M. Honigberg, G. F. Leedale, A. R. Loeblich, 3rd, J. Lom, D. Lynn, E. G. Merinfeld, F. C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra, and F. G. Wallace.** 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* **27**:37-58.
115. **Lewis, D. J.** 1987. Depth of penetration of vertebrate skin by phlebotomine sandflies (*Diptera: Psychodidae*). *Ann Trop Med Parasitol* **81**:173-9.
116. **Liew, F. Y., Y. Li, and S. Millott.** 1990. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* **145**:4306-10.
117. **Lipscomb, M. F., and B. J. Masten.** 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* **82**:97-130.
118. **Loetscher, M., T. Geiser, T. O'Reilly, R. Zwahlen, M. Baggiolini, and B. Moser.** 1994. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* **269**:232-7.
119. **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**:963-9.
120. **Lu, B., B. J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, R. North, C. Gerard, and B. J. Rollins.** 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* **187**:601-8.
121. **Lukacs, N. W., and K. K. Tekkanat.** 2000. Role of chemokines in asthmatic airway inflammation. *Immunol Rev* **177**:21-30.
122. **Luther, S. A., H. L. Tang, P. L. Hyman, A. G. Farr, and J. G. Cyster.** 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12694-9.
123. **Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rössner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**:77-92.
124. **Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, and A. O'Garra.** 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **154**:5071-9.



125. **Mack M, J. Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. Proudfoot, J. Plachy, H. Bruhl, M. Frink, H. J. Anders, V. Vielhauer, J. Pfirstinger, M. Stangassinger, and D. Schlondorff.** 2001. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol* **166**:4697-704.
126. **Maesaki, S.** 2002. Drug delivery system of anti-fungal and parasitic agents. *Curr Pharm Des* **8**:433-40.
127. **Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani.** 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **177**:1199-204.
128. **Mantovani, A., S. Sozzani, B. Bottazzi, G. Peri, F. L. Sica, M. Locati, and F. Colotta.** 1993. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): signal transduction and involvement in the regulation of macrophage traffic in normal and neoplastic tissues. *Adv Exp Med Biol* **351**:47-54.
129. **Marx, N., F. Mach, A. Sauty, J. H. Leung, M. N. Sarafi, R. M. Ransohoff, P. Libby, J. Plutzky, and A. D. Luster.** 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activators inhibit IFN- $\gamma$ -induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol* **164**:6503-8.
130. **McCann, S. H., S. Eresh, and D. C. Barker.** 1999. Kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Parasitology* **118 ( Pt 4)**:371-4.
131. **McColl, S. R.** 2002. Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol* **80**:489-96.
132. **McConville, M. J., S. J. Turco, M. A. Ferguson, and D. L. Sacks.** 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Embo J* **11**:3593-600.
133. **McNeely, T. B., G. Rosen, M. V. Londner, and S. J. Turco.** 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem J* **259**:601-4.
134. **Melby, P. C., F. J. Andrade-Narvaez, B. J. Darnell, G. Valencia-Pacheco, V. V. Tryon, and A. Palomo-Cetina.** 1994. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* **62**:837-42.
135. **Mellman, I., and R. M. Steinman.** 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**:255-8.
136. **Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster, and E. G. Engleman.** 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* **3**:1135-41.
137. **Mitchell, G. F.** 1983. Murine cutaneous leishmaniasis: resistance in reconstituted nude mice and several F1 hybrids infected with *Leishmania tropica major*. *J Immunogenet* **10**:395-412.
138. **Moll, H.** 2003. Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol* **5**:493-500.
139. **Moll, H.** 2003. Dendritic cells as a tool to combat infectious diseases. *Immunol Lett* **85**:153-7.

