Aktivierung und Effektorfunktionen humaner NK-Zellen nach Interaktion mit *Leishmania*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Helena Amelie Meßlinger

Aus dem Institut für Parasitologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: Frau Prof. Dr. med. vet. Anja Taubert

und

dem Mikrobiologischen Institut
des Universitätsklinikums Erlangen,
Medizinische Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Betreuer: Herr Prof. Dr. med. Christian Bogdan

Aktivierung und Effektorfunktionen humaner NK-Zellen nach Interaktion mit *Leishmania*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Helena Amelie Meßlinger
Tierärztin aus Würzburg

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Herr Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter:

Frau Prof. Dr. Anja Taubert

Herr Prof. Dr. Christian Bogdan

Tag der Disputation: 20.10.2017

Daten dieser Dissertation wurden bereits auf folgendenTagungen vorgestellt:

Helena Meßlinger, Ulrike Schleicher, Christian Bogdan (2013)
In vitro interaction of human NK cells with Leishmania parasites
14th Meeting of the Society for Natural Immunitiy, Heidelberg, 18.-22.9.2013
Poster und Abstract

Helena Meßlinger, Ulrike Schleicher, Christian Bogdan (2014)
In vitro interaction of human NK cells with *Leishmania* parasites
44th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI), Bonn, 17.-20.9. 2014
Poster und Abstract

Helena Meßlinger, Ulrike Schleicher, Christian Bogdan (2015)
Activation of human NK cells by *Leishmania* parasites occurs indirectly via monocyte-derived signals
4th European Congress of Immunology, Wien, 6.-9.9.2015
Poster und Abstract

Ulrike Schleicher, Helena Meßlinger, Christian Bogdan (2016)
Activation of human NK cells by *Leishmania* parasites occurs indirectly via monocyte-derived signals
EMBO Conference - Innate lymphoid cells 2016, Berlin, 30.11-02.12.2016
Poster und Abstract

Ein Manuskript mit Daten dieser Arbeit wurde in englischer Sprache in Frontiers of Immunology veröffentlicht:

Messlinger H, Sebald H, Heger L, Dudziak D, Bogdan C and Schleicher U (2018)
Monocyte-Derived Signals Activate Human Natural Killer Cells in Response to *Leishmania* Parasites.
Front. Immunol. 9:24. doi: 10.3389/fimmu.2018.00024

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Natürliche-Killer-Zellen 1

1.1.1 Aktivierung und Funktion 1

1.1.2 Das CD69 Molekül 5

1.1.3 Neural cell adhesion molecule (CD56) 6

1.2 Leishmanien 7

1.2.1 Lebenszyklus 7

1.2.2 Klink und Epidemiologie der Leishmaniose 7

1.3 Immunologie der Leishmaniose 9

1.4 Rolle von NK-Zellen bei muriner und humaner Leishmaniose 11

1.5 Fragestellung 14

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Material 15

2.1.1 Parasiten 15

2.1.2 Mäuse 16

2.1.3 Zelllinien 16

2.1.4 Antikörper/ Antiseren 16

2.1.5 Zytokine und Stimulanzien 19

2.1.6 Geräte 19

2.1.7 Verbrauchsmaterialien 20

2.1.8 Kits 21

2.1.9 Real-Time PCR Experimente 22

2.1.10 Medien, Puffer und Lösungen 22

2.1.11 Chemikalien und Reagenzien 23

2.2 Methoden 24

2.2.1 Auswahl der Blutspender 24

2.2.2 Zellbiologische und immunologische Methoden 24

2.2.2.1 Fixierung von Leishmanien, Leishmanien-Lysat 25

2.2.2.2 Gewinnung von humanem peripherem Blut 25

2.2.2.3 Gewinnung von sterilem autologem Plasma 25

2.2.2.4 Aufreinigung von humanen Leukozyten aus peripherem Blut 25

2.2.2.5 Depletion von Monozyten in humanen PBMC mittels Plastikadhäsion oder $CD14^+$-vermittelter magnetischer Zellseparation (MACS) 26

2.2.2.6 Generierung von dendritischen Zellen aus humanen Monozyten (Mo-DC) 27
2.2.2.7 Aufreinigung von humanen Leukozytenpopulationen mit Hilfe durchflusszytometrischer Sortierung (FACS-Sortierung)....27
2.2.2.8 Stimulation von humanen Leukozyten mit *Leishmania*-Promastigoten und anderen Stimulanzien 27
2.2.2.9 Stimulation von humanen PBMCs oder NK-Zellen mit Zellkulturüberständen desselben Blutspenders 29
2.2.2.10 Durchflusszytometrische Analysen 30
2.2.2.11 Immunfluoreszenz-Färbung von Monozyten 30
2.2.2.12 Bestimmung der zellspezifischen Zytotoxizität von NK-Zellen 31
2.2.2.13 Quantifizierung von Proteinen im Zellkulturüberstand mittels Sandwich-ELISA 32
2.2.2.14 Quantifizierung von Proteinen im Zellkulturüberstand mittels Procarta® Multiplex Immunoassay 33
2.2.2.15 Nachweis *Leishmania*-spezifischer Antikörper (IgG) im Immunfluoreszenz-Test 33
2.2.2.16 Generierung, Infektion und Analyse von intraperitoneal (i. p.)-humanisierten Mäusen 34
2.2.3 Molekularbiologische Methoden 35
2.2.3.1 Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen 35
2.2.3.2 Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Gene mittels quantitativer real-time RT-PCR Analyse 35
2.2.4 Statistische Analysen 36
3 ERGEBNISSE 37
3.1 Hochregulation von Aktivierungsmarkern auf humanen NK-Zellen nach Kokultur mit Leishmanien 37
3.1.1 Hochregulation von CD69 und CD25 nach Kokultur von PBMCs mit Leishmanien 37
3.1.2 Hochregulation der NK-zellulären CD69-EXpression nach Kokultur mit Leishmanien-infizierten Monozyten 42
3.1.3 Mechanismus der Steigerung der CD69-Expression durch Monozyten 44

3.1.3.1 Steigerung der CD69-Expression durch Zellkulturüberstand Leishmanien-infizierter Monozyten 44
3.1.3.2 Analyse der Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen 48
3.1.3.3 Blockierung von NK-Zell-aktivierenden Zytokinen in Zellkulturüberständen 51
3.1.4 Stimulation der CD69-Expression durch direkten Kontakt von NK-Zellen mit Leishmanien-infizierten Monozyten 53
3.1.4.1 Blockierung von membrangebundenen NK-Zell-aktivierenden Zytokinen während der Kokultur 53
3.1.4.2 Nachweis von IL-18 auf der Oberfläche *Leishmania*-infizierter Monozyten 56
3.2 Produktion von IFN-γ und Zytotoxizität von humanen NK-Zellen nach Kokultur mit Leishmanien 57
3.2.1 Kokultur von NK-Zellen und Leishmanien 57
3.2.1.1 Wirkung von IL-12 und IL-18 auf NK-Zell-Effektorfunktionen nach deren Stimulation mit Leishmanien 59
3.2.1.2 Wirkung der Zugabe von akzessorischen Zellen auf die NK-Zell-Effektorfunktionen nach Stimulation mit *Leishmania*-Promastigoten 62
3.2.2 Aktivierung von NK-Zellen in *L. infantum*-infizierten i. p.-humanisierten Mäusen 64
3.3 Einfluss promastigoter *Leishmania*-Stadien auf die CD56-Expression humaner NK-Zellen 65
3.3.1 Reduktion der CD56-Expression von NK-Zellen nach direktem Kontakt mit Leishmanien 65
3.3.2 Reduktion der CD56-Expression über Zugabe von Zellkulturüberständen von *L. infantum* 67
3.3.3 Mechanismus der Reduktion der CD56-Expression auf NK-Zellen 69
3.3.3.1 Nachweis von CD56 auf der Oberfläche von NK-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Antikörper-Klone 69
3.3.3.2 Analyse der mRNA-Expression von CD56 auf NK-Zellen 69
3.3.3.3 Messung von löslichem CD56 70
4 DISKUSSION 72
4.1 Aktivierung von NK-Zellen durch Leishmanien 72
4.1.1 Regulation von NK-Zell-Aktivierungsmarkern 73

4.1.2 Aktivierung von NK-Zell-Effektorfunktionen 78

4.2 Beeinflussung von NK-Zell-spezifischen Oberflächenmolekülen.....82

5 ZUSAMMENFASSUNG.....86

6 SUMMARY.....88

7 LITERATURVERZEICHNIS.....90

8 ANHANG.....100

DANKSAGUNG.....104

ERKLÄRUNG.....105

ABKÜRZUNGEN

APC	Allophycocyanin
CanL	canine Leishmaniose
CCR7	C-C Chemokin-Rezeptor 7
CD	*cluster of differentiation*
CL	kutane Leishmaniose
cMo	klassische Monozyten
cpm	*counts per minute*
CR	Komplement-Rezeptor
C3b	aktivierter Komplementfaktor 3
DAP12	*DNAX-activating protein of 12 kD*
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindo
DC	dendritische Zelle
DC-SIGN	*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*, CD209
DCL	diffuse kutane Leishmaniose
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
ELISPOT	*enzyme-linked immuno spot assay*
FACS	*fluorescence-activated cell sorting* (Durchflusszytometrie)
FGF	*fibroblast growth factor* (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	*forward scatter*
Ft-Lysat	*Freeze-thaw*-Lysat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
gp63	Glykoprotein mit Größe 63 kD
GRO-α	*growth related oncogene,* CXCL1
HA	Hämagglutinin
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
rhu	rekombinant human
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	*horse radish peroxidase* (Meerrettich-Peroxidase)
IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenz-Test
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	*inducible nitric oxide synthase* (induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase)
intMo	intermediäre Monozyten
ITAM	*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
ITIM	*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*
KIR	*killer cell immunoglobulin-like receptor*
KLR(A)	*killer cell lectin-like receptor* (subfamily A)
LACK	*leishmania homolog of receptors for activated C-kinase*
LCL	lokalisierte kutane Leishmaniose
LPG	Lipophosphoglykan
LPS	Lipopolysaccharid
CLSM	*confocal laser scanning* microscope (Konfokalmikroskop)
MACS	*magnetic activated cell sorting*
MCL	mukokutane Leishmaniose
MCMV	Murines Cytomegalievirus
MCP-1	*monocyte chemotactic protein 1*, CCL2
memIL-18	membrangebundenes IL-18
MHC	*major histocompatibility complex* (Gewebeverträglichkeitsantigene)
MIP-1	*macrophage inflammatory protein-1*
Mo-DC	aus Monozyten generierte dendritische Zellen
mRNA	*messenger* (Boten)-Ribonukleinsäure
NCAM	*neural cell adhesion molecule*, CD56 (neuronales Zelladhäsionsmolekül)
ncMo	nicht-klassische Monozyten
NCRs	*natural cytotoxicity-triggering receptor* (natürliche zytotoxische Rezeptoren)
NET	*neutrophil extracellular trap* (extrazelluläre DNA-Netze von Neutrophilen)
NF-κB	*nuclear factor 'κ-light chain enhancer' of activated B cells*
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NSG	NOD/SCID/IL-2Rg^{null}

PBMCs	*peripheral blood mononuclear cells* (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts)
PBS	*phosphate buffered saline* (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PEC	Peritonealexsudatzellen
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
PDGF-BB	*platelet derived growth factor BB*
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	*polymorphonuclear cells* (polymorphkernige Granulozyten)
RT	Reverse Transkriptase
SDF-1	*stromal cell-derived factor 1*, CXCL12
SEM	*standard error of the mean* (Standardfehler)
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SPF	*specific pathogen-free* (frei von bestimmten Krankheitskeimen)
SSC	*side scatter*
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
TGF	*transforming growth factor* (transformierender Wachstumsfaktor)
TLR	*Toll-like*-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
ÜS	Überstand
VEGF-A	*vascular endothelial growth factor A*
VL	viszerale Leishmaniose

1 EINLEITUNG

1.1 Natürliche-Killer-Zellen

1.1.1 AKTIVIERUNG UND FUNKTION

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sind Immunzellen des angeborenen Immunsystems, die in den 1970er Jahren in der Maus zum ersten Mal beschrieben wurden [1]. Ihren Namen erhielten sie aufgrund ihrer Fähigkeit, Tumorzellen direkt erkennen und abtöten zu können. Sie werden zum angeborenen Teil des Immunsystems gezählt, da sie im Gegensatz zu T- und B-Zellen ein limitiertes Repertoire an Rezeptoren aufweisen, über die sie auch ohne vorherigen Kontakt zu spezifischen Antigenen aktiviert werden können. Um jedoch vollständig aktiviert zu werden, müssen NK-Zellen einen *priming*-Prozess durch akzessorische Zellen und Zytokine durchlaufen [2-5].

NK-Zellen sind in geringen Mengen in fast allen Organen des Körpers zu finden. Die beiden wichtigsten Effektormechanismen der NK-Zellen sind ihre Zytotoxizität und die Produktion von inflammatorischen, aber auch anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Um Zielzellen abzutöten, werden entweder Perforin und Granzyme freigesetzt oder es wird über die Bindung von Todesrezeptor-Liganden (z. B. FasL) die Apoptose der Zelle ausgelöst [6]. Das wichtigste inflammatorische Zytokin der NK-Zellen ist Interferon (IFN)-γ. NK Zellen können aber auch Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), verschiedene Chemokine und die hemmend wirkenden Zytokine Interleukin (IL)-10 und Transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)-β produzieren [7-11]. Die Zytotoxizität und die Zytokinproduktion können unabhängig voneinander ausgelöst werden [12]. Dabei hängt es hauptsächlich von der Art und Stärke der Stimulation ab, welche Funktion dominiert und welche Zytokine oder Chemokine produziert werden [7, 8].

Die Aktivierung von NK-Zellen wird über das Gleichgewicht inhibierender und aktivierender Signale gesteuert. Dazu exprimieren NK-Zellen eine Reihe spezifischer NK-Zell-Rezeptoren, *pattern recognition receptors* wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sowie Zytokin-Rezeptoren. Eine Übersicht der wichtigsten Rezeptoren humaner NK-Zellen sind in der folgenden Abbildung E1 von Vivier et al. [13] dargestellt.

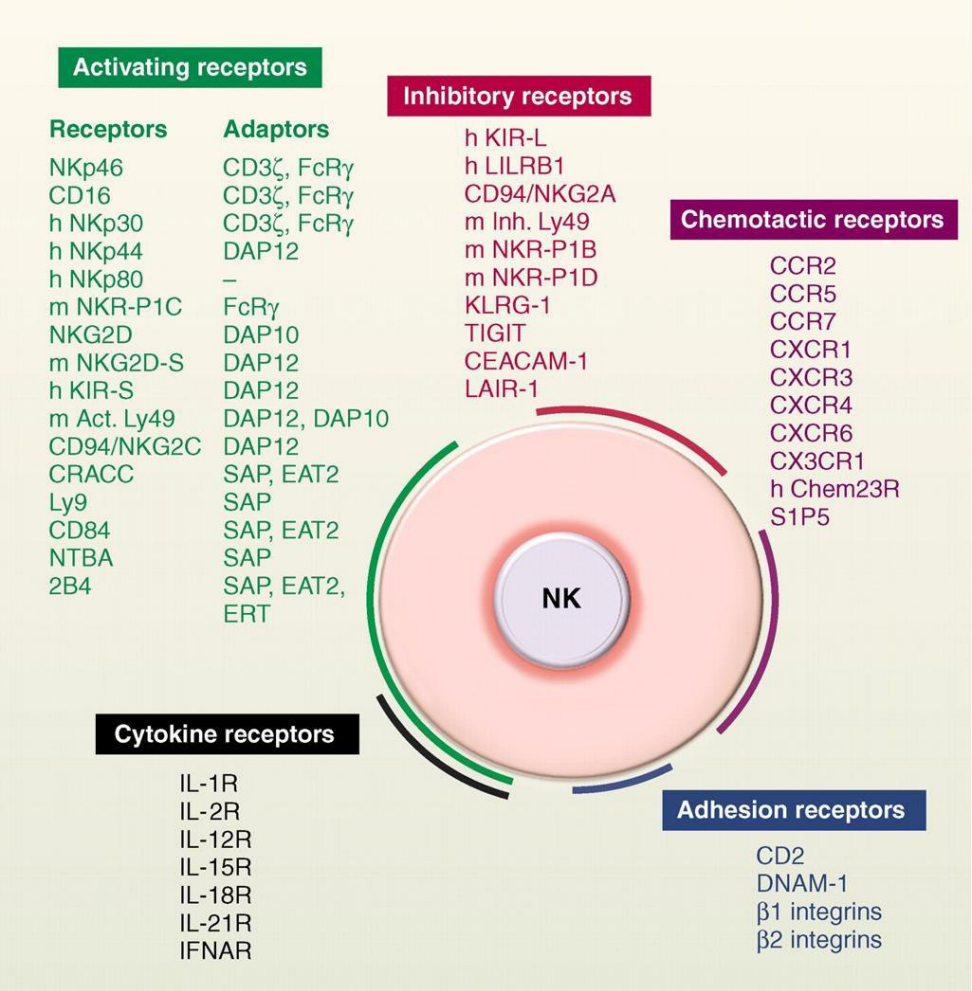


Abbildung E1: Humane NK-Zell-Rezeptoren.
Die Abbildung wurde übernommen von Vivier et al. [13].

Zu den humanen, inhibierend wirkenden NK-Zell-Rezeptoren gehören unter anderem die *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs) und das CD49/NKG2A-Heterodimer (*cluster of differentiation* 49/*NK group* 2A), welche unterschiedliche und personenspezifische Gewebeverträglichkeitsantigene (*major histocompatibility complex* [MHC]) der Klasse I erkennen und so zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen unterscheiden können [14, 15]. Zusätzlich können so auch gestresste Zellen und verschiedene Tumorzellen, bei denen MHCI vermindert oder in veränderter Form exprimiert wird, erkannt werden [16, 17]. Murine NK-Zellen exprimieren ebenfalls CD94/NKG2A-Rezeptoren, verwenden anstatt von KIRs jedoch unterschiedliche *killer cell lectin-like receptors* der Subfamilie A (KLRAs, auch Ly49-Rezeptoren) [18]. Obwohl sich KIRs und KLRAs in ihrer Struktur unterscheiden, haben sie dieselbe Funktion und vermitteln ihre Signale über zytoplasmatische ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) in die Zelle [19]. Die Aktivierung des jeweiligen Rezeptors führt zu einer Phosphorylierung des ITIM im Zytoplasma. Dadurch werden Protein-Tyrosin-Phosphatasen rekrutiert und aktiviert, welche ihrerseits negativ in die Signalwege der aktivierenden Rezeptoren eingreifen [20, 21].

Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren sind sehr vielfältig und erkennen unterschiedlichste Moleküle. Eine wichtige Gruppe stellen die ausschließlich auf NK-Zellen exprimierten, natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (*natural cytotoxicity-triggering receptors*, NCRs) dar, zu denen NKp46, NKp30 und NKp44 gehören und die vor allem mit NK-Zell-Zytotoxizität assoziiert sind [22]. Alle drei NCRs erkennen verschiedene auf Tumorzellen exprimierte Heparansulfate [23] sowie das Hämagglutinin (HA) unterschiedlicher Viren [24-26]. Daneben bindet NKp44 auch an Zellbestandteile bestimmter Bakterien [27] sowie NKp30 an B7-H6, ein Molekül, das auf bestimmten Tumorzellen zu finden ist [28]. Während NKp46 und NKp30 auf allen humanen NK-Zellen vorkommen, wird NKp44 nur auf bereits aktivierten und nicht auf ruhenden NK-Zellen exprimiert [29]. Murine NK-Zellen exprimieren wie alle Säugetier-NK-Zellen NKp46, jedoch kein NKp44 oder NKp30 [30, 31]. Weitere Beispiele für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren sind die von Menschen und Mäusen gleichermaßen exprimierten Moleküle NKG2D und CD94/NKG2C-Heterodimer. NKG2D erkennt Moleküle, die auf gestressten oder beschädigten Zellen präsentiert werden [32, 33]. CD94/NKG2C bindet wiederum an dieselben MHCI-Moleküle wie der inhibierende CD94/NKG2A-Rezeptor [34]. Anders als bei den inhibierenden Varianten, werden die Signale der aktivierenden Rezeptoren durch Adaptermoleküle auf unterschiedlichen Wegen in die Zelle vermittelt. NKp46 und NKp30 sind entweder mit der CD3ζ-Kette und/oder mit der Fc-Rezeptor-γ-Kette (früher: γ-Kette des Fcε-Rezeptor I) assoziiert, während NKp44 und CD94/NKG2C an das Adaptermolekül DAP12 (*DNAX activating protein of 12 kD*) gebunden ist. Alle diese Adaptoren besitzen ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), über deren Phosphorylierung, ähnlich der ITIMs, unterschiedliche weitere Signalmoleküle rekrutiert und aktiviert werden. NKG2D ist hingegen mit dem Adaptermolekül DAP10 assoziiert, welches ein anderes Motiv aufweist und daher andere Signalmoleküle aktiviert [35].

Das Signal eines einzigen dieser Rezeptoren ist in der Regel nicht ausreichend, um eine Aktivierung der NK-Zellen auszulösen. Dazu ist die zeitgleiche Aktivierung mehrerer aktivierender NK-Zell-Rezeptoren oder zusätzlicher Zytokin-Rezeptoren notwendig [8, 36]. Abgesehen von den genannten Rezeptoren nutzen NK-Zellen auch CD16 (Fcγ-Rezeptor III) zur Erkennung Antikörper-markierter Zellen, wobei hier das über CD16 vermittelte Signal alleine ausreichend ist, um eine zytotoxische Reaktion und Zytokinproduktion der NK-Zellen auszulösen [8, 36].

Humane NK-Zellen exprimieren TLR1 bis 6 sowie geringe Mengen an TLR7, TLR8 und TLR9, wobei letzterer nur in einer bestimmten NK-Zell-Subpopulation funktionell zu sein scheint [37, 38]. Während TLR1, 2, 4, 5 und 6 auf der Zelloberfläche exprimiert werden, sind TLR3, 7, 8 und 9 mit unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten assoziiert [39, 40]. Über diese Rezeptoren ist es den NK-Zellen möglich, Moleküle mikrobiellen und viralen Ursprungs zu erkennen [41].

Zusätzlich reagieren NK-Zellen auf eine Reihe von Zytokinen, die sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Entwicklung und Homöostase der Zellen wichtig sind. Aktivierende Zytokine sind IFN-α/β [42], IL-12, IL-18, IL-15 [7], IL-1 [43], IL-27 [44], IL-21 und IL-2 [45], das neben IL-15 auch Zellproliferation auslöst. Hemmende Zytokine sind TGF-β [46, 47] und IL-10, welches jedoch teils auch aktivierend wirken kann [48, 49]. Ähnlich wie bei den NCRs wird meist nur über eine Kombination von unterschiedlichen Zytokinen oder zusätzlicher Stimulation über andere Rezeptoren eine NK-Zell-Antwort ausgelöst. Dabei stellt vor allem die Kombination von IL-12 mit IL-18 einen starken Stimulus dar [7, 50].

Bei Menschen werden NK-Zellen nach ihrer Expression von CD56 und CD16 in zwei Hauptpopulationen eingeteilt. **CD56^{dim}/CD16^{+}** Zellen enthalten schon im nicht-aktiviertem Zustand viele zytotoxische Granula, exprimieren kein CCR7 (C-C Chemokin-Rezeptor 7) und sind überwiegend im Blut zu finden (≥ 90 % aller NK-Zellen). **CD56^{high}/CD16**$^{dim/-}$ Zellen enthalten dagegen kaum zytotoxische Granula und exprimieren CCR7, was dazu führt, dass diese Zellen vor allem in sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten zu finden sind [51]. Als einzige Immunzellen exprimieren sie auch unter homöostatischen Bedingungen den hochaffinen IL-2$\alpha\beta\gamma$-Rezeptor, wodurch sie auf kleinste Mengen von IL-2 reagieren können [52]. Beide Subpopulationen sind grundsätzlich in der Lage, alle bekannten NK-Zell-Effektorfunktionen auszuüben, reagieren dabei jedoch auf verschiedene Stimuli unterschiedlich schnell und stark. So sind nach Stimulation mit löslichen Zytokinen die CD56^{high} NK-Zellen die stärksten und schnellsten Produzenten von inflammatorischen Zytokinen [50], während dies nach Stimulation über aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, wie NCRs, auf die CD56^{dim} NK-Zellen zutrifft [8, 53]. Obwohl CD56^{dim} NK-Zellen nach Aktivierung schneller eine zytotoxische Reaktion zeigen, können CD56^{high} NK-Zellen durch zusätzliche Stimulation mit IL-2 oder IL-12 eine ähnlich starke Zytotoxizität erreichen [54, 55].
In den letzten Jahren mehren sich Hinweise darauf, dass NK-Zellen auch zu einer Gedächtnisantwort fähig sind. Diese ist grundsätzlich dadurch charakterisiert, dass nach Kontakt mit einem Antigen spezifische langlebige Gedächtniszellen gebildet werden, die bei nochmaligem Kontakt mit demselben Antigen zu einer schnelleren und stärkeren Immunreaktion befähigt sind. Bisher wurde angenommen, dass dieses Phänomen nur bei T- und B-Lymphozyten auftritt, da nur diese Zelltypen aufgrund genetischer Rekombination hochdiverse Antigenrezeptoren exprimieren, die jeweils für ein einzelnes Antigen (Epitop) spezifisch sind. Die meisten Nachweise für eine Gedächtnisähnliche Funktion von NK-Zellen wurden bisher im Mausmodel erbracht. Hier konnte nach einmaligem Kontakt mit anschließender Reinfektion mit unterschiedlichen Viren [56, 57] (v. a. mit murinem Cytomegalievirus [58, 59]) eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität beobachtet werden, die unabhängig von T- und B-Lymphozyten auftrat. Darüber hinaus kam es auch nach kutaner Sensibilisierung von

Mäusen mit unterschiedlichen Antigenen zur Vermehrung eines bestimmten NK-Zell-Subtyps in der Leber, der bei nochmaliger Stimulation mit demselben Antigen eine allergische Reaktion auslöste [60, 61]. In beiden Fällen war die Anwesenheit der Zytokine IL-12, IFN-α und IFN-γ für die Ausbildung der Gedächtnis-NK-Zellen notwendig [62, 63]. Bisher liegen noch keine direkten Nachweise von Gedächtnis-NK-Zellen im Menschen vor. Jedoch kommt es nach Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus (HCMV) zu einer Expansion eines speziellen NKG2C$^+$ NK-Zell-Subtyps [64, 65], der auf erneute Stimulation mit HCMV [66], aber auch mit anderen Viren, verstärkt aktiviert wird [67-69]. Zusätzlich konnte auch in Rhesusaffen fünf Jahre nach dem ersten Kontakt mit spezifischen Antigenen des Simianen Immundefizienz-Virus (SIV) eine Gedächtnis-Antwort von NK-Zellen nachgewiesen werden [70].

1.1.2 **Das CD69 MOLEKÜL**

CD69 bezeichnet ein Molekül, das zur Familie der Typ II C-Typ Lektin-Rezeptoren gehört und als Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert wird [71, 72].

Außer Erythrozyten können alle Zellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben, CD69 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Bei einigen Zelltypen, wie Monozyten [73], Thrombozyten [74] und Langerhans-Zellen [75], ist das Molekül konstitutiv vorhanden. Für alle anderen Zelltypen wird CD69 häufig als Aktivierungsmarker betrachtet, da es auf ruhenden Zellen nicht vorkommt, nach in vitro-Stimulation jedoch nach sehr kurzer Zeit auf der Zelloberfläche nachweisbar ist. Die Bindungspartner von CD69 waren lange Zeit nicht bekannt. Kürzlich konnte jedoch die Bindung an Galectin-1 (einem beta-Galactosidase-bindenden Lektin) gezeigt werden, das auch auf vielen Tumoren vermehrt exprimiert wird [76, 77]. Bei NK-Zellen führt unter anderem die Stimulation mit IL-12, IL-2, IFN-α, PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) [78, 79], der Kontakt mit K562-Tumorzellen und die CD16-Kreuzvernetzung zu einer gesteigerten CD69-Expression [80]. Bei CD69$^+$ T-Zellen führt die Aktivierung des Rezeptors mittels gegen CD69 gerichteten Antikörpern zur Steigerung der IL-2-, TNF- und IFN-γ-Produktion sowie zur Zellproliferation [71, 81]. Bei NK-Zellen wurde mit dieser Behandlung bisher nur die Steigerung der Zytotoxizität IL-2-stimulierter NK-Zellen gezeigt [82, 83]. Dieser Effekt konnte durch die Aktivierung des inhibitorisch wirkenden CD49/NKG2A Rezeptors wieder blockiert werden [84].

Neben seiner Funktion als kostimulatorischer Rezeptor ist CD69 auch bei der chemotaktischen Antwort auf Sphingosin-1-Phosphat (S1P) beteiligt. Bei T-Zellen führt eine gesteigerte CD69-Expression zu einer reduzierten Expression des S1P-Rezeptors 1 (S1PR1), wodurch die Zellen in lymphatischen Geweben gehalten werden [85, 86]. Da NK-Zellen jedoch vor allem S1PR5 und nur geringe Mengen an S1PR1 exprimieren [87, 88], scheint für sie der Signalweg über S1PR1 nur eine untergeordnete Rolle zu spielen [87, 89, 90]. Im Mausmo-

dell konnte gezeigt werden, dass S1PR5 weder mit CD69 interagiert noch dass seine Expression von CD69 beeinflusst wird [90].

1.1.3 **NEURAL CELL ADHESION MOLECULE (CD56)**

CD56, auch neuronales, zelluläres Adhäsionsmolekül genannt (*neural cellular adhesion molecule*, NCAM), ist ein Adhäsionsprotein der Immunogobulin-Superfamilie. Durch alternatives Spleißen entstehen viele unterschiedliche Isoformen, wobei die drei Hauptisoformen nach ihrer Größe von 120 kD, 140 kD und 180 kD benannt werden. Während $CD56_{120kD}$ nur oberflächlich in der Zellmembran verankert ist, besitzen die 140 kD- und 180 kD-Isoformen eine Transmembranregion und einen intrazytoplasmatischen Teil. Über letzteren können sie in unterschiedliche Signalwege eingreifen und auch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (*nuclear factor κB*) und somit zu einer Aktivierung der Zelle beitragen [91, 92]. CD56 wird von allen Zellen neuronalen Ursprungs synthetisiert und ist ein Molekül, das über Speziesgrenzen hinweg sehr konserviert ist [93]. CD56 ist eines der wenigen Säugetierproteine, das Polysialinsäuren in unterschiedlicher Menge gebunden hat. Im Bereich des Nervensystems ist es unter anderem an der Embryogenese des Gehirns und der Bildung neuer Synapsen beteiligt [94, 95]. Neben der membrangebundenen Form kann CD56 auch als lösliches Molekül vorliegen, das entweder durch Lösen der Verankerung aus der Zellmembran (*shedding*) abgegeben oder direkt sezerniert wird [96, 97]. CD56 kann einerseits homophile Bindungen eingehen [98] und andererseits an eine Vielzahl anderer Moleküle, z. B. auch an Bestandteile der extrazellulären Matrix, binden [99, 100].

Bei Menschen exprimieren auch NK-Zellen und einige wenige weitere Zelltypen wie NKT-Zellen die 140 kD-Isoform von CD56 [101]. Dabei ist die Expression bei NK-Zellen ab dem Stadium der unreifen NK-Zellen, jedoch noch nicht bei NK-Vorläuferzellen, nachweisbar [102]. Welche funktionellen Auswirkungen die CD56-Expression auf NK-Zellen hat, ist noch weitestgehend unbekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass NK-Zellen über homophile Bindungen von CD56 aktiviert werden können. So führte die Stimulation mit an eine Zellkulturplatte gekoppeltem anti-CD56-Antikörpern zur Induktion von CD69 [103]. Weiterhin kann CD56 auch an der Erkennung und Abtötung von Tumorzellen beteiligt sein, da die 140 kD-Isoform auch auf vielen Tumorzellen zu finden ist und als Zeichen besonderer Malignität angesehen wird [104-106]. Dabei treten jedoch je nach Art des Tumors erhebliche Unterschiede auf. Die Aussagen der verschiedenen Publikationen reichen von keinerlei Abtötung der Tumorzellen [101, 107] über Abtötung nach homophiler Interaktion [108, 109] bis zu einer nicht über homophile Bindung vermittelten Hemmung der Lyse [110]. Zusätzlich scheinen NK-Zellen über die Bindung von CD56 an FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor 1*) auf T-Zellen ein kostimulatorisches Signal zu liefern, das zusammen mit Stimulation des T-Zell-Rezeptors zu einer Aktivierung der T-Zellen führt [111]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Interaktion

zwischen CD56 auf NK-Zellen und DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) auf dendritischen Zellen zu einer verminderten Lyse von dendritischen Zellen (DCs) führte, wobei dieser Effekt auf $CD56^{dim}$ NK-Zellen mit geringerem Gehalt an Polysialinsäuren beschränkt war [112].

1.2 **Leishmanien**

1.2.1 **LEBENSZYKLUS**

Die Leishmaniose wird durch die Infektion mit Protozoen der Gattung *Leishmania* hervorgerufen. Leishmanien gehören zum Stamm der Euglenozoa, zur Klasse der Kinetoplastea und zur Familie der Trypanosomatidae. Die derzeit über 20 bekannten Spezies und Subspezies lassen sich in die Untergattungen *Leishmania (Leishmania)* und *Leishmania (Vianna)* einteilen [113]. Sie zeigen einen indirekten Entwicklungszyklus mit einem Wirtswechsel zwischen Säugetieren und weiblichen Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* (in der alten Welt) oder *Lutzomyia* (in der neuen Welt) [114]. In der Mücke liegen die Parasiten in ihrer begeißelten, länglichen, promastigoten Form von 5-14 µm Länge vor. Diese Stadien vermehren sich im Mitteldarm zunächst zu schwach-infektiösen prozyklischen Promastigoten, anschließend erfolgt die Umwandlung zu hoch-infektiösen metazyklischen Promastigoten, die sich in einem Gel-ähnlichen Proteinnetzwerk zwischen Mittel- und Vorderdarm ansammeln und bei einem Stich der Mücke regurgitiert und übertragen werden [115]. Dabei liegt die mittlere Infektionsdosis zwischen 100 und 1000 Parasiten [116, 117]. Im Säugetier werden die Parasiten durch Phagozytose in verschiedene Zellen aufgenommen und wandeln sich in abgerundete, unbegeißelte, 2-4 µm große Amastigote um. Durch die kontinuierliche intrazelluläre Vermehrung der Amastigoten kommt es zum Platzen der Wirtszelle, sodass weitere Zellen durch freigesetzte Amastigote infiziert werden können. Der Infektionskreislauf schließt sich, sobald eine Sandmücke bei einem Blutmahl infizierte Zellen oder freie Amastigote aufnimmt und sich die Leishmanien im Darm wieder zu Promastigoten umwandeln [118].

1.2.2 **KLINK UND EPIDEMIOLOGIE DER LEISHMANIOSE**

In vielen Fällen, vor allem bei viszeraler Leishmaniose, verläuft die Infektion subklinisch. Grundsätzlich hängt sowohl die Ausbildung klinischer Symptome als auch die Schwere des Krankheitsverlaufs von verschiedenen Risikofaktoren, wie geringes Alter, Unterernährung, eine hohe Infektionsdosis und eine nicht ausreichende Immunantwort ab [119, 120]. Insbesondere letzteres bedingt, dass die Leishmaniose gehäuft bei HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) -infizierten Menschen auftritt [121]. Zusätzlich sind auch einige Genpolymor-

phismen bekannt, die mit einer höheren oder niedrigeren Krankheitsrate assoziiert sind [122, 123].

Bei der Leishmaniose des Menschen werden hauptsächlich drei unterschiedliche Krankheitsbilder unterschieden: die kutane Form (CL), die mukokutane Form (MCL) und die viszerale Form (VL). Welche dieser Formen auftritt, ist maßgeblich von der Leishmanien-Spezies abhängig. Die kutane Leishmaniose wird im Mittelmeerraum, Nordafrika, im Nahen und Mittleren Osten durch *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica* und *L. (L.) infantum* hervorgerufen, während in Zentral- und Südamerika verschiedene Spezies des *L. (L.) mexicana*-Komplexes und des *Leishmania Vianna* Subgenus, wie *L. (V.) braziliensis*, für die CL verantwortlich sind [124]. Die CL ist durch Bildung von Papeln in der Haut gekennzeichnet, die sich innerhalb von 4-12 Wochen zu Ulzerationen mit einer typischen „Vulkanform" entwickeln, jedoch meist lokal auf den Bereich der Einstichstelle begrenzt bleiben. Bei immunkompetenten Patienten heilen diese Wunden selbstständig innerhalb von 6-12 Monaten - gegebenenfalls unter starker Narbenbildung - ab [125]. Mit 0,7 bis 1,2 Mio. neuen Fällen pro Jahr ist dies die am weitesten verbreitete Form der Leishmaniose. 95 % dieser Krankheitsfälle kommen in ähnlicher Häufigkeit in Mittel-/Südamerika, dem Mittelmeerraum und Westasien (Mittlerer Osten bis Zentralasien) vor. Besonders betroffen sind die Länder Afghanistan, Algerien, Iran, Syrien, Nord-Sudan, Äthiopien, Brasilien, Kolumbien, Peru und Costa Rica [126]. Die mukokutane Form der Leishmaniose wird vor allem durch *L. (V.) braziliensis* und *L. (V.) panamensis* verursacht und zeichnet sich durch eine progressive Zerstörung der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut aus. Sie tritt in 1-10 % aller Infektionen auf und kommt hauptsächlich in Südamerika vor, wobei die meisten Fälle in Bolivien, Brasilien und Peru zu verzeichnen sind und häufig auf eine kutane Leishmaniose folgen [127, 128]. *L. (L.) donovani* (alte Welt) und *L. (L.) infantum* (alte und neue Welt) sind die Verursacher der viszeralen Leishmaniose. Bei dieser Erkrankung verbreitet sich der Parasit in den inneren Organen, wobei vor allem die Milz, die Leber und das Rückenmark betroffen sind. Diese ohne Behandlung letal verlaufende Leishmanioseform führt zu Fieberschüben, Gewichtsverlust, Panzytopenie sowie Hepato- und Splenomegalie. Während *L. (L.) donovani* vorwiegend in Afrika und im südasiatischen Raum vorkommt und der Mensch hier als einziger Wirt beschrieben ist, ist *L. (L.) infantum* im Mittelmeerraum und Mittel-/Südamerika mit dem Hund als Hauptreservoir verbreitet [129]. Jährlich treten geschätzt 200.000-400.000 neue Fälle viszeraler Leishmaniose auf, wovon ca. 20.000 tödlich verlaufen. 90 % aller Fälle sind dabei in Bangladesch, Indien, Sudan, Süd-Sudan, Äthiopien und Brasilien zu verzeichnen [126].

1.3 **Immunologie der Leishmaniose**

Die verschiedenen klinischen Ausprägungen der Leishmaniose lassen sich gut im Mausmodell nachstellen. Mit dessen Hilfe konnten in den letzten Jahrzehnten viele Mechanismen der Immunantwort auf Leishmanien analysiert werden.

Die Sandmücke gehört zu den sogenannten *pool feedern*, die oberflächliche Blutkapillaren der Haut anritzen, bevor das Blut aus dem entstehenden Blutsee aufgenommen wird [130]. Dadurch sind die ersten Komponenten des Immunsystems, mit denen injizierte Promastigote in Kontakt kommen, einerseits Immunzellen der Haut wie residente Makrophagen und dendritische Zellen und andererseits das Komplementsystem sowie Immunzellen des Blutes, die durch Ausschüttung von Chemokinen zusätzlich zur Einstichstelle rekrutiert werden.

Das Komplementsystem ist in der Lage, extrazelluläre *Leishmania*-Stadien sehr effektiv abzutöten [131, 132]. Es wird angenommen, dass alle drei Wege der Komplementaktivierung beteiligt sind, wobei jedoch der alternative Weg der wichtigste ist [133]. Der entscheidende Schritt der Komplementaktivierung ist die Aktivierung des Komplementfaktors 3 (C3b), was zu der Rekrutierung weiterer Faktoren und Bildung des Membranangriffskomplexes mit nachfolgender Lyse der Leishmanien führt. Zum Überleben der *Leishmania*-Parasiten ist es daher essentiell, möglichst schnell in Zellen aufgenommen zu werden. Leishmanien sind nicht in der Lage, Zellen aktiv zu infizieren und werden nur passiv über Phagozytose aufgenommen. Um diesen Prozess zu beschleunigen, nutzen sie Komponenten des Komplementsystems. Hierbei spielen die beiden häufigsten Oberflächenantigene LPG (Lipophosphoglycan) und gp63 (eine Metalloprotease, auch Leishmanolysin genannt) von Promastigoten eine wichtige Rolle [134, 135]. Sie binden C3b auf der Parasitenoberfläche, was die Bindung an die Komplementrezeptoren 1 und 3 (CR1/3) auf Phagozyten begünstigt und die Phagozytose der Leishmanien beschleunigt [131, 136, 137]. Gp63 spaltet zudem C3b zu inaktivem C3bi, was zu einer Hemmung der Komplementvermittelten Lyse der Parasiten führt [138]. Hauptwirtszellen der Leishmanien sind daher professionelle Phagozyten wie z. B. Makrophagen, Monozyten, DCs und neutrophile Granulozyten. Nicht-phagozytierende Zellen wie T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen werden hingegen nicht infiziert.

Leishmanien verfügen über weitere Mechanismen, um die zelluläre Immunantwort des Wirts zu umgehen. In Makrophagen verzögern sie beispielsweise die Reifung von Phagosomen zu Phagolysosomen [139]. Dadurch bleibt genügend Zeit, sich nach der Aufnahme in die Wirtszellen in Amastigote umzuwandeln, die gegenüber den Bedingungen im Phagolysosom relativ resistent sind. Des Weiteren hemmen Leishmanien sowohl in Makrophagen als auch in DCs und Monozyten die Antigen-Präsentation [140-143] und die IL-12-Produktion [143, 144] und induzieren stattdessen die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF-β [145-147]. Neutrophile Granulozyten sind zwar in der Lage, extrazelluläre Leishmanien zu erkennen und sie über reaktive Sauerstoffmediate und die Ausbildung sogenannter

neutrophil extracellular traps (NETs) abzutöten [148, 149], haben aber auch negative Effekte auf die Immunabwehr. Intrazelluläre Leishmanien lösen in Granulozyten Apoptose aus. Diese apoptotischen Neutrophilen werden von Makrophagen aufgenommen und führen zu deren Infektion, ohne allerdings eine inflammatorische Reaktion der Fresszellen zu stimulieren. Die infizierten apoptotischen Neutrophilen agieren demnach als „Trojanisches Pferd“ und tragen auf diese Weise zu einer stärkeren Verbreitung der Parasiten bei [150, 151].
Im weiteren Verlauf der Infektion transportieren infizierte, aus Monozyten entstandene dendritische Zellen (Mo-DCs) [152, 153] oder residente Haut-DCs [154] die Parasiten zu den regionalen drainierenden Lymphknoten [155] und induzieren durch Produktion von IL-12 eine Leishmanien-spezifische T-Zell-Antwort [156]. Die Rolle von B-Zellen und Antikörpern bei Leishmanien-Infektionen ist umstritten. B-Zellen scheinen an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt zu sein [157]. Antikörper sind meist nur bei Patienten mit viszeraler Leishmaniose nachweisbar und vermitteln keinen Schutz gegen eine Infektion. Hohe Antikörpertiter sind hingegen sogar mit einem höheren Risiko der Progression von asymptomatischer zu klinischer Leishmaniose [158] bzw. Ausbildung einer chronischen Infektion [159] assoziiert.
Über unterschiedliche Mausmodelle konnten die Faktoren und Zelltypen ermittelt werden, die für die Kontrolle der Infektion benötigt werden. Dazu gehören IFN-γ-produzierende $CD4^+$ T-Helfer-Zellen des Typs 1 (Th1-Zellen) [156, 160, 161], die aus den Lymphknoten auswandern und im Bereich der Infektion akkumulieren [162]. Ein Überwiegen von Th2-Zellen sowie von IL-4, IL-10, IL-13 und TGF-β wird dagegen allgemein mit einer Progression statt einer Kontrolle der Infektion assoziiert [163-165]. Dies spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Krankheitsverläufen von *L. major*-infizierten C57BL/6-Mäusen und BALB/c-Mäusen wieder [166]. Während erstere eine Th1-dominierte Immunantwort zeigen und die Infektion kontrollieren können, zeigen BALB/c-Mäuse eine Th2-geprägte Reaktion mit progressivem, nichtheilendem Krankheitsverlauf. Durch Blockade von IL-4 [167] oder Gabe von IL-12 [168] kann auch bei diesen Mäusen eine Kontrolle der Infektion erreicht werden. Parallel dazu führt eine Behandlung von resistenten Mäusen mit anti-IL-12-Antikörpern [169] oder Überexpression von IL-4 [170] zu einer Progression der Erkrankung.
Zum Teil können diese Erkenntnisse aus dem Mausmodel auch auf den Menschen übertragen werden. So wurde beispielsweise in Biopsien von Patienten mit chronischer *L. mexicana*-Infektion ein höherer Gehalt an IL-10 und TGF-β nachgewiesen als bei akuter Infektion [171], wohingegen geheilte Patienten nach Restimulation mit Leishmanien-Antigen eine gesteigerte IL-12-Produktion zeigten [172]. Im Blut von Patienten mit akuter viszeraler Leishmaniose kann dagegen meist ein gemischtes Th1- (IFN-γ, TNF) und Th2- (IL-4, IL-10, TGF-β) assoziiertes Zytokin-Profil nachgewiesen werden [142, 173, 174]. Es wird daher angenommen, dass eine akute Leishmanien-Infektion nicht durch das Fehlen einer Th1-Immunantwort per se ausgelöst wird, sondern dieses durch anti-inflammatorische Zytokine

wie IL-10 unterdrückt wird [175-177]. Für diese These spricht auch, dass bei Patienten mit aktiver viszeraler Leishmaniose nach Stimulation von Blutleukozyten mit *Leishmania*-Antigen IL-10 produziert wird, während dies bei geheilten oder asymptomatischen Menschen nicht der Fall ist [175, 178, 179]. Stattdessen sind bei diesen Patientengruppen IFN-γ und IL-12 messbar [179, 180].

IFN-γ ist essentiell für die Kontrolle der Infektion, da es sowohl in murinen [181, 182] als auch in humanen [183-185] Makrophagen die Expression der induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase (iNOS) und die Produktion von TNF induziert, welches wiederum einen positiven Einfluss auf die iNOS-Expression hat [186, 187]. Auch andere Faktoren wie MIP-1α (*macrophage inflammatory protein 1*) und MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein 1*) unterstützen die iNOS-Induktion [188, 189]. Durch iNOS werden reaktive Stickstoffmediate produziert, die auf intrazelluläre Leishmanien direkt toxisch wirken [186, 187, 190, 191].

Obwohl die meisten immunkompetenten Wirte die Infektion kontrollieren können, kommt es doch zu einer lebenslangen Persistenz der Erreger [192-195]. Dies wird einerseits durch Infektion von „sicheren" Zielzellen, wie Hepatozyten, Fibroblasten und myeloiden Vorläuferzellen, welche die Parasiten nicht abtöten können [196-198], und andererseits durch eine IL-10-Produktion über regulatorische T-Zellen (T_{reg}) erreicht [190, 199-201].

1.4 Rolle von NK-Zellen bei muriner und humaner Leishmaniose

Nach der Infektion von Mäusen mit *L. major* (CL) oder *L. infantum* (VL) kommt es innerhalb der ersten 24 h zu einer Akkumulation von aktivierten, zytotoxischen und IFN-γ produzierenden NK-Zellen in der Haut und in der T-Zell-reichen Zone von Lymphknoten oder Milz [5, 202-204]. Wenn NK-Zellen vor der Infektion im Wirtstier depletiert werden, kommt es zu einer schwerer verlaufenden Erkrankung, und die Parasitenlast in den befallenen Organen ist höher als in unbehandelten Tieren [205, 206]. Zudem können die Parasiten nicht lokal über Immunreaktionen begrenzt werden und disseminieren in Folge [207]. NK-Zellen vermitteln im Mausmodell daher in der frühen Phase der Infektion (bevor eine adaptive T-Zell-Antwort generiert wird) einen protektiven Effekt, obwohl sie für die letztendliche Kontrolle der Infektion nicht essentiell sind [208, 209]. Mittels verschiedener gendefizienter Mausstämme und über den Einsatz blockierender Antikörper konnte gezeigt werden, dass die NK-Zellen nicht direkt durch den Parasiten aktiviert werden, sondern verschiedene indirekte Signale von anderen Zellen benötigen. Ein unverzichtbarer Faktor ist hierbei IL-12, das nach der Erkennung genomischer Parasiten-DNA durch TLR9 im phagosomalen Kompartiment von DCs produziert wird [5, 156, 210]. IL-2, das von Antigen-spezifischen T-Zellen gebildet wird, fungiert bei der NK-Zell-Aktivierung hingegen nur als verstärkendes Ko-Signal [205, 211]. Bei der viszeralen Leishmaniose der Maus wird neben IL-2 auch IL-18 benötigt, um eine maximale NK-Zell-Antwort auszulösen [212]. Bei der kutanen Leishmaniose der Maus konnte hingegen gezeigt

werden, dass auch IFN-α/β für die vollständige Aktivierung von NK-Zellen erforderlich ist [213]. Diese so aktivierten NK-Zellen zeigen zwar eine gesteigerte Zytotoxizität, die sich ex vivo in Kokulturen mit Tumorzellen nachweisen lässt, können jedoch *Leishmania*-infizierte Wirtszellen weder in vitro noch in vivo in C57BL/6-Mäusen als Zielzellen erkennen. Folglich werden diese auch nicht direkt durch NK-Zellen abgetötet. Der schützende Effekt von NK-Zellen wird vielmehr über die Produktion von IFN-γ vermittelt [214]. Dieses führt einerseits zu einer sehr frühen Induktion von iNOS in infizierten Makrophagen und damit zur Senkung der initialen Parasitenlast und unterstützt andererseits die Ausbildung einer protektiven Th1-Immunantwort. Die Aktivierung von NK-Zellen im Leishmanien-Mausmodell ist auch in der nachfolgenden Abbildung E2 dargestellt.

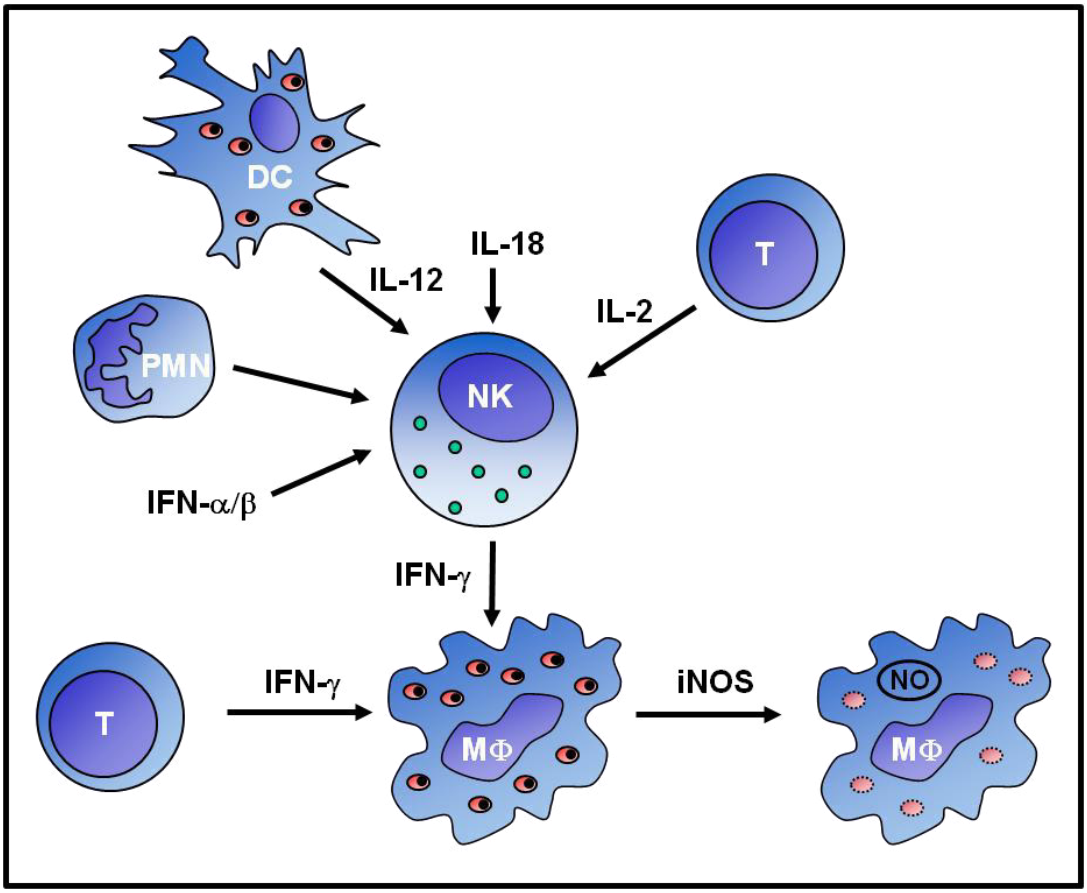


Abbildung E2: Aktivierung und Funktion von NK-Zellen in experimenteller muriner *Leishmania*-Infektion
In *Leishmania*-infizierten Mäusen werden Natürliche Killer-Zellen durch unterschiedliche akzessorische Zellen (DC, PMN, T-Zellen) und Zytokine (IL-12, IL-18, IL-2, IFN-α/β) aktiviert und produzieren in Reaktion IFN-γ. Dies führt zur gesteigerten Produktion von NO in infizierten Makrophagen und zur Abtötung der intrazellulären Parasiten.
Die Abbildung wurde modifiziert übernommen von Bogdan C, 2012 [215].

Welchen Beitrag NK-Zellen bei einer Leishmanien-Infektion im humanen System leisten, ist letztendlich noch unklar. Die diesbezüglich publizierten Daten sind teils widersprüchlich. Grundsätzlich scheinen NK-Zellen, ähnlich wie im Mausmodell, einen protektiven Effekt zu haben, da beispielsweise Patienten mit akuter viszeraler Leishmaniose (*L. donovani*) eine

reduzierte NK-Zell-Zahl im peripheren Blut aufwiesen, der sich nach erfolgreicher Therapie wieder normalisierte [216]. In anderen Untersuchungen wurde dagegen keine Veränderung der Anzahl, jedoch eine verringerte NK-Zell-Zytotoxizität bei *Leishmania*-Infektionen nachgewiesen [217, 218]. Weiterhin konnte bei *L. mexicana*-infizierten Patienten ein Zusammenhang zwischen der NK-Zell-Aktivität und dem Auftreten einer lokal begrenzten bzw. diffusen kutanen Leishmaniose (LCL, DCL) gezeigt werden. Dabei waren bei Patienten mit diffuser kutaner Symptomatik sowohl im peripheren Blut als auch in den eigentlichen Läsionen weniger NK-Zellen nachweisbar, und sie zeigten im Vergleich zu NK-Zellen von Patienten mit lokal begrenzter kutaner Leishmaniose eine geringere IFN-γ und TNF-Produktion [219].

Der Beitrag von NK-Zellen in der frühen Phase der Infektion kann aus offensichtlichen Gründen im humanen System nur in vitro untersucht werden. Der Mechanismus, über den hier eine Aktivierung der NK-Zellen erfolgt, ist nicht gesichert. Aus der Mehrzahl der Publikationen geht hervor, dass wie im Mausmodel akzessorische Zellen und Zytokine notwendig sind, da eine IFN-γ-Produktion und/oder Proliferation von NK-Zellen nach Stimulation mit Leishmanien nur bei Verwendung der Gesamtpopulation peripherer mononukleärer Zellen des Blutes (PBMCs) [220, 221], in Anwesenheit von Monozyten [222, 223] oder nach IL-12- [220] oder IL-2-Zugabe [224] beobachtet wurden. Andererseits war in einer Reihe von Studien eine NK-Zell-Aktivierung nur bei einigen Spendern oder gar nicht nachweisbar [225-227]. Es ist auch noch unklar, welche parasitären Moleküle für eine NK-Zell-Aktivierung nötig sind. Lebende Promastigote hatten einen besseren Effekt als hitzeinaktivierte Parasiten [228, 229], während die Daten zur Verwendung eines *Freeze-thaw*-Lysats teils widersprüchlich waren [220, 222, 223, 230]. Als eines der Parasitenmoleküle, die die NK-Zell-Antwort stimulieren, konnte das Leishmanien-Antigen LACK (*Leishmania* Homolog der Rezeptoren der aktivierten C-Kinase, ein Plaminogen-bindendes Protein) identifiziert werden. In PBMC-Kulturen induzierte es in Abhängigkeit der MHCII-Expression die IFN-γ -Produktion humaner NK-Zellen [222]. Des Weiteren wurden auch LPG [231] und gp63 [224] als NK-Zell-aktivierende Moleküle beschrieben.

Im Unterschied zum Mausmodell, in dem die Aktivierung von NK-Zellen ausschließlich indirekt über Zytokine von akzessorischen Zellen erfolgt, und im Gegensatz zu den oben aufgeführten humanen Daten wird außerdem beschrieben, dass humane NK-Zellen direkt durch Leishmanien aktiviert werden können. Als auslösende Mechanismen werden sowohl LPG-abhängige [231] als auch TLR2-vermittelte oder LPG/LACK-unabhängige Reaktionen genannt [229]).

1.5 **Fragestellung**

Basierend auf den bisherigen Daten zur Aktivierung und Funktion der NK-Zell-Antwort im Maussystem war es Ziel dieser Arbeit, die Erkenntnisse zur *Leishmania*-induzierten NK-Zell-Antwort für das Humansystem zu überprüfen. In Anlehnung an das bereits verwendete Mausmodell wurde dazu mit bis zu 24 Stunden p. i. ein früher Zeitraum nach Infektion für die Analysen gewählt.

Da die bisher veröffentlichten Daten zur Aktivierung und Effektorantwort von humanen NK-Zellen nach Stimulation mit *Leishmania* spp. zum Teil recht widersprüchliche Resultate beschreiben, sollte in dieser Arbeit über geeignete in vitro-Systeme unter Verwendung von reinen NK-Zell-Populationen von Spendern, die nie zuvor mit Leishmanien in Kontakt gekommen waren, folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

- Kann die direkte Konfrontation mit *Leishmania*-Parasiten humane NK-Zellen zu einer Effektorantwort stimulieren?
- Sind für das Auslösen einer NK-Zell-Antwort zusätzliche Signale von akzessorischen Zellen notwendig?
- Welche molekularen Mechanismen liegen der NK-Zell-Aktivierung über *Leishmania*-Parasiten im humanen System zugrunde?
- Gibt es *Leishmania*-Spezies-abhängige Unterschiede in der NK-Zell-Aktivierung (v. a. kutane vs. viszerotope Spezies)?
- Lassen sich die in vitro generierten Daten zu Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung über das humanisierte Mausmodell in vivo verifizieren?

Das langfristige Ziel des Dissertationsvorhabens war es, den exakten Mechanismus der Aktivierung von NK-Zellen in der humanen Leishmaniose zu identifizieren. Die Kenntnis der für die Aktivierung wichtigen Faktoren kann sowohl bei der Entwicklung eines humanen Impfstoffes als auch bei der Verbesserung der Leishmaniose-Therapie (vor allem bei der viszeralen Leishmaniose) von Nutzen sein.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 PARASITEN

Spezies	Stamm	Beschreibung
L. infantum	MHOM/DE/1998/LUB1	isoliert aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter viszeraler Leishmaniose
	MHOM/DE/2012/VA21737	isoliert aus einem Knochenmarkspunktat eines Patienten mit akuter viszeraler Leishmaniose
	MHOM/DE/2014/VA20763	isoliert aus einer Hautbiopsie eines Patienten mit kutaner Leishmaniose
	MCAN/ES/2010/BON	isoliert aus dem peripheren Blut eines Hundes mit viszeraler Leishmaniose
L. major	MHOM/IL/1981/FEBNI	isoliert aus einem Patienten mit kutaner Leishmaniose
L. mexicana	MNYC/BZ/1962/M379	isoliert aus einer Vesperratte
L. donovani	MHOM/SD/1962/1SCL2D ("bob")	isoliert aus einem Patienten mit viszeraler Leishmaniose

Sofern nicht anders vermerkt, wurde in den Experimenten der *L. infantum*-Stamm MHOM/DE/98/LUB1 verwendet.

Von *L. infantum*-, *L. mexicana*- und *L. donovani*-Promastigoten wurden mehrere Aliquots derselben Charge in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Vergleichbarkeit der Parasiten in den verschiedenen Experimenten zu gewährleisten, wurde alle 1-2 Monate ein neues Aliquot frisch aufgetaut. Die Vermehrung erfolgte ausschließlich in komplettem Leishmanien-Kulturmedium (substituiertes Schneider's Drosophila Medium). *L. major*-Parasiten wurden für 5-6 Passagen auf Novy-McNeil-Nicolle Blut-Agar vermehrt. Zur Aufrechterhaltung ihrer Infektiosität wurden sie danach in einer BALB/c-Maus passagiert, bevor sie wieder in vitro vermehrt wurden. Alle 2-3 Wochen wurden die Parasiten von der Blutagarplatte in Leishmanien-Kulturmedium überführt und dort weitervermehrt.

Das für die Kultur der Leishmanien benutzte Medium wurde regelmäßig auf seinen Lipopolysaccharid (LPS)-Gehalt mittels eines kolorimetrischen LPS-Assays (Lonza) untersucht. Während des Studienzeitraums lag der mittlere Gehalt bei 16,2 pg/ml.

2.1.2 **MÄUSE**

Maus-linie	**Originalbezeichnung**	**Genetischer Hinter-grund**	**Referenz**	**Herkunft**
NSG	NOD/SCID/IL-2Rg^{null}	C.B-17 x 129S4/SvJae	[232]	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

Die Original-Zuchtpaare wurden von Jackson Laboratory bezogen und im Franz-Penzoldt-Zentrum, der zentralen Versuchstierhaltungseinrichtung des Universitätsklinikums Erlangen, vermehrt und gehalten. Die Haltung erfolgte unter SPF (*specific pathogen-free*)-Bedingungen in individuell ventilierten Käfigen. Das Versuchsvorhaben wurde im Tierversuchsantrag Nummer 54-2532.1-54/13 beantragt und genehmigt.

2.1.3 **ZELLLINIEN**

Zelllinie	**Zelltyp**	**Organismus**	**Herkunft**
K562	chronische myeloische Leukämie	Mensch	ATCC, Manassas, USA

2.1.4 **ANTIKÖRPER/ ANTISEREN**

Antigen	**Spezifikation**	**Markierung; Arbeitslösung**	**Hersteller**
Durchflusszytometrie			
CD3	Maus anti-Human, Klon: OKT3, Isotyp: Maus IgG2a,κ	FITC, 1:200 PerCP-Cy5.5, 1:200 Biotinyliert, 1:200	eBioscience/ Affymetrix, Frankfurt, Deutschland BioLegend, Fell, Deutschland
CD11b	Maus anti-Human, Klon: ICRF44, Isotyp: Maus IgG1,κ,	V450, 1:200	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD11c	Maus anti-Human, Klon: 3.9, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PerCP-efluor®710, 1:100	eBioscience/ Affymetrix
CD14	Maus anti-Human, Klon: 61D3, Isotyp: Maus IgG1,κ,	FITC, 1:50	eBioscience/ Affymetrix
CD16	Maus anti-Human, Klon: CB16, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PerCP-efluor®710, 1:200 eFluor® 450, 1:200	eBioscience/ Affymetrix
CD19	Maus anti-Human, Klon: HIB19, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PE, 1:25, eFluor®450, 1:100	BioLegend eBioscience/ Affymetrix
CD25	Maus anti-Human, Klon: BC96, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PE-Cy7, 1:50	eBioscience/ Affymetrix, Bio-Legend
CD45	Maus anti-Human, Klon: 2D1 Isotyp: Maus IgG1,κ,	PerCp, 1:200	Dako/ Agiland Technologies, Glostrup, Dänemark
CD56	Maus anti-Human,	PE-Cy7, 1:200	eBioscience/ Affymetrix

(NCAM)	Klon: CMSSB, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PE-Cy5.5, 1:200 APC, 1:200	
CD56 (NCAM)	Maus anti-Human, Klon: MEM-188, Isotyp: Maus IgG2a,κ,	APC, 1: 50	BioLegend
CD56 (NCAM)	Maus anti-Human, Klon: HCD56, Isotyp: Maus IgG1,κ,	APC, 1:200	BioLegend
CD69	Maus anti-Human, Klon: FN50, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PerCP-Cy5.5, 1:100	BioLegend
CD80	Maus anti-Human Klon: 2D10, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PE, 1:100	BioLegend
CD83	Maus anti-Human, Klon: HB15e, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PE, 1:100	BioLegend
CD86	Maus anti-Human, Klon: IT2.2, Isotyp: Maus IgG2b,κ,	APC, 1:100	BioLegend
CD192 (CCR2)	Maus anti-Human, Klon: K036C2, Isotyp: Maus IgG2a,κ,	PE-Cy7, 1:100 PerCP-Cy5.5, 1:100	BioLegend
CD335 (NKp46)	Maus anti-Human, Klon: 9E2, Isotyp: Maus IgG1,κ,	PE, 1:100	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD336 (NKp44)	Maus anti-Human, Klon: P44-8, Isotyp: Maus IgG1,κ,	APC, 1:50	BioLegend
CD337 (NKp30)	Maus anti-Human, Klon: P30-15, Isotyp: Maus IgG1,κ ,	APC, 1:100	BioLegend
HLA-DR (MHC II)	Maus anti-Human, Klon: TL243, Isotyp: Maus IgG2a,κ,	FITC, 1:100	BioLegend
<u>Antikörper-vermittelte Molekülblockade</u>			
IFN-α	Schaf anti-Human, Serum	1:350 (10 000 neutralisie- rende Units [nU]/ml)	National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA
IFN-α <u>Kontrolle</u>	Schaf anti-Human, Serum	1:350	NIH
IFN-β	Schaf anti-Human, Serum	1:3 (1000 nU/ml)	NIH
IFN-β <u>Kontrolle</u>	Schaf anti-Human, Serum	1:3	NIH
IL-1β	Maus anti-Human, *functional grade purified*, Klon: CRM56, Isotyp: Maus IgG1,κ	1:100 Stock: 1 mg/ml final: 10 µg/ml	eBioscience/ Affymetrix
IL-2	Maus anti-human, *functional grade purified*, Klon: AB12-3G4, Isotyp: Maus IgG2a,κ,	1:1000 Stock: 1 mg/ml final: 1 µg/ml	eBioscience/ Affymetrix
IL-6	Ratte anti-Human, *LEAF-purified*, Klon: MQ2-13A5, Isotyp: Ratten IgG1,κ,	1:200 Stock: 1 mg/ml final: 5 µg/ml	BioLegend
IL-12/IL-23 (p40)	Maus anti-Human, *LEAF-purified*, Klon: C11.5,	1:50 Stock: 1 mg/ml final: 20 µg/ml	BioLegend

	Isotyp: Maus IgG1,κ,		
IL-15	Maus anti-Human , *functional grade purified*, Klon: ct2n, Isotyp: Maus IgG1,κ,	1:1000 Stock 1 mg/ml final: 1 µg/ml	eBioscience/ Affymetrix
IL-18	Maus anti-Human, Klon: 125-2H, Isotyp : Maus IgG1,κ	1:667 Stock 1 mg/ml final: 1,5 µg/ml	MBL, Woburn, USA
Isotyp-Kontrollantikörper			
Maus IgG1,κ	Klon: P3.6.2.8.1	eFluor450, 1:100 PE, 1:100	eBioscience/ Affymetrix
Maus IgG1,κ	Klon: MOPC	PerCP-Cy5.5, 1:100 APC, 1:100 PE-Cy7, 1:100	BioLegend
Maus IgG1,κ	*LEAF-purified*, Klon: MOPC-21,	1:100 Stock: 1mg/ml final: 10 µg/ml	BioLegend
Maus IgG2a,κ	Klon: G155-178	FITC, 1:100	BD Bioscience
Ratten IgG1,κ	Klon: eBRG1	APC, 1:100	eBioscience/ Affymetrix
Immunfluoreszenzfärbung			
NKp46	Maus anti-Human, *purified* Klon: 195314, Isotyp: Maus IgG2b,	1:50, 500 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
CD56 (NCAM)	Maus anti-Human, *purified* Klon: MEM-188, Isotyp: Maus IgG2a,k,	1:50	BioLegend
Leishmania	humanes Serum eines Patienten (LUB) mit viszeraler Leishmaniose	1:50	eigene Herstellung
IL-18	Maus anti-Human, Klon: 125-2H, Isotyp : Maus IgG1,κ	1:200	MBL
Zweit-Antikörper			
Ziegen IgG (H+L) *Affinity Purified* $F(ab')_2$ Fragment	Ziege anti-Maus	Alexa Fluor 568, 1:100	Invitrogen/ Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
		Alexa Fluor 488 1:50	Jackson Immuno Research, Newmarket, UK
ELISA			
IFN-γ (Fänger-Ak)	Maus anti-Human, *purified*, Klon: NIB42, Isotyp: Maus IgG1,κ,	1:300	BioLegend
IFN-γ (Detektions-Ak)	Maus anti-Human, Klon: 4S.B3, Isotyp: Maus IgG1,κ,	Biotinyliert, 1:300	BioLegend
MACS-Isolierung			
CD14	Maus anti-Human *Micro Beads*		Miltenyi Biotech

2.1.5 **ZYTOKINE UND STIMULANZIEN**

Bezeichnung	**Verdünnungsfaktor, Konzentration der Stocklösung, finale Konzentration im Versuch**	**Hersteller**
rekombinantes humanes (rh) GM-CSF	1:200, Stock: 100 000 U/ml, final: 50 U/ml	PeproTech, Hamburg, Deutschland
hu IFN-α (Namalwa/ Sendai)	1:50, Stock 5000 U/ml, final: 100 U/ml	NIH
hu IFN-β	1:150, Stock: 15 000 U/ml, final: 100 U/ml	NIH
rhu IL-1β	1:500, Stock: 10 µg/ml, final: 20 ng/ml	PeproTech
rh IL-2	1:20 000, Stock: 4 x 10^6 U/ml, final 200 U/ml	Chiron, Emeryville, USA
rh IL-4	1:1000, Stock: 250 000 U/ml, final: 250 U/ml	PeproTech
rh IL-6	1:1000, Stock 10 µg/ml, final: 10 ng/ml	BioLegend
rhu IL-8	1:1000, Stock: 10 µg/ml, final: 10 ng/ml	BioLegend
rhu IL-12 (p70)	1:1000, Stock: 10 µg/ml, final: 10 ng/ml	PeproTech
rhu IL-15	1:833, Stock: 1 µg/ml, final: 12 ng/ml	PeproTech
rhu IL-18	1:1000, Stock: 10 µg/ml, final: 10 ng/ml	MBL
rhu MIP-1α	1:500, Stock: 10 µg/ml, final: 20 ng/ml	BioLegend

2.1.6 **GERÄTE**

Produkt	**Hersteller**
Abzug	Köttermann Labortechnik, Hänigsen, Deutschland
Bestrahlungsgerät BIOBEAM 2000 S/N 035	Gamma-Service Medical GmbH, Leipzig Deutschland
Brutschränke • BBD6220 (37°C) • Hera cell 240 (28°C)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCanto™ II, Software FACSDiva™ 6.1.2	BD Biosciences
ELISA Reader SpectraMax® 340PC384, Software SoftMax® Pro 5.4	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
MACS® Multistand mit Magneten QuadroMACS™, OctoMACS™	Miltenyi Biotech
MAGPIX® mit xPONENT® Software	Luminex, Austin, ÜSA
Mikroskope • Auflichtmikroskop Axiovert 40C, 10x Okular • Durchlichtmikroskop Axioskop 40, 10x Okular mit AxioCam ICC1, Software Axiovision 4.6 • Laser Scanning Mikroskop (CLSM) 700 mit Zen 2009 Software • Axiophot, 40x Okular	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
NanoDrop™ 1000	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Neubauer-Zählkammer • Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm^2 • Tiefe 0,02 mm, Fläche 0,0025 mm^2	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Thermocycler • Veriti® 96 well Thermal Cycler • GeneAmp® PCR System 9700 • quantitative, real-time: ABI Prism® 7900 HT	Applied Biosystems/ life, Darmstadt, Deutschland
pH meter inoLab® pH720	WTW, Weilheim, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipetten • Pipetman Classic™ • Eppendorf Research®	 Gilson Inc., Middleton, USA Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Stepper Multipette® plus	Eppendorf
Sterilbänke • Herasafe • Microflow Biological safety cabinet	 Thermo Scientific Nalgene Nunc International/ Thermo Scientific
Taumler Polymax 2040	Heidolph Labortechnik, Schwabach, Deutschland
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf
Thermorührer RTC classic	IKA Werke, Staufen, Deutschland
TopCount NXT Microplate Gamma Counter	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Vortex MS1 Minishaker	IKA Werke
Waage TE1502S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbäder • Julabo TW12 • Thermomix BU	 Julabo, Seelbach, Deutschland B. Braun, Melsungen, Deutschland
Zellsorter Aria™ II	BD Biosciences
Zentrifugen • Minifuge Galaxy Mini • Tischzentrifuge 5417R • Multifuge 3SR+	 VWR, Darmstadt, Deutschland Eppendorf Heraeus

2.1.7 **VERBRAUCHSMATERIALIEN**

Produkt	**Hersteller**
Adhäsions-Objektträger, 12x 50 mm Ø Reaktionsfeld	Marienfeld Laboratory Glassware
ELISA-Platten, • Rundboden Vinyl • Maxisorp™	Nunc/ Thermo Scientific
FACS-Röhrchen • 1,2 ml Microtubes PS • 5 ml PS • Falcon® 5 ml PP steril	 Starlab, Hamburg, Deutschland Sarsted, Nümbrecht, Deutschland Corning, Wiesbaden, Deutschland
Falcon® PP conical tube 15 ml, 50 ml	Corning
Filter • CellTrics®, 30 und 50 µm • Millex®-GV Sterilfilter, 0,22 µm	 Sysmex Partec, Görlitz, Deutschland Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe semper care® nitrile skin^2	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Haut-Desinfektionsmittel CutaSept® F	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Immersionsöl Immersol™ 518N	Carl Zeiss
Kanülen Microlance™ 27G, 20G	BD Biosciences
LUMA-Platte (zur Messung von radioaktiven Überständen)	Perkin Elmer
MACS® Säule: Größe LS und MS	Miltenyi Biotech
Objektträger • Superfrost Ultra Plus • StarFrost®, adhesive slides	 Thermo Scientific Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße, 0,2 ml mit gewölbtem Deckel	Thermo Scientific
Pipetten Costar® Stripette 5, 10, 25 ml	Corning

Pipettenspitzen bis 1000 µl ungestopft: TipOne® gestopft: Biosphere®	 Starlab Sarsted
QIAshredder™ Säulen	QUIAGEN, Hilden, Deutschland
qPCR 384 well Platte	Applied Bioscience/ Life
qPCR Klebefolie Seal ABsolute™	Thermo Scientific
Safety multifly-Kanüle 20G, 21G	Sarsted
S-Monovette® • 9 ml, mit 1,6 mg EDTA/ml Blut • 7,5 ml Serum	Sarsted
Spritzen Discardit™ II 10 ml, 5ml, 2 ml Soft-Ject® 1ml	 BD Biosciences Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Stepper-Spitzen Combitips plus 1 ml, 5 ml, 25 ml	Eppendorf
Transwell-Einsatz 3470-Clear, 6,5 mm Durchmesser, 0, 4 µm Porengröße	Corning
Zelletten Zellstofftupfer	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Zellkultur-Flaschen 25, 75, 175 cm^2	Nunc/ Thermo Scientific
Zellkultur-Petrischalen 60, 100 mm Ø	Nunc/ Thermo Scientific
Zellkulturplatten • 96 well Nunclon™ Delta surface Microwell Flachboden/ Rundboden • 48 well Cellstar® Flachboden • 24 well Cellstar® Flachboden/ Rundboden	Nunc/ Thermo Scientific Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

2.1.8 **KITS**

Produkt	**Hersteller**
DNase Treatment & Removal Kit	Ambion/ Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
HAEMA-Schnellfärbung	LABOR+TECHNIK, Eberhardt Lehmann GmbH
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems/ life
Human IFN-γ ELISA MAX™ Standard Set	BioLegend
Human IL-2 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience/ Affymetrix
Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go! ®	eBioscience/ Affymetrix
Human IL-10 ELISA MAX ™ Standard Set	BioLegend
Human IL-12/IL-23 (p40) ELISA MAX ™ Standard Set	BioLegend
Human IL-18 Matched Antibody Pairs	eBioscience/ Affymetrix
QCL-1000 Chromogenic LAL-Test (Endotoxin-Nachweis)	Lonza, Verviers, Belgien
Monocyte Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotech
NCAM1 (CD56) Human ELISA Kit	abcam, Cambridge, UK
ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay: Human Cytokine/ Chemokine/ Growth Factor Panel 1 (45 plex)	eBioscience/ Affymetrix
RNeasy® MiniKit	QUIAGEN
StreptABComplex (HRP)	Dako/ Agilent Technologies
TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG	Applied Biosystems/ life
VectaStain® ABC-Peroxidase Standard-Kit	Vector Laboratories, Peterborough, UK

2.1.9 **REAL-TIME PCR EXPERIMENTE**

Es wurden folgende vorgefertigte TaqMan® PCR-Assays verwendet:

Assay Name	**Hersteller**
CD69 (Hs00924033_m1)	Life/ Thermo Scientific
GAPDH (Hs02758991_g1)	Life/ Thermo Scientific
IFN-γ (Hs00989291_m1)	Life/ Thermo Scientific
NCAM1 (CD56) (Hs00941830_m1)	Life/ Thermo Scientific

2.1.10 **MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN**

Alle Puffer und Lösungen wurden mit käuflich erworbenem, endotoxin-, RNase- und DNase-freiem Reinstwasser (Biochrom) oder mit Wasser hergestellt, das mit Hilfe eines MilliQ-Systems (Millipore GmbH, Schwabach, Deutschland) deionisiert (elektrischer Widerstand > 18 MegaΩ) und regelmäßig auf seine Endotoxin-Freiheit (<10 pg/ml) überprüft wurde. Wenn nötig, wurde die Sterilität durch Autoklavieren oder Filtration über einen Steril-Filter mit 0,22 µm Porengröße sichergestellt. Die Lagerung erfolgte entweder bei -20° C, 4° C oder bei Raumtemperatur.

PBS, Dulbecco w/o Ca^{2+} und Mg^{2+}	9,55 g/l in ddH_2O
Wasch-Puffer für humane Primärzellen	• 1 mM EDTA in PBS
NH_4Cl-Puffer (Erythrozytenlyse)	• 0,17 N NH_4Cl • 20 mM HEPES in ddH_2O
Komplettes Zellkulturmedium für primäre humane Zellen	RPMI-1640 (Gibco/ life, mit 300 mg/l Glutamin, 2000 mg/l D-Glucose • 10 mM HEPES • 50 µM 2-ME • 100 U/ml Penicillin G • 100 µg/ml Streptomycin • 10 % hitze-inaktiviertes autologes Plasma
Komplettes Zellkulturmedium für K562-Zellen	analog zu primären humanen Zellen, nur mit 10 % hitze-inaktiviertem FCS statt autologem Plasma
Differenzierungsmedium für DCs	Komplettes Zellkulturmedium für primäre humane Zellen mit • 250 U/ml rhu IL-4 • 50 U/ml rhu GM-CSF
Bicarbonat-Puffer (zum „Coaten“ für IL-12-ELISA)	• 100 mM $NaHCO_3$ • 30 mM Na_2CO_3 in ddH_2O
ELISA Blockierpuffer	10 % FCS in PBS
ELISA Waschpuffer	0,05 % Tween-20 in PBS
Tris-Puffer für ELISA	• 50 mM Tris in ddH_2O, eingestellt auf pH 7,5 mit HCl
FACS-Puffer	1 % FCS in PBS
Saponin-Puffer	• 0,5 % (w/v) Saponin • 2 % FCS in PBS

Sort-Puffer	• 2 mM EDTA • 10 % autologes Plasma (hitze-inaktiviert) in PBS
MACS-Puffer	• 1 mM EDTA • 0,5 % autologes Plasma (hitze-inaktiviert) in PBS
Aminosäure-Antibiotika-Pyruvat-(AAP)-Lösung 25x	• 2500 U/ml Penicillin G • 2,5 mg/ml Streptomycin • 25 mM Natrium-Pyruvat • 50 mM L-Glutamin • 25 % DMEM (ohne Phenolrot) • 6,8 mM L-Asparagin • 13,8 mM L-Arginin in ddH_2O
Komplettes Leishmanien-Kultur-Medium	Schneider's Drosophila Medium, eingestellt auf einen pH von 6,9 mit $NaHCO_3$, $CaCl_2$, NaOH und HCl, sterilfiltriert; supplementiert mit • 4 % AAP Lösung, 25 x • 10 % FCS • 10 mM HEPES • 2 % (v/v) humaner Urin (sterilfiltriert)

2.1.11 **CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN**

Produkt	**Hersteller**
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Fluka Analytical/ Sigma-Aldrich München, Deutschland
Biocoll Trennlösung 1,077 g/ml	Biochrom/ Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (Albuminfraktion V)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Carl Roth
CellFIX (FACS Fix)	BD Biosciences
Cell Proliferation Dye eFluor® 670 (Verdünnung 1:500)	eBioscience/ Affymetrix
Chromium-51, spezifische Aktivität 400-1200 Ci/g	PerkinElmer
Cytofix/ Cytoperm™	BD Biosciences
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Verdünnung 1:300)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/ Life, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Traufkirchen, Deutschland
Fixable Viability Dye (eFluor® 506, Verdünnung 1:1000)	eBioscience/ Affymetrix
GolgiStop™	BD Biosciences
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Humanes Serumalbumin (HSA), Endotoxin-frei	Pentex/ Miles, Kamkakee, USA
Human TruStain FcX™ (Verdünnung 1:20)	BioLegend
Isopropanol	Carl Roth
L-Arginin	Sigma-Aldrich
L-Asparagin	Sigma-Aldrich
Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich
Methanol (MeOH)	Carl Roth
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Carl Roth
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich

Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (Dulbeco's PBS, w/o Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom/ Merck-Millipore
Red Blood Cell Lysis Buffer	Sigma-Aldrich
Reinstwasser, steril, geeignet für HPLC	Biochrom/ Merck-Millipore
Salzsäure (HCl)	Carl Roth
Saponin	Carl Roth
Schneider's Drosophila Insekten Medium mit Glutamin	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland Sigma-Aldrich
Schwefelsäure (H_2SO_4), 95-85 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin • APC-konjugiert, Verdünnung 1:500 • FITC-konjugiert, Verdünnung 1:1000	 BD Biosciences BioLegend
Tetramethylbenzidin (TMB)	Alfar Aesar, Karlsruhe, Deutschland BD Biosciences
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth
Trypanblau, 0,4 % (v/v)	Sigma-Aldrich
Tween-20	Merck-Millipore
Vectashield® Eindeckmedium (ohne DAPI)	Vector Laboratories
Ziegen-Serum	Sigma-Aldrich

2.2 **Methoden**

2.2.1 **AUSWAHL DER BLUTSPENDER**

Als Blutspender wurden gesunde weibliche und männliche Erwachsene (18 ♀, 8 ♂) im Alter zwischen 24 und 57 Jahren ausgewählt. Es handelte sich dabei vor allem um Mitarbeiter des Mikrobiologischen Instituts, die alle vorab über den Zweck der Blutentnahme informiert worden waren und dieser ausdrücklich zugestimmt hatten (Ethikantrag 112_12B). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme zeigten sie keinerlei Zeichen akuter Infektionen. Eine vorhandene Infektion mit Leishmanien wurde durch Anamnese und über das Fehlen *Leishmania*-spezifischer Antikörper im Blut mittels Immunfluoreszenz (*Leishmania*-IgG Immunfluoreszenz-Test, IFT siehe 2.2.2.14) ausgeschlossen.

2.2.2 **ZELLBIOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN**

Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die meisten Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C, 420 × g für 10 min durchgeführt. Abweichungen hiervon sind bei den ausführlichen Methodenbeschreibungen aufgeführt. Die *Leishmania*-Parasiten wurden bei 28 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit in komplettem Schneider's Medium kultiviert. Die Zentrifugation wurde standardmäßig bei 4 °C, 3400 × g für 10 min durchgeführt und die Parasiten vor Verwendung mindestens zweimalig mit PBS gewaschen. Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen und Parasiten wurden diese mittels Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer manuell ausgezählt.

2.2.2.1 Fixierung von Leishmanien, Leishmanien-Lysat

Neben lebenden Promastigoten wurden auch fixierte Promastigote und Leishmanien-Lysat verwendet. Die Fixierung der Promastigoten erfolgte mit 4 %igem Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Leishmanien auf dieselbe Konzentration eingestellt wie lebende Promastigoten, die zum Vergleich in jedem Experiment mitgeführt wurden. Zur Herstellung des Leishmanien-Lysats (*Freeze-thaw*-Lysat, *Ft*-Lysat) wurden die Parasiten auf dieselbe Konzentration eingestellt, die auch für lebende Promastigote im Versuch verwendet wurde, und dann zur Zerstörung der Zellmembran viermalig einem Einfrier-Auftau-Prozess unterworfen (Einfrieren bei -80°C gefolgt von einer langsamen Auftauphase bei Raumtemperatur). Dazwischen wurden die Parasiten gründlich gemischt (Vortex).

2.2.2.2 Gewinnung von humanem peripherem Blut

Den Spendern wurde mit einer Flügelkanüle (20G/21G) zwischen 18 und 135 ml Blut aus der *Vena mediana cubiti* entnommen, in sterilen 9 ml EDTA-Röhrchen aufgefangen und innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet.

2.2.2.3 Gewinnung von sterilem autologem Plasma

Das EDTA-Blut wurde zentrifugiert und die obere Phase bis auf 1 ml Überstand zur unteren Phase abgenommen. Das so gewonnene Plasma wurde zum Inaktivieren von Enzymen im Wasserbad für 30 min auf 56 °C erhitzt und anschließend bei 4 °C, 3400 × g für 10 min zentrifugiert. Die flüssige Phase des Plasmas wurde gewonnen und über einen Sterilfilter mit 0,22 µm Porenweite filtriert. Das autologe Plasma des jeweiligen Spenders wurde als physiologische Proteinquelle allen Zellkulturmedien für humane Zellen in einer Konzentration von 10 % hinzugefügt.