140. **Moll, H.** 2000. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. *Adv Exp Med Biol* **479**:163-73.
141. **Moll, H., and C. Berberich.** 2001. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunobiology* **204**:659-66.
142. **Moll, H., and C. Berberich.** 2001. Dendritic cells as vectors for vaccination against infectious diseases. *Int J Med Microbiol* **291**:323-9.
143. **Moll, H., S. Flohé, and M. Röllinghoff.** 1995. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol* **25**:693-9.
144. **Moll, H., H. Fuchs, C. Blank, and M. Röllinghoff.** 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**:1595-601.
145. **Moll, H., U. Ritter, S. Flohé, K. Erb, C. Bauer, and C. Blank.** 1996. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **184**:163-8.
146. **Moreira, E. S., C. Anacleto, and M. L. Petrillo-Peixoto.** 1998. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitol Res* **84**:720-6.
147. **Morsy, T. A.** 1997. Visceral leishmaniasis with special reference to Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* **27**:373-96.
148. **Müller, K. G. van Zandbergen, B. Hansen, H. Laufs, N. Jahnke, W. Solbach, and T. Laskay.** 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* **190**:73-76.
149. **Murao, K., T. Ohyama, H. Imachi, T. Ishida, W. M. Cao, H. Namihira, M. Sato, N. C. Wong, and J. Takahara.** 2000. TNF- $\alpha$  stimulation of MCP-1 expression is mediated by the Akt/PKB signal transduction pathway in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **276**:791-6.
150. **Murphy, P. M.** 2002. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* **54**:227-9.
151. **Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim, and C. A. Power.** 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**:145-76.
152. **Nagorsen, D., F. M. Marincola, and M. C. Panelli.** 2004. Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine* **25**:31-5.
153. **Nakamura, K., I. R. Williams, and T. S. Kupper.** 1995. Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): Analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J Invest Dermatol* **105**:635-43.
154. **Nandy, A., M. Addy, A. K. Maji, S. K. Guha, D. Banerjee, and D. Chaudhuri.** 1998. Recurrence of kala-azar after PKDL: role of co-factors. *Trop Med Int Health* **3**:76-8.
155. **Nylen S, K. Maasho, K. Soderstrom, T. Ilg, and H. Akuffo.** 2003. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon- $\gamma$ . *Clin Exp Immunol.* **131**:457-67.
156. **Ochi, H., W. M. Hirani, Q. Yuan, D. S. Friend, K. F. Austen, and J. A. Boyce.** 1999. T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses

- and CCR3 expression during differentiation of human mast cells *in vitro*. *J Exp Med* **190**:267-80.
157. **Ogata, M., Y. Zhang, Y. Wang, M. Itakura, Y.-Y. Zhang, A. Harada, S.-I. Hashimoto, and K. Matsushima.** 1999. Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor-beta1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. *Blood* **93**:3225-32.
158. **Palena, C., P. Arlen, H. Zeytin, J. W. Greiner, J. Schlom, and K.-Y. Tsang.** 2003. Enhanced expression of lymphotactin by CD8+ T cells is selectively induced by enhancer agonist peptides of tumor-associated antigens. *Cytokine* **24**:128-42.
159. **Passwell, J. H., R. Shor, J. Smolen, and C. L. Jaffe.** 1994. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *Int J Exp Pathol* **75**:277-84.
160. **Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman, and I. Mellman.** 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* **388**:787-92.
161. **Pirmez, C., C. Cooper, M. Paes-Oliveira, A. Schubach, V. K. Torigian, and R. L. Modlin.** 1990. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* **145**:3100-4.
162. **Pirmez, C., M. Yamamura, K. Uyemura, M. Paes-Oliveira, F. Conceicao-Silva, and R. L. Modlin.** 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* **91**:1390-5.
163. **Power, C. A., D. J. Church, A. Meyer, S. Alouani, A. E. I. Proudfoot, I. Clark-Lewis, S. Sozzani, A. Mantovani, and T. N. C. Wells.** 1997. Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3 $\alpha$  from lung dendritic cells. *J Exp Med* **186**:825-35.
164. **Puentes, S. M., R. P. Da Silva, D. L. Sacks, C. H. Hammer, and K. A. Joiner.** 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* **145**:4311-6.
165. **Pype, J. L., L. J. Dupont, P. Menten, E. Van Coillie, G. Opdenakker, J. Van Damme, K. F. Chung, M. G. Demedts, and G. M. Verleden.** 1999. Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**:528-36.
166. **Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, and C. R. Mackay.** 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* **101**:746-54.
167. **Rabin, R. L., M. K. Park, F. Liao, R. Swofford, D. Stephany, and J. M. Farber.** 1999. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J Immunol* **162**:3840-50.
168. **Racoosin, E. L., and S. M. Beverley.** 1997. *Leishmania major* promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol* **85**:283-95.
169. **Rana, S., G. Besson, D. G. Cook, J. Rucker, R. J. Smyth, Y. Yi, J. D. Turner, H.-H. Guo, J.-G. Du, S. C. Peiper, E. Lavi, M. Samson, F. Libert, C. Liesnard, G. Vassart, R. W. Doms, M. Parmentier, and R. G. Collman.** 1997. Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance

- to patient-derived and prototype isolates resulting from the  $\Delta ccr5$  mutation. *J Virol* **71**:3219-27.
170. **Reed, S. G.** 1996. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol* **14**:471-8.
171. **Reiner, S. L., and R. M. Locksley.** 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* **13**:151-77.
172. **Reiners, J., T. Henne, G. Offner, C. von Schnakenburg, J. Strehlau, K. Latta, J. H. Ehrich, M. Melter, and C. von Schmakenburg.** 2002. Mig, IP-10, and CXCR3 gene expression is predictive for the individual response of children with chronic allograft nephropathy to mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* **34**:2217-8.
173. **Reis e Sousa, C., P. D. Stahl, and J. M. Austyn.** 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* **178**:509-19.
174. **Reynes, J., P. Portales, M. Segondy, V. Baillat, P. Andre, B. Reant, O. Avinens, G. Couderc, M. Benkirane, J. Clot, J. F. Eliaou, and P. Corbeau.** 2000. CD4<sup>+</sup> T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **181**:927-32.
175. **Ritter, U.** 1998. Dissertation. Universität Würzburg. Die Bedeutung von Chemokinen bei der Immunantwort gegen Leishmanien.
176. **Ritter, U.** 1994. Diplomarbeit. Universität Erlangen. Die Rolle von Monocyte Chemoattractant Protein-1 bei der lokalen und diffusen Form der amerikanischen Leishmaniasis.
177. **Ritter, U., and H. Moll.** 2000. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN- $\gamma$  and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol* **30**:3111-20.
178. **Ritter, U., H. Moll, T. Laskay, E. Brocker, O. Velazco, I. Becker, and R. Gillitzer.** 1996. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* **173**:699-709.
179. **Ritter, U., and H. Körner.** 2002. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* **24**: 295-301.
180. **Rittig, M. G., and C. Bogdan.** 2000. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* **16**:292-7.
181. **Rittig, M. G., G. R. Burmester, and A. Krause.** 1998. Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed. *Trends Microbiol* **6**:384-8.
182. **Rittig, M. G., B. Wilske, and A. Krause.** 1999. Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? *Microbes Infect* **1**:727-35.
183. **Robbiani, D. F., R. A. Finch, D. Jager, W. A. Muller, A. C. Sartorelli, and G. J. Randolph.** 2000. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3 $\beta$ , ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* **103**:757-68.
184. **Robertson M. J.** 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* **71**:173-83.
185. **Romani, N., S. Koide, M. Crowley, M. Witmer-Pack, A. M. Livingstone, C. G. Fathman, K. Inaba, and R. M. Steinman.** 1989. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* **169**:1169-78.

186. **Romani, N., A. Lenz, H. Glassel, H. Stossel, U. Stanzl, O. Majdic, P. Fritsch, and G. Schuler.** 1989. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* **93**:600-9.
187. **Romani, N., G. Ratzinger, K. Pfaller, W. Salvenmoser, H. Stossel, F. Koch, and P. Stoitzner.** 2001. Migration of dendritic cells into lymphatics—the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. *Int Rev Cytol* **207**:237-70.
188. **Romani, N., and G. Schuler.** 1992. The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system. *Springer Semin Immunopathol* **13**:265-79
189. **Rossi, D., and A. Zlotnik.** 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**:217-42.
190. **Rzany, B., J. Krutmann, E. Goertler, and E. Schopf.** 1990. Cutaneous leishmaniasis: treatment with cryotherapy and intramuscular injections of meglumine antimonate (glucantime). *Hautarzt* **41**:98-101.
191. **Sacks, D., and S. Kamhawi.** 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* **55**:453-83.
192. **Sacks, D. L.** 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* **3**:189-96.
193. **Sadick, M. D., N. Street, T. R. Mosmann and R. M. Locksley.** 1990. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin-4 monoclonal antibody. Evidence for a T-cell-dependent, interferon- $\gamma$ -independent mechanism. *J. Exp. Med.* **171**: 115-127.
194. **Saeki, H., A. M. Moore, M. J. Brown, and S. T. Hwang.** 1999. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* **162**:2472-5.
195. **Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia.** 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* **187**:875-83.
196. **Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia.** 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* **277**:2005-7.
197. **Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp, and A. Lanzavecchia.** 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* **29**:1617-25.
198. **Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia.** 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* **28**:2760-9.
199. **Salman, S. M., N. G. Rubeiz, and A. G. Kibbi.** 1999. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clin Dermatol* **17**:291-6.
200. **Salotra, P., G. Sreenivas, K. R. Beena, A. Mukherjee, and V. Ramesh.** 2003. Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *J Clin Pathol* **56**:840-3.
201. **Samson, M., G. LaRosa, F. Libert, P. Painsavoine, M. Detheux, G. Vassart, and M. Parmentier.** 1997. The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J Biol Chem* **272**:24934-41.