2.2.2.4 Aufreinigung von humanen Leukozyten aus peripherem Blut

Nach Abnahme des Plasmas (siehe 2.2.2.3) wurde das Blut mit PBS/1 mM EDTA auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Zur **Gewinnung mononukleärer Zellen** (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurde das Blut mit PBS/1 mM EDTA 1:1 verdünnt und mittels Dichtegradientenzentrifugation die PBMCs und Erythrozyten/Granulozyten voneinander getrennt. Dazu wurden je 15-35 ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf 15 ml Biocoll (Biochrom, 1,077 g/ml Dichte) geschichtet und bei Raumtemperatur unter langsamer Beschleunigung und ohne Bremse für 24 min zentrifugiert (900 × g). Die in der Biocoll-Lösung in einer Interphase angesammelten PBMCs wurden mit einer Pipette abgenommen und in Röhrchen mit PBS/1 mM EDTA überführt. Anschließend wurden zur Abtrennung von Thrombozyten

drei Waschschritte mit sinkenden g-Werten durchgeführt und restliche Erythrozyten mittels Ammoniumchlorid-Behandlung lysiert. Der erste Waschschritt wurde bei Raumtemperatur, 900 × g für 10 min, durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in PBS/1 mM EDTA resuspendiert. Der zweite Waschschritt wurde bei Raumtemperatur und 300 × g für 10 min durchgeführt. Auch hier wurde der Überstand verworfen, die Zellen jedoch zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml 37 °C warmem Ammoniumchlorid-Puffer resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation wurde das Ammoniumchlorid durch Zugabe von 30 ml kaltem PBS/1 mM EDTA verdünnt und inaktiviert und die Zellen bei 4 °C, 200 × g für 10 min sedimentiert.
Zur **Aufreinigung der Granulozyten** (*polymorphonuclear cells*, PMNs) wurde nach Abnehmen der PBMC-Phase die Biocoll-Lösung so weit wie möglich entfernt. Da sich die Granulozyten auf der Oberfläche des Pellets befinden, wurde nur der obere Teil des Pellets mit einer Pipette aufgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die im Pellet vorhandenen Erythrozyten wurden durch die Zugabe von destilliertem Wasser lysiert. Dabei wurden 36 ml Wasser direkt auf das Pellet gegeben, die Zellen gemischt und nach 20 s durch Zugabe von 4 ml 10-fach konzentriertem PBS wieder physiologische osmotische Bedingungen hergestellt. Die Lyse wurde so lange wiederholt, bis das Pellet keine rote Färbung mehr aufwies. Alle Zellen wurden zur Bestimmung der Zellzahl in PBS/1 mM EDTA aufgenommen.

2.2.2.5 Depletion von Monozyten in humanen PBMC mittels Plastikadhäsion oder $CD14^+$-vermittelter magnetischer Zellseparation (MACS)

Zur Depletion von Monozyten in PBMCs wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt. Bei der **Depletion über Plastikadhäsion** wurden PBMCs in plasmafreiem Zellkulturmedium in einer Konzentration von 4 Mio/ml aufgenommen und jeweils 6 ml für 1,5 h bei 37 °C in einer 25 cm^2 Zellkulturflasche inkubiert. In dieser Zeitspanne adhärieren vor allem Monozyten, wobei die Adhäsion durch das fehlende Plasma im Zellkulturmedium verbessert wird. Nach erfolgter Inkubation wurden die nicht-adhärenten Zellen (PBMCs ohne Monozyten) entfernt und die Flasche zweimalig mit PBS gespült. Die Monozytendepletion mit dieser Methode lag im Schnitt bei 82 %.
Bei der **Depletion über $CD14^+$-vermittelte magnetische Zellseparation** (*magnetic-activated cell sorting*, MACS; Miltenyi Biotech) wurden die Monozyten nach Angaben des Herstellers mit anti-CD14-konjugierten magnetischen Mikropartikeln markiert und auf eine in einem magnetischen Feld befindliche Säule gegeben. Die markierten Zellen wurden in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen (PBMCs ohne Monozyten) unterhalb der Säule aufgefangen werden konnten. Die Depletionseffektivität dieser Methode lag bei >90 %.

Nach erfolgter Depletion wurden die restlichen PBMCs gewaschen und in Zellkulturmedium mit 10 % autologem Plasma in der zu den kompletten PBMCs korrespondierenden Konzentration aufgenommen.

2.2.2.6 Generierung von dendritischen Zellen aus humanen Monozyten (Mo-DC)

Für die Generierung von dendritischen Zellen wurden Monozyten verwendet, die mittels Plastikadhäsion (siehe 2.2.2.5) gewonnen worden waren. Zu den in der Zellkulturflasche verbliebenen adhärenten Zellen (Monozyten) wurde Zellkulturmedium mit 10 % autologem Plasma, 250 U rhuIL-4 und 50 U rhuGM-CSF hinzugegeben und die Zellen 6 Tage lang inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärenten Zellen abgenommen, zweimal mit Medium gewaschen, gezählt und der Gehalt an Mo-DCs mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurden CD3/CD19/CD56$^-$- und CD11c/CD11b$^+$-Zellen als dendritische Zellen eingestuft. Der Gehalt war generell gering und schwankte in den verschiedenen Experimenten und Blutspendern zwischen 4 % und 29 %. Die Hauptpopulation anderer Zelltypen als DCs waren CD3$^+$ T-Zellen (im Mittel 60%). Aufgrund der geringen Reinheit wurden nur drei Experimente mit dieser Methode durchgeführt.

2.2.2.7 Aufreinigung von humanen Leukozytenpopulationen mit Hilfe durchflusszytometrischer Sortierung (FACS-Sortierung)

Die vier Hauptzellpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen) in den PBMCs, sowie drei unterschiedliche Monozyten-Subpopulationen (klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten) wurden mittels FACS-Sortierung unter Verwendung eines Aria^{TM} II-Geräts voneinander getrennt und aufgereinigt. Hierzu wurden bis zu 15 x 10^6 PBMCs in Sort-Puffer (PBS/2 mM EDTA/10 % autologes Plasma) aufgenommen und mit spezifischen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert (4 °C, im Dunkeln, 20 min). Nach der Markierung wurden die Zellen mit Sort-Puffer gewaschen und über einen 50 µm Filter filtriert. Folgende Leukozyten-Subpopulationen wurden über die folgenden Marker separiert: T-Zellen: CD3$^+$, B-Zellen: CD19$^+$, gesamte Monozyten: CD14$^+$, NK-Zellen: CD56$^+$/CD3$^-$, klassische Monozyten (cMo): CD14^{high}/CD16$^-$/CCR2^{high}, nicht-klassische Monozyten (ncMo): CD14^{low}/CD16^{high}/CCR2$^-$ und intermediäre Monozyten (intMo): (CD14^{high}/CD16^{low}/CCR2$^+$) Die erhaltenen Zellpopulationen wiesen alle eine Reinheit von >95 % auf.

2.2.2.8 Stimulation von humanen Leukozyten mit *Leishmania*-Promastigoten und anderen Stimulanzien

Für die Kokultur humaner Leukozyten und Parasiten wurden beide in Medium mit 10 % autologem Plasma über 20 h unter Standardbedingungen inkubiert. Das Verhältnis von Zellen

und Parasiten sowie deren Konzentration richteten sich nach dem Zelltyp und der jeweiligen Analyse. Neben lebenden Promastigoten wurden auch abgetötete Parasiten und Parasiten-Lysat in denselben Konzentrationen wie die lebenden Parasiten verwendet (2.2.2.1).

Bei allen Analysen von **kompletten PBMCs** wurden je 10^6 Zellen in einer 48-well Flachbodenplatte mit Leishmanien in Verhältnissen von 1:0,2/1/5/10 inkubiert. Das Endvolumen betrug hierbei entweder 500 µl oder bei Verwendung blockierender Antikörper 300 µl. Zur Analyse der Beteiligung der unterschiedlichen Zellpopulationen in den PBMCs wurden vor der FACS-Sortierung die prozentualen Anteile von T-Zellen ($CD3^+$), B-Zellen ($CD19^+$), NK-Zellen ($CD3^-/CD56^+$) und Monozyten ($CD14^+$) bestimmt. Daraufhin wurde für jede Zellpopulation die Menge an Zellen errechnet, die in 10^6 PBMCs vorhanden war, und jeweils diese Anzahl an Zellen in unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet. Bei diesen Ansätzen wurde immer dieselbe Anzahl an Leishmanien zugegeben, die auch für die kompletten PBMCs verwendet wurde, sodass ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Ansätze möglich war (siehe auch Beispiel unten). Bei einigen Experimenten wurden auch je 10^6 PMN oder unterschiedliche Mengen an Mo-DC zu der PBMC-*Leishmania* Kokultur hinzugegeben.

Bei der Verwendung von **aufgereinigten NK-Zellen** zur alleinigen Analyse wurden unterschiedliche Zellzahlen mit Parasiten in den Verhältnissen 1:1/10/33 in einer 96-well-Flachbodenplatte kokultiviert.

Bei der **Kokultur von aufgereinigten NK-Zellen mit unterschiedlichen Monozytenpopulationen** wurden je 1,5 x 10^5 NK-Zellen mit Leishmanien in einem Verhältnis von 1:33 in einer 96-well Rundbodenplatte und einem Endvolumen von 250 µl verwendet. Die Rundbodenplatte gewährleistet einen sicheren Kontakt zwischen den unterschiedlichen Zelltypen. Da die Ausbeute an Monozyten zwischen den einzelnen Spendern sehr variabel war, wurde in jedem Experiment eine unterschiedliche Zahl an Monozyten (die jeweils maximal mögliche; 18 000 bis 68 000 Zellen) zugegeben. Die Anzahl der drei unterschiedlichen Monozytenpopulationen innerhalb jedes Experiments waren jedoch gleich.

Bei Verwendung von **reinen Monozyten** wurden 5 x 10^5 Zellen in einem Endvolumen von 500 µl bzw. 300 µl (mit blockierenden Antikörpern) in einer 48-well Flachbodenplatte aufgenommen und zusammen mit 10 oder 5 x 10^6 *Leishmania* Promastigoten (Verhältnis 1:10 und 1:20) inkubiert.

Die Experimente unter Verwendung von **Transwells** wurden aufgrund der Größe der Transwell-Einsätze in 24-well Flachbodenplatten durchgeführt, und die Zellzahlen und das Endvolumen auf die Plattengröße angepasst, die Verhältnisse jedoch beibehalten.

Zum **Blockieren verschiedener Zytokine** (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-α/β) wurden spezifische Antikörper und die entsprechenden Isotypkontrollen zu Beginn der Inkubationszeit in den unter 2.1.3 genannten Endkonzentrationen direkt zu den unterschiedlichen

Zellen zugegeben. Für Positivkontrollen wurden die Zellen mit dem jeweiligen rekombinanten Zytokin unter Ab- und Anwesenheit der blockierenden Antikörper stimuliert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in den Platten bei 4 °C, 3400 × g für 10 min zentrifugiert, die Zellkulturüberstände unter sterilen Bedingungen abgenommen und für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden entweder im Durchflusszytometer analysiert (2.2.2.9), fluoreszenzmikroskopisch untersucht (2.2.2.10), die Zytotoxizität der NK-Zellen bestimmt (2.2.2.11) oder für die RNA-Gewinnung weiterbearbeitet (2.2.3.1).

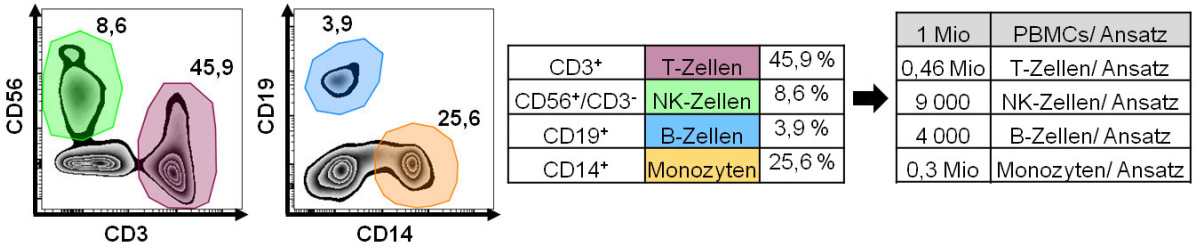


Abbildung M1: Beispiel für die Bestimmung der Zellpopulationen in PBMCs und deren Verwendung in *Leishmania*-Kokultur

2.2.2.9 Stimulation von humanen PBMCs oder NK-Zellen mit Zellkulturüberständen desselben Blutspenders

Bei -20 °C gelagerte Zellkulturüberstände wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. 8 x 10^5 PBMCs oder 10^5 aufgereinigte NK-Zellen wurden in Medium mit 10 % autologem Plasma aufgenommen und in einer 96-well-Flachbodenplatte mit autologen Zellkulturüberständen von vorangegangenen Experimenten mit Zellen desselben Spenders für 20 h inkubiert. Dabei wurden die Überstände in Konzentrationen von 80 %, 60 %, 40 % und 20 % verwendet. Das Gesamtvolumen pro well betrug 200 µl.

Um die Eigenschaften der in den Überständen enthaltenen Moleküle näher zu charakterisieren, wurden bei einigen Experimenten die Überstände vor Zugabe zu den Zellen über einen 0,22 µm Sterilfilter filtriert oder bei 90 °C für 5 min gekocht und auf Eis abgekühlt. Weiterhin wurden in Überständen vor Zugabe der Zellen unterschiedliche Zytokine (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-α/β) blockiert. Hierfür wurden spezifische Antikörper bzw. Antiseren oder entsprechende Isotyp-Kontrollen in den unter 2.1.3 genannten Endkonzentrationen zugegeben und die Überstände bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit für 1-2 h vorbehandelt. Anschließend wurden frisch isolierte Zellen desselben Spenders zugegeben und für weitere 20 h kultiviert. Als Positivkontrollen dienten Zellen, die mit dem jeweiligen rekombinanten Zytokin mit und ohne Zugabe des spezifischen blockierenden Antikörpers stimuliert wurden. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert (2.2.2.9).

2.2.2.10 Durchflusszytometrische Analysen

Für die Analyse von Oberflächenantigenen und intrazellulären Zytokinen wurden Leukozytenpopulationen mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper markiert. Zur Kontrolle der spezifischen Färbung wurden Isotyp-Kontrollen mit unspezifischen Antikörpern mitgeführt. Die zu analysierenden Zellpopulationen wurden in 1,2 ml Röhrchen (Starlab) einmal mit FACS-Puffer (PBS/1 % FCS) gewaschen (4 °C, 420 × g, 6 min). Anschließend wurden Oberflächenantigene mit den jeweiligen Antikörpern (siehe 2.1.4) markiert (4 °C, im Dunklen, 15-20 min) und nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Wenn biotinylierte Antikörper verwendet wurden, wurden die Zellen vor Zugabe des Fluoreszenz-gekoppelten Streptavidins (siehe 2.1.11) mit FACS-Puffer gewaschen.
Zum Färben von intrazellulären Zytokinen wurde für die letzten 6-12 h der Kultur GolgiStop™ (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers zugegeben, um die Sekretion der Zytokine in den Zellkulturüberstand zu verhindern. Die so behandelten Zellen wurden nach der Oberflächenfärbung mittels Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences) fixiert und permeabilisiert (150 µl/ Röhrchen, 4°C, 20 min). Anschließend wurden sie zweimal mit Saponin-Puffer gewaschen und das intrazelluläre Zytokin mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper markiert (4 °C, im Dunklen, 20-30 min). Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch nochmaliges Waschen mit Saponin-Puffer entfernt. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und innerhalb von 6 h im Durchflusszytometer analysiert. Alle Messungen wurden mit einem FACS Canto II durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Diva 6.1.2 und FlowJo 10.0.7 Software.

2.2.2.11 Immunfluoreszenz-Färbung von Monozyten

Für die Analyse von Monozyten im Konfokalmikroskop (CLSM) wurden die Zellen über das *Monocyte Isolation Kit II* (Miltenyi Biotech) nach Anweisung des Herstellers über negative Selektion aus PBMCs aufgereinigt. Hierbei werden alle anderen Zelltypen außer Monozyten mit zellspezifischen Antikörpern markiert, diese an magnetische Mikropartikel gekoppelt und an eine in einem magnetischen Feld platzierte Säule gebunden. So verbleiben alle markierten Zelltypen an der Säule, während die unmarkierten Monozyten im Durchfluss gewonnen werden können. Nach Kokultur mit Leishmanien in einem Verhältnis 1:10 (siehe 2.2.2.8) wurden die Monozyten auf speziellen Adhäsions-Objektträgern (Marienfeld) fixiert und gefärbt. Dafür wurden die Objektträger vor Benutzung wie folgt vorbereitet: Die Schutzschicht der Reaktionsfelder wurde gründlich unter laufendem Leitungswasser abgelöst und die Objektträger anschließend mindestens 30 min in einer Glasküvette mit PBS gewaschen und gelagert. Um eine optimale Anheftung der negativ geladenen Zellen an die positiv geladene Oberfläche zu gewährleisten, wurden die Zellen zum Entfernen von löslichen Proteinen im Medium zweimalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 2,5 x 10^5 Monozyten nach

Leishmanien-Kokultur in einem Volumen von 30 µl je Reaktionsfeld aufgetragen und zur Adhäsion der Zellen 1-1,5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Adhäsion wurden die Objektträger in PBS gewaschen, die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert (70 µl/Reaktionsfeld, 15 min, Raumtemperatur, im Dunklen) und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Ansätze, bei denen sowohl eine Oberflächenfärbung als auch eine intrazelluläre Färbung durchgeführt werden sollte, wurden weiterhin für 1-2 min mit 70 µl -20 °C kaltem Methanol pro Reaktionsfeld permeabilisiert und die Objektträger wiederum mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung und/oder Permeabilisierung wurde entweder sofort mit der Färbung begonnen oder die Objektträger getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. In letzterem Fall wurden die Zellen vor Beginn der Färbung 15 min in PBS inkubiert.
Die Färbung wurde wie folgend durchgeführt: Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen im ersten Schritt der Färbung mit PBS/2 % BSA/10 % Ziegen-Serum (30 µl/Reaktionsfeld, 30 min, Raumtemperatur) inkubiert. Alle verwendeten Antikörper wurden in PBS/0,5 % BSA/0,5 % Ziegen-Serum verdünnt. Zwischen allen Färbeschritten wurden die Zellen dreimal mit ca. 80 µl PBS/0,1 % Tween 20 pro Reaktionsfeld für 5 min gewaschen. Die Markierung mit unkonjugierten IL-18-Antikörpern (MBL, 30 µl/Reaktionsfeld, Verdünnung 1:200) erfolgte über Nacht bei 4°C, wohingegen AF568-gekoppelte Zweitantikörper (Invitrogen, 30 µl/Reaktionsfeld, 1:200) nur für 30 min bei Raumtemperatur eingesetzt wurde. Zur Kontrolle der spezifischen Färbung für IL-18 wurde bei jeweils in einem Ansatz pro Experiment der IL-18 Antikörper vor der Färbung mit rekombinantem IL-18 vorbehandelt (1,2 µg/ml, 30 min, 37 °C). Zum Ende der Färbung wurden die Zellkerne mittels DAPI gefärbt (Sigma-Aldrich, 30 µl/Reaktionsfeld, 1:300, 15 min, Raumtemperatur). Abschließend wurden die Proben mit VectaShield® Eindeckmedium (Vector Laboratories) versehen, mit einem Objektglas abgedeckt und bei 4 °C zum Aushärten des Mediums mindestens über Nacht gelagert. Die Proben wurden mittels eines CLSM 700 Mikroskops (Hersteller) mit einem 63er Ölobjektiv analysiert. Die Auswertung der Fluoreszenz-Färbung erfolgte mit Hilfe der Software ZEN2009 (Zeiss).

2.2.2.12 Bestimmung der zellspezifischen Zytotoxizität von NK-Zellen

Die Zytotoxizität von NK-Zellen wurde mittels eines ^{51}Chrom-Freisetzungsassays bestimmt. Dazu wurden PBMCs oder NK-Zellen nach Kokultur mit Leishmanien verwendet. Als Positivkontrollen wurden Ansätze mit IL-12/18-stimulierten Zellen mitgeführt. Bei Verwendung von PBMCs wurde mittels FACS-Analyse vor dem Ansetzen der Kokultur der Prozentsatz an NK-Zellen ($NKp46^+CD3^-$-Zellen) in jeder Probe bestimmt. Die Zellen wurden daraufhin auf 2 x 10^5 NK-Zellen/100 µl in Medium mit 10 % FCS eingestellt und in Triplikaten in einer vierstufigen 1:2 Serien-Verdünnung mit je 100 µl in eine 96-well-Rundbodenplatte ausgesät, sodass 2 x 10^5 , 1 x 10^5 , 0,5 x 10^5 und 0,25 x 10^5 NK-Zellen/100 µl vorlagen. Zu den NK-Zellen

wurden dann je 10^4 Zielzellen in 100 µl Medium mit 10 % FCS gegeben, sodass sich Effektorzell-/Zielzell-Verhältnisse von 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1 in einem Endvolumen von 200 µl ergaben. Die Zellen wurden über 4 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Zielzellen wurden K562-Zellen verwendet, die vor der Kokultur mit radioaktivem ^{51}Cr markiert worden waren. Dazu wurden 2-10 x 10^6 K562-Zellen in 400 µl Medium/10 % FCS aufgenommen und mit ca. 150 µCi ^{51}Cr für 90 min inkubiert. Dann folgten zwei Waschschritte mit Medium/10 % FCS zum Entfernen des nicht aufgenommenen radioaktiven Materials, gefolgt von einer Ruhephase von 60 min bei 37°C, nach der die noch lebenden K562-Zellen gezählt und eingestellt wurden (in dieser Zeit sterben schon beschädigte Zellen ab). Nach Kokultur der NK-Zellen und K562 Ziel-Zellen wurden 50 µl des Zellkulturüberstandes auf eine LUMA-Platte (Perkin-Elmer, speziell beschichtete 96-well Platte zur Messung radioaktiver Überstände) gegeben und nach Trocknung über Nacht das durch die Lyse der Zielzellen ins Medium freigesetzte ^{51}Cr als *counts per minute* (cpm) mit einem TopCount NXT Microplate Gamma Counter gemessen. Zur Bestimmung des Hintergrunds wurde auch die spontane Freisetzung von ^{51}Cr durch die markierten K562-Zellen ohne weiteren Stimulus bestimmt. Zur Bestimmung der maximal möglichen Freisetzung an Radioaktivität wurden 25 µl der ^{51}Cr-markierten K562-Zellen direkt auf die LUMA-Platte gegeben. Aus den gemessenen Werten für die spontane, maximale und durch Kultur mit den NK-Zellen in den verschiedenen Proben erzielte Freisetzung an Radioaktivität ließ sich die spezifische Lyse mittels folgender Formel errechnen:

% spezifische Lyse = $(cpm_{Probe}-cpm_{spontan})/(cpm_{maximum}-cpm_{spontan})$ x100

2.2.2.13 Quantifizierung von Proteinen im Zellkulturüberstand mittels Sandwich-ELISA

Der Nachweis von humanem IL-2, IL-6, IL-10, IL-12/IL-23 (p40), IL-18 und von löslichem CD56 in Zellkulturüberständen wurde mittels kommerzieller ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)-Kits nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt (siehe 2.1.8). Falls nicht im Kit vorhanden, wurden Streptavidin-AB Komplex/ Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP, Dako), 50 mM Tris-Puffer, Tetramethylbenzidin (TMB, Alfa Aesar oder BD Biosciences) als Substrat und H_2SO_4 als Stopp-Lösung eingesetzt. Die Nachweisgrenzen der jeweiligen ELISAs waren wie folgt: IL-2 (4-125 pg/ml), IL-6 (4-1000 pg/ml), IL-10 (3,9-250 pg/ml), IL-12 (p40) (62,5-4000 pg/ml), IL-18 (je nach Analyse 78/165/312-5000 pg/ml) und CD56 (78-5000 pg/ml). Der Nachweis von humanem IFN-γ wurde teils mit Hilfe eines kommerziellen Kits (siehe 2.1.8) und teils mit einzeln erworbenen Antikörpern (siehe 2.1.4) nach einem Standard-ELISA-Protokoll durchgeführt. Das Inkubationsvolumen betrug jeweils 50 µl. Der Fänger-Antikörper wurde in PBS verdünnt über Nacht bei 4 °C in der Mikrotiter-Platte inkubiert. Dann wurde die Platte mit 150 µl/well Blockier-Puffer 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Proben und Standardverdünnungen aufgetragen,

die wiederum bei 4 °C über Nacht inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde der Detektions-Antikörper in PBS/10 % FCS verdünnt aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen allen Schritten wurde die Platte jeweils 3-4-mal mit ELISA-Waschlösung (PBS/0,05 % Tween 20) gewaschen und auf Papiertüchern trockengeklopft. Die Streptavidin-AB/HRP-Lösungen A und B (Dako) wurden nach Angaben des Herstellers zunächst in einer 1:100 Verdünnung in 50 mM Tris-Puffer 30 min vorinkubiert, anschließend auf 1:2000 weiterverdünnt und 1 h bei Raumtemperatur in der ELISA-Platte inkubiert. Danach wurde die Platte 8-mal mit ELISA-Waschlösung gewaschen, je 50 µl TMB-Substrat zugegeben und nach ca. 30 min Inkubation im Dunklen die Farbreaktion über Zugabe von 25 µl H_2SO_4/well gestoppt. Die Absorption wurde in einem SpectraMax® bei 450 nm gemessen. Die Nachweisgrenze des IFN-γ-Kits lag bei 7,8-500 pg/ml, die des eigenen ELISAs bei 15,6-1000 pg/ml.

2.2.2.14 Quantifizierung von Proteinen im Zellkulturüberstand mittels Procarta® Multiplex Immunoassay

Es wurde das kommerziell erhältliche ProcartaPlex Human Cytokine/ Chemokine/ Growth Factor Panel 1 (45 plex) (eBioscience) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das grundlegende Messverfahren ähnelt dem des Sandwich-ELISAs, wobei das gewünschte Protein mit einem ersten spezifischen Fänger-Antikörper gebunden und einem zweiten Antikörper detektiert wird. Die Besonderheit des Multiplex-Assays besteht darin, dass mehrere Proteine simultan in einer einzigen Probe analysiert werden können. Dazu werden die Fänger-Antikörper an Mikropartikel gebunden, die durch ihr spezifisches Fluoreszenzspektrum unterschieden werden können. So kann jedem Partikel ein bestimmtes Protein zugeordnet werden. In der hier durchgeführten Analyse wurde eine Mixtur aus 45 unterschiedlichen Mikropartikeln eingesetzt, wodurch 45 unterschiedliche Proteine gemessen werden konnten. Dabei wurden die zu analysierenden Zellkulturüberstände aufgetaut und unverdünnt eingesetzt. Die Messung und Auswertung erfolgte mit einem MAGPIX® mit xPONENT® Software. Die Analyse wurde durch die Core Unit - Cell Sorting and Immunomonitoring des Universitätsklinikums Erlangen durchgeführt.

2.2.2.15 Nachweis *Leishmania*-spezifischer Antikörper (IgG) im Immunfluoreszenz-Test

Das zu analysierende humane Plasma wurde in einem 4 ml FACS-Röhrchen mit PBS/1 % FCS 1:50 auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt. Als Kontrollen dienten Seren eines negativen Spenders (Negativkontrolle) und eines Patienten mit bekanntem Antikörper-Titer (Positivkontrolle). Anschließend wurden je 5 x 10^6 *L. major*-Promastigote einem Volumen von 100 µl PBS/1 % FCS zugegeben, sodass sich eine finale Verdünnung des Plasmas von 1:100 ergab, und mit den Parasiten 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. In diesem

Zeitraum können im Plasma oder Serum vorhandene Leishmanien-spezifische Antikörper an die Parasiten binden. Anschließend wurden die Leishmanien zweimal mit PBS/1 % FCS gewaschen und in einem Volumen von 100 µl PBS/1 % FCS aufgenommen. An die Leishmanien gebundene Antikörper wurden mittels Fluoreszenzgekoppelter anti-Human IgG-Antikörper detektiert, die für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit den Leishmanien inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen der Parasiten wurden sie in 100 µl PBS/1 % FCS aufgenommen. Je ein Tropfen der Leishmanien-Suspension wurde auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt, und das Vorhandensein von fluoreszierenden Leishmanien bei 400-facher Vergrößerung mit einem Axiophot-Mikroskop (Zeiss) analysiert.

2.2.2.16 Generierung, Infektion und Analyse von intraperitoneal (i. p.)-humanisierten Mäusen

Für die Generierung von i. p.-humanisierten Mäusen wurden ausgewachsene NOD/SCID/IL-2Rg^{null} (NSG)-Mäuse verwendet, die keine T-, B- und NK-Zellen sowie eine verminderte Anzahl von myeloiden Immunzellen besitzen. Diese Mäuse wurden mit einer Dosis von 1,4 Gy bestrahlt und 4-6 h später 7-15 x 10^6 frisch aufgereinigte humane PBMCs (siehe 2.2.2.4) in 500 µl PBS intraperitoneal übertragen. Das Geschlecht der Mäuse und der humanen Blutspender wurde hierbei aufeinander abgestimmt. Nach 24 h wurden die i. p.-humanisierten Mäuse mit 10 x 10^6 *L. infantum*-Parasiten (in 500 µl PBS) i. p. infiziert. Als Kontrollen dienten Mäuse, die nur mit 500 µl PBS i. p. behandelt wurden. 12 h nach der Infektion wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und die Peritonealexsudatzellen (*peritoneal exsudate cells*, PECs) gewonnen. Hierfür wurde die Bauchhöhle zweimalig mit jeweils 10 ml PBS ausgespült. Die so gewonnenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und entweder direkt im Durchflusszytometer analysiert oder für die Restimulation in Medium mit 10 % autologem Plasma aufgenommen. Bei der Restimulation wurden je 5 x 10^5 PECs in einer 96-well Rundbodenplatte in Medium alleine, mit derselben Menge an K562-Tumorzellen oder den Zytokinen IL-12 plus IL-18 (je 10 ng/ml) in einem Endvolumen von 200 µl für 6 h bei 37° C inkubiert. Murine und humane Zellen wurden im Durchflusszytometer über den jeweiligen CD45-Marker, der auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, voneinander unterschieden. Dabei bestanden die murinen Zellen zum Hauptteil aus in die Bauchhöhle rekrutierten neutrophilen Granulozyten (Ly6G$^+$/F4/80$^-$). Es waren keine murinen T-Zellen, B-Zellen oder NK-Zellen nachweisbar. Bei den Zellen mit humanem CD45 waren hingegen alle in den ursprünglichen PBMCs vorhandenen Zellpopulationen zu finden.

2.2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.3.1 Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen

Gesamt-RNA aus humanen Zellen wurde mittels des RNeasy® Mini Kits (Qiagen) nach Angabe des Herstellers isoliert. Damit die maximale Bindungskapazität (1 x 10^7 Zellen) der Säulen nicht überschritten wurde, wurden maximal 5 x 10^5 NK-Zellen + 5 x 10^6 Leishmanien verwendet. Nach der Kokultur wurden die Zellen in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gegeben und zweimalig mit PBS gewaschen (400 × g, 10 min, RT). Daraufhin wurden die Zellen mit dem im Kit enthaltenden RLT-Puffer lysiert, wobei dem Puffer zur Deaktivierung von RNasen 1 % β-Mercaptoethanol hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden über QIAshredder™-Säulen (Qiagen) nach Angaben des Herstellers homogenisiert, das Lysat mit Ethanol verdünnt und auf die RNeasy-Säulen gegeben. Nachdem die RNA an die in den Säulen vorhandene Membran gebunden hatte, wurde diese dreimal gewaschen und im letzten Schritt, die RNA mit 30 µl destilliertem Wasser wieder aus der Membran gelöst. Die RNA-Konzentration wurde mittels eines NanoDrop™1000 bestimmt und die gewonnene RNA entweder direkt in cDNA umgeschrieben oder zunächst bei -80° C eingefroren.

2.2.3.2 Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Gene mittels quantitativer real-time RT-PCR Analyse

Humane Total-RNA wurde mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Die gewonnene Menge an RNA lag stets unter 5 µg, sodass immer die gesamte RNA-Menge in einer Reaktion umgeschrieben wurde. Dazu wurden je 28 µl RNA mit 12 µl des nach Angabe des Herstellers hergestellten Mastermixes gemischt und mittels unterschiedlicher Thermocycler (siehe 2.1.6) folgendermaßen behandelt: 10 min 25° C, 2x 60 min 37° C. Die generierte cDNA wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20° C gelagert. Zur weiteren Analyse wurden die Proben als Duplikate unter Anwendung des TaqMan® Universal MasterMix II und spezifischer TaqMan® Systeme (life) in einem ABI Prism 7900 HAT amplifiziert und quantifiziert. Dazu wurden je 4,5 µl cDNA (mit max. 100 ng), 0,5 µl des jeweiligen Kits und 5 µl des Mastermixes pro Ansatz verwendet.

Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen: 2 min bei 50° C, 10 min bei 95° C, 40 Zyklen à 15 s bei 95° C und 1 min bei 60° C. Als endogene Kontrolle für die Normalisierung der Expression der verschiedenen Zielgene wurde das Gen der humanen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (huGAPDH) verwendet. Die relative mRNA-Expression wurde mit dem Programm SDS 2.3 (Applied Biosystems) unter Verwendung folgender Formel errechnet: $2 - (CT_{(Zielgen)} - CT_{(endogene\ Kontrolle)}) \times f$. Der Faktor f ist ein arbiträrer Faktor, der auf 10^4 festgelegt wurde.

2.2.4 **STATISTISCHE ANALYSEN**

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4 durchgeführt. Für alle Analysen wurde der Mann-Whitney-Test für nicht nach Gauß normalverteilte Proben verwendet. In Abbildungen wird entweder der Mittelwert mit Standardfehler oder der Median gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Proben wurden mit einem Stern gekennzeichnet und solche zwischen unterschiedlich stimulierten Proben mit einer Raute. Dabei symbolisiert die Anzahl der Symbole unterschiedliche p-Werte: * und $^{\#}$ $p<0,05$, ** und ## $p<0,01$, ***, ### $p<0,001$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Hochregulation von Aktivierungsmarkern auf humanen NK-Zellen nach Kokultur mit Leishmanien

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob *Leishmania*-Parasiten humane NK-Zellen aktivieren können, und wenn ja, welche Faktoren hierbei eine Rolle spielen.
Ein erster Anhaltspunkt für die Stimulation von NK-Zellen ist die gesteigerte Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, die mit einer Aktivierung der Zellen assoziiert werden.
Der bei Lymphozyten häufig verwendete Aktivierungsmarker CD69 wird nach Aktivierung der Zellen schon sehr früh exprimiert (< 2-4 Stunden, Maximum 24 h), wohingegen ein weiterer Marker, CD25 (entspricht der α-Kette des IL-2 Rezeptors), frühestens 6 Stunden (Maximum 96 h) nach Stimulation nachweisbar ist [233-235].

3.1.1 HOCHREGULATION VON CD69 UND CD25 NACH KOKULTUR VON PBMCS MIT LEISHMANIEN

Um zu analysieren, ob die Expression von CD25 und CD69 auf NK-Zellen nach Interaktion mit *Leishmania*-Parasiten moduliert wird, wurden mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) mit Promastigoten unterschiedlicher *Leishmania*-Spezies kokultiviert. Um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten, wurde hierbei dem Zellkulturmedium autologes Plasma des jeweiligen Spenders zugefügt. Nach der Kokultur wurden die NK-Zellen als NKp46-positive und gleichzeitig CD3-negative Zellen ($NKp46^+/CD3^-$) durchflusszytometrisch analysiert. Die grundsätzliche *Gating*-Strategie der nachfolgend gezeigten FACS-Analysen ist in Abb. 1 dargestellt und beschrieben.

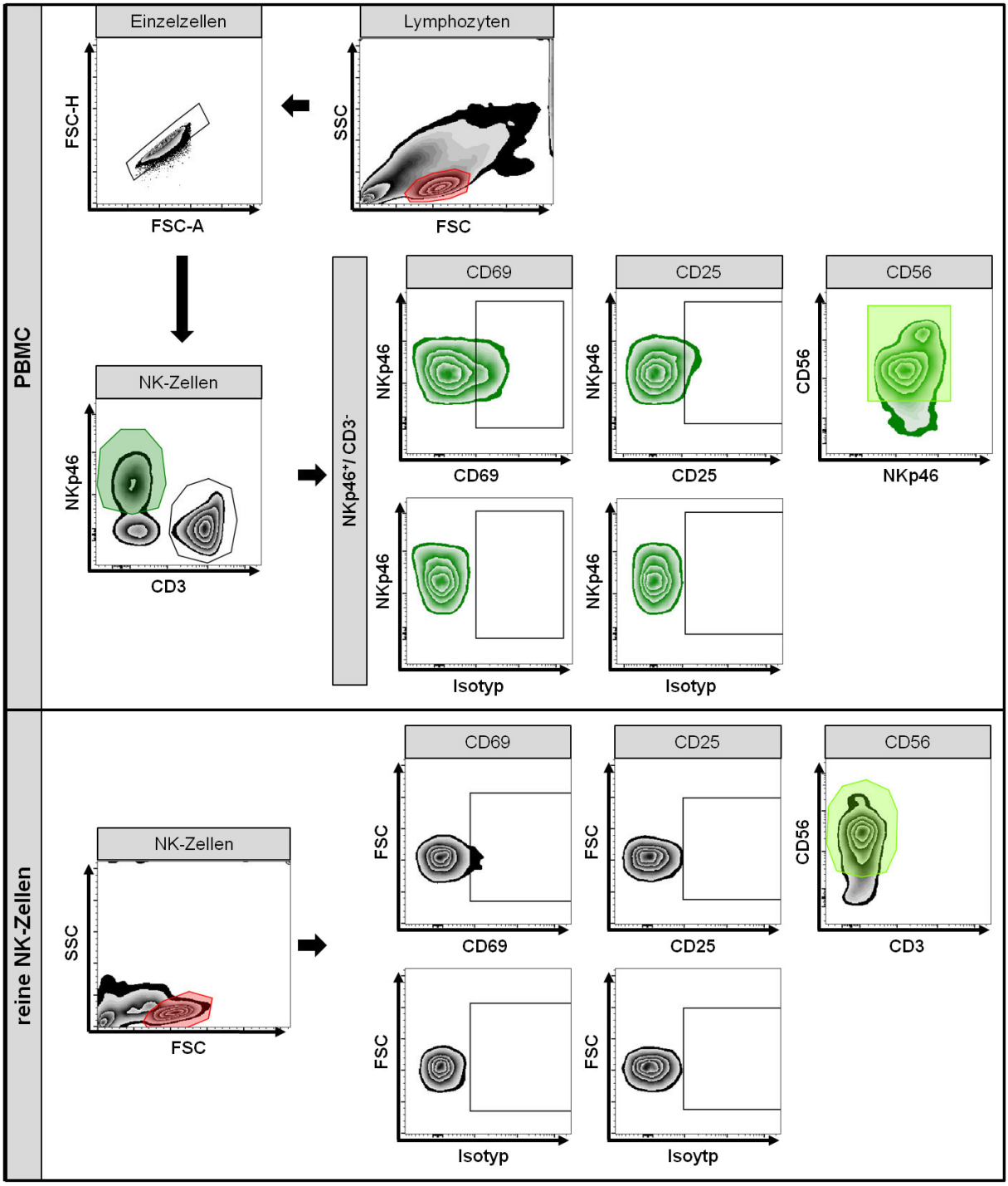


Abbildung 1: Gating-Strategie der FACS-Analysen

Mit dem ersten Gate wurden über die Lage der Zellen im forward scatter (FSC, Größe der Zellen) bzw. sideward scatter (SSC, Granularität der Zellen) zunächst alle Lymphozyten ausgewählt. Bei der Analyse von PBMCs wurden zusätzlich Zellaggregate ausgeschlossen (FSC-A/FSC-H Dot Plot). Bei den aufgereinigten NK-Zellen war dies aufgrund der geringen Aggregatbildung nicht notwendig. Die NK-Zellen innerhalb der PBMCs wurden als $NKp46^{+}CD3^{-}$ Zellen nachgewiesen (dunkelgrünes Gate) und die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle auf dieser Zellpopulation bestimmt. Bei aufgereinigten NK-Zellen wurden direkt alle Lymphozyten analysiert. Das hellgrüne Gate beinhaltet alle CD56-exprimierende NK-Zellen. Die Spezifität der Färbung und die Lage der unterschiedlichen Gates wurden mittels Isotyp-Kontrollen überprüft und festgesetzt.

Nach 20-stündiger Inkubation mit *Leishmania*-Promastigoten zeigten die NK-Zellen innerhalb der PBMC-Fraktion eine deutlich gesteigerte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (Medium vs. *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani;* alle p<0,0001) und eine leichte Steigerung von CD25 (alle Spezies außer *L. donovani;* p<0,0008) (Abb. 2 A). Über die Steigerung der CD25-Expression bei Kokultur mit *L. donovani* konnte aufgrund der geringen Spenderanzahl (n=3) keine gesicherte Aussage getroffen werden. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit IL-12 und IL-18 stimuliert worden waren. Diese kombinierte Zytokinbehandlung führte zu einer signifikanten Steigerung (Medium vs. IL-12/18 p<0,0001) der CD69 und CD25-Expresssion der NK-Zellen, die nochmals höher als die durch Leishmanien induzierte Expression ausfiel. Die Stimulation der Expression der Aktivierungsmarker durch Leishmanien war dosisabhängig und stieg mit zunehmender Parasitenzahl kontinuierlich an (Abb. 2 B). Bei einem Verhältnis von Zellen zu Leishmanien von 1:10 traten geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen *Leishmania*-Spezies auf. Die höchste mittlere CD69-Expression konnte bei *L. mexicana* und *L. donovani* beobachtet werden, wohingegen die schwächste mittlere Reaktion mit *L. infantum* erreicht wurde. Um zu untersuchen, ob die *Leishmania*-spezifische Stärke der CD69-Steigerung mit der klinischen Krankheitsausprägung der Leishmaniose in Verbindung steht, wurden je zwei viszerotrope (VL1, VL2; isoliert aus dem Blut von Patienten mit VL) und dermotrope *L. infantum*-Stämme (CL, Isolat aus Patienten; CanL, Isolat aus dem Blut eines Hundes) parallel analysiert. Alle vier Stämme zeigten jedoch eine vergleichbare Stimulation der CD69- und CD25-Marker (Abb. 2 D). Somit konnte kein Zusammenhang zwischen der Steigerung der Expression der Aktivierungsmarker auf NK-Zellen und der v*on L. infantum* ausgelösten Erkrankung hergestellt werden. Da die Expression von CD69 im Vergleich zu CD25 bei allen *Leishmania*-Spezies sehr viel deutlicher ausfiel, wurden die meisten der weitergehenden Untersuchungen auf die Analyse der CD69-Expression beschränkt.