- 
202. **Saraiva, E. M., P. F. Pimenta, T. N. Brodin, E. Rowton, G. B. Modi, and D. L. Sacks.** 1995. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* **111**:275-87.
203. **Sato, N., S. K. Ahuja, M. Quinones, V. KostECKi, R. L. Reddick, P. C. Melby, W. A. Kuziel, and S. S. Ahuja.** 2000. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J Exp Med* **192**:205-18.
204. **Schaniel, C., E. Pardali, F. Sallusto, M. Speletas, C. Ruedl, T. Shimizu, T. Seidl, J. Andersson, F. Melchers, A. G. Rolink, and P. Sideras.** 1998. Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *J Exp Med* **188**:451-63.
205. **Scheicher, C., M. Mehlig, R. Zecher, and K. Reske.** 1992. Dendritic cells from mouse bone marrow: *in vitro* differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods* **154**:253-64.
206. **Schmuth, M., S. Neyer, C. Rainer, A. Grassegger, P. Fritsch, N. Romani, and C. Heufler.** 2002. Expression of the C-C chemokine MIP-3 $\alpha$ /CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol* **11**:135-42.
207. **Schuler, G., and R. M. Steinman.** 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells *in vitro*. *J Exp Med* **161**:526-46.
208. **Scott, P., and C. A. Hunter.** 2002. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol* **14**:466-70.
209. **Seay, M. B., P. L. Heard, and G. Chaudhuri.** 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect Immun* **64**:5129-37.
210. **Shankar, A. H., P. Morin, and R. G. Titus.** 1996. *Leishmania major*: differential resistance to infection in C57BL/6 (high interferon- $\alpha/\beta$ ) and congenic B6.C-H-28c (low interferon- $\alpha/\beta$ ) mice. *Exp Parasitol* **84**:136-43.
211. **Siebert, H., A. Sachse, W. A. Kuziel, N. Maeda, and W. Brück.** 2000. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* **110**:177-85.
212. **Simpson, J. E., J. Newcombe, M. L. Cuzner, and M. N. Woodroffe.** 2000. Expression of the interferon- $\gamma$ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26**:133-42.
213. **Soares, R. P. P., M. E. Macedo, C. Ropert, N. F. Gontijo, I. C. Almeida, R. T. Gazzinelli, P. F. P. Pimenta, and S. J. Turco.** 2002. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* **121**:213-24.
214. **Sozzani, S., P. Allavena, A. Vecchi, and A. Mantovani.** 1999. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* **66**:1-9.