Eine Trennung der humanen Zellen und der Parasiten durch ein Transwell führte zu keinerlei Veränderung des Expressionsmusters von CD69 auf den NK-Zellen (Abb. 2 C). Die Expressionssteigerung von CD69 auf NK-Zellen war folglich kontaktabhängig. Weiterhin erschien die CD69-Expression tendenziell geringer, wenn abgetötete Parasiten für die Stimulation verwendet wurden (Abb. 2 E). Dabei wurden sowohl mit Formaldehyd fixierte Parasiten (intakte Zellmembranen) als auch solche Präparationen verwendet, bei der die Parasiten wiederholt eingefroren und wieder aufgetaut worden waren (*Freeze-thaw*-Lysat, *Ft*-Lysat, defekte Zellmembranen). Eine signifikante Reduktion der CD69-Steigerung war nur unter Verwendung der *Ft*-Lysate von *L. major* (unbehandelt vs. Ft p=0,0071) und *L. mexicana* (unbehandelt vs. Ft p=0,0093) zu erreichen. Allerdings induzierten auch diese Präparationen nach wie vor eine signifikante Verstärkung der CD69-Expression (Abb. 2 E, Medium vs. *L. major* Ft p=0,0049; *L. mex*icana Ft p=0,0013).

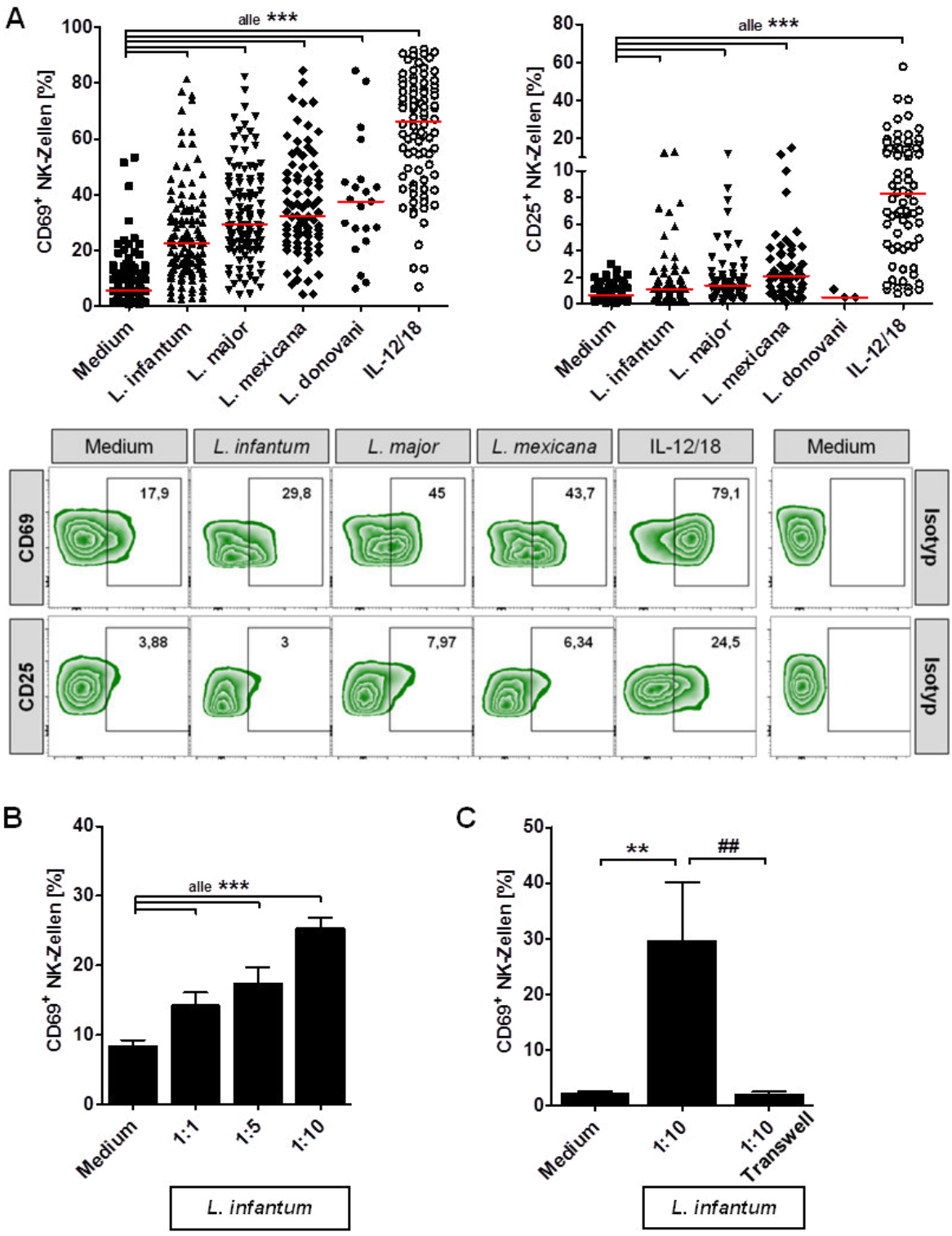
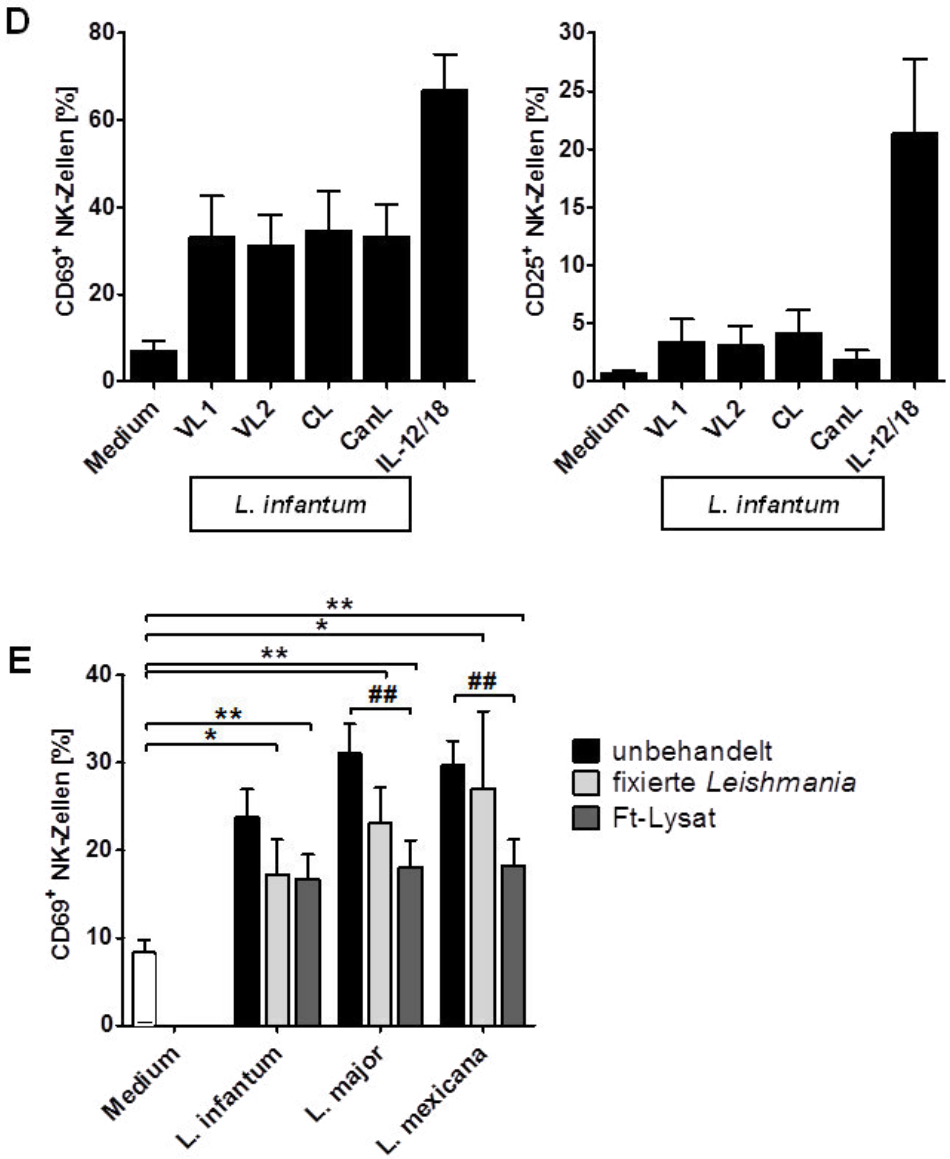


Abbildung 2: Modulation der CD69- und CD25-Expression auf NK-Zellen nach PBMC-*Leishmania* Kokultur

Humane PBMCs wurden mit *Leishmania spp.*-Promastigoten oder IL-12 plus IL-18 (je 10 ng/ml) für 20 h inkubiert und die Oberflächenexpression von CD69 und CD25 auf NKp46^{+}CD3^{-} NK-Zellen analysiert. Das Verhältnis von PBMCs zu Parasiten war, soweit nicht anders angegeben, 1:10.



(A) CD69- (links) und CD25-Expression (rechts) auf NK-Zellen nach Kokultur mit unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies. Für die sechs verschiedenen Stimulationsbedingungen (d. h. Medium, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* und IL-12/IL-18) sind jeweils die Mediane von 129/117/107/83/21/88 (CD69) bzw. 80/73/65/57/3/75 (CD25) Spendern als roter Querbalken gegeben. Die FACS-Plots zeigen exemplarisch die Analyse eines Spenders.
(B) Dosisabhängige CD69-Expression nach Exposition von NK-Zellen mit *L. infantum*-Promastigoten. Mittelwert ± Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) von 119/43/17/119 Spendern.
(C) Steigerung der CD69-Expression durch *L. infantum*-Promastigote nach bzw. ohne Kontakt (Transwell-System) zwischen PBMCs und Parasiten. Porengröße des Transwells 0,4 µm.
Mittelwert ± SEM von 6 unterschiedlichen Spendern.
(D) Steigerung der CD69- und CD25-Expression durch viszerotrope (VL1, VL2) vs. dermotrope (CL, CanL) *L. infantum*-Stämme.
Mittelwert ± SEM von 9/9/9/7/9 (CD69) bzw. 6/6/6/6/5/6 (CD25) Spendern. VL: humane viszerale Leishmaniose, CL: humane kutane Leishmaniose, CanL: canine Leishmaniose.
(E) Steigerung der CD69-Expression durch lebende bzw. Formaldehyd-fixierte Leishmanien und *Freeze-thaw*-Lysat derselben Anzahl von Leishmanien.
Mittelwert ± SEM von 22/22/18/18 (lebend), 8/9/6 (fixiert) und 17/15/14 (Lysat) Spendern.
(A-E) Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet. Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen wurden mit * und Unterschiede zwischen unterschiedlich stimulierten Zellen mit # gekennzeichnet (*/# $p<0,05$, **/## $p<0,01$, ***/### $p<0,001$).

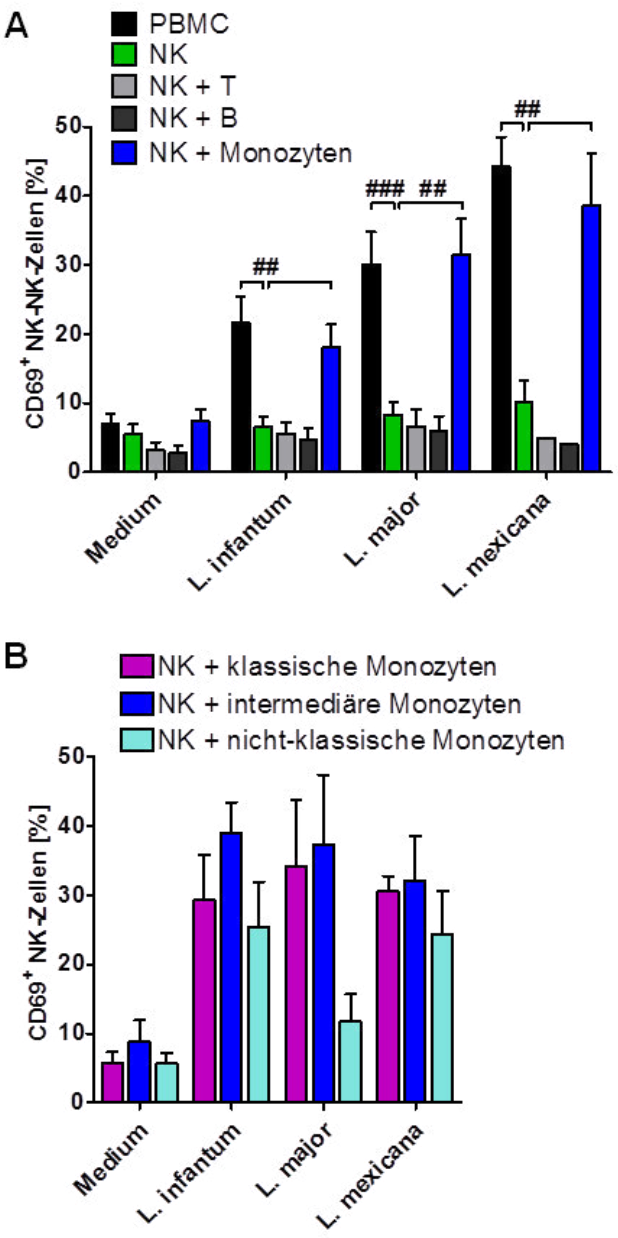
3.1.2 HOCHREGULATION DER NK-ZELLULÄREN CD69-EXPRESSION NACH KOKULTUR MIT LEISHMANIEN-INFIZIERTEN MONOZYTEN

Um zu untersuchen, ob die Steigerung der CD69-Expression auf den NK-Zellen direkt durch die Leishmanien zustande kam oder ob diese über andere Zelltypen innerhalb der PBMC-Fraktion vermittelt wurde, wurden die verschiedenen Hauptzellpopulationen (NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen, Monozyten) mittels FACS-Sortierung aufgereinigt. Anschließend wurden die NK-Zellen alleine oder mit jeweils einer der anderen Zellpopulationen und Leishmanien kokultiviert. Alle Zellen wurden dabei in den Verhältnissen eingesetzt, wie sie ursprünglich in den PBMCs vorhanden gewesen waren. Die Anzahl der zugegebenen Parasiten war dieselbe wie bei den Analysen mit der Gesamtfraktion der PBMCs (siehe auch Beispiel unter 2.2.2.7).

Die Stimulation von reinen NK-Zellpopulationen mit Leishmanien beeinflusste (unabhängig von der Parasitenspezies) die CD69-Expression nicht. Auch die Zugabe von T- oder B-Zellen zu den NK-Zellen hatte keinen Effekt. Nur durch die Zugabe von Monozyten konnte die bei der Gesamtfraktion der PBMCs gemessene Steigerung der CD69-Expression nahezu erreicht werden (Abb. 3A). Dies traf auf alle eingesetzten Leishmania-Spezies zu (Medium vs. *L. infantum* $p<0{,}0001$; *L. major* $p=0{,}0002$; *L. mexicana* $p=0{,}004$).

Monozyten des menschlichen Bluts stellen keine homogene Population dar, sondern lassen sich in drei unterschiedliche Subpopulationen einteilen: klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten. Zur Unterscheidung können die Marker CD14, CD16 und CCR2 (C-C Chemokin-Rezeptor 2) genutzt werden. Klassische Monozyten (cMo) sind $CD14^{high}/CD16^{-}/CCR2^{high}$ und nicht-klassische Monozyten (ncMo) sind $CD14^{low}/CD16^{high}/CCR2^{-}$, während intermediäre Monozyten (intMo) zwischen diesen beiden Populationen ($CD14^{high}/CD16^{low}/CCR2^{+}$) liegen [236]. In einer Studie an *L. braziliensis*-infizierten Patienten konnte gezeigt werden, dass insbesondere intermediäre Monozyten vermehrt vorhanden waren und zu gesteigerten Entzündungsreaktionen beitrugen [237]. Daher wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob eine der genannten Monozyten-Populationen im besonderen Maße an der Steigerung der CD69-Expression der NK-Zellen beteiligt ist. Die Monozyten wurden hierzu über FACS in die drei Subpopulationen sortiert und einzeln zu den NK-Zellen gegeben. Um die Wirkung der einzelnen Populationen direkt vergleichen zu können, wurden sie in einem Experiment immer in derselben Anzahl eingesetzt, obwohl ihr Anteil an der Gesamtfraktion der Monozyten grundsätzlich sehr unterschiedlich ist (cMo ca. 80-90 % der Gesamtmonozytenpopulation, intMo und ncMo je ca. 5-10 %, eigene Daten, [238]). Alle drei Subpopulationen der Monozyten waren grundsätzlich in der Lage, CD69 auf NK-Zellen zu induzieren. Über die Stärke der CD69-Steigerung im Vergleich zur Mediumkontrolle können keine Aussagen getroffen werden, da in den einzelnen Experimenten unterschiedliche Mengen an Monozyten zugegeben wurden. Die Stärke der Steigerung der CD69-Expression der

unterschiedlichen Monozytenpopulationen untereinander lassen sich jedoch vergleichen. Obwohl die Steigerung mit nicht-klassische Monozyten augenscheinlich niedriger ausfiel als mit klassischen oder intermediären Monozyten (Abb. 3 B), konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gemessen werden, sodass sich insgesamt der Subtyp der Monozyten als nicht entscheidend bei der Stimulation der CD69-Expression herausstellte.



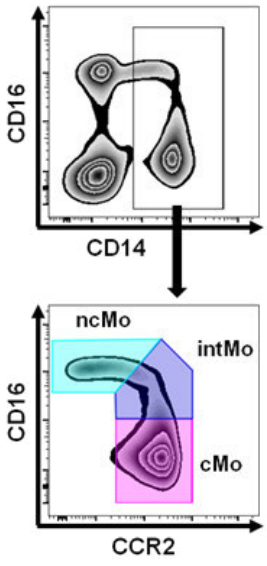


Abbildung 3: Stimulation der CD69-Expression auf NK-Zellen nach Kokultur mit unterschiedlichen Immunzellpopulationen und promastigoten *Leishmania*-Stadien

(A) NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen und Monozyten wurden aus humanen PBMCs über FACS-Sortierung isoliert. Gereinigte NK-Zellen wurden mit sortierten T-Zellen, B-Zellen oder Monozyten substituiert, wobei die ursprünglichen Verhältnisse der PBMC-Gesamtfraktion beibehalten wurden. PBMCs wurden mit Leishmanien in einem Verhältnis 1:10 kokultiviert und dieselbe Menge an Parasiten auch für die Ansätze der einzelnen Zellpopulationen verwendet. NK-Zellen wurden als NKp46^{+}CD3^{-} Zellen nachgewiesen und die CD69-Expression nach Kokultur gemessen. Mittelwert ± SEM von 15/14/14/7 (PBMC/NK+Mo), 15/14/14/4 (NK) und 7/7/6/1 (NK+T/NK+B) Spendern.

(B) Klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten wurden über die Marker CD14, CD16 und CCR2 aus humanen PBMCs durch FACS-Sortierung isoliert und in gleicher Menge zu autologen NK-Zellen gegeben. Die jeweils eingesetzte Anzahl an Monozyten variierte hierbei zwischen den verschiedenen Spendern, wobei immer die maximal mögliche Menge verwendet wurde (Verhältnisse NK:Mo zwischen 1:0,12 und 1:0,45). Das Verhältnis NK-Zellen zu Leishmanien war bei allen Experimenten 1:33. Zum Nachweis der NK-Zellen wurde nur das Lymphozytengate im FSC/SSC genutzt und die CD69-Expression bestimmt. Mittelwert ± SEM von 5/5/4/4 unterschiedlichen Spendern.

(A/B) Signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet und mit $^{\#}$ gekennzeichnet ($^{\#}$ $p<0,05$, $^{\#\#}$ $p<0,01$, $^{\#\#\#}$ $p<0,001$).

3.1.3 MECHANISMUS DER STEIGERUNG DER CD69-EXPRESSION DURCH MONOZYTEN

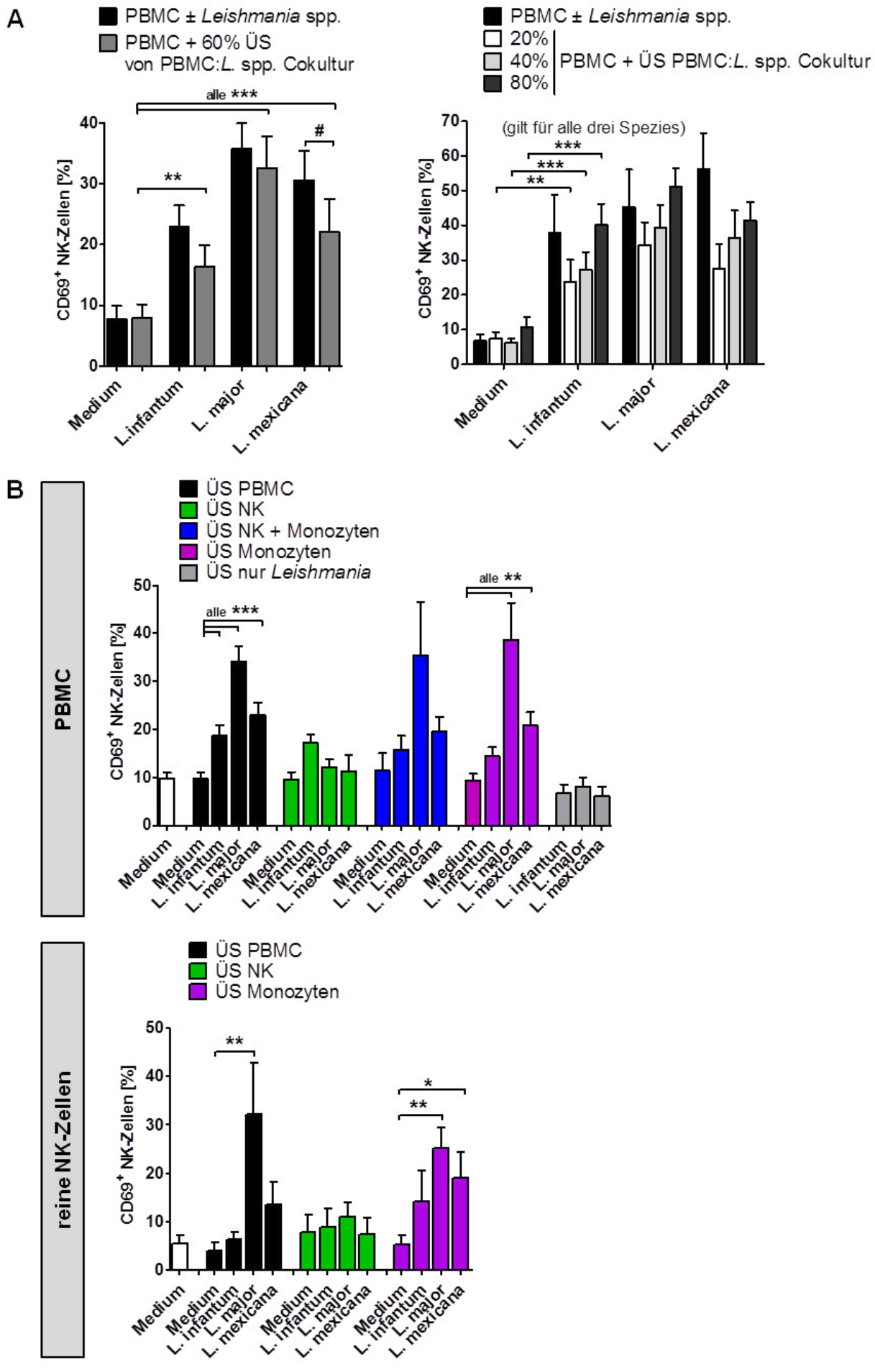
Die Aktivierung von NK-Zellen ist von dem Gleichgewicht zwischen aktivierend und inhibierend wirkenden Signalen abhängig. Dazu besitzen NK-Zellen eine Vielzahl von Rezeptoren, die lösliche oder zellgebundene Moleküle binden können. NK-Zellen können folglich sowohl durch Zytokine und Chemokine als auch durch Kontakt mit anderen Zellen aktiviert werden. In dieser Arbeit wurde deshalb auch untersucht, durch welchen Mechanismus die CD69-Expression auf den NK-Zellen ausgelöst wird. Dazu wurden einerseits Immunzellen mit Überständen von Kokulturen verschiedener Immunzellpopulationen und Leishmanien stimuliert und andererseits Leishmanien-infizierte Monozyten durch eine Membran von NK-Zellen getrennt, sodass kein direkter Kontakt mehr möglich war.

3.1.3.1 Steigerung der CD69-Expression durch Zellkulturüberstand Leishmanien-infizierter Monozyten

Überstände von Leishmanien-Kokulturen mit PBMCs oder einzelnen Immunzellpopulationen wurden mit frisch isolierten Zellen desselben Spenders auf Stimulation der CD69-Expression getestet. Die Überstände von PBMC:*Leishmania*-Kokulturen führten zu einer signifikanten Steigerung von CD69 auf NK-Zellen innerhalb der PBMC-Gesamtfraktion. Die Steigerung der CD69-Expression war dabei dosisabhängig, wobei durch Zugabe des Überstandes in 80 %iger Konzentration ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden konnte wie mit lebenden Leishmanien (Abb. 4 A rechts, Medium ÜS vs. *Leishmania* ÜS 80 %: $p<0,0005$; 40 %: $p<0,0003$; 20 %: $p<0,0045$). In dieser hohen Konzentration ist es jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Effekte eine unspezifische Reaktion der Zellen auf unzureichende Nährstoffzufuhr über das bereits „verbrauchte" Medium darstellen. Daher wurden die Überstände für alle weitergehenden Analysen in einer Konzentration von 60 % eingesetzt, da hierbei einerseits über die Zugabe von 40 % frischen Mediums die Versorgung der Zellen gewährleistet war und andererseits eine CD69-Steigerung auf NK-Zellen erreicht wurde (Medium ÜS vs. *Leishmania* ÜS *L. infantum:* $p=0,0043$; *L. major:* $p<0,0001$; *L. mex*icana: $p=0,0008$), die nur geringfügig unterhalb des Niveaus der lebenden Leishmanien lag (Abb. 4 A).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Überstand Leishmanien-infizierter Monozyten (nur bei *L. major* und *L. mexicana*) ausreichend war, um CD69 auf NK-Zellen in PBMCs in signifikanter Menge zu induzieren (Medium ÜS vs. *Leishmania* ÜS *L. major:* $p=0,002$; *L. mexicana:* $p=0,004$), während Überstände von reinen NK-Zellen oder von reinen Leishmanien, die unter denselben Bedingungen kultiviert wurden wie die humanen Zellen, keinen Effekt hatten. Die Überstände von infizierten Monozyten hatten dabei eine direkte Wirkung auf NK-Zellen, da sie nicht nur bei NK-Zellen innerhalb der PBMC-Fraktion, sondern auch bei reinen NK-Zellen die Expression von CD69 induzierten (Abb. 4 B; Medium

ÜS vs. *Leishmania* ÜS *L. major:* p=0,008; *L. mexicana:* p=0,015). Die Überstände von *L. infantum*-Zell-Kokulturen hatten im Vergleich zu den anderen beiden *Leishmania*-Spezies eine geringere Wirkung, sodass die Reaktionen meist nicht signifikant waren. Der in den Überständen vorhandene lösliche Faktor konnte nicht durch Filtration über einen Filter mit 0,22 µm großen Poren entfernt werden. Eine Verunreinigung mit Parasiten oder anderen Zellen kann daher ausgeschlossen werden. Die Wirkung der Überstände wurde durch einmaliges Erhitzen auf 90° C vollkommen aufgehoben, was auf ein Protein als auslösenden Faktor hinweist (Abb. 4 C). Die Überstände von Kokulturen mit fixierten *L. major*-Promastigoten bewirkten eine signifikant geringere Steigerung der CD69-Expression auf NK-Zellen als Überstände von lebenden Parasiten, während Überstände von *Ft*-Lysat keine Wirkung zeigten (Abb. 4 D; ÜS lebende *Leishmania* vs. ÜS fixiert: p=0,0379; ÜS Ft p=0,0121). Mit den beiden anderen *Leishmania*-Spezies wurden Ergebnisse mit ähnlicher Tendenz erreicht, die jedoch nicht signifikant waren. Der lösliche Faktor wurde folglich nur produziert, wenn intakte und im optimalen Fall lebende Leishmanien in der PBMC-Kultur vorhanden waren.


A
PBMC ± Leishmania spp.
PBMC + 60% ÜS von PBMC:L. spp. Cokultur
alle ***
**
#
CD69+ NK-Zellen [%]
Medium
L.infantum
L. major
L. mexicana
PBMC ± Leishmania spp.
20%
40%
80%
PBMC + ÜS PBMC:L. spp. Cokultur
(gilt für alle drei Spezies)
***
***
**
B
PBMC
ÜS PBMC
ÜS NK
ÜS NK + Monozyten
ÜS Monozyten
ÜS nur Leishmania
alle ***
alle **
reine NK-Zellen
ÜS PBMC
ÜS NK
ÜS Monozyten
**
*
**

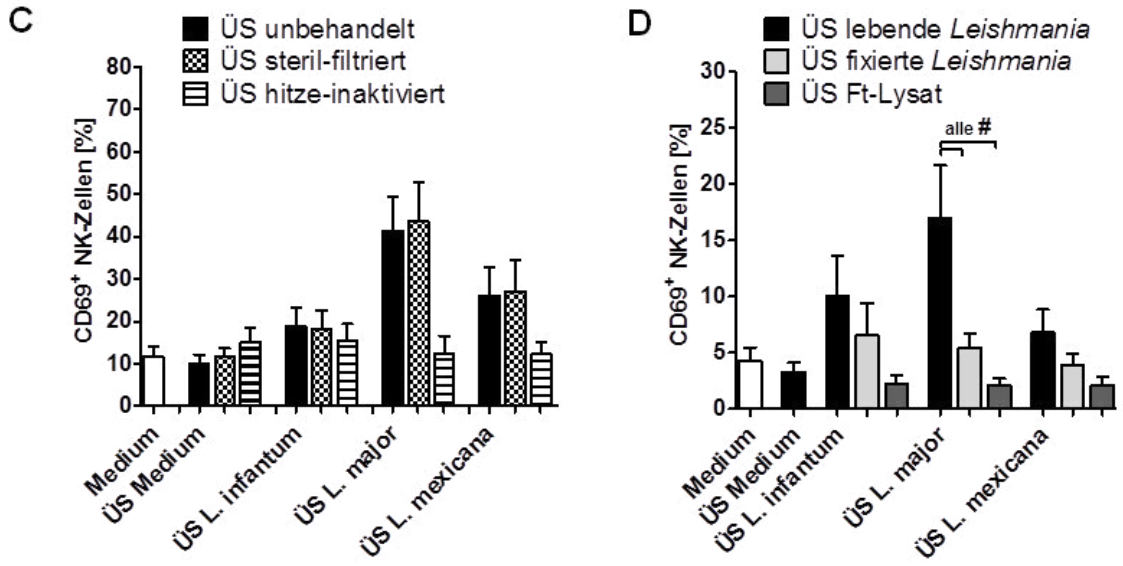


Abbildung 4: Stimulation der CD69-Expression auf NK-Zellen durch einen von Monozyten produzierten löslichen Faktor

Humane PBMCs oder reine NK-Zellen wurden für 20 h mit Zellkulturüberstand (ÜS) von Zell-*Leishmania*-Kokulturen desselben Spenders stimuliert und die Oberflächenexpression von CD69 der NK-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Überstände in einer Konzentration von 60 % eingesetzt. Die NK-Zellen in der PBMC-Gesamtfraktion wurden als $NKp46^{+}CD3^{-}$ Zellen identifiziert. Bei den aufgereinigten NK-Zellen wurden alle lebenden Zellen im Lymphozytengate (FSC/SSC) analysiert.

(A) Vergleich der CD69-Expression auf NK-Zellen in PBMCs nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Überstandes von PBMC-*Leishmania* Kokulturen mit lebenden Leishmanien.
Mittelwert ± SEM von 24/23/20/15 Spendern [linker Graph] bzw. 11/4/3/4 (*Leishmania* spp.), 9/9/7/8 (20 %), 10/11/7/7 (40 %), 9/9/7/9 (80 %) [rechter Graph] Spendern.

(B) CD69-Expression auf NK-Zellen in PBMCs oder reinen NK-Zellen nach Stimulation mit Überständen (ÜS) von Kokulturen unterschiedlicher Immunzellen mit *Leishmania*-Promastigoten.
Mittelwert ± SEM von 59/59/50/49 (ÜS PBMC), 4/3/4/3 (ÜS NK), 4/4/4/2 (ÜS NK+Mo), jeweils 4 (ÜS Mo), 8/8/6 Spendern (ÜS nur Leishmania) [PBMC Kulturen] bzw. 7/7/6/5 (ÜS PBMC), 3/3/2/3 (ÜS NK), jeweils 6 (ÜS Mo) Spendern [reine NK-Zellen].

(C) CD69-Expression auf NK-Zellen in PBMCs nach Stimulation mit unterschiedlich behandelten Überständen von PBMC-*Leishmania* Kokulturen. Mittelwert ± SEM von 10/10/8/10 (unbehandelt), 9/9/7/9 (filtriert) und 9/9/6/8 (inaktiviert) Spendern.

(D) CD69-Expression auf NK-Zellen in PBMCs nach Stimulation mit Kokultur-Überständen von PBMCs mit lebenden oder toten Leishmanien oder Leishmanien-Lysat. Mittelwert ± SEM von 7 (ÜS lebend/ÜS fixiert) und 4 (ÜS Lysat) Spendern.

(A-D) Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet. Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen wurden mit * und Unterschiede zwischen unterschiedlich stimulierten Zellen mit # gekennzeichnet (*/# $p<0,05$, **/## $p<0,01$, ***/### $p<0,00$

3.1.3.2 Analyse der Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen

Monozyten sind in der Lage, diverse unterschiedliche Zytokine und Chemokine zu produzieren. Um die Frage zu beantworten, welche löslichen Moleküle in den Zellkulturüberständen von *Leishmania*-stimulierten Monozyten für die Steigerung der CD69-Expression auf humanen NK-Zellen verantwortlich sein könnten, wurde ein Procarta® Multiplex Immunoassay (eBioscience/ affymetrix) durchgeführt. Mit dem *Human Cytokine/ Chemokine/ Growth Factor Panel 1* können gleichzeitig 45 verschiedene Moleküle in einer einzigen Probe quantifiziert werden. In dieser Analyse wurden Überstände von NK-Zell-*L. major*-Kokulturen unter An- und Abwesenheit von Monozyten dreier unterschiedlicher Spendern miteinander verglichen. *L. major*-stimulierte Proben wurden hier ausgewählt, da diese *Leishmania*-Spezies in den vorangegangenen Untersuchungen stets den stärksten Effekt bezüglich der CD69-Expressionssteigerung zeigte (Abb. 4).

Insgesamt zeigten sich starke individuelle Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern insbesondere bezüglich der Quantität, aber auch der Qualität der Zytokin/Chemokin-Freisetzung (Abb. 5). In den Überständen von *L. major*-stimulierten NK-Zellen konnten insgesamt nur sieben Moleküle in geringen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 5 B). Dabei waren nur die beiden Wachstumsfaktoren PDGF-BB (*platelet-derived growth factor BB*) und VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) sowie die Zytokine IL-9 und IL-18 bei mehr als einem Spender nachweisbar. Da PDGF-BB und VEGF-A auch in vergleichbaren Konzentrationen in den Überständen von *L. major*-stimulierten NK-Zell/Monozyten-Kokulturen gemessen wurden, stammten sie folglich nicht von Monozyten. Auch IL-9 konnte ausgeschlossen werden, da dieses Zytokin in den Überständen von NK-Zell/Monozyten-Kokulturen nicht mehr nachweisbar war. Die von *L. major*-stimulierten Monozyten produzierten Faktoren umfassten daher GRO-α (*growth related oncogene*, syn. CXCL1), IL-1RA, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*, syn. CCL2), MIP-1α, MIP-1β (*macrophage inflammatory protein*) und SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*, syn. CXCL12) (Abb. 5 A). Über Verwendung zusätzlicher ELISAs wurde zusätzlich IL-12p40 in Überständen von PBMCs nachgewiesen, welches nach Depletion der Monozyten nicht mehr messbar war (Abb. 5 C). Die Chemokine GRO-α, MCP-1 und SDF-1 sowie der IL-1 Rezeptor-Antagonist wurden in der unmittelbaren weiteren Analyse nicht berücksichtigt, da sie bisher nicht als NK-Zell-aktivierende Moleküle bekannt sind. Alle anderen Faktoren stellen potenzielle Stimulatoren der NK-Zell-Aktivierung dar [7, 48, 49, 83, 239-244] und wurden als möglicher Signalgeber der NK-Zellaktivierung durch *Leishmania*-stimulierte Monozyten in Betracht gezogen.

A

NK-Zellen + Monozyten + *L.major*				
Zytokin/ Chemokin [pg/ml]	**Spender 1**	**Spender 2**	**Spender 3**	**Mittelwert ± SD**
BDNF	<1,7	<1,7	<1,7	
EGF	<2,6	<2,6	<2,6	
Eotaxin	<0,8	<0,8	<0,8	
FGF-2	<3	<3	<3	
GM-CSF	<20,9	<20,9	<20,9	
GRO-α	146,8	49,5	<1,6	98,1±68,8
HGF	<8,8	<8,8	<8,8	
IFN-α	<0.6	<0.6	<0.6	
IFN-γ	<6	<6	<6	
IL-1RA	17880,1	10091,3	913,3	9628,5±8493,3
IL-1α	1,9	<0,6	<0,6	
IL-1β	322,5	323,6	21,2	222,4±174,3
IL-2	<5	<5	<5	
IL-4	35,3	<14,6	<14,6	
IL-5	<6,8	<6,8	<6,8	
IL-6	717,6	101,3	11	276,7±384,5
IL-7	<0,6	<0,6	<0,6	
IL-8	3317	13704,5	1411,2	6144,2±6616,3
IL-9	<10	<10,	23,6	
IL-10	1,6	1,556	<1,489	1,6±0,1
IL-12p70	<6,7	<6,7	<6,7	
IL-13	<2	<2	<2	
IL-15	<3	<3	<3	
IL-17A	<2,4	<2,4	<2,4	
IL-18	61	51,2	<9,8	56,1±6,9
IL-21	38,2	<10,6	<10,6	
IL-22	<30	<30	<30	
IL-23	<10,3	<10,3	<10,3	
IL-27	<21,7	<21,7	<21,7	
IL-31	<22,6	<22,6	<22,6	
IP-10	<2,6	<2,6	<2,6	
LIF	17	<5,3	<5,3	
MCP-1	83,5	19	<1,7	51,3± 45,6
MIP-1α	>5950	196,2	49,5	2065,2±3365,1
MIP-1β	3735,4	1924,2	614,8	2091,5±1567
NGFβ	<7,9	<7,9	<7,9	
RANTES	<0,6	29,2	<0,6	
PDGF-BB	2678,7	288,5	<7,6	1483,6±1690,1
PIGF-1	3,3	1,4	<1,1	
SCF	<1,5	<1,5	1,8	
SDF-1α	701,2	384	<13,6	542,6±224,3
TNF-α	40,4	<4,7	<4,7	
TNF-β	<3,5	<3,5	<3,5	
VEGF-A	56,2	173,4	272,1	167,2±108,1
VEGF-D	<8,7	<8,7	<8,7	

B

NK-Zellen + *L. major*			
Zytokin/ Chemokin [pg/ml]	**Spender 1**	**Spender 2**	**Spender 3**
IL-9	43,6	<10	129,5
IL-18	17,6	10,1	<9,8
IL-21	97,1	<10,6	<10,6
MIP-1b	<5,2	100,1	<5,2
PDGF-BB	5469,2	161,4	<7,6
PIGF-1	2,1	<1,1	<1,1
VEGF-A	140,9	118,9	<5,9

C

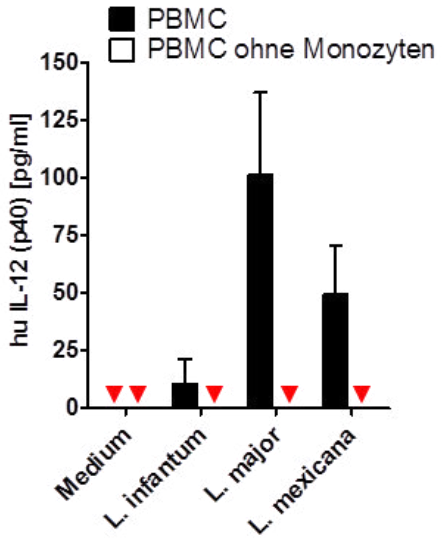


Abbildung 5: Nachweis von Zytokinen und anderen Molekülen in Zellkulturüberständen von *Leishmania*-stimulierten PBMCs, aufgereinigten NK-Zellen oder Monozyten

(A/B) Multiplex Immunoassay mit Zellkulturüberständen von NK-Zell/Monozyten/*L. major*-Kokulturen. Reine NK-Zellen wurden mit *L. major*-Promastigoten unter An- **(A)** oder Abwesenheit **(B)** von Monozyten desselben Spenders für 20 h kokultiviert. Die Überstände dieser Kulturen wurden über einen Multiplex Immunoassay auf den Gehalt von 45 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen untersucht. Es wurden je 3 Spender analysiert. Werte unterhalb der Nachweisgrenze sind mit „< der jeweiligen Nachweisgrenze“ angegeben. Von den Kokulturen mit NK-Zellen und Monozyten sind die Werte aller Moleküle abgebildet; von den reinen NK-Zellen nur jene, die oberhalb der Nachweisgrenze lagen. Diejenigen Zytokine, die bei mindestens zweien der drei Spender nachweisbar waren, wurden dunkel hinterlegt und der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

(C) IL-12 (p40) ELISA. Humane PBMCs oder PBMCs, aus denen Monozyten entfernt wurden, wurden mit *Leishmania*-Promastigoten unterschiedlicher *Leishmania*-Arten in einem Verhältnis von 1:10 (bezogen auf die PBMC-Gesamtfraktion) für 20 h kokultiviert und die IL-12p40-Konzentration in den Zellkulturüberständen mittel ELISA gemessen. Sensitivitätsgrenze: 15,6 pg/ml. Mittelwert ± SEM von 6/6/5/5 (PBMC) und 6/5/5/6 (PBMC ohne Monozyten) Spendern. ▼: unterhalb der Nachweisgrenze

3.1.3.3 Blockierung von NK-Zell-aktivierenden Zytokinen in Zellkulturüberständen

Ausgehend von den unter 3.1.3.2 benannten Daten wurde weitergehend untersucht, welche der nachgewiesenen Zytokine generell in der Lage sind, innerhalb desselben Zeitraums wie Leishmanien (20 h) eine Stimulation der CD69-Expression auf NK-Zellen hervorzurufen. Dazu wurden PBMCs mit unterschiedlichen rekombinanten Zytokinen beziehungsweise aufgereinigten Zytokinen (IFN-α/β) stimuliert. Neben den im Multiplex Assay gemessenen Zytokinen (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18, MIP-1α) wurden auch weitere bekannte NK-Zell-aktivierende Moleküle getestet (IFN-α/β, IL-2, IL-12 und IL-15). IL-10 wurde in diesem Zusammenhang nicht analysiert, da die im Multiplex-Assay gemessenen Konzentrationen bei allen Spendern sehr gering waren. Außerdem ist IL-10 bei der humanen Leishmaniose eher als inhibierend wirkendes Zytokin beschrieben [220, 245, 246], sodass eine Aktivierung der CD69-Expression auf NK-Zellen durch IL-10 unwahrscheinlich erscheint. Von allen getesteten Zytokinen konnte nur mit IFN-α/β, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-15 und IL-18 eine Steigerung der CD69 Expression auf NK-Zellen erreicht werden (Abb. 6 A), wobei nur die Reaktionen von IL-6 nicht signifikant waren (Medium vs. IFN-α/β/IL-18/IL-15 $p<0,0001$; IL-1β $p=0,0028$; IL-2 $p=0,003$).