- 
215. **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.
216. **Sozzani, S., F. Sallusto, W. Luini, D. Zhou, L. Piemonti, P. Allavena, J. Van Damme, S. Valitutti, A. Lanzavecchia, and A. Mantovani.** 1995. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* **155**:3292-5.
217. **Stein, J. V., S. F. Soriano, C. M'rini, C. Nombela-Arrieta, G. G. de Buitrago, J. M. Rodriguez-Frade, M. Mellado, J. P. Girard, and C. Martinez- A..** 2003. CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* **101**:38-44.
218. **Steinman, R. M., M. Witmer-Pack, and K. Inaba.** 1993. Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance. *Adv Exp Med Biol* **329**:1-9.
219. **Stossel H, F. Koch, E. Kampgen, P. Stoger, A. Lenz, C. Heufler, N. Romani, and G. Schuler.** 1990. Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* **172**:1471-82.
220. **Stryer, L.** 1996. *Biochemie*, 4 ed. Spektrum, Akad. Verl.
221. **Sunshine, G. H., and T. J. Mitchell.** 1985. Antigen presentation by spleen dendritic cells. *J Invest Dermatol* **85**:110s-114s.
222. **Swihart, K., U. Fruth, N. Messmer, K. Hug, R. Behin, S. Huang, G. Del Giudice, M. Aguet, and J. A. Louis.** 1995. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon  $\gamma$  receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4<sup>+</sup> T cell response. *J Exp Med* **181**:961-71.
223. **Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG.** 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med.* **177**(6):1797-802.
224. **Szekanecz, Z., and A. E. Koch.** 2001. Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol* **13**:202-8.
225. **Theodorides, J.** 1997. Historical note on the discovery of cutaneous leishmaniasis transmission by *Phlebotomus*. *Bull Soc Pathol Exot.* **90**(3):177-8.
226. **Tolson, D. L., S. J. Turco, and T. W. Pearson.** 1990. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **58**:3500-7.
227. **Travi, B. L., Y. Osorio, M. T. Becerra, and G. H. Adler.** 1998. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**:275-8.
228. **Traynor, T. R., A. C. Herring, M. E. Dorf, W. A. Kuziel, G. B. Toews, and G. B. Huffnagle.** 2002. Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity. *J Immunol* **168**:4659-66.

229. **Uguccioni, M., C. R. Mackay, B. Ochensberger, P. Loetscher, S. Rhis, G. J. LaRosa, P. Rao, P. D. Ponath, M. Baggiolini, and C. A. Dahinden.** 1997. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* **100**:1137-43.
230. **Valladeau, J., C. Dezutter-Dambuyant, and S. Saeland.** 2003. Langerin/CD207 sheds light on formation of Birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol Res* **28**:93-107.
231. **Valladeau, J., V. Duvert-Frances, J.-J. Pin, C. Dezutter-Dambuyant, C. Vincent, C. Massacrier, J. Vincent, K. Yoneda, J. Banchereau, C. Caux, J. Davoust, and S. Saeland.** 1999. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* **29**:2695-704.
232. **Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque, and S. Saeland.** 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12**:71-81.
233. **Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Aït-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari, and C. Caux.** 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol* **32**:231-42.
234. **Vecchi, A., L. Massimiliano, S. Ramponi, W. Luini, S. Bernasconi, R. Bonecchi, P. Allavena, M. Parmentier, A. Mantovani, and S. Sozzani.** 1999. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leukoc Biol* **66**:489-94.
235. **Vester, B., K. Müller, W. Solbach, and T. Laskay.** 1999. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun* **67**:3155-9.
236. **Vieira, P. L., E. C. de Jong, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg, and P. Kaliński.** 2000. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* **164**:4507-12.
237. **von der Weid T, A.M. Beebe, D.C. Roopenian, R.L. Coffman.** 1996. Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population. *J Immunol* **157**:4421-7.
238. **von Stebut, E., Y. Belkaid, T. Jakob, D. L. Sacks, and M. C. Udey.** 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* **188**:1547-52.
239. **von Stebut, E., Y. Belkaid, B. V. Nguyen, M. Cushing, D. L. Sacks, and M. C. Udey.** 2000. *Leishmania major*-infected murine Langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* **30**:3498-506.
240. **Vulcano, M., C. Albanesi, A. Stoppacciaro, R. Bagnati, G. D'Amico, S. Struyf, P. Transidico, R. Bonecchi, A. Del Prete, P. Allavena, L. P. Ruco, C. Chiabrand, G. Girolomoni, A. Mantovani, and S. Sozzani.** 2001. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Immunol* **31**:812-22.