Um zu klären, ob und welche der potenziell CD69-stimulierenden Zytokine in den Überständen von *Leishmania*-stimulierten Monozyten für diese Reaktion verantwortlich sein könnten, wurden die Zytokine in den Überständen über Zugabe neutralisierender Antikörper blockiert. Da die Anzahl der Überstände von reinen Monozyten begrenzt war, wurden diese Analysen auch mit Überständen von PBMC-Gesamtfraktionen durchgeführt. Zur Neutralisation der Zytokine wurden die Überstände vor der Stimulation der Zellen mit spezifischen blockierenden Antikörpern beziehungsweise den jeweiligen Kontroll-Antikörpern (Analysen in Anhang 1) vorbehandelt. Als Kontrolle für die erfolgreichen Neutralisation wurden die Zellen in parallelen Ansätzen auch mit rekombinanten Zytokinen stimuliert, die zuvor mit dem dafür passenden Antikörper blockiert worden waren. Die Zytokine wurden entweder einzeln (IL-1β, IL-2, IL-6 und IL-15) oder in Kombination blockiert (IFN-α/β, IL-12, IL-18).

Bei keinem der Zytokine hatte die Neutralisation einen Einfluss auf die überstandsvermittelte Steigerung der CD69-Expression (Abb. 6 B), während die Stimulation durch die rekombinanten Zytokine komplett aufgehoben (ÜS unbehandelt vs. ÜS mit Antikörpern IL-12/18 $p=0,0012$; IFN-α/β $p=0,0006$; IL-1β $p=0,0379$) oder zumindest reduziert (IL-15, IL-2 nicht signifikant) werden konnte. In Folge ist keines der oben genannten Zytokine an der Wirkung der Überstände von *Leishmania*-stimulierten Monozyten beteiligt.

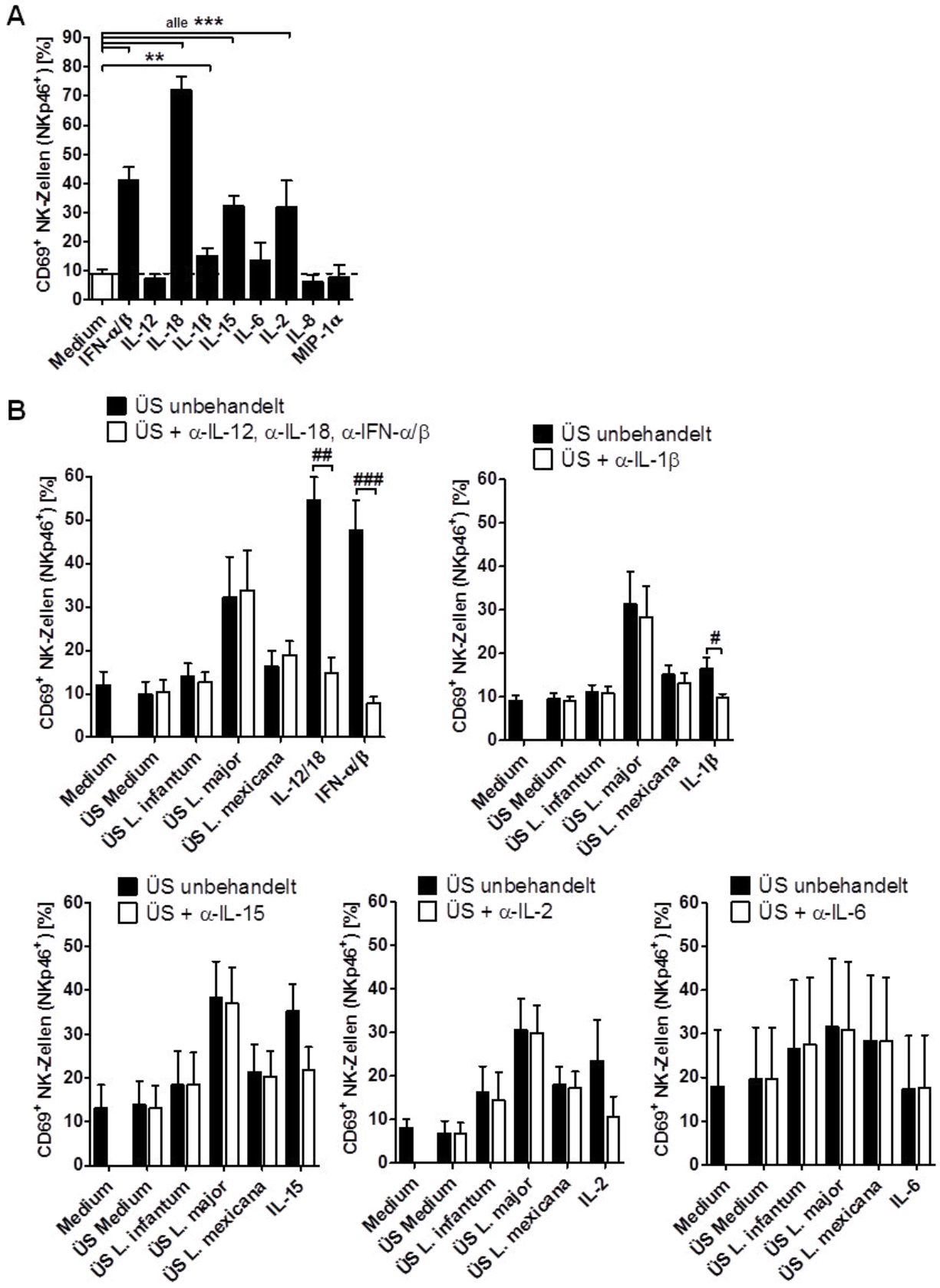

A
alle ***
**
CD69+ NK-Zellen (NKp46+) [%]
Medium
IFN-α/β
IL-12
IL-18
IL-1β
IL-15
IL-6
IL-2
IL-8
MIP-1α
B
ÜS unbehandelt
ÜS + α-IL-12, α-IL-18, α-IFN-α/β
##
###
ÜS Medium
ÜS L. infantum
ÜS L. major
ÜS L. mexicana
IL-12/18
IFN-α/β
ÜS + α-IL-1β
#
IL-1β
ÜS + α-IL-15
IL-15
ÜS + α-IL-2
IL-2
ÜS + α-IL-6
IL-6

Abbildung 6: Einfluss der Zytokin-Neutralisation auf die NK-zelluläre CD69-Expression nach Stimulation mit Zellkulturüberständen von *Leishmania*-stimulierten PBMCs.
Humane PBMCs wurden für 20 h entweder mit rekombinanten Zytokinen (Konzentration unter 2.1.5) oder 60 % Zellkulturüberstand von PBMC-*Leishmania* Kokulturen desselben Spenders stimuliert und die CD69-Expression der $NKp46^+CD3^-$ NK-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurden die Zytokine und Überstände vor Stimulation mit spezifischen blockierenden Antikörpern in den unter 2.1.4 angegebenen Konzentrationen behandelt (37°C, 1-2 h).
(A) CD69-Expression auf NK-Zellen in PBMC-Gesamtfraktionen nach Stimulation mit unterschiedlichen rekombinanten Zytokinen. Mittelwert ± SEM von 57/17/11/12/8/19/8/7/3/3 Spendern für die angegebenen 10 Stimulationsbedingungen.
(B) CD69-Expression auf NK-Zellen in PBMC-Gesamtfraktionen nach Stimulation mit Zellkulturüberstände von PBMC-*Leishmania*-Kokulturen (lebende Leishmanien), die vor dem Einsatz zur Stimulation mit blockierenden Antikörpern für verschiedene Zytokine behandelt worden waren. Mittelwert ± SEM von 7/7/7/6/7/7/7 (IFN-α/β, IL-12, IL-18), 7/7/7/7/6/7 (IL-1β), 9/9/9/7/8/9 (IL-15), je 5 (IL-2), je 4 (IL-6) Spendern.
(A/B) Signifikante Unterschiede zwischen blockierten und unblockierten Proben wurden mittels Man-Whitney-Test errechnet und mit $^{\#}$ gekennzeichnet ($^{\#}$ $p<0,05$, $^{\#\#}$ $p<0,01$, $^{\#\#\#}$ $p<0,001$).

3.1.4 STIMULATION DER CD69-EXPRESSION DURCH DIREKTEN KONTAKT VON NK-ZELLEN MIT LEISHMANIEN-INFIZIERTEN MONOZYTEN

Da NK-Zellen nicht nur durch lösliche Faktoren, sondern auch durch direkten Kontakt zu anderen Zellen aktiviert werden können, wurden hier zudem Analysen in einem Transwell-System durchgeführt. Dabei befinden sich die Zellen in demselben Reaktionsansatz und teilen sich in Folge dasselbe Medium, werden aber über eine Membran (Porengröße: 0,4 µm) an einem direkten Kontakt gehindert. Lösliche Moleküle sind jedoch in der Lage, die Membran zu passieren. Durch Verhinderung des Kontakts von NK-Zellen zu Leishmanien-infizierten Monozyten wurde die Steigerung der CD69-Expression vollkommen unterbunden (Abb. 7 A). In Verbindung mit den Daten zum Transfer von Kulturüberständen zeigt das Transwell-Experiment, dass die Hochregulation der NK-zellulären CD69-Expression nach Kokultur mit Leishmanien-infizierten Monozyten zumindest einen initialen NK-Zell-Monozyten-Kontakt voraussetzt, in dessen Folge dessen dann ggf. der/die verantwortliche(n) lösliche(n) Faktor(en) synthetisiert wird/werden.

3.1.4.1 Blockierung von membrangebundenen NK-Zell-aktivierenden Zytokinen während der Kokultur

IL-15 kommt nicht nur in löslicher Form vor, sondern wird auch auf der Zellmembran bestimmter Zellen wie Monozyten „präsentiert" [247, 248]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch IL-18 auf Makrophagen in einer membrangebundenen Form vorliegen kann [249]. Darum wurde in dieser Arbeit auch der mögliche Beitrag von Membranassoziiertem IL-18 und IL-15 analysiert. Dazu wurden neutralisierende Antikörper direkt zu der Kokultur von Monozyten und Leishmanien gegeben, sodass sie über den gesamten Inkubationszeitraum von 20 h wirksam waren. Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit der Antikörper wurden die

Zellen mit rekombinantem humanem IL-15 oder IL-18 stimuliert und gleichzeitig der jeweilige blockierende Antikörper hinzugegeben. Durch diese Zugabe konnte die Wirkung der rekombinanten Zytokine komplett aufgehoben werden, was eine gute Funktionalität der blockierenden Antikörper beweist (Abb. 7 B, Zytokin vs. Zytokin mit Antikörper; IL-15 PBMC: p=0,0065; IL-18 PBMC: p=0,0079; IL-18 NK+Mo: p=0,041).

Die Neutralisation von IL-15 in der Kokultur mit PBMCs hatte keinen signifikanten Einfluss auf die durch *Leishmania*-infizierte Monozyten ausgelöste Steigerung der CD69-Expression auf NK-Zellen (Abb. 7 B). Über die Ansätze mit gereinigten NK-Zellen plus Monozyten kann keine Aussage getroffen werden, da nur Daten von zwei Spendern vorliegen. Die Tendenz ist jedoch dieselbe wie bei den PBMCs. Die Zugabe von blockierenden IL-18-Antikörpern zur PBMC-*Leishmania* Kokultur führte dagegen zu einer signifikanten Reduktion der CD69-Expression auf NK-Zellen (Abb. 7 C; Leishmanien vs. Leishmanien mit Antikörper; *L. infantum:* p=0,344; *L. major:* p=0,0056; *L. mexicana:* p=0,0148). Auch bei Verwendung von reinen NK-Zellen plus Monozyten wurde eine Reduktion der CD69-Steigerung erreicht, welche jedoch nicht signifikant war. Eine komplette Aufhebung der Wirkung der infizierten Monozyten wurde in keinem der Fälle erreicht. In Verbindung mit den Überstandtransferexperimenten lässt dies darauf schließen, dass membrangebundenes IL-18 an der Initiation der CD69-Hochregulation beteiligt ist. Dagegen spielen bei der durch den Überstand vermittelte Stimulation der CD69-Expression von NK-Zell-PBMC- bzw. NK-Zell-Monozyten-Kokulturen offensichtlich andere Faktoren eine Rolle.

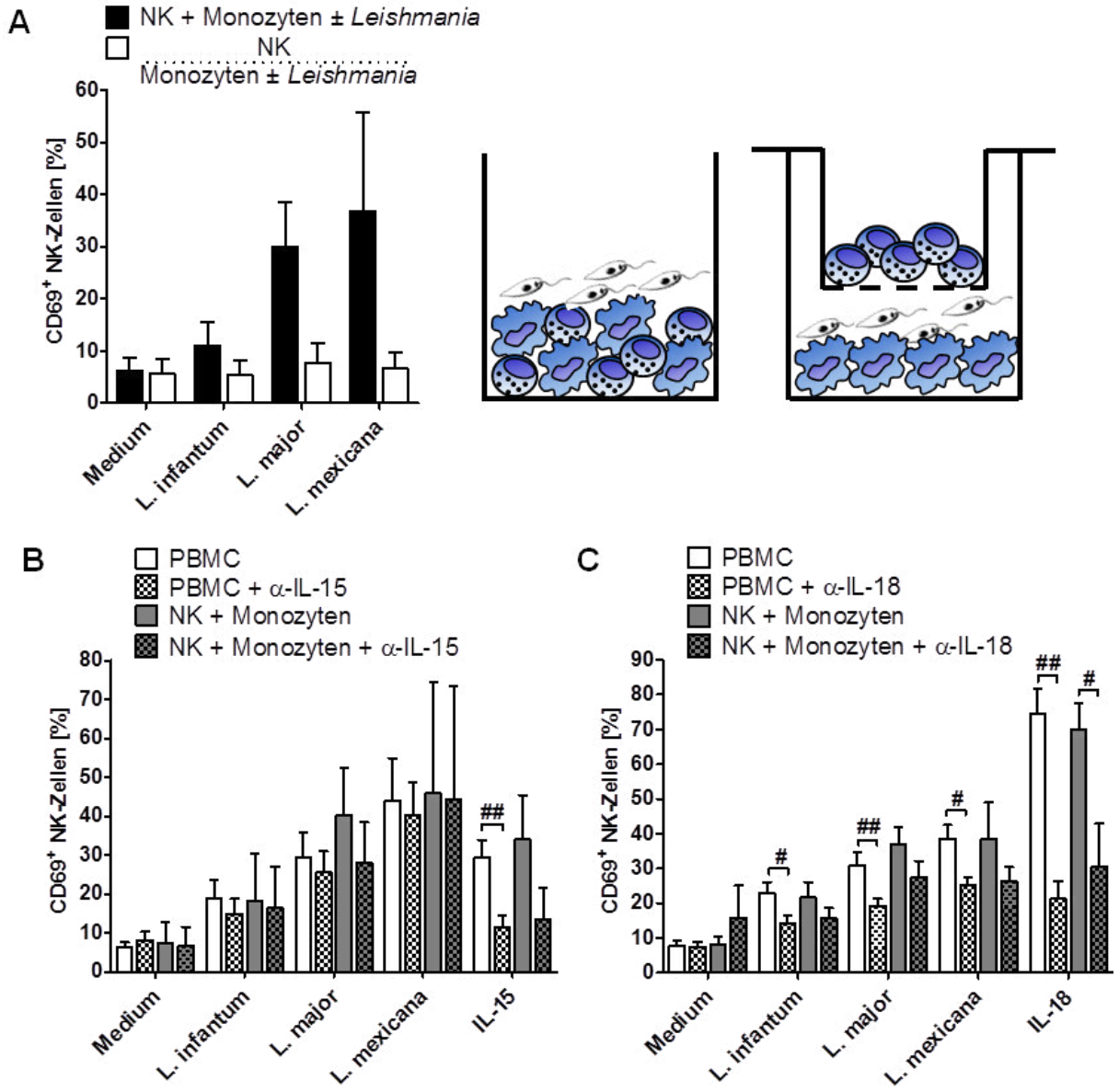


Abbildung 7: Kontakt- und IL-18-abhängige Steigerung der NK-zellulären CD69-Expression durch Monozyten

(A) NK-Zellen und Monozyten desselben Spenders wurden aus PBMCs aufgereinigt und in den ursprünglich in den PBMCs vorhandenen Verhältnissen für 20 h mit oder ohne Transwell (Porengröße 0,4 µm) mit Leishmanien kokultiviert. Die Menge an Leishmanien entsprach hierbei, bezogen auf die NK-Zellen, immer einem Verhältnis von 1:10. Die NK-Zellen wurden über die Marker $CD3^-$ und $NKp46^+$ nachgewiesen und die CD69-Expression nach Kokultur durchflusszytometrisch gemessen. Mittelwert ± SEM von 6/5/6/3 und 3/5/6/3 Spendern.

(B/C) PBMCs oder aus PBMCs aufgereinigte NK-Zellen und Monozyten wurden 20 h lang in An- oder Abwesenheit von blockierenden Antikörpern für IL-15 **(B)** oder IL-18 **(C)** mit Leishmanien, IL-15 (12 ng/ml) oder IL-18 (10 ng/ml) kokultiviert. Die Leishmanien wurden in Bezug auf die PBMCs in einem Verhältnis von 1:10 eingesetzt und dieselbe Anzahl an Parasiten auch bei der NK-Zell-Monozyten Kokultur zugegeben. Mittelwert ± SEM von **(B)** 19/8/6/3/10 (PBMCs) bzw. 2 (NK+Mo) Spendern und **(C)** 16/15/16/8/5 (PBMCs) bzw. 8/8/85/6 (NK+Mo) Spendern.

(B/C) Signifikante Unterschiede zwischen blockierten und unblockierten Proben wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet und mit $^{\#}$ gekennzeichnet ($^{\#}$ $p<0,05$, $^{\#\#}$ $p<0,01$, $^{\#\#\#}$ $p<0,001$).

3.1.4.2 Nachweis von IL-18 auf der Oberfläche *Leishmania*-infizierter Monozyten

Um die Beteiligung von membrangebundenem IL-18 an der Leishmanien-induzierten CD69-Steigerung auf NK-Zellen zu verifizieren, sollte IL-18 auf der Oberfläche von Monozyten direkt angefärbt werden. Wie andere Mitglieder der IL-1-Familie wird IL-18 nicht unmittelbar in einer aktiven Form synthetisiert, sondern liegt zuerst in einer inaktiven Pro-Form (pro-IL-18) im Zytoplasma vor. In einigen Zelltypen, unter anderem auch in Monozyten, wird pro-IL-18 konstitutiv exprimiert [250, 251]. Erst nach Aktivierung von Caspasen kommt es zur Umwandlung in aktives IL-18 [252, 253]. Für den Nachweis von membrangebundenem IL-18 (memIL-18) wurden Monozyten negativ über das *Monocyte Isolation Kit II* (Miltenyi) aufgereinigt und mit *Leishmania*-Promastigoten kokultiviert. Um zwischen intrazellulärem pro-IL-18 und Oberflächen-memIL-18 unterscheiden zu können, wurde die Zellen entweder nur mit Formaldehyd fixiert (Nachweis von memIL-18) oder zusätzlich mit Methanol permeabilisiert (Nachweis von memIL-18 und intrazellulärem pro-IL-18). Anschließend wurden die Zellen mit einem IL-18-spezifischen Antikörper gefärbt und im konfokalen Mikroskop analysiert. Bei den fixierten Zellen ohne Permeabilisierung waren IL-18 in der Mediumkontrolle nicht oder nur in geringe Mengen nachweisbar, was dafür spricht, dass unstimulierte Monozyten kaum IL-18 auf der Oberfläche exprimieren. Nach Kokultur mit Leishmanien war dagegen eine deutliche, diffus über die Zellen verteilte Färbung sichtbar (Abb. 8), wobei die Stärke der Reaktion Spender-abhängig variierte. Generell induzierte *L. infantum* schwächere Reaktionen als die anderen beiden verwendeten Spezies. Nur nach Verwendung von *L. major*-Promastigoten erschien die IL-18-spezifische Reaktion nach zusätzlicher Permeabilisierung der Zellen stärker (Abb. 8 A). In der Konjugat-Kontrolle konnte grundsätzlich keine Reaktion nachgewiesen werden. Bei Vorbehandlung des IL-18-Antikörpers mit rekombinantem IL-18, kam es zu einer Reduktion der IL-18-Färbung (Anhang 2), was die Spezifizität der Reaktion belegt. Die vorliegenden Daten deuten somit darauf hin, dass durch den Kontakt zwischen Monozyten und Leishmanien die Produktion von IL-18 in Monozyten induziert wird. Mittels dieser Technik war es jedoch nicht möglich, präzise zwischen intrazellulärem und membrangebundenem IL-18 zu unterscheiden. In Folge kann nur konstatiert werden, dass membranständiges IL-18 grundsätzlich an der Steigerung der NK-zellulären CD69-Expression beteiligt zu sein scheint.

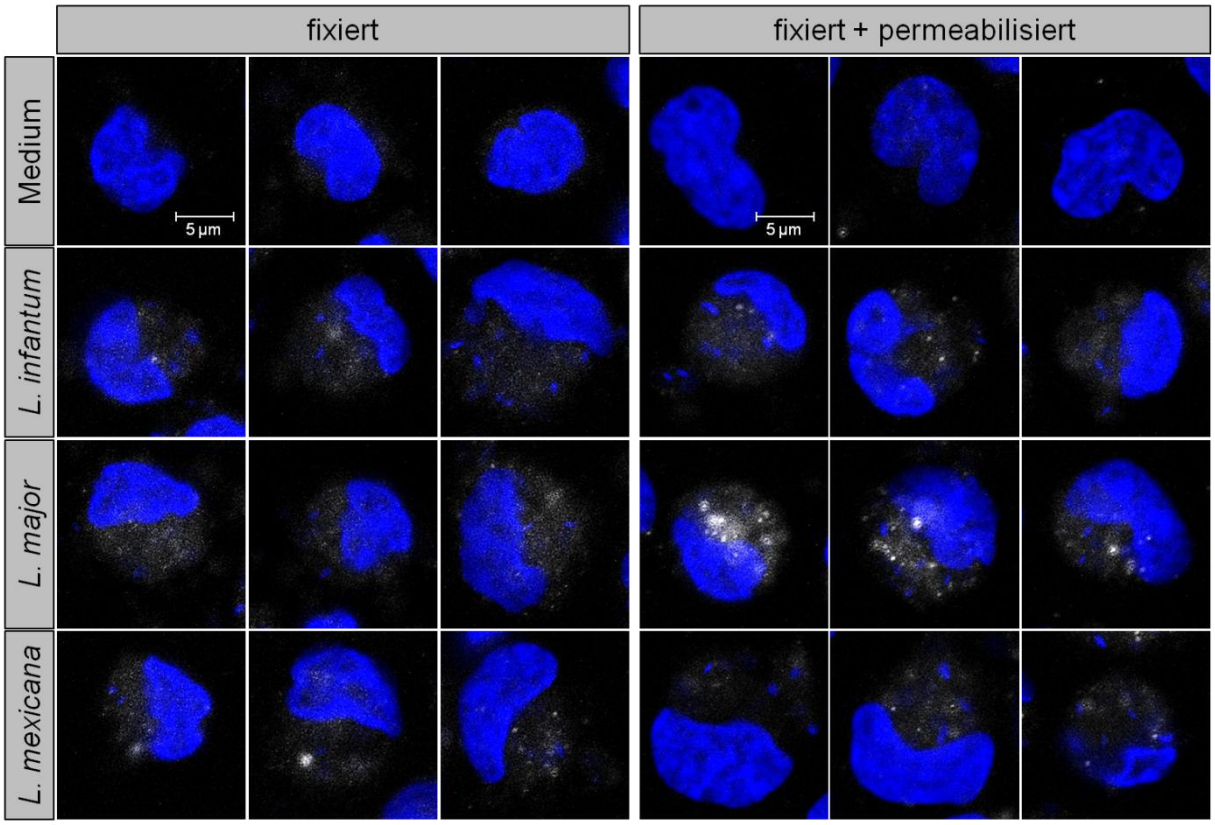


Abbildung 8: Nachweis von membrangebundenem und intrazellulärem IL-18 bei Monozyten
Monozyten wurden negativ aus PBMCs aufgereinigt und mit Leishmanien in einem Verhältnis von 1:10 für 20 h kokultiviert. Nach Fixierung mit Formaldehyd bzw. zusätzlicher Permeabilisierung mit Methanol wurde IL-18 (weiß) auf und in den Zellen angefärbt. Der Zellkern wurde mittels DAPI (blau) angefärbt. Es sind je drei Zellen eines Spenders exemplarisch dargestellt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind repräsentativ für drei Experimente mit unterschiedlichen Spendern.

3.2 Produktion von IFN-γ und Zytotoxizität von humanen NK-Zellen nach Kokultur mit Leishmanien

3.2.1 KOKULTUR VON NK-ZELLEN UND LEISHMANIEN

Eine Beteiligung von NK-Zellen an der Abwehr einer Leishmanien-Infektion in vivo setzt den Ablauf von NK-Zell-Effektorfunktionen voraus. Ein Schlüssel-Zytokin in der NK-Zell-vermittelten Abwehr ist IFN-γ, aber auch durch zytotoxische Reaktionen mit anschließender Lyse infizierter Zellen könnten NK-Zellen zu einer Eindämmung der Infektion beitragen. Es wurde daher untersucht, ob die NK-Zellen in Reaktion auf *Leishmania*-Parasiten IFN-γ produzieren und/oder eine gesteigerte Zytotoxizität zeigen.

Die Kokultur von PBMCs mit Leishmanien alleine führte in dem analysierten Zeitraum zu keiner gesteigerten Produktion von IFN-γ. Dies wurde sowohl mittels Sandwich-ELISA (Abb. 9 A) als auch über intrazelluläre FACS-Färbung (Abb. 9 B) ermittelt. Die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität wurde über einen ^{51}Chrom-Freisetzungsassay bestimmt. Nach der Kokultur von PBMCs mit Leishmanien war keine Steigerung, sondern eine Reduktion der Zytotoxizität der

NK-Zellen in der PBMC-Gesamtfraktion zu beobachten (Abb. 9 C; nur das Verhältnis 20:1 zeigte signifikante Reaktionen im Vergleich zur Mediumkontrolle, p=0,41). Als Kontrollen dienten Zellen, die mit IL-12 und IL-18 stimuliert wurden. Diese Behandlung stellt einen stark aktivierenden Stimulus für NK-Zellen dar und vermittelt die Produktion von IFN-γ (Medium vs. IL-12/18: p<0,0001) als auch eine gesteigerte NK-zelluläre Zytotoxizität (20:1/ 10:1/ 5:1/ 2,5:1 p=0,0048/ 0,0120/ 0,176/ 0,0120). Diese Analysen zeigen, dass NK-Zellen in PBMC-Kulturen durch *Leishmania*-Promastigote zwar aktiviert werden und in der Folge CD69 verstärkt exprimieren, die aktivierenden Signale aber nicht ausreichend sind, um klassische Effektorfunktionen von NK-Zellen zu induzieren.

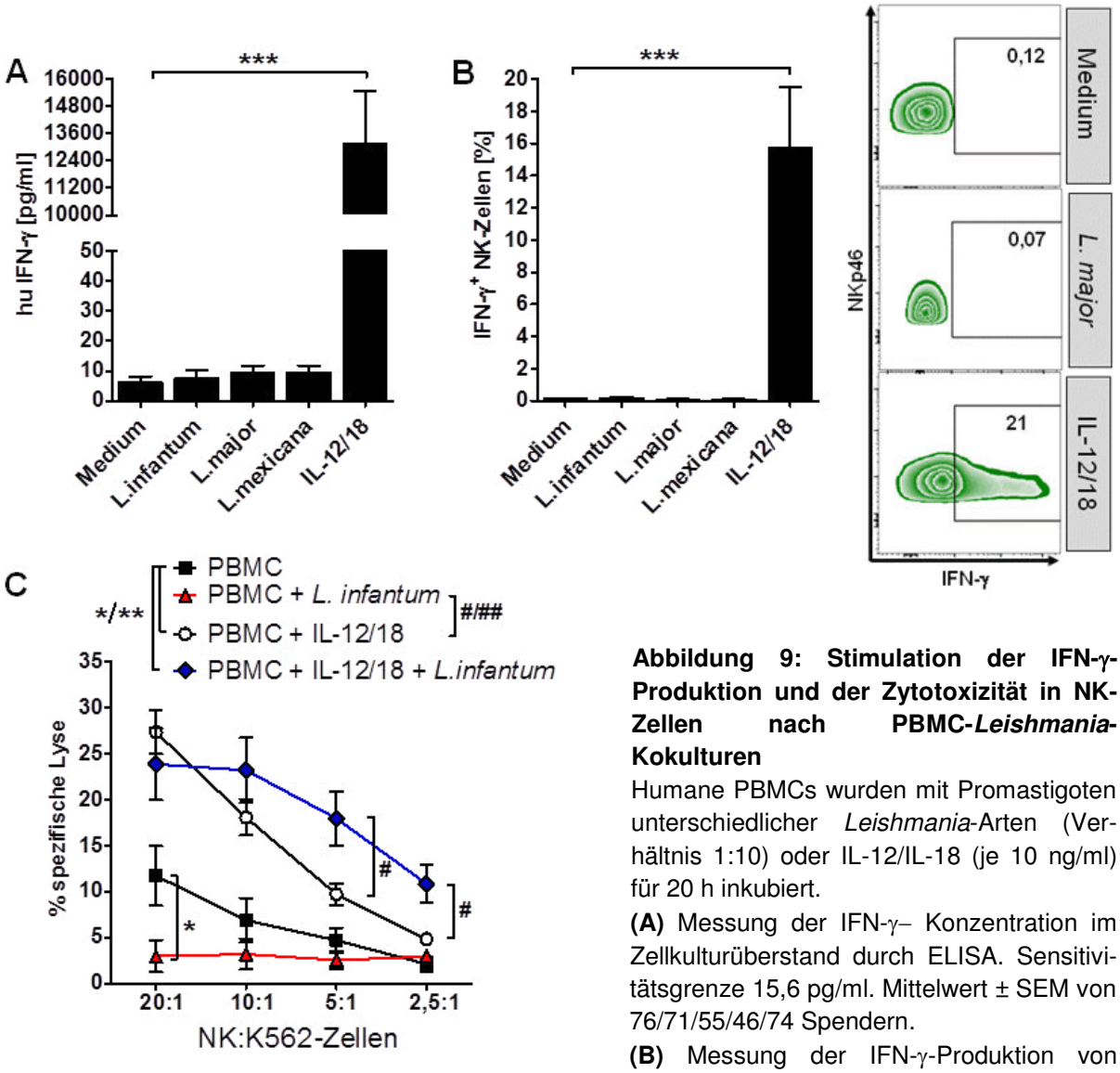


Abbildung 9: Stimulation der IFN-γ-Produktion und der Zytotoxizität in NK-Zellen nach PBMC-*Leishmania*-Kokulturen

Humane PBMCs wurden mit Promastigoten unterschiedlicher *Leishmania*-Arten (Verhältnis 1:10) oder IL-12/IL-18 (je 10 ng/ml) für 20 h inkubiert.

(A) Messung der IFN-γ– Konzentration im Zellkulturüberstand durch ELISA. Sensitivitätsgrenze 15,6 pg/ml. Mittelwert ± SEM von 76/71/55/46/74 Spendern.

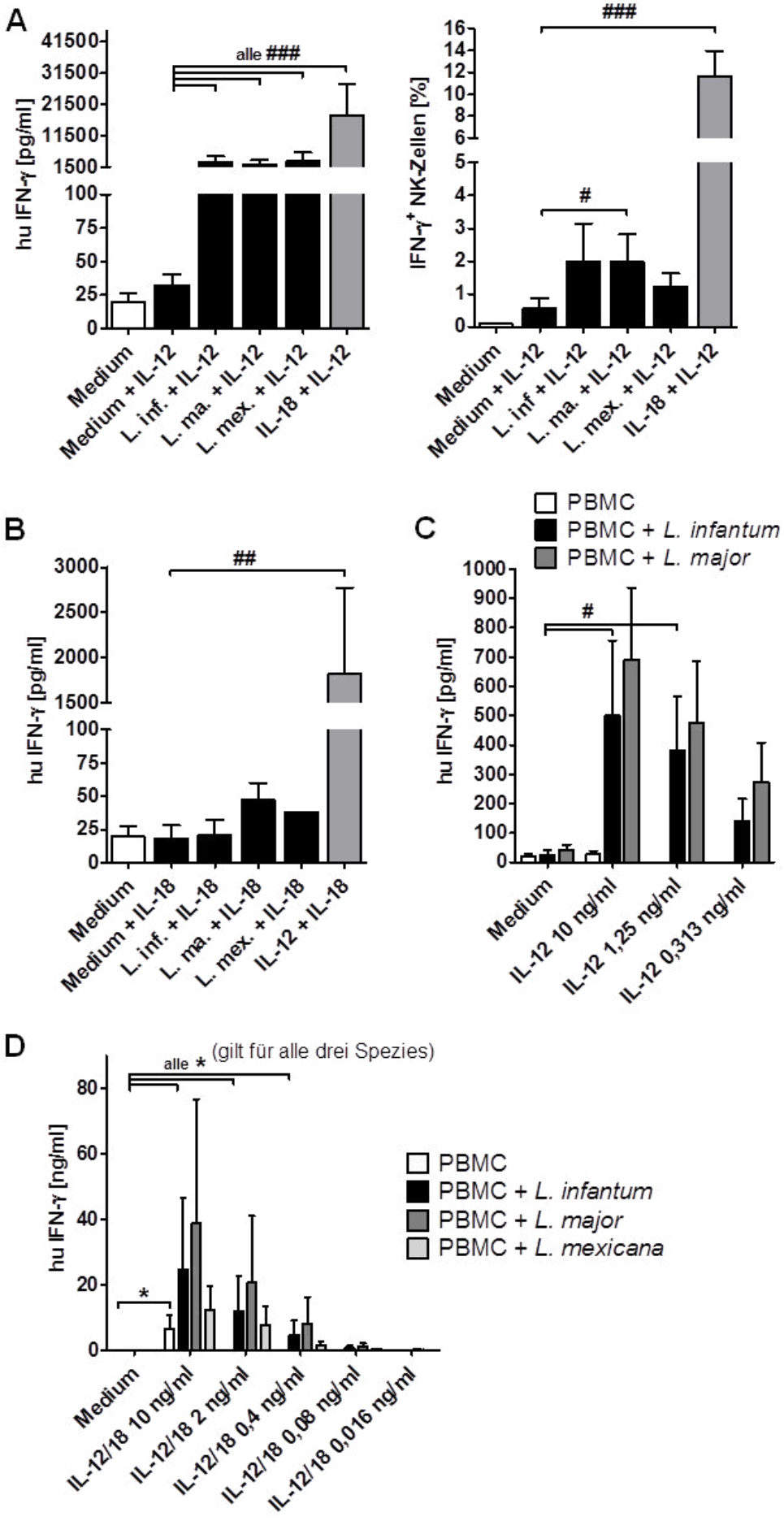
(B) Messung der IFN-γ-Produktion von $NKp46^{+}CD3^{-}$ NK-Zellen über intrazelluläre Färbung und FACS-Analyse. Mittelwert ± SEM von 17/14/15/8/17 Spendern.

(C) Messung der spezifischen Lyse von ^{51}Cr-markierten K562-Zellen durch NK-Zellen im Chromium Release-Assay. Mittelwert ± SEM von 6 (PBMC) bzw. 9 (PBMC + IL-12/18) Spendern.

(A-C) Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet. Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen wurden mit * und Unterschiede zwischen unterschiedlich stimulierten Zellen mit # gekennzeichnet (*/# p<0,05, **/## p<0,01, ***/### p<0,001).

3.2.1.1 Wirkung von IL-12 und IL-18 auf NK-Zell-Effektorfunktionen nach deren Stimulation mit Leishmanien

In weiteren Analysen wurde untersucht, welche zusätzlichen Signale neben Leishmanien noch notwendig sind, um eine NK-Zell-Effektorantwort hervorzurufen. Die Stimulation von PBMCs mit einer Kombination der Zytokine IL-12 und IL-18 in hohen Konzentrationen von 10 ng/ml führte sowohl zu der Produktion von IFN-γ als auch zu einer Steigerung der Zytotoxizität der NK-Zellen (siehe 3.2.1). Durch gleichzeitige Stimulation mit IL-12 plus IL-18 und Leishmanien konnte diese zytotoxische Wirkung deutlich verstärkt werden (Abb. 9 C; IL-12/18 vs. Leishmanien plus IL-12/18: 5:1 und 2,5:1 p=0,0315). Um zu untersuchen, welches der beiden Zytokine in welchem Umfang an dieser Wirkung beteiligt ist, wurden PBMCs mit IL-12 und IL-18 einzeln und in Kombination unter An- und Abwesenheit von Leishmanien in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Bei Abwesenheit der Leishmanien konnte nur mit der höchsten getesteten Konzentration von IL-12/18 (10 ng/ml) die IFN-γ-Produktion in NK-Zellen induziert werden (Abb. 10 D; Medium vs. IL-12/18 10 ng/ml: p=0,0265). Mit zusätzlicher Leishmanien-Stimulation konnte hingegen mit allen drei Spezies schon mit 400 pg/ml dieselbe Wirkung erzielt werden (Abb. 10 D; Medium vs. Leishmanien plus IL-12/18 400 pg/ml: alle Spezies p=0,0265). Bei PBMCs hatte die Stimulation mit jeweils IL-12 oder IL-18 alleine auch in der hohen Konzentration von jeweils 10 ng/ml keine Wirkung auf die IFN-γ-Produktion (Abb. 10 A/B), während die Kombination von IL-12 und Leishmanien zur Steigerung der IFN-γ-Produktion in NK-Zellen (Abb. 10 A; Medium plus IL-12 vs. Leishmanien plus IL-12: alle Spezies p<0,0005) und in geringerem Maße auch in T-Zellen (Abb. 10 E, FACS-Plots) führte. Titrationsanalysen ergaben, dass IL-12 bis zu einer Konzentration von 300 pg/ml in der Lage war, die IFN-γ-Produktion in NK-Zellen innerhalb der PBMC-*Leishmania*-Kokultur zu induzieren (Abb. 10 C; signifikant nur bei *L. infantum* vs. *L. infantum* plus IL-12 10 ng/ml: p=0,0278 und 1,25 ng/ml: p=0,0416). Die gleichzeitige Behandlung der PBMCs mit Leishmanien und exogen zugegebenem IL-18 führte im Gegensatz zu IL-12 zu keiner Stimulation der IFN-γ-Produktion (Abb. 10 B). IL-18 hatte aber eine Bedeutung bei der IFN-γ-induzierenden Wirkung von IL-12, da der IL-12-vermittelte Effekt auf die IFN-γ-Produktion durch die Neutralisation von IL-18 in der Kokultur vollständig blockiert werden konnte (Abb. 10 E; Leishmanien plus IL-12 vs. Leishmanien plus IL-12 und Antikörper; signifikant nur für ELISA: *L. major und L. mexicana:* p=0,02; ICS: *L. major:* p=0,0159).


A
hu IFN-γ [pg/ml]
alle ###
Medium
Medium + IL-12
L. inf. + IL-12
L. ma. + IL-12
L. mex. + IL-12
IL-18 + IL-12
IFN-γ+ NK-Zellen [%]
###
#
B
hu IFN-γ [pg/ml]
##
Medium
Medium + IL-18
L. inf. + IL-18
L. ma. + IL-18
L. mex. + IL-18
IL-12 + IL-18
C
PBMC
PBMC + L. infantum
PBMC + L. major
hu IFN-γ [pg/ml]
#
Medium
IL-12 10 ng/ml
IL-12 1,25 ng/ml
IL-12 0,313 ng/ml
D
hu IFN-γ [ng/ml]
alle * (gilt für alle drei Spezies)
*
PBMC
PBMC + L. infantum
PBMC + L. major
PBMC + L. mexicana
Medium
IL-12/18 10 ng/ml
IL-12/18 2 ng/ml
IL-12/18 0,4 ng/ml
IL-12/18 0,08 ng/ml
IL-12/18 0,016 ng/ml

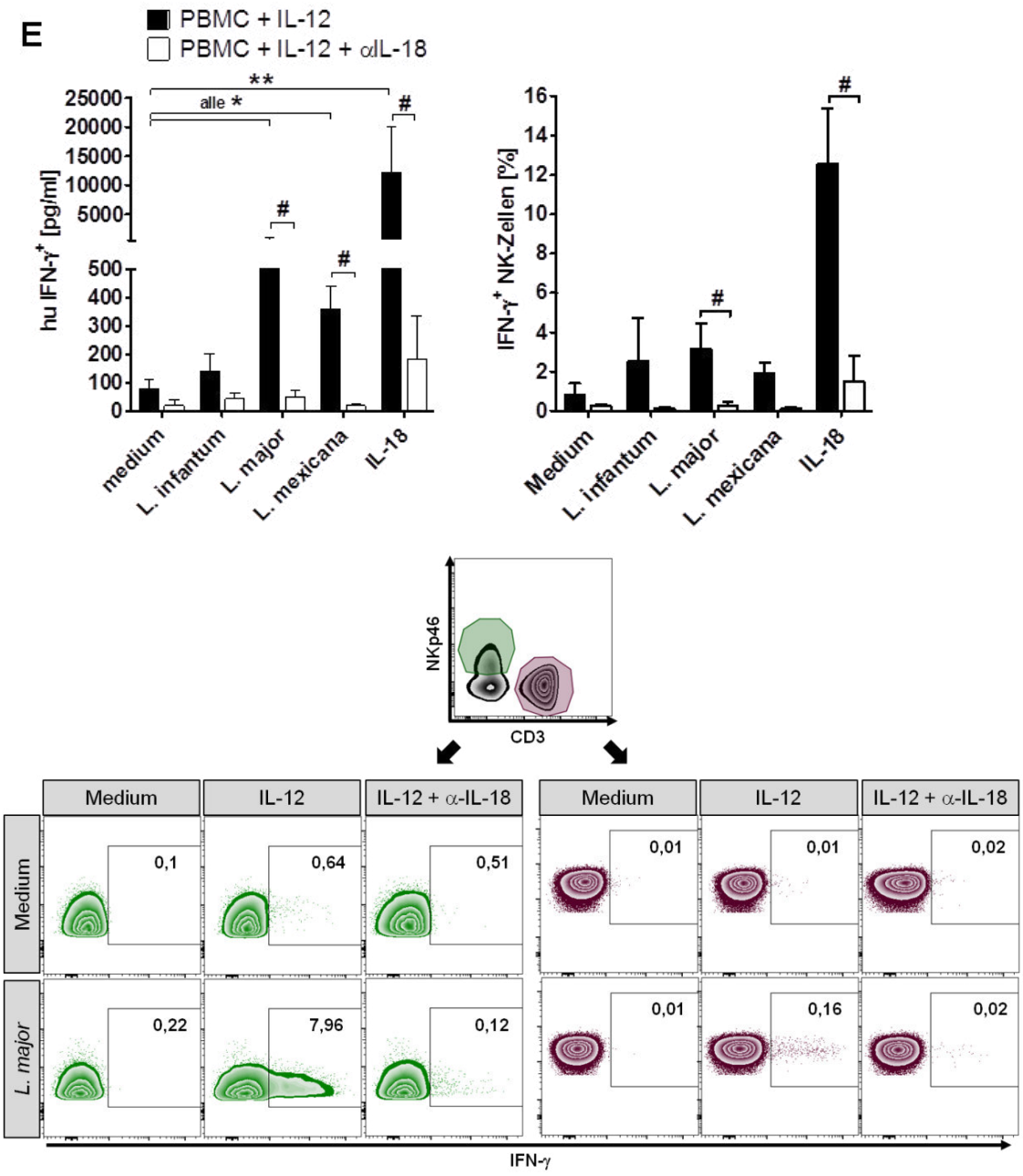


Abbildung 10: Wirkung von exogenem IL-12 und IL-18 auf die IFN-γ-Produktion von NK-Zellen in PBMC-*Leishmania* Kokulturen

Humane PBMCs wurden mit *Leishmania spp.*-Promastigoten (Verhältnis 1:10) unter An- und Abwesenheit von exogenem IL-12 und/oder IL-18 (10 ng/ml bzw. Konzentrationsangaben in Graph) für 20 h inkubiert und die IFN-γ-Konzentration des Zellkulturüberstandes (A/B/C/D/E) oder der Prozentsatz an IFN-γ produzierenden $NKp46^{+}CD3^{-}$ NK-Zellen über intrazelluläre Färbung im FACS (A/E) bestimmt. Nachweisgrenze des ELISA: 15,6 pg/ml.

(A) IFN-γ im Zellkulturüberstand und Anteil an $IFN\text{-}\gamma^{+}$ NK-Zellen nach Zugabe von 10 ng/ml IL-12 zu der Kokultur. Mittelwert ± SEM von 22/22/22/21/18/22 (ELISA) bzw. 9 (ICS) Spendern

(B) Zugabe von 10 ng/ml IL-18 zu der Kokultur. Mittelwert ± SEM von 6/6/6/3/1/6 Spendern.

(C) IL-12-Ttiration. Mittelwert ± SEM von 6/6/3 Spendern

(D) IL-12/18-Titration. Mittelwert ± SEM von 4 Spendern

(E) Zugabe von 10 ng/ml IL-12 zu der Kokultur unter An- und Abwesenheit von blockierendem IL-18 Antikörpern. Mittelwert ± SEM von 6 (ELISA) bzw. 5 (ICS) Spendern

(A-E) Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet und Unterschiede zwischen unterschiedlich stimulierten Zellen mit $^{\#}$ gekennzeichnet ($^{\#}$ $p<0,05$, $^{\#\#}$ $p<0,01$, $^{\#\#\#}$ $p<0,001$).

3.2.1.2 Wirkung der Zugabe von akzessorischen Zellen auf die NK-Zell-Effektorfunktionen nach Stimulation mit *Leishmania*-Promastigoten

Die Tatsache, dass durch Zugabe von IL-12 zu PBMC-*Leishmania*-Kokulturen die Produktion von IFN-γ in NK-Zellen ausgelöst werden kann, weist darauf hin, dass in diesem in-vitro-System ein entscheidender intrinsischer, aktivierender Faktor fehlt. Aus dem Mausmodell der Leishmaniose ist bekannt, dass auch neutrophile Granulozyten zur Aktivierung von NK-Zellen beitragen (nicht veröffentliche Daten der Arbeitsgruppe). Ferner stellt insbesondere das von dendritischen Zellen produzierte IL-12 einen Schlüsselfaktor der IFN-γ-Produktion in NK-Zellen im murinen System dar [5, 156, 210].

In der Fraktion der PBMCs sind keine Granulozyten enthalten, und der Anteil der dendritischen Zellen im Blut ist im Vergleich zu Gewebe sehr gering [254]. Es wurde daher untersucht, ob die Substitution der PBMCs mit neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear cells*, PMN) oder dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) zu einer Aktivierung der NK-Zell-Effektorfunktionen durch Leishmanien führt. Weder die Zugabe von Mo-DCs (Abb. 11 A) noch von PMNs (Abb. 11 B) zu der PBMC-*Leishmania*-Kokultur hatte einen Einfluss auf die Produktion von IFN-γ oder die CD69-Expression der NK-Zellen. Diese beiden Zelltypen scheinen folglich keine ausreichenden zusätzlichen NK-Zell-aktivierende Signale zu liefern.

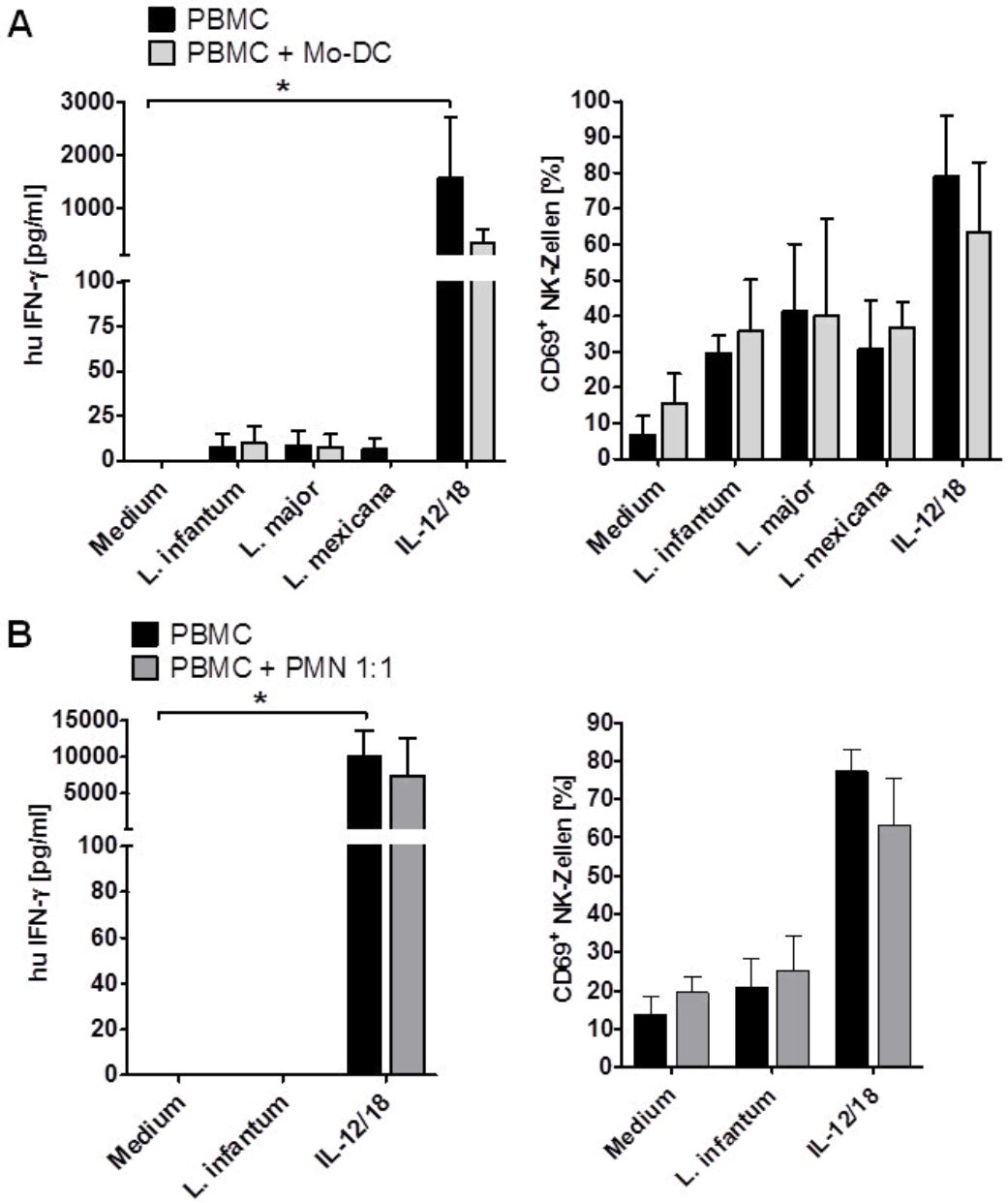


Abbildung 11: Wirkung der Zugabe von akzessorischen Zelltypen zur PBMC-Leishmanien-Kokultur auf die IFN-γ–Synthese

Kulturen aus humanen PBMCs und aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (Mo-DC) (A) oder neutrophilen Granulozyten (PMN) (B) wurden mit *Leishmania spp.*-Promastigoten (Verhältnis PBMC: *Leishmania* 1:10) oder IL-12 plus IL-18 (je 10 ng/ml) für 20 h stimuliert. Die Mo-DCs wurden nicht als hochgereinigte Zellpopulationen, sondern in Mischung mit anderen Zellen eingesetzt. Ihr tatsächlicher Anteil im Zellgemisch variierte je nach Spender zwischen 2 und 14,5%. PMNs wurden als reine Populationen im Verhältnis 1:1 zu den PBMCs zugegeben. Es wurde die IFN-γ-Konzentration des Überstandes mittels ELISA und die CD69-Expression auf $NKp46^+$ $CD3^-$ NK-Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt.

(A) Mittelwert ± SEM von 4/3/3/4/2 Spendern.

(B) Mittelwert ± SEM von 3 Spendern

(A/B) Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet und Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen mit * gekennzeichnet (* $p<0,5$, ** $p<0,1$, *** $p<0,001$).

3.2.2 AKTIVIERUNG VON NK-ZELLEN IN *L. INFANTUM*-INFIZIERTEN I. P.-HUMANISIERTEN MÄUSEN

Um Anhaltspunkte zu gewinnen, ob humane NK-Zellen unter Bedingungen, die eher einer in vivo-Situation gleichen, ohne zusätzliche exogene Stimuli zur Produktion von IFN-γ aktiviert werden können, wurden Experimente mit intraperitoneal (i. p.)-humanisierten Mäusen durchgeführt. Hierbei wurden NOD/SCID/IL-2Rg^{null} (NSG)-Mäusen, die keine eigenen T-, B- und NK-Zellen besitzen, humane PBMCs in die Bauchhöhle injiziert und diese Mäuse anschließend mit *L. infantum* intraperitoneal infiziert. Die Bauchhöhle der Mäuse dient hierbei als eine Art natürlicher Inkubator für die humanen Zellen, in dem die durch die Leishmanien ausgelösten Entzündungsreaktionen nachgestellt werden können. Für die Analyse der NK-Zell-Aktivität wurden Peritonealexsudatzellen (PECs) aus der Bauchhöhle der Tiere gewonnen. Als murine Zellen wurden vor allem Granulozyten in die Bauchhöhle rekrutiert. Alle anderen Zellen waren humanen Ursprungs (Daten nicht gezeigt).

Im Mausmodell der Leishmaniose wird 12 h nach der Infektion mit *L. infantum* die maximale NK-Zell-Aktivität erreicht. Daher wurde auch hier dieser Zeitpunkt für die Analyse gewählt. Ohne weitere Stimulation war kein Unterschied in der IFN-γ-Produktion der NK-Zellen zwischen den PBS-Kontrollmäusen und den infizierten Tieren zu sehen (Abb. 12). Nach Restimulation mit K562-Tumorzellen zeigten die NK-Zellen der infizierten Mäuse eine erhöhte IFN-γ-Produktion, wobei diese Reaktion allerdings nicht signifikant war (Abb. 12). Die Restimulation mit Tumorzellen wird in diesem Zusammenhang eingesetzt, um eine vorhandene NK-Zell-Aktivierung zu verstärken und somit auch geringe Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen erkennen zu können. Die bisherigen Analysen mit i. p.-humanisierten Mäusen liefern somit bestenfalls Hinweise darauf, dass NK-Zellen in einer in vivo-Situation durch eine Leishmanien-Infektion aktiviert werden könnten.

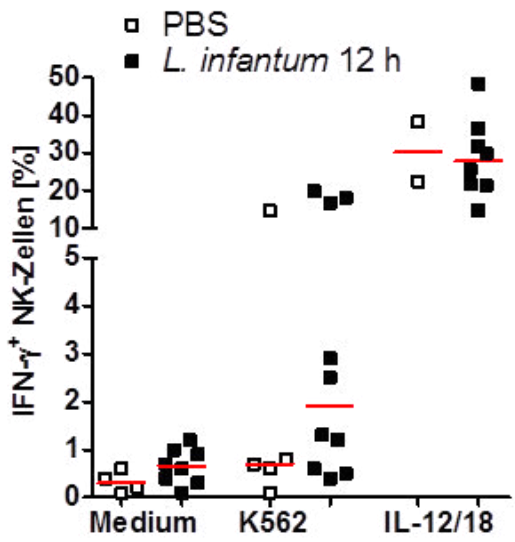


Abbildung 12: IFN-γ-Produktion humaner NK-Zellen in Peritonealexsudatzellen i. p.-humanisierter Mäuse
NSG-Mäuse wurden mit humanen PBMCs i. p.-humanisiert und entweder mit je 10 Mio. *L. infantum*-Promastigoten i. p. infiziert oder mit PBS i. p. injiziert. Nach 12 h wurden die Peritonealexsudatzellen gewonnen. Diese Zellen wurden daraufhin entweder in Medium belassen, mit K562-Zellen (Verhältnis 1:1) oder mit IL-12/IL-18 (je 10 ng/ml) für 6 h restimuliert. Anschließend wurde der Prozentsatz an IFN-γ produzierenden humanen NKp46^{+}CD3^{-} NK-Zellen über intrazelluläre Färbung im FACS bestimmt. Die Mediane der jeweiligen Gruppen sind als rote Querbalken angegeben. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3 Einfluss promastigoter *Leishmania*-Stadien auf die CD56-Expression humaner NK-Zellen

3.3.1 REDUKTION DER CD56-EXPRESSION VON NK-ZELLEN NACH DIREKTEM KONTAKT MIT LEISHMANIEN

Der am häufigsten gebrauchte Marker für den Nachweis humaner NK-Zellen ist CD56. Die tatsächliche Funktion dieses Moleküls ist jedoch weitestgehend unbekannt. Die Kokultur von NK-Zellen und *Leishmania*-Promastigoten führte zu einer Reduktion der CD56-Expression auf der Oberfläche der NK-Zellen (Abb. 13). In Folge dessen wurde in dieser Arbeit ein anderer Marker, NKp46, für den Nachweis von NK-Zellen in PBMCs verwendet. Der reduzierende Effekt der Leishmanien auf die CD56 Expression war sowohl bei NK-Zellen in PBMC-Gesamtfraktionen (Abb. 13 B; Medium vs. Leishmanien, alle Spezies $p<0,0001$) als auch bei gereinigten NK-Zellen (Abb. 13 A; Medium vs. Leishmanien, Verhältnisse 1:33/1:10: alle Spezies $p<0,0007$; Verhältnis 1:1 *L. infantum:* $p=0,0365$, *L. major:* $p=0,0055$, *L. mexicana:* $p=0,0002$) zu beobachten. Die Verminderung der CD56-Expression war dabei sowohl dosis- als auch speziesabhängig, wobei nach Konfrontation mit Promastigoten von *L. major* die geringsten und bei *L. mexicana* die stärkste Reaktionen auftraten. Dagegen waren keine Unterschiede zwischen verschiedenen *L. infantum*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft (siehe 3.1.1) zu vermerken (Abb. 13 C). Außerdem konnte die Reduktion der CD56-Expression durch die Trennung der NK-Zellen und Leishmanien über ein Transwell-System komplett aufgehoben werden (Abb. 13 D). Es handelt sich folglich um eine direkte, kontaktabhängige Wirkung der Leishmanien auf die NK-Zellen.

Um weiter zu untersuchen, ob die Reduktion der CD56-Expression durch einen aktiven Prozess seitens der Leishmanien ausgelöst wird, wurden Formaldehyd-fixierte Parasiten und *Freeze-thaw*-Lysate in die Untersuchungen mit einbezogen (Abb. 13 E). Die Resultate fielen für die verschiedenen Leishmanien-Spezies sehr unterschiedlich aus. Bei *L. infantum* bewirkten die fixierten Parasiten eine deutlich geringere Reduktion der CD56-Expression als die Lebenden (lebende vs. fixierte Leishmanien: $p=0,0045$); unter Verwendung des Lysats war eine noch geringere Reduktion (lebende vs. Leishmanien-Lysat: $p<0,0001$) zu verzeichnen. Die Fixierung von *L. major*-Promastigoten hatte dagegen keinen Einfluss auf die CD56-Expression, während unter Verwendung von Lysat eine geringfügig geringere Reduktion der Expression sichtbar war (nicht signifikant). Bei *L. mexicana* konnte sowohl mit fixierten Parasiten als auch mit *Ft*-Lysat eine ähnlich starke Reduktion der NK-zellulären CD56-Expression hervorgerufen werden wie mit lebenden Parasiten.

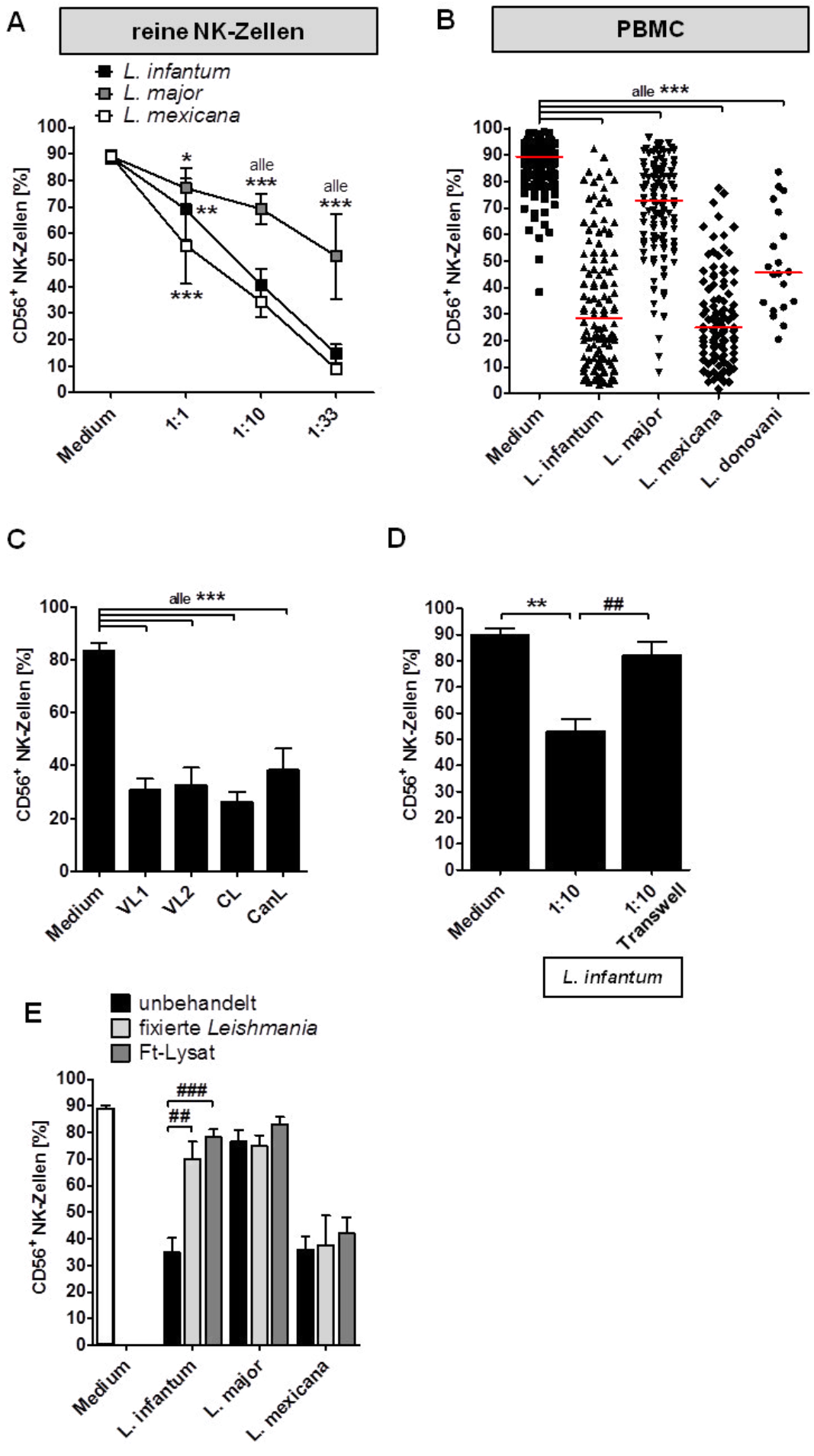

A
reine NK-Zellen
L. infantum
L. major
L. mexicana
CD56+ NK-Zellen [%]
Medium
1:1
1:10
1:33
alle ***
B
PBMC
alle ***
L. infantum
L. major
L. mexicana
L. donovani
C
alle ***
VL1
VL2
CL
CanL
D
**
##
1:10 Transwell
L. infantum
E
unbehandelt
fixierte Leishmania
Ft-Lysat
###

Abbildung 13: Expression von CD56 auf der Oberfläche von NK-Zellen nach Kontakt mit *Leishmania*-Promastigoten
Humane PBMCs oder reine NK-Zellen wurden für 20 h mit *Leishmania spp.*-Promastigoten kokultiviert und die CD56-Expression auf NK-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die NK-Zellen in der PBMC-Gesamtfraktion wurden als $NKp46^+CD3^-$ Zellen identifiziert. Bei den über Zellsortierung $NKp46^+CD3^-$ aufgereinigten NK-Zellen wurden alle lebenden Zellen im Lymphozytengate (FSC/SSC) analysiert.
(A) Kokultur aufgereinigter NK-Zellen mit Leishmanien in unterschiedlichen Verhältnissen. Mittelwert ± SEM von 17/16/12/12 Spendern.
(B) Kokultur von PBMCs und Leishmanien in einem Verhältnis 1:10. Mittelwert ± SEM von 132/121/114/97/20 Spendern.
(C) Kokultur von PBMCs mit *L. infantum*-Stämmen von Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsbild: VL1, VL2: viszerale Leishmaniose; CL: kutane Leishmaniose; CanL: canine Leishmaniose. Mittelwert ± SEM von 9/9/9/9/7 Spendern.
(D) Kokultur von PBMCs und *L. infantum* (Verhältnis 1:10) mit und ohne Transwell (Porengröße 0,4 µm). Mittelwert ± SEM von je 6 Spendern.
(E) Kokultur von PBMCs und Paraformaldehyd-fixierten Leishmanien bzw. mit *Freeze-thaw* (*Ft*)-Lysaten. Mittelwert ± SEM von 22/17/18 (unbehandelt), 8/9/6 (fixiert), 17/14/14 (Lysat) Spendern.
(A-C) Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet. Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen wurden mit * und Unterschiede zwischen unterschiedlich stimulierten Zellen mit # gekennzeichnet (*/# $p<0,05$, **/## $p<0,01$, ***/### $p<0,001$).

3.3.2 REDUKTION DER CD56-EXPRESSION ÜBER ZUGABE VON ZELLKULTUR-ÜBERSTÄNDEN VON *L. INFANTUM*

Obwohl die Reduktion der CD56-Expression auf NK-Zellen durch Leishmanien kontaktabhängig war, wurde zusätzlich untersucht, ob auch lösliche Leishmanien-Faktoren eine solche Reaktion auslösen können. Dazu wurden PBMCs oder gereinigte NK-Zellen mit 60 % Zellkulturüberständen von PBMC-*Leishmania*-Kokulturen oder reinen Leishmanienkulturen stimuliert, die unter denselben Bedingungen kultiviert worden waren wie die Kokulturen. Nur mit den Überständen von *L. infantum* konnte eine Reduktion der CD56-Expression auf der Oberfläche von NK-Zellen beobachtet werden (Abb. 14 A/B; ÜS Medium vs. ÜS mit Leishmanien, ÜS PBMC auf PBMC: $p<0,0001$; ÜS PBMC auf NK $p=0,003$; ÜS Leishmanien auf PBMC: $p=0,0003$; ÜS Leishmanien auf NK: $p=0,0444$), die jedoch in ihrer Ausprägung geringer als nach Kontakt mit Leishmanien ausfiel. Dabei war die Wirkung der Überstände von reinen Leishmanien vergleichbar mit der von PBMC-*Leishmania* Kokulturen. Die Reduktion der CD56-Expression kam nur unter Verwendung von Zellkulturüberständen lebender Leishmanien zustande und nicht, wenn Überstände von fixierten Leishmanien oder Leishmanien-Lysat eingesetzt wurden (Abb. 14 C; ÜS Medium vs. ÜS lebende Leishmanien: $p=0,007$; ÜS lebende vs. behandelte Leishmanien; fixiert: $p=0,014$; Lysat: $p=0,0016$). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Leishmanien-spezifischer löslicher Faktor nur von durch *L. infantum*, jedoch nicht von den anderen drei untersuchten *Leishmania*-Spezies, abgegeben wird und zur Reduktion der CD56-Expression auf NK-Zellen führt.

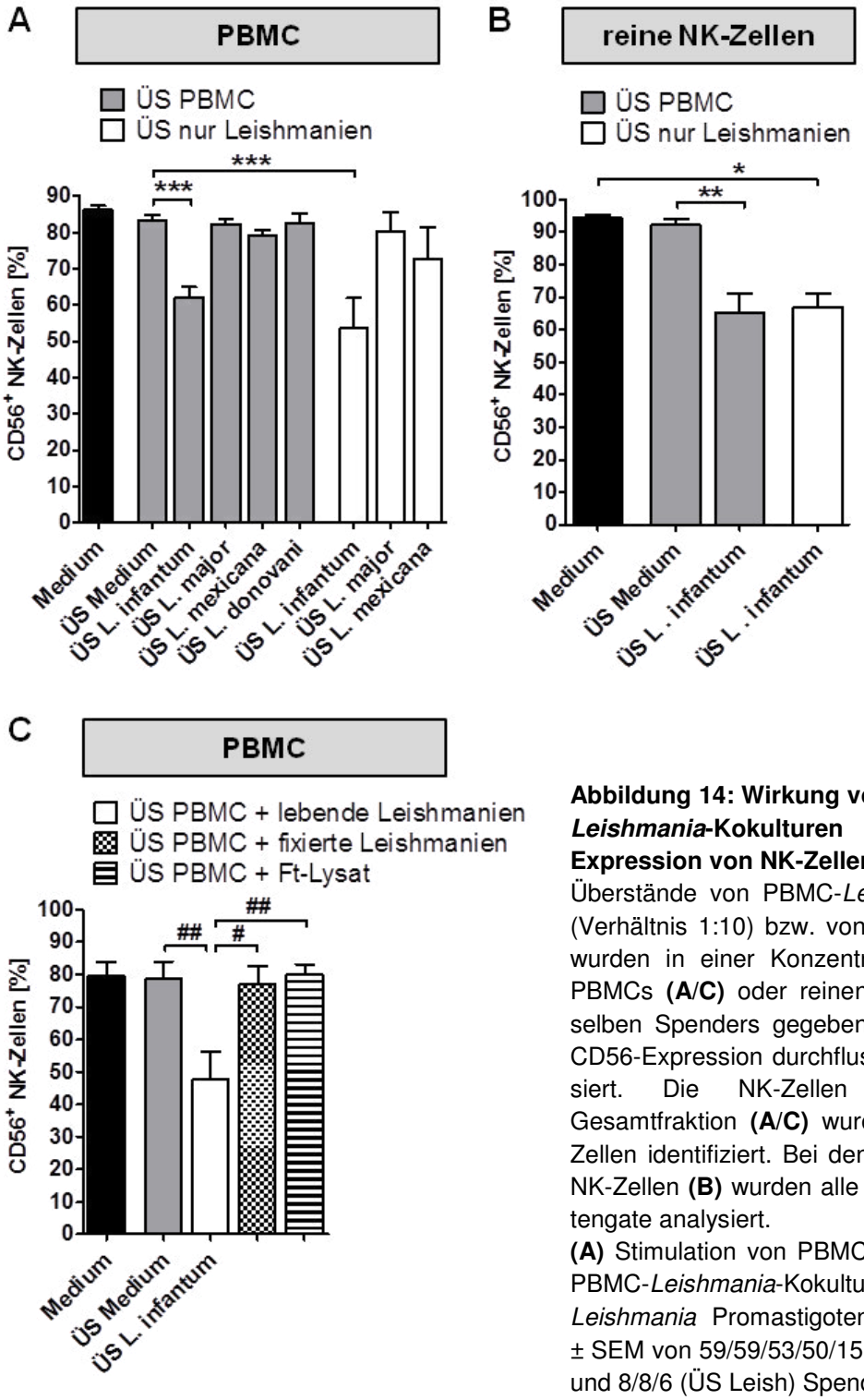


Abbildung 14: Wirkung von Überständen aus *Leishmania*-Kokulturen auf die CD56-Expression von NK-Zellen

Überstände von PBMC-*Leishmania* Kokulturen (Verhältnis 1:10) bzw. von Leishmanien alleine wurden in einer Konzentration von 60 % zu PBMCs **(A/C)** oder reinen NK-Zellen **(B)** desselben Spenders gegeben und nach 20 h die CD56-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Die NK-Zellen in der PBMC-Gesamtfraktion **(A/C)** wurden als $NKp46^+CD3^-$ Zellen identifiziert. Bei den reinen $NKp46^+CD3^-$ NK-Zellen **(B)** wurden alle Zellen im Lymphozytengate analysiert.

(A) Stimulation von PBMCs mit Überstand von PBMC-*Leishmania*-Kokulturen oder reinen *Leishmania* Promastigoten-Kulturen. Mittelwert ± SEM von 59/59/53/50/15 (ÜS PBMC Kokultur) und 8/8/6 (ÜS Leish) Spendern.

(B) Stimulation von reinen NK-Zellen mit Überstand von PBMC-*L. infantum*-Kokulturen oder reinen *L. infantum* Promastigoten-Kulturen. Mittelwert ± SEM von 8 (ÜS PBMC) bzw. 2 (ÜS Leish) Spendern.

(C) Stimulation von PBMCs mit Überstand von PBMC-Kokulturen mit lebenden oder Paraformaldehyd-fixierten *L. infantum* bzw. *Freeze-thaw*-Lysaten. Mittelwert ± SEM von 8/8/8/7/5 Spendern.

(A-C) Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet und Unterschiede zwischen unterschiedlich stimulierten Zellen mit * gekennzeichnet (* $p<0,05$, * $p<0,01$, * $p<0,001$).

3.3.3 MECHANISMUS DER REDUKTION DER CD56-EXPRESSION AUF NK-ZELLEN

Die verminderte CD56-Expression nach Konfrontation von NK-Zellen mit *Leishmania*-Stadien kann unterschiedliche Ursachen haben. Die Leishmanien selbst oder sezernierte Leishmanien-Produkte könnten (a) an das Molekül binden und somit die Bindung des zum Nachweis verwendeten Antikörpers blockieren; (b) die Internalisierung von CD56 auslösen; (c) eine verminderte Transkription oder Translation von CD56 bewirken; oder (d) CD56 von der Oberfläche der Zellen abspalten. Frühere Arbeiten in anderen Experimentalsystemen zeigten, dass CD56 grundsätzlich auch als lösliches Molekül abgegeben werden kann [96, 97].
Der Nachweis einer Internalisierung des Moleküls durch getrenntes Färben von oberflächlichem und intrazellulärem CD56 und Auswertung über Durchflusszytometrie oder Konfokalmikroskopie konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Dies lag wahrscheinlich daran, dass bei der Oberflächenfärbung keine komplette Sättigung des Oberflächen-CD56 erreicht wurde, wodurch dies bei der intrazellulären Färbung nochmals mit markiert wurde und daher alle Zellen doppelt positiv waren (Daten nicht gezeigt).

3.3.3.1 Nachweis von CD56 auf der Oberfläche von NK-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Antikörper-Klone

Um zu untersuchen, ob die Bindung des Antikörpers für den CD56-Nachweis durch die Leishmanien behindert wird, wurden Färbungen mit drei unterschiedlichen Antikörper-Klonen (CMSSB, HCD56, MEM-188) durchgeführt. Diese binden jeweils an unterschiedliche Epitope des CD56-Moleküls. Mit allen drei Klonen wurde eine vergleichbare Reduktion der CD56-Expression gemessen (Abb. 15 A). In Folge erscheint es unwahrscheinlich, dass die Reduktion der CD56-Expression auf eine Blockierung des Moleküls durch die Leishmanien und damit auf eine Nichterkennbarkeit durch die eingesetzten Antikörper zurückzuführen ist.

3.3.3.2 Analyse der mRNA-Expression von CD56 auf NK-Zellen

Um zu überprüfen, ob eine verminderte Transkription von CD56 vorliegt, wurde mRNA aus Kokulturen von reinen NK-Zellen und Leishmanien verwendet und mittels eines CD56-spezifischen TaqMan-Systems analysiert. Die Kokultur mit Leishmanien führte dosisabhängig zu einer Abnahme der CD56-mRNA (Medium vs. Leishmanien; aufgrund der Spenderanzahl nur signifikant bei *L. infantum* 1:10: p=0,0006, *L. mexicana* 1:10: p=0,0037). Diese Reaktion war für alle drei Leishmanienspezies vergleichbar ausgeprägt. Da sich die Reduktion der CD56-Oberflächenexpression zwischen den Spezies jedoch stark unterscheidet, sind die mRNA-Reduktion und die Reduktion der Oberflächenexpression nicht miteinander korreliert (Abb. 15 B). Es ist daher durchaus möglich, dass die Expression auf unterschiedlichen Ebenen reguliert wird.

3.3.3.3 Messung von löslichem CD56

Da CD56 auch als lösliches Molekül abgegeben werden kann, wurden Zellkulturüberstände von reinen NK-Zell-*Leishmania*-Kokulturen mittels eines CD56-spezifischen ELISAs untersucht. Hier zeigten sich keine Unterschiede in der Konzentration löslichen CD56 zwischen der Mediumkontrolle und den Ansätzen mit Leishmanien (Abb. 15 C). Allerdings konnte bereits in der Mediumkontrolle eine relativ hohe Konzentration (12,8 ± 2,4 ng/ml) an löslichem CD56 gemessen werden. Dies lag zum Teil daran, dass das autologe Plasma, das dem Medium in einer Konzentration von 10 % zugesetzt wurde, im Mittel bereits 7,3 ± 3 ng/ml lösliches CD56 enthielt. Durch diese hohen Hintergrundwerte könnten möglicherweise geringe Schwankungen der CD56-Konzentration überlagert worden sein. Die Ergebnisse deuten jedoch grundsätzlich darauf hin, dass die reduzierte Oberflächenexpression von CD56 auf NK-Zellen nach Stimulation mit Leishmanien nicht auf eine enzymatische Freisetzung des Moleküls von der Oberfläche zurückzuführen ist.

Somit bleibt der exakte Mechanismus, durch den Leishmanien eine Reduktion der NK-zellulären CD56-Expression auslösen, derzeit ungeklärt. Weder eine Internalisierung noch eine vollständige Abspaltung des Moleküls können komplett ausgeschlossen werden. Obwohl eine deutliche mRNA-Reduktion messbar war, war diese nicht mit der Reduktion der Oberflächenexpression korreliert. Die parasiteninduzierte Verminderung der CD56 Expression auf der Oberfläche der NK-Zellen muss folglich noch andere Ursachen haben.

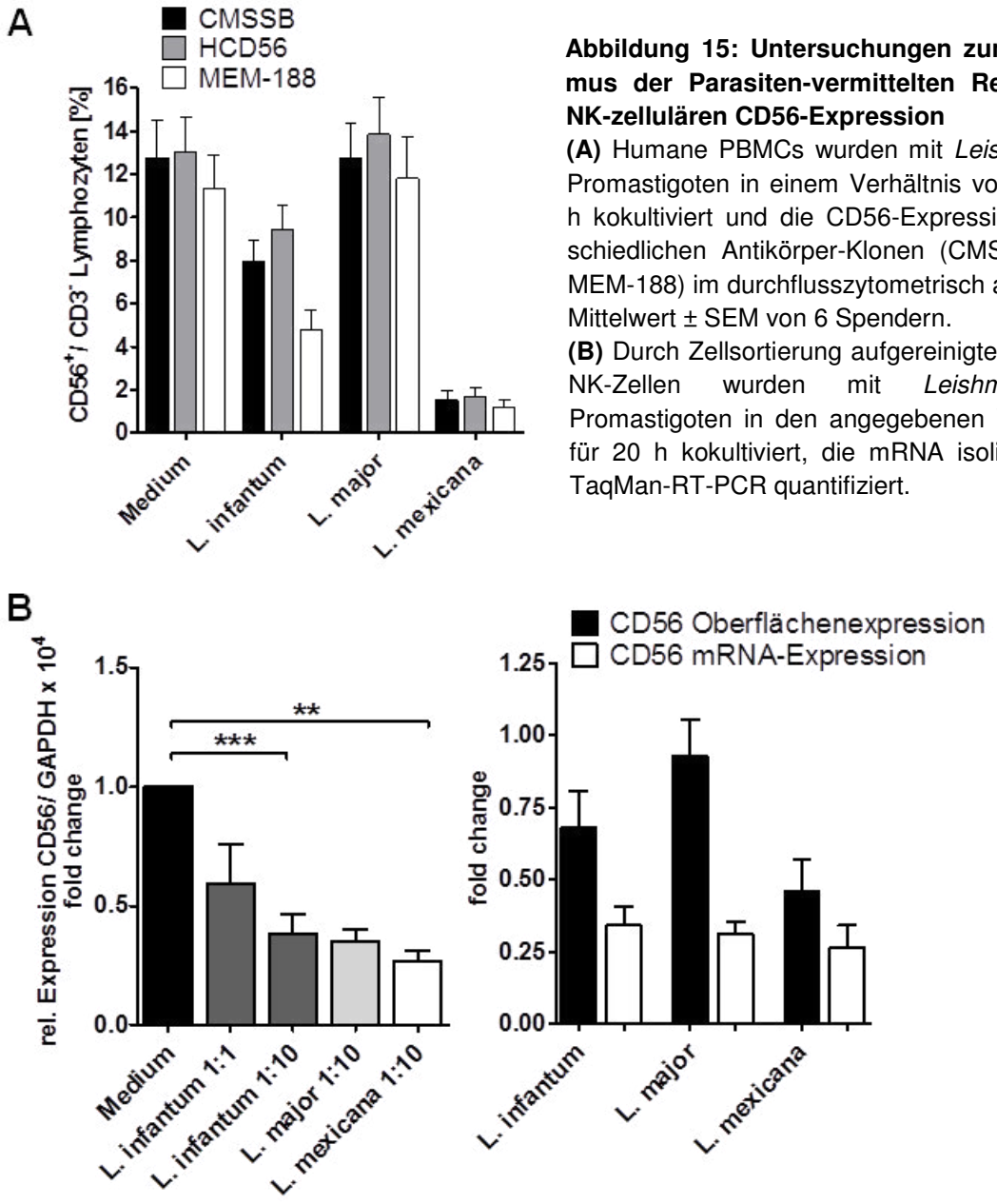


Abbildung 15: Untersuchungen zum Mechanismus der Parasiten-vermittelten Reduktion der NK-zellulären CD56-Expression

(A) Humane PBMCs wurden mit *Leishmania spp.*-Promastigoten in einem Verhältnis von 1:10 für 20 h kokultiviert und die CD56-Expression mit unterschiedlichen Antikörper-Klonen (CMSSB, HCD56, MEM-188) im durchflusszytometrisch analysiert. Mittelwert ± SEM von 6 Spendern.

(B) Durch Zellsortierung aufgereinigte NKp46$^+$CD3$^-$ NK-Zellen wurden mit *Leishmania spp.*-Promastigoten in den angegebenen Verhältnissen für 20 h kokultiviert, die mRNA isoliert und über TaqMan-RT-PCR quantifiziert. Die Expression wurde auf die endogene Kontrolle (huGAPDH) normalisiert. Der *fold change* wurde über die Division durch die jeweilige Mediumkontrolle errechnet, die folglich den Wert 1 erhielt. Mittelwert ± SEM von 8/3/8/2/5 bzw. 4/1/3 Spendern.

(C) Durch Zellsortierung aufgereinigte NKp46$^+$CD3$^-$ NK-Zellen wurden mit *Leishmania spp.*-Promastigoten in einem Verhältnis von 1:10 für 20 h kokultiviert und mittels ELISA der Gehalt an löslichem CD56 im Zellkulturüberstand bestimmt. Mittelwert ± SEM von 9/7/6/7/3 Spendern.

(A-C) Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test errechnet und Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen mit * gekennzeichnet (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

4 DISKUSSION

4.1 Aktivierung von NK-Zellen durch Leishmanien

Natürliche Killer-Zellen wurden in den 70er Jahren ursprünglich als Tumor-abtötende Zellen beschrieben [1]. Seit dieser Zeit belegen die Daten, das NK-Zellen zusätzlich an der Abwehr viraler [255, 256], bakterieller [257] und parasitärer [258, 259] Infektionen beteiligt sind. In vielen Fällen sind sie zwar nicht essentiell für die letztendliche Kontrolle der Infektion, unterstützen aber die Funktion anderer Immunzellen. So tragen NK-Zellen im Mausmodell der Leishmaniose in der Frühphase der Infektion zur Erregerkontrolle und zur Ausbildung einer schützenden adaptiven T-Zell-Antwort bei, sind jedoch in der Spätphase nicht mehr für die Kontrolle der Infektion notwendig [205, 208, 209, 213, 260]. Ob dies auch bei Menschen mit Leishmanien-Infektionen der Fall ist, ist unklar, da in den meisten Fällen eine *Leishmania*-Infektion erst mit dem Auftreten klinischer Symptome diagnostiziert wird und Analysen in der Frühphase der Infektion entsprechend nicht möglich sind. Ausgehend von der Hypothese, dass NK-Zellen bei der Kontrolle der Infektion beteiligt sind und bei manchen Menschen die Ausbildung klinischer Symptome verhindern können, wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Immunantwort von gesunden Spendern, die noch nie mit Leishmanien in Kontakt gekommen waren, in vitro analysiert. Die wenigen bisherigen Studien, die sich mit der NK-Zell-Antwort gesunder Spender auf *Leishmania*-Infektionen befasst haben, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So ist bisher nicht abschließend geklärt, ob NK-Zellen direkt durch *Leishmania*-Parasiten aktiviert werden können oder ob andere Zellen und Faktoren für eine Aktivierung notwendig sind.

In den meisten Studien waren für die Generierung einer NK-Zell-Antwort akzessorische Zellen oder Zytokine notwendig. Dabei konnten jedoch nicht mit allen getesteten *Leishmania*-Spezies oder Antigenpräparationen dieselben Reaktionen ausgelöst werden. So konnte in einer Arbeit sowohl mit lebenden als auch hitze-inaktivierten *Leishmania (L.) aethiopica*-Promastigoten in PBMCs eine IFN-γ-Produktion induziert werden [261], während in einer Folgestudie derselben Arbeitsgruppe nur einige wenige Spender auf die hitze-inaktivierten Parasiten reagierten [228]. Auch nach Stimulation von PBMCs mit LACK-Antigen von *L. aethiopica* konnte eine erhöhte Synthese von IFN-γ nachgewiesen werden [222, 229]. Die Ergebnisse nach Stimulation mit *Freeze-thaw*-Lysaten von *L. aethiopica* waren hingegen wieder gegenläufig: In einer Studie mit PBMCs gesunder Personen aus einen Endemiegebiet (Äthiopien) konnte IFN-γ induziert werden [221], bei Verwendung von PBMCs gesunder Personen aus einem nicht-Endemiegebiet reagierten dagegen keine oder nur wenige Spender mit einer geringer IFN-γ-Produktion [220, 222, 223, 228].