241. **Wang, Z. E., S. L. Reiner, S. Zheng, D. K. Dalton, and R. M. Locksley.** 1994. CD4<sup>+</sup> effector cells default to the Th2 pathway in interferon  $\gamma$ -deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* **179**:1367-71.
242. **Weigle, K. A., L. A. Labrada, C. Lozano, C. Santrich, and D. C. Barker.** 2002. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol* **40**:601-6.
243. **Will, A., C. Blank, M. Röllinghoff, and H. Moll.** 1992. Murine epidermal Langerhans cells are potent stimulators of an antigen-specific T cell response to *Leishmania major*, the cause of cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* **22**:1341-7.
244. **Willmann, K., D. F. Legler, M. Loetscher, R. S. Roos, M. B. Delgado, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser.** 1998. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* **28**:2025-34.
245. **Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* **185**:317-28.
246. **Wu, L., C. L. Li, and K. Shortman.** 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* **184**:903-11.
247. **Wu, M., H. Fang, and S. T. Hwang.** 2001. CCR4 mediates antigen-primed T cell binding to activated dendritic cells. *J Immunol* **167**:4791-5.
248. **Xing, Z., A. Zganiacz, and M. Santosuosso.** 2000. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF- $\alpha$  and nitric oxide from macrophages via IFN- $\gamma$  induction. *J Leukoc Biol* **68**:897-902.
249. **Xu, L. L., M. K. Warren, W. L. Rose, W. Gong, and J. M. Wang.** 1996. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells *in vitro*. *J Leukoc Biol* **60**:365-71.
250. **Yanagihara, S., E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai, and Y. Yamaguchi.** 1998. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* **161**:3096-102.
251. **Yoshida, R., M. Nagira, M. Kitaura, N. Imagawa, T. Imai, and O. Yoshie.** 1998. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* **273**:7118-22.
252. **Yoshida, R., M. Nagira, M. Kitaura, N. Imagawa, T. Imai, and O. Yoshie.** 1998. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* **273**:7118-22.
253. **Zaitseva, M., A. Blauvelt, S. Lee, C. K. Lapham, V. Klaus-Kovtun, H. Mostowski, J. Manischewitz, and H. Golding.** 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* **3**:1369-75.
254. **Zaph, C., and P. Scott.** 2003. Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* **71**:1587-1589.
255. **Zer R., I. Yaroslavski, L. Rosen, and A. Warburg.** 2001. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol* **31**:810-14.

256. **Zhou, Y., T. Kurihara, R.-P. Ryseck, Y. Yang, C. Ryan, J. Loy, G. Warr, and R. Bravo.** 1998. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* **160**:4018-25.
257. **Zlotnik, A., and O. Yoshie.** 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**:121-7.
258. **Zou, W., V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, S. Wei, R. Krzysiek, I. Durand-Gasselien, A. Gordon, T. Pustilnik, D. T. Curiel, P. Galanaud, F. Capron, D. Emilie, and T. J. Curiel.** 2001. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* **7**:1339-46.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CXCR	C-X-C Chemokinrezeptor
CD	Bezeichnung für Zelloberflächen-Antigene (cluster of differentiation)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	registrierte Impulse pro Minute (counts per minute)
dATP/CTP/GTP/TTTP	2'-desoxy-Adenosin/Cytidin/Guanosin/Thymin
DCL	diffus kutane Leishmaniose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FACS	"fluorescence activated cell sorting"
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-kostimulierender Faktor
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
i.p.	intraperitoneal

---

IP-10	$\gamma$ -IFN inducible protein-10
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaare
kd	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli ( $\times 10^{-3}$ )
M	molar, mol/l
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
$\mu$	Mikro ( $\times 10^{-6}$ )
mAk	monoklonaler Antikörper
Min	Minute
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
mRNA	"messenger"-RNA
n	nano ( $\times 10^{-9}$ )
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid
NK	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
p	piko ( $\times 10^{-12}$ )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
TAE	Tris-Acetat Puffer
Taq	Thermophilus aquaticus
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin

TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zelle
T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2	T <sub>H</sub> -Zelle vom Typ 1/Typ2
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit, Einheit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen

## 8.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname: Steigerwald, Mario  
 Straße: Turnstrasse 9  
 PLZ/Wohnort: 63768 Hösbach  
 Geburtsdatum/-ort: 05.01.1970 Aschaffenburg  
 Familienstand: ledig  
 Nationalität: deutsch

Eltern: Kurt Steigerwald  
 Hilde Steigerwald, geb. Seitz

### Schulbildung:

von 09/1976 bis 07/1980 Grundschule Hösbach  
 von 09/1980 bis 07/1987 Hanns-Seidel-Gymnasium in Hösbach  
 von 07/1987 bis 06/1990 Oberstufengymnasium Bachgau in Babenhausen  
 am 06/1990 Abitur

### Zivildienst

von 10/1990 bis 12/91 Lebenshilfe Werkstätten e.V. Schmerlenbach

### Studium

von 10/92 bis 12/98 Studium der Diplom-Biologie an der bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg:

04/95 Diplom-Vorprüfung in Biologie  
 04/94 bis 12/98 Hauptfachpraktika in Mikrobiologie und Tierphysiologie  
 12/97 Diplomprüfung in dem Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Tierphysiologie und Biochemie

12/97 bis 12/98 Erstellung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie and der bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Thema: „Optimierung eines Vektors für die DNA-Übertragung in eukaryotische Zellen durch attenuierte Bakterien“

02/99 bis 06/04 Promotion am Institut für molekulare Infektionsbiologie Würzburg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Heidrun Moll mit dem Thema: “Die Rolle von dendritischen Zellen und Chemokinen bei der Regulation der Immunantwort gegen Erreger der kutanen Leishmaniose“

---

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- Publikation Steigerwald M., and H. Moll. 2005. *Leishmania major* Modulates Chemokine and Chemokine Receptor Expression by Dendritic Cells and Affect Their Migratory Capacity. Infect. Immun. Apr. Vol.:73
- Vorträge Die Rolle von dendritischen Zellen und Chemokinen bei der Regulation der Immunantwort gegen Erreger der kutanen Leishmaniose. 2001. Sonderforschungsbereich 479, Würzburg.
- Leishmania major* infection modulates chemokine and chemokine-receptor expression in dendritic cells. 2002. Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Marburg.
- Posterpräsentation *Leishmania major* infection modulates chemokine and chemokine-receptor expression in dendritic cells. 2002. Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Marburg.
- Chemokine and chemokine receptor dynamics in dendritic cells exposed to *Leishmania major*. 2004. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Würzburg.

---

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Heidrun Moll für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und ihre stets vorhandene Diskussionsbereitschaft in wissenschaftlichen Fragen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jörg Hacker danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. R. Gillitzer und Atje Toksoy für die Einarbeitung in das Thema der *In-situ*-Hybridisierung bedanken.

Dr. Klaus Erb danke ich für seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Weiterhin gilt mein Dank Hilde Merkert, welche mich mit den Techniken der konfokalen Lasermikroskopie vertraut gemacht hat und die immer ein offenes Ohr für diverse Probleme hatte.

Mein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Moll: Veronika Fuß, welche mich fern der Heimat immer an meine Aschaffener Wurzeln erinnern hat; Birgit Mai für diverse Nachsitzungen im Cafe Journal, welche ich sehr vermissen werde; Robinson José Ramírez-Pineda für seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft (auch zu nächtlicher Stunde). Martina Schultheis, welche mich auch an stressigen Tagen durch ihr gewinnbringendes Lächeln immer in gute Laune versetzt hat; Christina de Witt, ohne die ein Arbeiten mit Labortieren in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre; Marcela Fajardo-Moser, die mir gerade gegen Ende der Arbeit immer Mut zusprach; Prof. Dr. Alicia Ponte-Sucre, die immer ein offenes Ohr für wissenschaftliche Fragestellungen und Diskussionen hatte; Uwe Münster und Christof Berberich, welche mir gerade zu Beginn der Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen; Christian Keller und „Joey“, für diverse nächtliche Nachsitzungen; Christine Hambrecht, der „guten Seele“ des Labors, welche über die Jahre zu einem wahren Freund gereift ist.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Andrea, die immer für mich da war und zu jedem Zeitpunkt der Arbeit eine sehr große seelische wie wissenschaftliche Stütze war.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Schwester Pia und ihrer Familie (Karlheinz, Felix und Fabio) bedanken, welche mir nicht nur in „harten Zeiten“ eine große Hilfe waren.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern. Danke für alles!



**Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig angefertigt und keine anderen als die genannte Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Konstanz, den 6. März 2005

Mario Steigerwald