Auch wurde nicht in jeder Studie die Herkunft des IFN-γ geklärt und nur in zwei Untersuchungen [222, 223] wurde nachgewiesen, dass dieses Zytokin tatsächlich von NK-Zellen und nicht von T-Zellen produziert wurde. Anzumerken ist weiterhin, dass in den meisten Fällen nur eine sehr geringe Menge an IFN-γ (100-300 pg/ml) messbar war [220, 221] bzw. dass es nur über sensitivere Techniken als den ELISA (hier: ELISPOT) nachweisbar war [228]. Letztlich muss noch darauf hingewiesen werden, dass in den genannten Studien keine Angaben zum Endotoxin-Gehalt der verwendeten *Leishmania*-Kulturmedien gemacht wurden. Nur bei der Verwendung von aufgereinigtem LACK, jedoch nicht von *Ft*-Lysaten, wurde in zwei Studien die Endotoxinfreiheit überprüft [222, 229]. In den meisten Fällen kann folglich eine LPS-induzierte Monozyten-/DC-Aktivierung innerhalb der PBMCs als Ursache für die NK-Zell-Aktivierung nicht ausgeschlossen werden.

In zwei Studien wurde zudem eine direkte Aktivierung von reinen NK-Zell-Populationen durch *Leishmania*-Antigene beschrieben [229, 231]. Bei Nylen et al. (2003) wurden NK-Zellen sowohl durch lebende als auch durch tote Promastigote von *L. aethiopica*, *L. mexicana* und *L. donovani*, nicht jedoch über Stimulation mit LACK aktiviert und produzierten nachfolgend IFN-γ [229]. In einer Folgestudie konnten diese Daten für zwei unterschiedliche *L. major*-Stämme nicht bestätigt werden [224]. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte dagegen, dass die Stimulation mit einem oberflächlich gebundenen Lipophosphoglykan (LPG) von *L. major* allein ausreichend war, um eine gesteigerte IFN-γ-Produktion in reinen NK-Zell-Populationen auszulösen [231].

In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene *Leishmania*-Spezies, die unterschiedliche Krankheitsbilder auslösen und eine unterschiedliche geographische Herkunft aufweisen, miteinander verglichen, um gegebenenfalls speziesspezifische Effekte erfassen zu können. Erstmalig wurde auch die NK-Zell-Antwort in Reaktion auf unterschiedliche Stämme von *L. infantum*-Parasiten analysiert. Außerdem wurden lebende Parasiten direkt mit toten, jedoch morphologisch intakten Parasiten sowie mit *Leishmania*-Antigen (*Ft*-Lysate) als Stimulatoren verglichen.

4.1.1 **REGULATION VON NK-ZELL-AKTIVIERUNGSMARKERN**

Grundsätzlich bewirkte die Konfrontation mit allen getesteten *Leishmania*-Spezies (*L. infantum, L. major, L. mexicana, L. donovani*) eine Expressionssteigerung der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 (außer *L. donovani*) auf NK-Zellen (s. Abb. 2 A). Da CD69 grundsätzlich schneller induziert wird als CD25 [233-235], ist es hierbei nicht verwunderlich, dass nach der relativ kurzen Inkubationszeit von 20 h die Steigerung der CD69-Expression deutlich stärker ausfiel als die von CD25. Erstere wurde allerdings nicht durch einen direkten Effekt der Leishmanien auf die NK-Zellen ausgelöst, da sie ausschließlich bei Anwesenheit von solchen Monozyten gemessen werden konnte, die direkten Kontakt zu Leishmanien oder

Leishmania-Antigen hatten (s. Abb. 2 C, 3 A, 5, 7 A). Die Stärke der CD69-Expression war insgesamt von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Dies waren die Anzahl der Leishmanien, die *Leishmania*-Spezies und die Art der Präparation der Leishmanien (s. Abb. 2). Entsprechend zeigte sich eine Abhängigkeit von der Dosis als auch von der Vitalität als auch Integrität der Parasiten.

Neben genetischen Unterschieden zwischen den Parasitenspezies spielt vor allem die initiale Immunantwort des Wirtes eine große Rolle für den Ausgang einer Infektion. Es ist daher möglich, dass das unterschiedliche NK-Zell-Aktivierungspotential der einzelnen *Leishmania*-Spezies zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings beim direkten Vergleich von dermotropen und viszerotropen *L. infantum*-Stämmen keine signifikanten Unterschiede in der NK-Zell-Aktivierung in vitro beobachtet, was eine inverse Korrelation zwischen der NK-Zell-Aktivierung (CD69 Expression) und der Viszeralisierung der Leishmanien unwahrscheinlich macht.

Da die Hochregulation der Aktivierungsmarker gemäß der vorliegenden Daten ausschließlich indirekt über Monozyten erfolgte, könnten die Speziesunterschiede auch auf eine unterschiedlich starke Aktivierung der Monozyten zurückzuführen sein. So ist beispielsweise bekannt, dass verschiedene *Leishmania*-Spezies unterschiedlich gut phagozytiert werden und unterschiedlich schnell replizieren. Dabei zeigt *L. infantum* eine geringere Infektionsrate von humanen Monozyten als *L. major* [145, 262], und zum Erreichen derselben Infektionsrate humaner Makrophagen werden 50 % weniger *L. donovani* als *L. major*-Promastigote benötigt [145]. Dies deckt sich mit der in dieser Arbeit beschriebenen Stärke der CD69-Steigerung auf den NK-Zellen, bei der *L. infantum* den geringsten und *L. donovani* den stärksten Effekt hatte (s. Abb. 2 A). Es ist daher möglich, dass die quantitativen Speziesunterschiede der CD69-Expression durch die jeweilige Anzahl der phagozytierten Leishmanien bzw. der Infektionsrate der Monozyten hervorgerufen wurden. Dies wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass das Ausmaß der CD69-Expression mit zunehmender Anzahl der Parasiten anstieg (s. Abb. 2 B). Zusätzlich liefert es auch eine Erklärung des Phänomens, dass mit lebenden sowie mit fixierten (d.h. abgetöteten, aber morphologisch intakten) Parasiten eine ähnlich starke Steigerung der CD69-Expression hervorgerufen werden konnte, während dies im Fall der *Ft*-Lysate deutlich geringer ausfiel (s. Abb. 2 E). Leishmanien werden grundsätzlich indirekt über Phagozytose aufgenommen, wobei bestimmte Oberflächenmoleküle, wie das LPG oder gp63 (eine Metalloprotease, Leishmanolysin), die Bindung an Fresszellen vermitteln und damit die Aufnahme beschleunigen können [134, 135]. Es ist daher plausibel, dass intakte Promastigote unabhängig von ihrer Vitalität schneller oder besser aufgenommen werden als reines Antigen. Lebende Promastigote sollten dabei allerdings einen stärkeren Stimulus darstellen, da sie sich während der Kokultur weiterhin vermehren.

In diesem Kontext wurde auch untersucht, ob eine der bekannten Monozyten-Subpopulationen stärker an der NK-zellulären Hochregulation der CD69-Expression beteiligt ist als andere. Im menschlichen Blut werden anhand der Oberflächenmarker CD14, CD16 und CCR2 drei Monozytenpopulationen unterschieden: klassische ($CD14^{high}/CD16^{-}/CCR2^{high}$), intermediäre ($CD14^{high}/CD16^{low}/CCR2^{+}$) und nicht-klassische ($CD14^{low}/CD16^{high}/CCR2^{-}$) [236]. Neben den verschiedenen Oberflächenmolekülen weisen diese Subpopulationen auch funktionelle Unterschiede auf. So produzieren klassische Monozyten nach LPS-Stimulation vor allem pro-inflammatorische Zytokine, während intermediäre Monozyten vorwiegend IL-10 freisetzen und nicht-klassische Monozyten primär nur auf virale Stimuli reagieren [238, 263]. Zusätzlich ist bekannt, dass intermediäre Monozyten eine stärkere Antigen-Präsentation zeigen als die beiden anderen Subpopulationen und dass nicht-klassische Monozyten eine geringere Phagozytoseleistung besitzen [238, 264]. Grundsätzlich waren alle drei Subpopulationen in der Lage, in der Kokultur mit NK-Zellen und Leishmanien die gesteigerte Expression von CD69 auf NK-Zellen zu vermitteln. Die Stärke der Reaktion war bei klassischen und intermediären Monozyten vergleichbar, während sie mit nicht-klassischen Monozyten insignifikant schwächer ausfiel (s. Abb. 3 B). Die niedrigeren Werte der nicht-klassischen Monozyten können mit ihrer geringeren Phagozytoseleistung erklärt werden, die in Folge zu einer schwächeren Kostimulation der NK-Zellen führte.

Monozyten können andere Zellen sowohl über lösliche Faktoren als auch über zellgebundene Moleküle stimulieren. Die in dieser Arbeit konstatierte Erhöhung der NK-zellulären CD69-Expression wurde teils über einen löslichen Faktor (s. Abb. 16 unten) und teils durch direkten Kontakt der beiden Zelltypen (s. Abb. 16 oben) hervorgerufen, da einerseits Zellkulturüberstand von *Leishmania*-infizierten Monozyten unmittelbar zu einer Stimulation der CD69-Expression auf NK-Zellen führte (s. Abb. 4), andererseits jedoch die CD69-Hochregulation bei fehlendem Kontakt zwischen Monozyten und NK-Zellen ausblieb (s. Abb. 7).

In Analogie zu lebenden Promastigoten war die Steigerung der CD69-Expression über Zellkulturüberstände sowohl dosis- als auch Parasitenspeziesabhängig. Überstände von *L. major*-infizierten Monozyten hatten den größten Effekt, während mit Überständen von *L. infantum*-Monozyten-Kokulturen die geringsten Reaktionen gemessen wurden (s. Abb. 4 A/B). Zusätzlich war der CD69-stimulierende, lösliche Faktor mit der Vitalität der Parasitenstadien verknüpft, da nur die Überstände lebender, nicht jedoch toter Leishmanien (fixiert oder lysiert) die genannten Effekte induzierten. Zudem wurde die Wirkung der Überstände durch Erhitzen vollständig aufgehoben (s. Abb. 4 C/D). Die Hitzelabilität schließt (Glyko-) Lipide und Glykane als stimulierende Strukturen aus und weist auf proteinhaltige Moleküle wie Zytokine hin. In den Überständen konnten mehrere, typischerweise von Monozyten produzierte Moleküle nachgewiesen werden (s. Abb. 5). Dabei hatten nur IFN-α/β, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-15, und IL-18 eine direkt stimulierende Wirkung auf die NK-zelluläre CD69-Expression (s.

Abb. 6 A). Allerdings führte weder die Blockade von IL-12 noch der anderen genannten Botenstoffe zu einer Aufhebung der CD69-vermittelten Reaktion (s. Abb. 6 B). Der lösliche Faktor ist somit keines der genannten Zytokine, die klassischerweise für ihre aktivierende Wirkung auf NK-Zellen bekannt sind [7, 83, 239-241]. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich um ein Zytokin handelt, welches in dem verwendeten Zytokin-Array nicht enthalten war oder das noch nie im Zusammenhang mit NK-Zellen analysiert wurde. Auch wurde beispielsweise IL-21, ein bekanntes NK-Zell-aktivierendes Zytokin [45, 265], nicht weitergehend untersucht, da es nur von einem der drei im Zytokin/ Chemokin-Assay analysierten Spender produziert wurde. Weiterhin könnte die CD69-Expression aber auch durch ein *Leishmania*-spezifisches Protein verursacht werden, das jedoch nur nach Aufnahme der Parasiten durch Monozyten produziert wird (da die Überstände von reinen Leishmanien keine NK-zelluläre CD69-Expression induzierten). Dies könnte wiederum bedeuten, dass das fragliche Protein entweder über die Monozyten von Leishmanien abgespalten wird oder nur von intrazellulären Leishmanien in ihrer amastigoten Form produziert wird. *Leishmania*-spezifische Moleküle, wie z. B. die Oberflächenmoleküle gp63 und LPG, werden vorwiegend über 30-70 nm große Exosomen in die Umgebung abgegeben [266, 267]. Solche Exosomen werden sowohl von promastigoten als auch von amastigoten Formen der Leishmanien produziert. Da sie sich jedoch in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, könnten von Amastigoten produzierte Exosomen durchaus eine andere Wirkung haben als die von Promastigoten [267]. Dies würde auch erklären, warum der CD69-induzierende Faktor nur im Falle lebender Parasiten wirkte, da nur diese sich in Amastigote umwandeln können. Weiterhin könnten so auch die Speziesunterschiede begründet werden, da sich die unterschiedlichen *Leishmania*-Arten deutlich in der Zusammensetzung und Menge ihrer Oberflächenmoleküle [268, 269] als auch bezüglich der produzierten Exosomen [270] unterscheiden.

Neben einem oder mehrerer löslicher Moleküle zeigte sich die gesteigerte CD69-Expression auch als abhängig vom direkten Zellkontakt, da nach Trennung von NK-Zellen und Monozyten durch ein Transwell-System die Reaktion ausblieb (s. Abb. 7 A). Dabei machte es keinen Unterschied, ob zusätzlich auf der NK-Zell-Seite des Transwell-Kultursystems Leishmanien vorhanden waren oder nicht (ein Experiment, Daten nicht gezeigt). Unerwartet war hierbei zunächst, dass es im Transwell-System zu einer vollständigen Aufhebung der Reaktion kam. Der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene lösliche Faktor müsste theoretisch auch in einem Transwell-System wirksam sein, da die verwendete Membran eine Porengröße von 0,4 µm aufwies und der lösliche Faktor durch einen Sterilfilter (Porengröße: 0,22 µm) filtrierbar war. Eine mögliche Erklärung könnten Unterschiede in der Konzentration und Synthese- oder Wirkkinetik des gesuchten Moleküls im Transwell-Ansatz sein. Sollte es erst gegen Ende der Kokultur produziert werden, wäre es verglichen mit den anderen Kokulturbedingungen bei Einsatz von Zellkulturüberständen ggf. zu kurz wirksam.

Auch einige Zytokine haben zellkontaktabhängige Effekte, da sie nicht nur in löslicher Form abgegeben, sondern auch membranständig auf Zellen präsentiert werden. Am besten bekannt ist dieser Effekt bei IL-15, das in der transpräsentierten Form beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Aktivierung von NK-Zellen spielt [3, 271]. Aber auch von IL-18 wurde kürzlich eine membrangebundene Form auf humanen Makrophagen beschrieben [249, 272]. Die Möglichkeit der Beteiligung membrangebundener Zytokine bei der Steigerung der CD69-Expression wurde über die direkte Zugabe blockierender Antikörper zu der PBMC-*Leishmania*-Kokultur untersucht. Dabei hatte die Blockierung von IL-15 keinen hemmenden Effekt, während durch anti-IL-18-Antikörper eine signifikante Reduktion der CD69-Expression von etwa 50 % erreicht wurde (s. Abb. 7 B/C). In den Zellkulturüberständen waren grundsätzlich nur geringe Mengen an IL-18 messbar, entsprechend hatte die Neutralisation dieses Zytokins unter diesen experimentellen Bedingungen keinen Effekt auf die CD69-Expression (Abb. 5 A, 6 B). Dies könnte darauf hindeuten, dass das IL-18 tatsächlich in einer membrangebundenen Form vorliegt.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass Monozyten nach Kontakt mit Leishmanien vermehrt IL-18 exprimieren (s. Abb. 8). Die verwendete Nachweistechnik erlaubte jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf eine intrazelluläre oder oberflächliche Lokalisation des IL-18. Im Gegensatz zu vielen anderen Zytokinen wird IL-18 nach Aktivierung der Zellen nicht neu synthetisiert und abgegeben, sondern liegt zunächst in einer inaktiven Form, dem pro-IL18, im Zytoplasma vor und wird erst in einem weiteren, Caspasen-vermittelten enzymatischen Schritt in seine aktive Form umgewandelt [252, 253]. Monozyten gehören dabei typischerweise zu den Zelltypen, die pro-IL-18 konstitutiv exprimieren [250, 251]. Der für die Fluoreszenzfärbung verwendete Antikörper detektierte sowohl die pro- als auch die aktive Form, die entweder sezerniert oder transpräsentiert wird. Um zwischen membranständigem transpräsentiertem und der intrazellulären pro-Form von IL-18 unterscheiden zu können, wurden Färbungen mit nur fixierten (hier sollte ausschließlich oberflächenständiges IL-18 erkannt werden) und fixierten als auch permeabilisierten Zellen verglichen (intrazelluläres und Oberflächen-IL-18 sollten hier gleichermaßen erkannt werden). Bei beiden Methoden kam es unter Konfrontation mit Leishmanien zu einer gesteigerten Expression von IL-18, das gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt erschien und entsprechend nicht eindeutig der Zellmembran zugeordnet werden konnte. Zwischen den fixierten und den zusätzlich permeabilisierten Zellen konnte jedoch kein Unterschied erkannt werden (s. Abb. 8). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Zellmembran bereits durch die Behandlung der Zellen leicht durchlässig geworden ist, sodass auch hier schon intrazelluläres pro-IL-18 angefärbt wurde. Auch wenn membranständiges IL-18 nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, so ist es doch unter Berücksichtigung aller Fakten sehr wahrscheinlich, dass von infizierten Monozyten transpräsentiertes IL-18 an der Aktivierung von humanen NK-Zellen beteiligt ist.

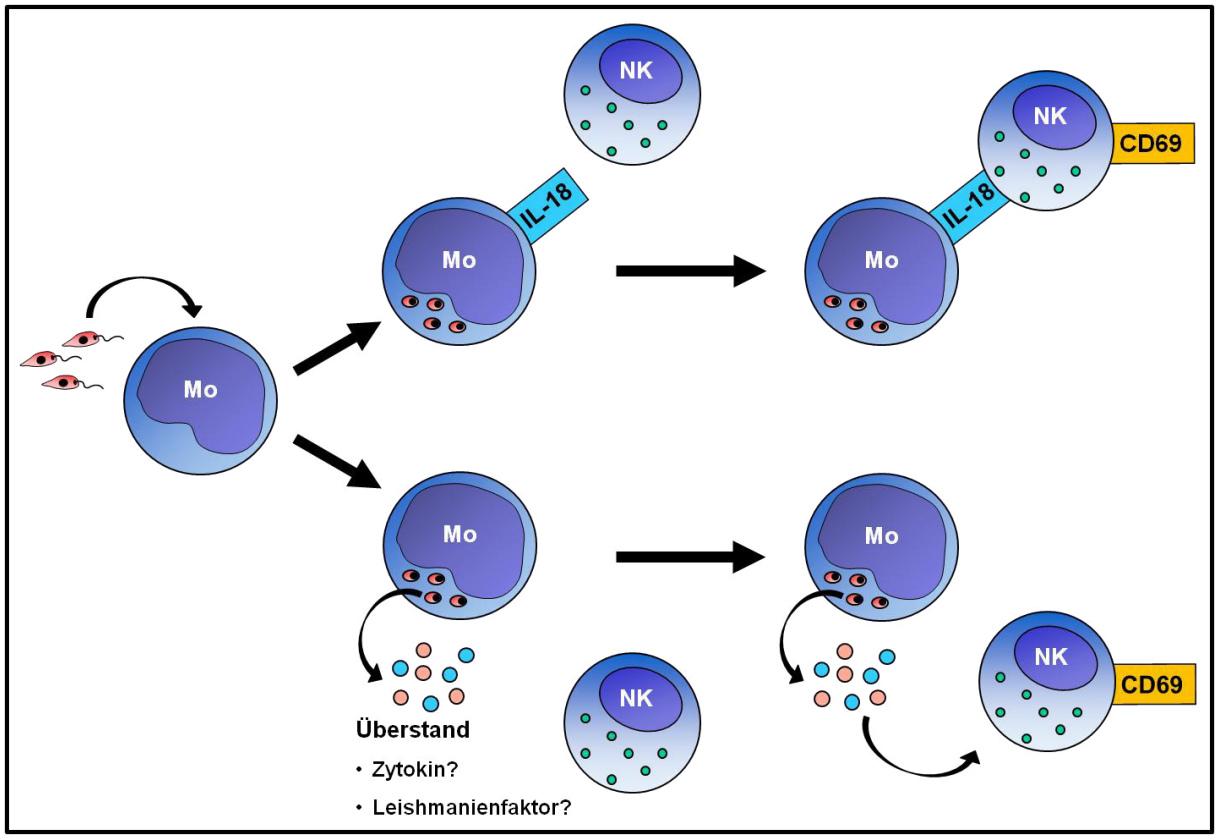


Abbildung 16: Modell der *Leishmania*-induzierten CD69-Expression auf NK-Zellen.
Humane *Leishmania*-infizierte Monozyten bewirken eine Voraktivierung humaner NK-Zellen, die sich in der Hochregulation des NK-zellulären Aktivierungsmarkers CD69 zeigt. Diese Aktivierung erfolgt zum einen über direkten Kontakt mit membrangebundenem IL-18, das nach Infektion mit Leishmanien vermehrt auf den Monozyten präsentiert wird. Zum anderen wird entweder von infizierten Monozyten oder von den intrazellulären amastigoten Leishmanien ein löslicher Faktor produziert, der zusätzlich zu einer kontaktunabhängigen Steigerung der CD69-Expression führt.

4.1.2 AKTIVIERUNG VON NK-ZELL-EFFEKTORFUNKTIONEN

Eine, wie in der Literatur beschriebene, direkte Aktivierung humaner NK-Zellen durch Leishmanien konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Bezugnehmend auf Nylen et al. [229] könnte dies in einer verkürzten Stimulationsdauer von 20 h begründet liegen (Nylen et al. verwendeten 48 h). Weitere mögliche Gründe könnten die abweichenden Kultivierungsbedingungen sowie die anderweitige Herkunft der NK-Zellen sein. Beide Faktoren könnten eine unterschiedliche Voraktivierung der NK-Zellen bedingt haben. Insbesondere bei der Studie von Becker et al. [231] ist dies durchaus vorstellbar, da hier Zellen von Blutspendern aus Mexiko, einem Leishmanien-Endemiegebiet, analysiert wurden. Dafür spricht auch, dass in einer Studie mit an viszeraler Leishmaniose erkrankten Patienten aus Brasilien und Bangladesch bereits bei gesunden Kontrollspendern unterschiedliche Konzentrationen an Zytokinen im Serum nachgewiesen wurden [173]. Es ist daher möglich, dass Menschen aus unterschiedlichen Regionen bereits eine unterschiedliche angeborene Immunantwort gegenüber Leishmanien zeigen.

In dieser Arbeit erfolgte die Aktivierung von NK-Zellen durch Leishmanien nur indirekt über Signale von akzessorischen Zellen (siehe auch Übersicht Abb. 17). Obwohl die NK-Zellen in der PBMC-*Leishmania*- bzw. NK-Monozyten-Kokultur die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 gesteigert exprimierten, wurde keine vermehrte Produktion von IFN-γ und sogar eine verminderte Zytotoxizität beobachtet (s. Abb. 9). Das Ausbleiben einer typischen NK-Zell-Effektorantwort könnte ein Anzeichen einer allgemeinen „Erschöpfung" der NK-Zellen sein [13, 273]. Dies scheint hier jedoch nicht der Fall zu sein, da die NK-Zellen auf die Stimulation mit den Zytokinen IL-12 und IL-18 erwartungsgemäß IFN-γ produzierten und gesteigerte Zytotoxizität zeigten. Zudem wurde die Wirkung der Zytokine durch die Zugabe von Leishmanien nicht vermindert, sondern verstärkt (s. Abb. 9, 10). Die verminderte Zytotoxizität nach Konfrontation mit Leishmanien alleine könnte auch damit erklärt werden, dass die extrazellulären Promastigoten den Kontakt zwischen NK-Zellen und den Tumor-Zielzellen behindern, welcher für die Auslösung der spezifischen Zytotoxizitätsreaktion notwendig ist. Bei zusätzlicher Stimulation mit IL-12/18 bewirken dagegen die Zytokine bereits alleine eine Aktivierung der Zellen, sodass hier für die Auslösung der Zytotoxizität kein zusätzlicher Kontakt mehr notwendig ist und in Folge keine Hemmung der Zytotoxizität mehr stattfindet.

Parasitäre Signale allein sind also nicht ausreichend, um in dem hier untersuchten in vitro-System NK-Zellen zu einer Effektorantwort zu stimulieren. Dies steht im Wiederspruch zu bereits publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen. In den meisten dieser Fällen erfolgte die Analyse jedoch erst nach 48-72 h und ergab nur geringe Mengen an IFN-γ [220, 221, 228]. Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch im vorliegenden Fall nach einer längeren Stimulationsdauer IFN-γ nachweisbar gewesen wäre. Allerdings ist es fraglich, ob eine solch geringe IFN-γ-Antwort der NK-Zellen zu einem so späten Zeitpunkt in einer in vivo-Situation überhaupt relevant wäre. Obwohl durch die alleinige Stimulation mit Leishmanien keine vollständige Aktivierung von NK-Zellen erreicht werden konnte, zeigte sie ein stimulierendes Potential, da sie bei bereits aktivierten NK-Zellen sowohl die IFN-γ-Produktion als auch die Zytotoxizität nochmals steigerte (s. Abb. 10). Für die Auslösung der NK-Zell-Effektorantwort sind neben den bereits identifizierten Signalen infizierter Monozyten folglich noch weitere stimulierende Signale notwendig. So konnte durch die Zugabe von exogenem IL-12 zu der PBMC-Leishmanien-Kokultur die NK-zelluläre IFN-γ-Produktion stimuliert werden. Diese Wirkung kam jedoch nur unter relativ hohen IL-12-Konzentrationen von 300 pg/ml zustande (während die Stimulation der PBMCs mit IL-12 alleine keinerlei Effekt hatte) (s. Abb. 10 A/C). Durch die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit IL-12 und Leishmanien sowie der Neutralisation von IL-18 konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Wirkung von IL-12 in der Kokultur von IL-18 abhängig ist (s. Abb. 10 E). Allerdings kann keine gesicherte Aussage dazu gemacht werden, ob es sich hier ausschließlich um membrangebundenes IL-18 auf

Monozyten handelt. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass durch Behandlung mit IL-12 die Freisetzung von löslichem IL-18 induziert wurde.
Die in PBMC-*Leishmania*-Kokultur-Überständen maximal gemessene Konzentration von 100 pg/ml IL-12p40 (s. Abb. 5 B) ist, sofern dies als Maß für das bioaktive IL-12 (Heterodimer IL-12p70 [p35/p40]) herangezogen werden kann, wahrscheinlich nicht ausreichend, um eine gesteigerte NK-zelluläre IFN-γ-Produktion auszulösen. Wird die IL-12-Konzentration durch exogene Zugabe auf ein kritisches Niveau von mindestens 300 pg/ml erhöht, kann diese Effektorfunktion in den NK-Zellen aber in Abhängigkeit von IL-18 hervorgerufen werden.
IL-12 wird von allen mononukleären Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) produziert, wobei vor allem letztere die Hauptproduzenten darstellen [274]. Im peripheren Blut sind jedoch nur geringe Mengen an DCs und keine Makrophagen vorhanden. In der Haut und in sekundären lymphatischen Organen befinden sich hingegen unterschiedlichste Dichten dieser Zellpopulationen [254, 275, 276]. Bei einer natürlichen Infektion durch den Stich einer Sandmücke sind bei der sich anschließenden Immunreaktion neben den Blutleukozyten auch Immunzellen der Haut beteiligt. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass in einer in vivo-Situation die für eine Aktivierung der NK-Zell-Effektorantwort notwendige IL-12-Konzentration erreicht werden kann. Basierend auf diesen Überlegungen wurde in dieser Studie untersucht, ob NK-Zellen in PBMC-*Leishmania*-Kokulturen eine IFN-γ-basierte Effektorantwort zeigen, wenn zusätzlich aus Monozyten generierte DCs (Mo-DCs) anwesend sind (s. Abb. 11 A), da diese Zellen nach Phagozytose von Leishmanien IL-12 produzieren können [277, 278]. Die Daten der vorliegenden Studie zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall war, was ggf. auf die zu geringe Menge produzierten IL-12 zurückzuführen war. Im Gegensatz zu den Literaturdaten konnte in den hier durchgeführten Experimenten auch mit keiner der verwendeten *Leishmania*-Spezies die Produktion von IL-12p40 in Mo-DCs induziert werden (Daten nicht gezeigt). Ob dies an der zu niedrigen Anzahl von Mo-DCs in Relation zur PBMC-Zahl oder an anderen methodischen Problemen lag, konnte bisher nicht geklärt werden. Generell muss natürlich bedacht werden, dass die in vitro generierten Mo-DCs nur ansatzweise mit primären DCs aus Geweben vergleichbar sind. Für zukünftige Experimente würde sich daher anbieten, primäre DCs aus dem Blut aufzureinigen und in der Kokultur zu verwenden. Die Rolle von DCs als IL-12-Produzenten bei der NK-Zellaktivierung kann demnach nicht abschließend beurteilt werden.

In einem weiteren Ansatz wurden neutrophile Granulozyten der PBMC-*Leishmania*-Kokultur als akzessorische Zellen zugesetzt (s. Abb. 11 B), da dieser Zelltyp im Mausmodell an der NK-Zell-Aktivierung beteiligt ist (nicht veröffentliche Daten der Arbeitsgruppe). Auch unter diesen Bedingungen wurde keine vermehrte NK-zelluläre IFN-γ-Produktion beobachtet, sodass Neutrophile in der humanen Situation bei der *Leishmania*-vermittelten NK-Zell-Aktivierung möglicherweise keine Rolle spielen.

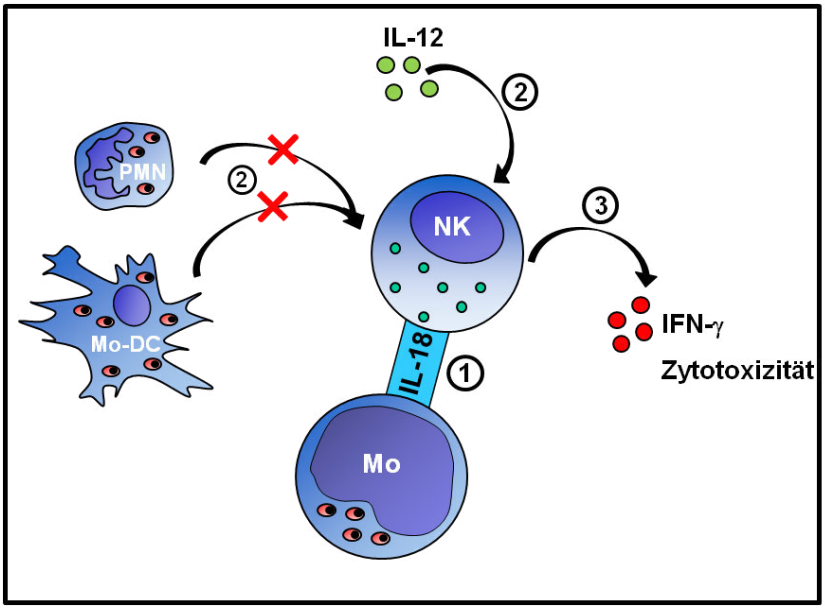


Abbildung 17: Modell der Aktivierung von NK-Zell-Effektorfunktionen durch Leishmanien
Der Kontakt mit membrangebundenem IL-18 auf Monozyten ist alleine nicht ausreichend, um eine Effektorantwort bei NK-Zellen auszulösen. Nach zusätzlicher Stimulation mit IL-12 kommt es, abhängig von der Anwesenheit von IL-18, zur Produktion von IFN-γ. Neutrophile Granulozyten oder unreife aus Monozyten generierte DCs liefern keine ausreichenden zusätzlichen Signale, um eine NK-Zell-Effektorantwort auszulösen.

Parallel zu den in vitro-Versuchen wurden auch in vivo-Experimente mit intraperitoneal (i.p.)-humanisierten NOD/SCID/IL-2Rg^{null} (NSG)-Mäusen durchgeführt. Hier bestätigten sich im Prinzip die in vitro generierten Daten, da nur nach zusätzlicher Stimulation mit Tumorzellen eine vermehrte IFN-γ-Produktion von NK-Zellen ausgelöst werden konnte, die zudem sehr schwach ausfiel (s. Abb. 12). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass in diesem Mausmodell keine optimalen Bedingungen erreicht werden. Zum einen sind nicht alle Zellen humanen Ursprungs, da NSG-Mäuse zwar keine eigenen T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, jedoch noch Zellen myeloiden Ursprungs, wie Makrophagen und dendritische Zellen, besitzen [232]. Da die Signale der murinen Zellen (z. B. die von diesen produzierten Zytokine) nur teilweise eine Kreuzreaktivität mit humanen Immunzellen zeigen, kann dies zu einer geringeren Aktivierung der humanen NK-Zellen geführt haben. Auch gilt das Kompartiment der Bauchhöhle nicht als physiologischer Ort einer natürlichen Leishmanien-Infektion, da typische Interaktionen der NK-Zellen mit residenten dendritischen Zellen der Haut oder Zellen der Lymphorgane, die im klassischen Mausmodell für eine NK-Zell-Aktivierung nötig sind, in der Bauchhöhe nicht stattfinden. Letztendlich kann aus den hier erarbeiteten Daten nicht mit Sicherheit geschlussfolgert werden, ob die in vivo-Daten tatsächlich die in vitro-Daten unterstützen oder ob das hier praktizierte humanisierte Maussystem einfach kein adäquates Modellsystem zur Beantwortung unserer Fragestellungen war.
Eine Alternative zu dem i.p.-Modell sind intravenös (i.v.)-humanisierte Mäuse. Hierbei werden neugeborenen NSG-Mäusen humane hämatopoetische Stammzellen transplantiert, so-

dass diese Mäuse im Erwachsenenalter ein humanes Immunsystem entwickeln [232]. Allerdings wurde gezeigt, dass einige der Zelltypen nicht voll funktionsfähig sind und dass gerade NK-Zellen und myeloische Zellen in deutlich geringeren Mengen vorhanden sind als dies bei Menschen der Fall ist. In den letzten Jahren wurden deshalb immer neue NSG-Mauslinien mit unterschiedlichen Verbesserungen gezüchtet und neue Behandlungsverfahren etabliert [279, 280]. Ob diese eine realistische Analyse der Aktivität humaner NK-Zellen während einer *Leishmania*-Infektion erlauben, muss jedoch erst noch untersucht werden.

4.2 **Beeinflussung von NK-Zell-spezifischen Oberflächenmolekülen**

Der am häufigsten verwendete Marker zum Nachweis humaner NK-Zellen ist das Oberflächenmolekül CD56. Obwohl dieses Molekül Gegenstand intensiver Forschung ist (insbesondere im Zusammenhang mit neurogenen Zellen), ist seine Funktion für NK-Zellen noch weitgehend unbekannt. Da es sich um ein Adhäsionsmolekül handelt, ist anzunehmen, dass es auch im Falle der NK-Zellen zu Interaktionen mit anderen Zellen oder Gewebestrukturen beiträgt. Neben der reinen Adhäsion vermittelt CD56 bei Neuronen auch den Eingriff in intrazelluläre Signalwege [91, 92]. Dies ist auch bei NK-Zellen nicht ausgeschlossen. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass der direkte Kontakt von NK-Zellen mit *Leishmania*-Promastigoten zu einer Reduktion der CD56-Expression führt, wobei die Stärke der Reaktion sowohl von der Anzahl als auch der Spezies der Leishmanien, nicht jedoch von ihrem Organtropismus abhing (s. Abb. 13). Ein anderer Marker, NKp46, zeigte dagegen bei allen *Leishmania*-Spezies nur eine mäßige Reduktion seiner Expression. CD16 war wiederum nur nach Exposition mit *L. mexicana* verringert nachweisbar (s. Anhang 3). Ein ähnliches Phänomen wurde im Zusammenhang mit Leishmanien bisher auch von Lieke et al. [224] beschrieben. Dabei zeigten reine NK-Zellpopulationen nach einer 24-stündigen Kokultur mit *L. major*-Promastigoten eine deutlich reduzierte Expression von CD16, CD56, NKp30 und NKp44, jedoch nicht von NKp46 [224]. Der genaue Mechanismus, über den die reduzierte CD56-Expression vermittelt wird, ist noch unbekannt. Das Molekül wurde nicht von der NK-Zell-Membran abgespalten, da die Konzentration löslichen CD56 im Zellkulturüberstand unverändert blieb (s. Abb. 14 C). Dagegen konnte eine deutliche Reduktion der CD56-Gentranskription nachgewiesen werden (s. Abb. 14 B links), was eine Ursache der verminderten Oberflächenexpression sein kann. Allerdings korrelierten das Ausmaß der transkriptionellen Beeinflussung nicht mit der Stärke der Oberflächenreduktion, da bei allen drei getesteten *Leishmania*-Spezies zwar eine vergleichbare Reduktion der mRNA-Transkription gemessen wurde, die Verminderung der Oberflächenexpression jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt war (s. Abb. 14 B rechts). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Expression über zusätzliche Mechanismen beeinflusst wird. So besteht die Möglichkeit, dass neben der Regulation auf mRNA-Ebene das oberflächliche CD56-Molekül durch die Leish-

manien bzw. über Leishmanienprodukte so verändert wird, dass es nicht mehr nachweisbar ist.

Um auslösende Faktoren der verminderten CD56-Expression näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche Leishmanien-Präparationen und -Spezies verglichen. Da im Falle von *L. mexicana* unter Verwendung von fixierten Leishmanien vergleichbare Reaktionen erreicht werden konnten wie mit lebenden Parasiten, scheint eine aktive Beteiligung der Leishmanien, z. B. in Form der Sekretion bestimmter Faktoren oder energieabhängiger Prozesse, nicht notwendig zu sein. Die vergleichbare Wirkung von *Freeze-thaw*-Lysaten weist weiter darauf hin, dass einzelne Bestandteile der Parasitenmembran für die Wirkung ausreichend sind (s. Abb. 13 E). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Reduktion der CD56-Expression auf ein bestimmtes Oberflächenmolekül der Leishmanien zurückzuführen ist, welches zum Beispiel über einen Pathogenerkennungsrezeptor eine Signalwirkung in den NK-Zellen auslöst. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen *Leishmania*-Spezies könnten demnach auf eine speziesabhängige, unterschiedlich stark ausfallende Expression dieses Moleküls zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu *L. mexicana* konnte bei *L. infantum* durch die Fixierung beziehungsweise Lyse der Parasiten die CD56-Reduktion fast komplett aufgehoben werden (s. Abb. 13 E). Dies könnte daran liegen, dass das verantwortliche Molekül durch die Behandlung der Leishmanien so verändert oder beschädigt wird, dass es nicht mehr voll wirksam ist. Die noch vorhandene Wirksamkeit bei *L. mexicana* ist dann möglicherweise auf eine anfangs stärkere Expression dieses Moleküls zurückzuführen. Ein weiterer Unterschied zwischen den Spezies ist, dass nur der Überstand von *L. infantum*-Kulturen ebenfalls eine CD56-Reduktion bewirkte (s. Abb. 15).

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse könnte der Virulenzfaktor gp63 ein vielversprechender Kandidat für das gesuchte Oberflächenmolekül sein. Bei diesem handelt es sich um eine Metalloprotease, die insbesondere auf der promastigoten Form der Leishmanien exprimiert wird und in der Lage ist, unterschiedliche Substrate bei unterschiedlichen pH-Werten umzusetzen [281, 282]. So wurde beschrieben, dass diese Molekül gezielt CD4-Moleküle auf T-Zellen spalten kann, ohne andere Rezeptoren wie CD3, CD8 oder CD25 zu beeinflussen [283]. Einige Moleküle scheinen folglich anfälliger gegenüber der Wirkung dieser Protease zu sein als andere. Dies könnte erklären, warum nur CD56 in einem so starken Ausmaß betroffen ist, während andere Moleküle wie NKp46 oder CD16 kaum beeinflusst werden. Einen weiteren Hinweis liefert die bereits erwähnten Studie mit NK-Zellen von Lieke et al. [224], bei der die verminderte CD56-Expression dann ausblieb, wenn eine gp63-defekte *L. major*-Mutante in Kurzzeitexperimenten verwendet wurde. Allerdings führte hier eine längere Inkubationszeit von 5 Tagen auch mit der $gp63^{ko}$-Variante zu einem Verschwinden des NK-zellulären CD56-Markers [224]. Gp63 wird auch in löslicher Form in großen Mengen in den Zellkulturüberstand abgegeben, wobei dies jedoch nicht nur bei *L.*

infantum, sondern auch bei allen anderen *Leishmania*-Spezies der Fall ist [284, 285]. Allerdings werden gp63-vermittelte enzymatische Reaktionen weder über Lyse (*freeze-thaw*-Behandlung) noch durch Fixierung der Parasiten mit Glutaraldehyd und damit wahrscheinlich auch mit Formaldehyd nicht beeinträchtigt [285, 286]. Damit wäre nicht erklärbar, warum bei fixierten *L. infantum* und *Ft*-Lysat keine Reduktion der CD56-Expression mehr zu messen war. Es bleibt daher zu überprüfen, ob gp63 tatsächlich an der genannten Reaktion beteiligt ist und ob zusätzlich andere *Leishmania*-spezifische Moleküle zugrunde liegen.

Eine der wichtigsten Fragen, die sich bei diesen Analysen stellt, ist, ob die veränderte CD56-Expression einen direkten Einfluss auf die Funktion der NK-Zellen hat oder nur eine Begleiterscheinung ist. Da die Funktion dieses Moleküls bisher nicht genau bekannt ist, kann über einen direkten Einfluss nur spekuliert werden. Eine verringerte Adhäsionsfähigkeit über CD56 könnte das Wanderungsverhalten der NK-Zellen und damit ihre Verfügbarkeit an Orten einer *Leishmania*-Infektion vermindern. Zusätzlich ist bekannt, dass CD56 eine Rolle beim Kontakt mit anderen Immunzellen spielen kann [111, 112]. So ist es vorstellbar, dass durch Reduktion der CD56-Expression die Wirkung auf andere Zellen vermindert wird. Weiterhin können NK-Zellen auch direkt über CD56 aktiviert werden [103]. Die bei einer geringeren Expression ausbleibenden, aktivierenden Signale könnten demnach zu einer geringeren Aktivierung der NK-Zellen führen. Alle diese Faktoren könnten insgesamt zu einer schlechteren Kontrolle einer *Leishmania*-Infektion beitragen, jedoch auch Auswirkungen auf die Immunantwort auf andere Krankheiterreger haben und somit Sekundärinfektionen begünstigen. Natürlich besteht auch die Möglichkeit, dass die Veränderung der CD56-Expression keine funktionellen Auswirkungen hat und somit bei der Abwehr von *Leishmania*-Infektionen keine direkte Rolle spielt. Hinweise lassen sich aus anderen Erkrankungen ableiten: So wurde bei Patienten mit chronischen Viruserkrankungen [68, 287-290], sekundärer Syphilis [291] und *Myasthenia gravis* [292] ein vermehrtes Auftreten von $CD56^-$ NK-Zellen beschrieben. Diese Zellen zeigten eine allgemein verringerte Aktivität mit verminderter spezifischer Tumorzell-Lyse und Zytokinproduktion. Dies war bei HIV (humanes Immundefizienz-Virus), HCMV (humanes Cytomegalievirus) und EBV (Epstein-Barr-Virus) durch eine erhöhte Expression von inhibierenden Rezeptoren und einer verminderten Expression von aktivierenden Rezeptoren (NKp46, NKp30) bedingt [287-289]. Dagegen war bei chronischen Hepatitis-Virus-Infektionen keine Veränderung der NK-Rezeptorverteilung vorhanden [290]. Durch Stimulation mit IL-2 konnte die CD56-Expression wiederhergestellt werden, dies beeinflusste jedoch die beschriebenen Reaktionen nicht, sodass ein direkter Zusammenhang zwischen der CD56-Veränderung und der NK-Zellfunktion ist in diesem Fall nicht zu bestehen scheint. Die geringere Zytotoxizitätskapazität dieser $CD56^-$ NK-Zellen deckt sich mit den hier beschriebenen NK-Zellreaktionen. Allerdings zeigten die $CD56^-$ NK-Zellen der genannten Publikationen auch nach Stimulation mit Zytokinen eine geringere Aktvierung, während dies

in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall war (die mit *Leishmania*-Stadien konfrontierten und zeitgleich Zytokin-stimulierten NK-Zellen produzierten sogar mehr IFN-γ als in Abwesenheit von Leishmanien). Dabei wurde das IFN-γ bei zwei analysierten Spendern in erster Linie von $CD56^-$ Zellen produziert (s. Anhang 4). Weitere Unterschiede zu den bei Virusinfektionen beschriebenen Daten (s.o.) sind die allenfalls marginale Expressionsminderung der beiden Oberflächenmarker NKp46 und CD16. Folglich scheinen hier beschriebenen $CD56^-$ NK-Zellpopulationen nicht mit den bei chronischen Virusinfektionen auftretenden Zelltypen identisch zu sein. Allerdings könnte die Dauer der Stimulation einen Einfluss ausgeübt haben. So ist es nicht ausgeschlossen, dass NK-Zellen nach längerer Stimulation mit Leishmanien auch eine reduzierte Aktivität zeigen. Zusätzlich wurden Leishmanien und Zytokine in den hier durchgeführten Analysen zur selben Zeit zu den Zellen gegeben. Es ist daher nicht bekannt, wie die durch Leishmanien-Stimulation auftretenden $CD56^-$ NK-Zellen auf eine spätere Zytokin-Stimulation reagieren würden.

Zusammenfassend konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt werden, dass NK-Zellen auch im humanen System innerhalb von 20 h nach einer *Leishmania*-Infektion aktiviert werden können. Die Stimulation der NK-Zellen ist dabei speziesübergreifend, da sie gleichermaßen bei vier unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies nachweisbar war. Allerdings fand keine direkte Aktivierung der NK-Zellen durch die Parasiten statt, es waren vielmehr zusätzliche Zelltypen und Zytokine notwendig. Vor allem Monozyten spielten hier eine entscheidende Rolle. Einerseits produzierten sie einen noch unbekannten löslichen Faktor und andererseits exprimierten sie IL-18 membrangebunden auf der Zelloberfläche. Beides führte zu einer Voraktivierung von NK-Zellen, die in Folge über geringfügige zusätzliche Stimulation mit IL-12 mit einer erhöhten IFN-γ-Produktion sowie gesteigerten Zytotoxizitätsreaktionen reagierten. Welche Zellen für die Produktion des IL-12 in einer in vivo-Situation verantwortlich sein könnten, muss erst noch geklärt werden. Trotzdem gibt diese Arbeit Hinweise darauf, dass humane NK-Zellen in der Lage sind, sehr schnell mit der Produktion von IFN-γ auf eine *Leishmania*-Infektion zu reagieren. Eine medikamentöse Unterstützung der NK-Zell-Antwort könnte daher sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie von Leishmanien-Infektionen von Vorteil sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Fragestellung. Die einzelligen *Leishmania*-Parasiten, die Erreger der teils tödlich verlaufenden Leishmaniose werden über den Stich von Sandmücken auf viele unterschiedliche Säugetiere, wie auch den Menschen, übertragen. Durch die fortschreitende Ausbreitung des Vektors und verstärkte Zuwanderung aus Endemiegebieten hat die Leishmaniose auch in Deutschland in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Leishmanien werden nach der Übertragung passiv über Phagozytose in unterschiedliche Zellen, vor allem Immunzellen, aufgenommen und vermehren sich intrazellulär. Eine effektive Immunantwort gegen Leishmanien ist daher mit der Produktion von leishmanizid wirkenden, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (z. B. Stickstoffmonoxid [NO]) durch die infizierten Zellen selbst verbunden. Die NO-Produktion wird vor allem durch das Zytokin Interferon (IFN)-γ induziert, das von T-Lymphozyten und Natürlichen Killer (NK)-Zellen produziert wird. Im Mausmodell der Leishmaniose konnte nachgewiesen werden, dass IFN-γ von NK-Zellen bei einer Leishmanien-Infektion einen protektiven Effekt hat. Auch beim Menschen gibt es Hinweise darauf, dass NK-Zellen an der Immunabwehr von Leishmanien beteiligt sind. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung im menschlichen Körper teils noch unklar und die bisher erzielten Ergebnisse kontrovers. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob aus dem Blut isolierte humane NK-Zellen in vitro in einem Zeitraum von 20 h durch Leishmanien aktiviert werden können und welche Faktoren hierfür notwendig sind.

Methoden. Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) wurden aus frischem Venenblut über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und einzelne Immunzellpopulationen über durchflusszytometrische Sortierung, magnetische Zellseparation oder Plastikädhäsion aufgereinigt. Die verschiedenen Immunzellpopulationen wie NK-Zellen, Monozyten, T- und B-Zellen oder neutrophile Granulozyten wurden in unterschiedlicher Zusammensetzung mit *Leishmania* spp.-Promastigoten bzw. *Leishmania*-Antigen für 20 h kokultiviert und der Aktivierungsstatus der NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie, ELISA, ^{51}Chrom-Freisetzungsassay und quantitativer Real-time-PCR bestimmt. Um zu untersuchen, ob direkter Zellkontakt oder spezifische Zytokine bei der Zellaktivierung eine Rolle spielen, wurden die Zellen teils durch ein Transwell-System voneinander getrennt, teils wurden der Kokultur neutralisierende Antikörper zugesetzt. Die Überstände der Kokulturen wurden abgenommen, für unterschiedliche Analysen weiterbehandelt (Filtration, Erhitzung, Zytokinblockade) und ihre stimulierende Wirkung auf NK-Zellen getestet bzw. der Gehalt verschiedener immunmodulatorischer Proteine über ELISA und Multiplex Immunoassay bestimmt. Die IL-18-Expression von Monozyten wurde zusätzlich nach Immunfluoreszenzfärbung mit einem konfokalen Mikroskop analysiert.

Ergebnisse Die Kokultur von PBMCs mit promastigoten Stadien unterschiedlicher *Leishmania*-Arten führte zu einer gesteigerten Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NK-Zellen. Die Stärke der Expression war spezies- und dosisabhängig, zeigte jedoch keinen Zusammenhang zum Organtropismus der jeweiligen Parasiten-Stämme. Während T- oder B-Lymphozyten keine Rolle spielten, wurden *Leishmania*-infizierte Monozyten als Induktoren der NK-Zell-Aktivierung identifiziert. Die Steigerung der CD69-Expression war dabei nicht abhängig von einer bestimmten Monozytensubpopulation. Sie konnte sowohl durch einen löslichen Faktor, der von *Leishmania*-infizierten Monozyten produziert wurde, als auch durch direkten Kontakt zwischen Monozyten und NK-Zellen ausgelöst werden. Während es in dieser Arbeit nicht möglich war, den löslichen Faktor zu identifizieren, konnte das auf Monozyten präsentierte, membrangebundene IL-18 für die kontaktabhängige Steigerung der CD69-Expression verantwortlich gemacht werden. Es wurden keine Hinweise auf eine direkte Aktivierung der NK-Zellen durch Leishmanien gefunden. Trotz der CD69-Steigerung auf NK-Zellen wurde weder die Produktion von IFN-γ noch eine NK-Zell-Zytotoxizität unter den genannten Bedingungen ausgelöst. Unter zusätzlicher Stimulation mit dem Zytokin IL-12 kam es jedoch in IL-18-abhängiger Weise zum Ablauf der genannten Effektormechanismen. Die Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten oder unreifen, aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (Mo-DCs) in PBMC-*Leishmania*-Kokulturen hatte allerdings keinen Einfluss auf die Effektorfunktionen der NK-Zellen. Die zelluläre Quelle des für die Aktivierung benötigten IL-12 in einer in vivo-Situation ist daher bisher nicht geklärt. Vielversprechende Kandidaten sind, wie bereits im Mausmodel gezeigt, reife DCs.
Neben den indirekten Effekten der Leishmanien auf NK-Zellen konnte auch eine direkte, kontaktabhängige Interaktion gemessen werden, die zur verminderten Expression des Oberflächenmoleküls CD56 auf den NK-Zellen führte. Welche Auswirkungen diese Reaktion auf die allgemeine Funktionalität der NK-Zellen hat, bedarf weiterer Untersuchungen.

Schlussfolgerungen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass NK-Zellen nicht *Leishmania*-infizierter Menschen in vitro in sehr kurzer Zeit durch unterschiedliche *Leishmania* spp. aktiviert werden können und dass hierfür spezifische Signale weiterer Zelltypen, wie z. B. über Monozyten präsentiertes IL-18, notwendig sind. Für die Auslösung NK-Zell-spezifischer Effektorantworten sind jedoch weitere Stimuli wie IL-12 notwendig. Obwohl die Quelle für IL-12 in einer in vivo-Situation noch unklar ist, ist es wahrscheinlich, dass NK-Zellen auch in dieser Situation an der frühen Abwehr einer *Leishmania*-Infektion beteiligt sind.

6 SUMMARY

Background and Hypothesis. Protozoan *Leishmania* parasites, which are the causative agents of potentially lethal leishmaniasis, are transmitted by the bite of sandflies to a variety of mammals, including humans. Due to progressive spreading of the vector and considerable immigration from endemic countries over the last years, leishmaniasis has also gained enhanced medical significance in Germany. After transmission, *Leishmania* parasites are passively taken up via phagocytosis by different cell types, mainly immune cells, and replicate intracellularly. Thus, an effective immune response against *Leishmania* is associated with the host cell production of leishmanicidal reactive oxygen and nitrogen species (e. g. nitrogen monoxide [NO]). The NO production is mainly induced by the cytokine interferon (IFN)-γ, which is produced by T-lymphocytes and NK cells. In a murine model of leishmaniasis, it was shown that NK cell-derived IFN-γ plays a protective role in *Leishmania* infections. Similarly, in the human system there are some evidences that NK cells contribute to the immune response against *Leishmania*. However, the underlying mechanisms of NK cell activation in the human context are not entirely known and the data are somewhat controversial, so far. Therefore, this study intended to analyse whether human blood-derived NK cells can be activated by *Leishmania* in vitro (within a period of 20 hours), and to identify the inducers or stimuli of NK cell activation in this context.

Methods. Mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) were isolated from freshly collected venous blood via density gradient centrifugation, and different immune cell populations were purified by flow cytometric cell sorting, magnetic cell sorting or plastic adhesion. The different cell types (NK cells, monocytes, T cells and B cells) were cocultured for 20 h in variable cell compositions with *Leishmania* spp. promastigotes or *Leishmania*-antigen, and the NK cell activation status was determined by flow cytometry, ELISA, ^{51}chromium-release-assay and quantitative real-time-PCR. Transwell assays or antibody-mediated blockage were used to analyse the contact dependency or the role of specific antigens in NK cell activation. Cell culture supernatants were harvested, treated by different methods (filtration, heat inactivation, cytokine blockage) and tested for their NK cell activating potential. Furthermore, the content of different immune modulators in the supernatants was determined via ELISA and multiplex immunoassay. In addition, the monocyte-derived IL-18-expression was analyzed by immunofluorescence staining and confocal laser scanning microscopy.

Results. The coculture of PBMCs with different *Leishmania* spp. led to an increased expression of the activation marker CD69 on NK cells. This reaction was species- and dose-dependent but independent of the organotropism of the different parasite strains. *Leishmania*-infected monocytes were identified as triggers of NK cell activation, whilst neither T- nor

B-lymphocytes exhibited any stimulatory effect on NK cells. However, CD69 upregulation revealed as independent on the monocyte subtype. CD69 expression was triggered by both, a soluble factor being produced by *Leishmania*-infected monocytes, and by direct contact of monocytes and NK cells. In the current study it was not possible to identify the soluble factor but to elucidate monocyte-derived, surface-bound IL-18 as trigger of contact-dependent CD69 induction. Overall, there was no evidence of direct contact-dependent NK cell activation by *Leishmania* stages themselves or of CD69-induced production of IFN-γ or NK cell cytotoxicity. For the latter reactions an additional stimulation with the cytokine IL-12 is obviously necessary, which is effective only in the presence of IL-18. However, the addition of neutrophil granulocytes or immature monocyte-derived dendritic cells to PBMC-*Leishmania* coculture, had no effect on the NK cell effector function. Therefore, the cellular source of the IL-12 needed for activation in an in vivo situation is still unclear. Similar to the mouse model, promising candidates for this function are mature DCs.
Besides indirect effects of *Leishmania* on NK cells, a direct interaction between these cells led to a contact-dependent reduction of surface CD56 expression on NK cells. The consequences of this change on NK cell function will be analysed in future projects.

Conclusion. The current study shows that NK cells originating from non-infected humans are activated in vitro by different *Leishmania* spp. within a very short time span, and that these reactions depend on specific signals of other cell types, such as monocyte-derived surface-expressed IL-18. In addition, to trigger NK cell effector functions, IL-12 is needed as additional stimulus. Although the actual source of IL-12 in an in vivo situation remains unclear, it appears likely that NK cells contribute to the early immune defence in *Leishmania*-infections.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, *"Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype.* Eur J Immunol, 1975. **5**(2): p. 112-7.
2. Chaix, J., et al., *Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18.* J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1627-31.
3. Lucas, M., et al., *Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15.* Immunity, 2007. **26**(4): p. 503-17.
4. Guia, S., et al., *A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo.* Blood, 2008. **111**(10): p. 5008-16.
5. Schleicher, U., et al., *NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs.* J Exp Med, 2007 **204**(4): p. 893-906.
6. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity.* Molecular immunology, 2005. **42**(4): p. 501-10.
7. Fehniger, T.A., et al., *Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response.* J Immunol, 1999 **162**(8): p. 4511-20.
8. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition.* Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
9. Mehrotra, P.T., et al., *Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12.* J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2637-44.
10. Ostapchuk, Y.O., et al., *Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF-beta in healthy donors and breast cancer patients.* Cell Immunol, 2015.
11. Maroof, A., et al., *Posttranscriptional regulation of Il10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function.* Immunity, 2008. **29**(2): p. 295-305.
12. Rajagopalan, S., J. Fu, and E.O. Long, *Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells.* J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1877-81.
13. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells.* Science, 2011 **331**(6013): p. 44-9.
14. Moretta, A., et al., *Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 619-48.
15. Perez-Villar, J.J., et al., *The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1.* J Immunol, 1997. **158**(12): p. 5736-43.
16. Granados, D.P., et al., *ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides.* BMC Immunol, 2009. **10**: p. 10.
17. Garcia-Lora, A., I. Algarra, and F. Garrido, *MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape.* J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 346-55.
18. Karlhofer, F.M., R.K. Ribaudo, and W.M. Yokoyama, *MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells.* Nature, 1992. **358**(6381): p. 66-70.
19. Long, E.O., *Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm.* Immunological reviews, 2008. **224**: p. 70-84.
20. Olcese, L., et al., *Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases.* J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4531-4.
21. Stebbins, C.C., et al., *Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(17): p. 6291-9.
22. Sivori, S., et al., *Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines.* J Neuroimmunol, 2000. **107**(2): p. 220-5.
23. Hecht, M.L., et al., *Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences.* J Proteome Res, 2009. **8**(2): p. 712-20.
24. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells.* Nature, 2001. **409**(6823): p. 1055-60.
25. Arnon, T.I., et al., *Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30.* European journal of immunology, 2001. **31**(9): p. 2680-9.
26. Jarahian, M., et al., *Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin.* PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002195.
27. Esin, S., et al., *Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria.* Infect Immun, 2008. **76**(4): p. 1719-27.
28. Brandt, C.S., et al., *The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans.* The Journal of experimental medicine, 2009. **206**(7): p. 1495-503.
29. Vitale, M., et al., *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis.* The Journal of experimental medicine, 1998. **187**(12): p. 2065-72.
30. Walzer, T., et al., *Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(9): p. 3384-9.
31. Hollyoake, M., R.D. Campbell, and B. Aguado, *NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in Mus caroli.* Mol Biol Evol, 2005. **22**(8): p. 1661-72.

32. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor.* Immunity, 2001. **14**(2): p. 123-33.
33. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.* Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
34. Vales-Gomez, M., et al., *Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E.* EMBO J, 1999. **18**(15): p. 4250-60.
35. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.* Science, 1999. **285**(5428): p. 730-2.
36. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion.* Blood, 2006. **107**(1): p. 159-66.
37. Lauzon, N.M., et al., *The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity.* Cell Immunol, 2006. **241**(2): p. 102-12.
38. Sivori, S., et al., *A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2.* Blood, 2010. **116**(10): p. 1637-47.
39. Heil, F., et al., *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily.* European journal of immunology, 2003. **33**(11): p. 2987-97.
40. Matsumoto, M., et al., *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells.* J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3154-62.
41. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
42. Mori, S., et al., *Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFN-alpha and PMA/ionomycin.* Int J Oncol, 1998. **12**(5): p. 1165-70.
43. Cooper, M.A., et al., *Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells.* European journal of immunology, 2001. **31**(3): p. 792-801.
44. Ziblat, A., et al., *IL-27 stimulates human NK-cell effector functions and primes NK cells for IL-18 responsiveness.* Eur J Immunol, 2015. **45**(1): p. 192-202.
45. Skak, K., K.S. Frederiksen, and D. Lundsgaard, *Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression.* Immunology, 2008 **123**(4): p. 575-83.
46. Laouar, Y., et al., *Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma.* Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 600-7.
47. Lee, H.M., K.S. Kim, and J. Kim, *A comparative study of the effects of inhibitory cytokines on human natural killer cells and the mechanistic features of transforming growth factor-beta.* Cell Immunol, 2014. **290**(1): p. 52-61.
48. Cai, G., R.A. Kastelein, and C.A. Hunter, *IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18.* European journal of immunology, 1999. **29**(9): p. 2658-65.
49. Mocellin, S., et al., *IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis.* Genes Immun, 2004. **5**(8): p. 621-30.
50. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset.* Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
51. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets.* Trends Immunol, 2001 **22**(11): p. 633-40.
52. Nagler, A., L.L. Lanier, and J.H. Phillips, *Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo.* The Journal of experimental medicine, 1990. **171**(5): p. 1527-33.
53. De Maria, A., et al., *Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011 **108**(2): p. 728-32.
54. Ellis, T.M. and R.I. Fisher, *Functional heterogeneity of Leu 19"bright"+ and Leu 19"dim"+ lymphokine-activated killer cells.* J Immunol, 1989. **142**(8): p. 2949-54.
55. Nagler, A., et al., *Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells.* J Immunol, 1989. **143**(10): p. 3183-91.
56. Abdul-Careem, M.F., et al., *Genital HSV-2 infection induces short-term NK cell memory.* PloS one, 2012. **7**(3): p. e32821.
57. Gillard, G.O., et al., *Thy1+ NK [corrected] cells from vaccinia virus-primed mice confer protection against vaccinia virus challenge in the absence of adaptive lymphocytes.* PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002141.
58. Sun, J.C., J.N. Beilke, and L.L. Lanier, *Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells.* Immunological reviews, 2010. **236**: p. 83-94.
59. Min-Oo, G. and L.L. Lanier, *Cytomegalovirus generates long-lived antigen-specific NK cells with diminished bystander activation to heterologous infection.* The Journal of experimental medicine, 2014. **211**(13): p. 2669-80.
60. Paust, S., et al., *Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses.* Nat Immunol, 2010. **11**(12): p. 1127-35.
61. Peng, H., et al., *Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation.* J Clin Invest, 2013. **123**(4): p. 1444-56.
62. Majewska-Szczepanik, M., et al., *Natural killer cell-mediated contact sensitivity develops rapidly and depends on interferon-alpha, interferon-gamma and interleukin-12.* Immunology, 2013. **140**(1): p. 98-110.
63. Sun, J.C., et al., *Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory.* The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(5): p. 947-54.

64. Guma, M., et al., *Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts.* Blood, 2006. **107**(9): p. 3624-31.
65. Lopez-Verges, S., et al., *Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(36): p. 14725-32.
66. Foley, B., et al., *Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen.* J Immunol, 2012. **189**(10): p. 5082-8.
67. Brunetta, E., et al., *Chronic HIV-1 viremia reverses NKG2A/NKG2C ratio on natural killer cells in patients with human cytomegalovirus co-infection.* AIDS, 2010. **24**(1): p. 27-34.
68. Bjorkstrom, N.K., et al., *Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus.* The Journal of experimental medicine, 2011. **208**(1): p. 13-21.
69. Petitdemange, C., et al., *Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity.* PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002268.
70. Reeves, R.K., et al., *Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques.* Nat Immunol, 2015. **16**(9): p. 927-32.
71. Ziegler, S.F., et al., *Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens.* European journal of immunology, 1993. **23**(7): p. 1643-8.
72. Lopez-Cabrera, M., et al., *Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors.* The Journal of experimental medicine, 1993. **178**(2): p. 537-47.
73. De Maria, R., et al., *Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors.* J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1999-2004.
74. Testi, R., et al., *CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation.* The Journal of experimental medicine, 1990. **172**(3): p. 701-7.
75. Bieber, T., et al., *CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells.* J Invest Dermatol, 1992. **98**(5): p. 771-6.
76. de la Fuente, H., et al., *The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1.* Mol Cell Biol, 2014. **34**(13): p. 2479-87.
77. Thijssen, V.L., et al., *Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review.* Biochim Biophys Acta, 2015. **1855**(2): p. 235-47.
78. Gerosa, F., et al., *Differential effects of tyrosine kinase inhibition in CD69 antigen expression and lytic activity induced by rIL-2, rIL-12, and rIFN-alpha in human NK cells.* Cell Immunol, 1993 **150**(2): p. 382-90.
79. Borrego, F., J. Pena, and R. Solana, *Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases.* Eur J Immunol, 1993. **23**(5): p. 1039-43.
80. Benlahrech, A., et al., *Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon gamma Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways.* Sensors (Basel), 2009. **9**(1): p. 386-403.
81. Santis, A.G., et al., *Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway.* European journal of immunology, 1992. **22**(5): p. 1253-9.
82. Pisegna, S., et al., *Src-dependent Syk activation controls CD69-mediated signaling and function on human NK cells.* J Immunol, 2002. **169**(1): p. 68-74.
83. Lanier, L.L., et al., *Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen.* The Journal of experimental medicine, 1988. **167**(5): p. 1572-85.
84. Zingoni, A., et al., *CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94 / NKG2-A inhibitory receptor.* Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 644-51.
85. Mackay, L.K., et al., *Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention.* J Immunol, 2015. **194**(5): p. 2059-63.
86. Shiow, L.R., et al., *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs.* Nature, 2006. **440**(7083): p. 540-4.
87. Walzer, T., et al., *Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor.* Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1337-44.
88. Sanchez, T. and T. Hla, *Structural and functional characteristics of S1P receptors.* J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 913-22.
89. Vaessen, L.M., et al., *FTY720 treatment of kidney transplant patients: a differential effect on B cells, naive T cells, memory T cells and NK cells.* Transpl Immunol, 2006. **15**(4): p. 281-8.
90. Jenne, C.N., et al., *T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow.* J Exp Med, 2009. **206**(11): p. 2469-81.
91. Little, E.B., et al., *A short segment within the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is essential for N-CAM-induced NF-kappa B activity in astrocytes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(5): p. 2238-43.
92. Walmod, P.S., et al., *Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction.* Neurochem Res, 2004. **29**(11): p. 2015-35.

93. Hoffman, S., C.M. Chuong, and G.M. Edelman, *Evolutionary conservation of key structures and binding functions of neural cell adhesion molecules.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984. **81**(21): p. 6881-5.
94. Cremer, H., et al., *NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus.* Mol Cell Neurosci, 1997. **8**(5): p. 323-35.
95. Ronn, L.C., V. Berezin, and E. Bock, *The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing.* Int J Dev Neurosci, 2000. **18**(2-3): p. 193-9.
96. Bock, E., et al., *Characterization of soluble forms of NCAM.* FEBS Lett, 1987. **225**(1-2): p. 33-6.
97. Olsen, M., et al., *Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane.* Biochem J, 1993. **295 (Pt 3)**: p. 833-40.
98. Rutishauser, U., S. Hoffman, and G.M. Edelman, *Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982. **79**(2): p. 685-9.
99. Probstmeier, R., K. Kuhn, and M. Schachner, *Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix.* J Neurochem, 1989. **53**(6): p. 1794-801.
100. Herndon, M.E., C.S. Stipp, and A.D. Lander, *Interactions of neural glycosaminoglycans and proteoglycans with protein ligands: assessment of selectivity, heterogeneity and the participation of core proteins in binding.* Glycobiology, 1999. **9**(2): p. 143-55.
101. Lanier, L.L., et al., *Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56).* J Immunol, 1991. **146**(12): p. 4421-6.
102. Montaldo, E., et al., *Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function.* Cytometry A, 2013. **83**(8): p. 702-13.
103. Lemster, B.H., et al., *Induction of CD56 and TCR-independent activation of T cells with aging.* J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1979-90.
104. Gattenlohner, S., et al., *Specific detection of CD56 (NCAM) isoforms for the identification of aggressive malignant neoplasms with progressive development.* Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1160-71.
105. Mechtersheimer, G., M. Staudter, and P. Moller, *Expression of the natural killer cell-associated antigens CD56 and CD57 in human neural and striated muscle cells and in their tumors.* Cancer Res, 1991. **51**(4): p. 1300-7.
106. Ikushima, S., et al., *Expression of CD56/NCAM on hematopoietic malignant cells. A useful marker for acute monocytic and megakaryocytic leukemias.* Int J Hematol, 1991. **54**(5): p. 395-403.
107. Zarcone, D., et al., *Antibodies to adhesion molecules inhibit the lytic function of MHC-unrestricted cytotoxic cells by preventing their activation.* Cell Immunol, 1992. **143**(2): p. 389-404.
108. Takasaki, S., et al., *CD56 directly interacts in the process of NCAM-positive target cell-killing by NK cells.* Cell Biol Int, 2000. **24**(2): p. 101-8.
109. Nitta, T., et al., *Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction.* The Journal of experimental medicine, 1989. **170**(5): p. 1757-61.
110. Jarahian, M., et al., *Blockade of natural killer cell-mediated lysis by NCAM140 expressed on tumor cells.* Int J Cancer, 2007. **120**(12): p. 2625-34.
111. Kos, F.J. and C.S. Chin, *Costimulation of T cell receptor-triggered IL-2 production by Jurkat T cells via fibroblast growth factor receptor 1 upon its engagement by CD56.* Immunol Cell Biol, 2002. **80**(4): p. 364-9.
112. Nabatov, A.A. and I.S. Raginov, *The DC-SIGN-CD56 interaction inhibits the anti-dendritic cell cytotoxicity of CD56 expressing cells.* Infect Agent Cancer, 2015. **10**: p. 49.
113. Grimaldi, G. and J. Schottelius, *Leishmaniases--their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids.* Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 3-8.
114. Ready, P.D., *Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents.* Annu Rev Entomol, 2013. **58**: p. 227-50.
115. Stierhof, Y.D., et al., *Filamentous proteophosphoglycan secreted by Leishmania promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors.* Eur J Cell Biol, 1999. **78**(10): p. 675-89.
116. Kimblin, N., et al., *Quantification of the infectious dose of Leishmania major transmitted to the skin by single sand flies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10125-30.
117. Rogers, M.E., et al., *Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG.* Nature, 2004. **430**(6998): p. 463-7.
118. Kaye, P. and P. Scott, *Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface.* Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(8): p. 604-15.
119. Cerf, B.J., et al., *Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis.* J Infect Dis, 1987. **156**(6): p. 1030-3.
120. Ivonise, F., et al., *Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of Leishmania braziliensis Infection.* Clinical Infectious Diseases, 2002. **34**(11): p. e54-e58.
121. Pintado, V. and R. Lopez-Velez, *HIV-associated visceral leishmaniasis.* Clin Microbiol Infect, 2001. **7**(6): p. 291-300.
122. Blackwell, J.M., H.S. Mohamed, and M.E. Ibrahim, *Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link.* Trends in Parasitology, 2004. **20**(6): p. 268-274.
123. Karplus, T.M., et al., *Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of Leishmania chagasi infection.* Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6919-25.

124. McMahon-Pratt, D. and J. Alexander, *Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?* Immunol Rev, 2004 **201**: p. 206-24.
125. Akilov, O.E., A. Khachemoune, and T. Hasan, *Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis.* Int J Dermatol, 2007. **46**(2): p. 132-42.
126. Alvar, J., et al., *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.* PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35671.
127. Murray, H.W., et al., *Advances in leishmaniasis.* Lancet, 2005. **366**(9496): p. 1561-77.
128. WHO, *Control of the leishmaniases*, in *WHO Technical Report Series*Geneva, 2010.
129. Chappuis, F., et al., *Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?* Nat Rev Microbiol, 2007 **5**(11): p. 873-82.
130. Ribeiro, J.M., *Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?* Infect Agents Dis, 1995. **4**(3): p. 143-52.
131. Moreno, I., et al., *Kinetic analysis of ex vivo human blood infection by Leishmania.* PLoS Negl Trop Dis, 2010 **4**(7): p. e743.
132. Mendes-Sousa, A.F., et al., *Different host complement systems and their interactions with saliva from Lutzomyia longipalpis (Diptera, Psychodidae) and Leishmania infantum promastigotes.* PloS one, 2013. **8**(11): p. e79787.
133. Gurung, P. and T.D. Kanneganti, *Innate immunity against Leishmania infections.* Cell Microbiol, 2015. **17**(9): p. 1286-94.
134. Russell, D.G., *The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on Leishmania mexicana promastigotes.* Eur J Biochem, 1987. **164**(1): p. 213-21.
135. Puentes, S.M., et al., *Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan.* The Journal of experimental medicine, 1988. **167**(3): p. 887-902.
136. Da Silva, R.P., et al., *CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages.* J Immunol, 1989. **143**(2): p. 617-22.
137. Mosser, D.M. and P.J. Edelson, *The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes.* J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2785-9.
138. Brittingham, A., et al., *Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis.* J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3102-11.
139. Lodge, R., T.O. Diallo, and A. Descoteaux, *Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane.* Cell Microbiol, 2006. **8**(12): p. 1922-31.
140. Meier, C.L., M. Svensson, and P.M. Kaye, *Leishmania-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level.* J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6706-13.
141. Contreras, I., et al., *Impact of Leishmania mexicana infection on dendritic cell signaling and functions.* PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(9): p. e3202.
142. Cillari, E., et al., *In vivo and in vitro cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis.* Cytokine, 1995 **7**(7): p. 740-5.
143. Markikou-Ouni, W., Y. Ben Achour-Chenik, and A. Meddeb-Garnaoui, *Effects of Leishmania major clones showing different levels of virulence on infectivity, differentiation and maturation of human dendritic cells.* Clinical and experimental immunology, 2012. **169**(3): p. 273-80.
144. Cameron, P., et al., *Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by Leishmania mexicana amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway.* J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3297-304.
145. Meddeb-Garnaoui, A., H. Zrelli, and K. Dellagi, *Effects of tropism and virulence of Leishmania parasites on cytokine production by infected human monocytes.* Clinical and experimental immunology, 2009. **155**(2): p. 199-206.
146. Padigel, U.M. and J.P. Farrell, *Control of infection with Leishmania major in susceptible BALB/c mice lacking the common gamma-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-beta by parasitized cells.* J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6340-5.
147. Resende, M., et al., *Leishmania-infected MHC class IIhigh dendritic cells polarize CD4+ T cells toward a nonprotective T-bet+ IFN-gamma+ IL-10+ phenotype.* J Immunol, 2013. **191**(1): p. 262-73.
148. Novais, F.O., et al., *Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection.* J Immunol, 2009. **183**(12): p. 8088-98.
149. Guimaraes-Costa, A.B., et al., *Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(16): p. 6748-53.
150. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach, *Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor.* Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 183-91.
151. Peters, N.C., et al., *In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies.* Science, 2008. **321**(5891): p. 970-4.
152. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, *Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania.* Immunity, 2007. **26**(4): p. 519-31.
153. Favila, M.A., et al., *Human dendritic cells exhibit a pronounced type I IFN signature following Leishmania major infection that is required for IL-12 induction.* J Immunol, 2014. **192**(12): p. 5863-72.

154. Ritter, U., et al., *CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis.* European journal of immunology, 2004. **34**(6): p. 1542-50.
155. Ehrchen, J.M., et al., *The absence of cutaneous lymph nodes results in a Th2 response and increased susceptibility to Leishmania major infection in mice.* Infection and immunity, 2008. **76**(9): p. 4241-50.
156. Scharton-Kersten, T., et al., *IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis.* J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5320-30.
157. Rodriguez-Pinto, D., N.G. Saravia, and D. McMahon-Pratt, *CD4 T cell activation by B cells in human Leishmania (Viannia) infection.* BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 108.
158. Hasker, E., et al., *Strong association between serological status and probability of progression to clinical visceral leishmaniasis in prospective cohort studies in India and Nepal.* PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(1): p. e2657.
159. Buxbaum, L.U., *Leishmania mexicana infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans.* PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(5): p. e2224.
160. Murray, H.W., et al., *Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma.* Journal of immunology, 1987. **138**(7): p. 2290-7.
161. Kumar, R., et al., *Leishmania specific CD4 T cells release IFNgamma that limits parasite replication in patients with visceral leishmaniasis.* PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(10): p. e3198.
162. Esterre, P., et al., *Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1992 **421**(3): p. 239-47.
163. Heinzel, F.P., et al., *Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets.* The Journal of experimental medicine, 1989. **169**(1): p. 59-72.
164. Leal, L.M., et al., *Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to Leishmania major infection.* Eur J Immunol, 1993. **23**(2): p. 566-9.
165. Groux, H., et al., *A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells.* J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1723-9.
166. Sacks, D. and N. Noben-Trauth, *The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 845-58.
167. Chatelain, R., K. Varkila, and R.L. Coffman, *IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice.* J Immunol, 1992. **148**(4): p. 1182-7.
168. Heinzel, F.P., et al., *Recombinant interleukin 12 cures mice infected with Leishmania major.* The Journal of experimental medicine, 1993. **177**(5): p. 1505-9.
169. Hondowicz, B.D., et al., *Leishmania major-infected C3H mice treated with anti-IL-12 mAb develop but do not maintain a Th2 response.* J Immunol, 1997. **159**(10): p. 5024-31.
170. Erb, K.J., C. Blank, and H. Moll, *Susceptibility to Leishmania major in IL-4 transgenic mice is not correlated with the lack of a Th1 immune response.* Immunol Cell Biol, 1996. **74**(3): p. 239-44.
171. Melby, P.C., et al., *Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis.* Infection and immunity, 1994. **62**(3): p. 837-42.
172. Valencia-Pacheco, G., et al., *In situ cytokines (IL-4, IL-10, IL-12, IFN-gamma) and chemokines (MCP-1, MIP-1alpha) gene expression in human Leishmania (Leishmania) Mexicana infection.* Cytokine, 2014. **69**(1): p. 56-61.
173. Duthie, M.S., et al., *Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013.
174. Gama, M.E., et al., *Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis.* Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(1): p. 129-36.
175. Ghalib, H.W., et al., *Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections.* J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 324-9.
176. Gautam, S., et al., *IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis.* J Infect Dis, 2011. **204**(7): p. 1134-7.
177. Verma, S., et al., *Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis.* PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10107.
178. Singh, O.P., et al., *Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis.* PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(10): p. e1874.
179. Peruhype-Magalhaes, V., et al., *Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome.* Scandinavian journal of immunology, 2005. **62**(5): p. 487-95.
180. Bacellar, O., et al., *Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis.* J Infect Dis, 1996. **173**(6): p. 1515-8.
181. Assreuy, J., et al., *Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major.* European journal of immunology, 1994. **24**(3): p. 672-6.
182. Lykens, J.E., et al., *Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo.* J Immunol, 2010. **184**(2): p. 877-85.
183. Brandonisio, O., et al., *Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins.* Parassitologia, 2001. **43 Suppl 1**: p. 1-6.

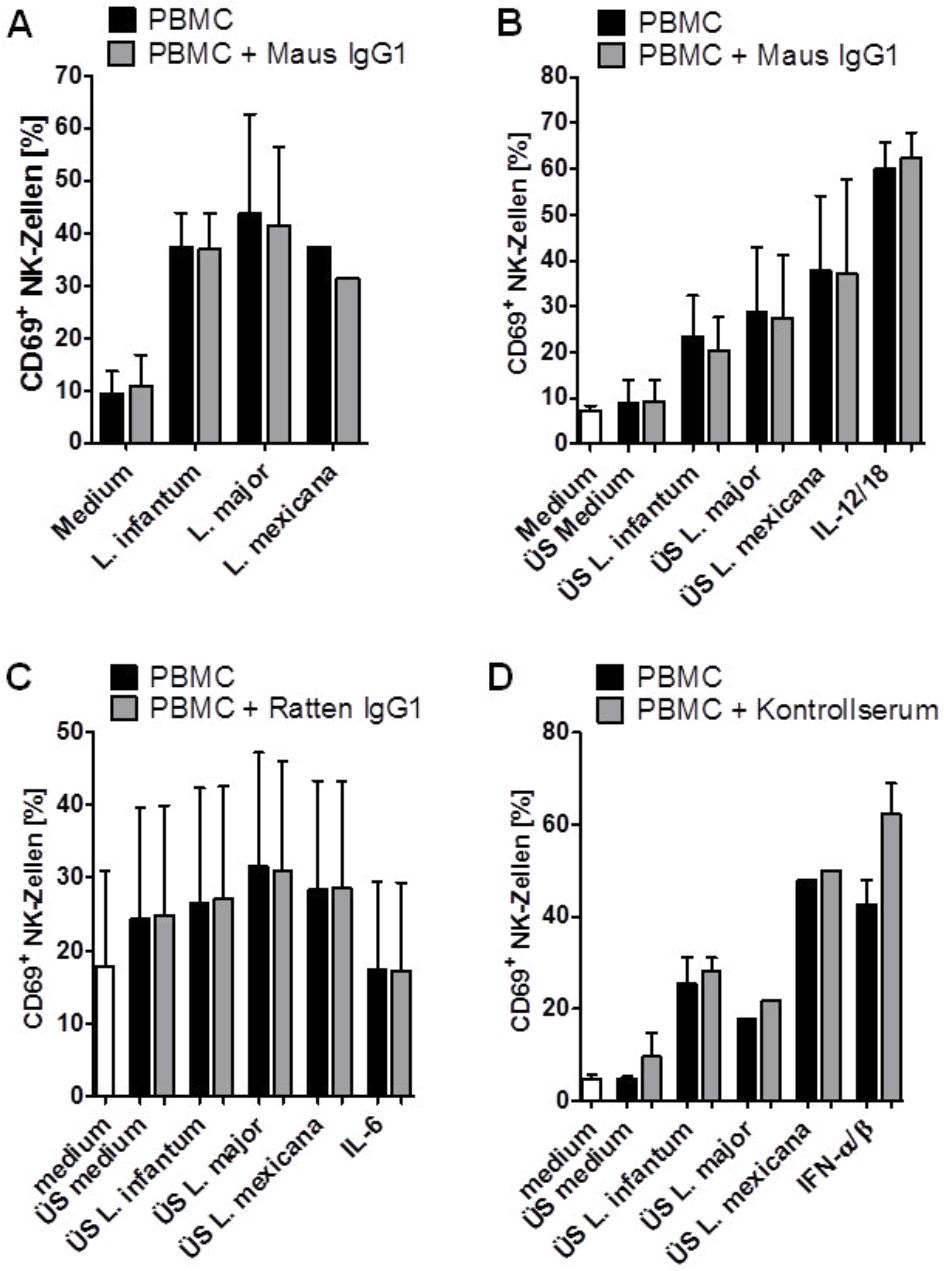
184. Vouldoukis, I., et al., *The killing of Leishmania major by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(17): p. 7804-8.
185. Qadoumi, M., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis.* Infection and immunity, 2002. **70**(8): p. 4638-42.
186. Liew, F.Y., Y. Li, and S. Millott, *Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide.* Journal of immunology, 1990. **145**(12): p. 4306-10.
187. Bogdan, C., et al., *Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of Leishmania major amastigotes.* European journal of immunology, 1990. **20**(5): p. 1131-5.
188. Brandonisio, O., et al., *Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in Leishmania infantum-infected human macrophages.* Clin Exp Med, 2002. **2**(3): p. 125-9.
189. Bhattacharyya, S., et al., *Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide.* J Infect Dis, 2002. **185**(12): p. 1704-8.
190. Vouldoukis, I., et al., *Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of Leishmania infantum and Leishmania major by human macrophages by decreasing nitric oxide generation.* Eur J Immunol, 1997. **27**(4): p. 860-5.
191. Giudice, A., et al., *Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis.* BMC Infect Dis, 2007. **7**: p. 7.
192. Aebischer, T., S.F. Moody, and E. Handman, *Persistence of virulent Leishmania major in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host.* Infection and immunity, 1993. **61**(1): p. 220-6.
193. Mendonca, M.G., et al., *Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?* J Infect Dis, 2004. **189**(6): p. 1018-23.
194. Dereure, J., et al., *Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure.* J Infect, 2003. **47**(1): p. 77-81.
195. Stenger, S., et al., *Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase.* The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(4): p. 1501-14.
196. Gangneux, J.-P., et al., *In Vitro and Ex Vivo Permissivity of Hepatocytes for Leishmania donovani.* Journal of Eukaryotic Microbiology, 2005. **52**(6): p. 489-491.
197. Bogdan, C., et al., *Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis.* J Exp Med, 2000. **191**(12): p. 2121-30.
198. Mirkovich, A.M., et al., *Increased myelopoiesis during Leishmania major infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism.* Clin Exp Immunol, 1986. **64**(1): p. 1-7.
199. Vieth, M., et al., *Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against Leishmania major in murine macrophages.* Scand J Immunol, 1994. **40**(4): p. 403-9.
200. Belkaid, Y., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity.* Nature, 2002. **420**(6915): p. 502-507.
201. Rai, A.K., et al., *Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31551.
202. Muller, K., et al., *Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice.* Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 73-6.
203. Bajenoff, M., et al., *Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging.* J Exp Med, 2006 **203**(3): p. 619-31.
204. Thalhofer, C.J., et al., *Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan Leishmania infantum chagasi.* Infection and immunity, 2011. **79**(1): p. 108-17.
205. Scharton, T.M. and P. Scott, *Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice.* J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 567-77.
206. Laskay, T., M. Rollinghoff, and W. Solbach, *Natural killer cells participate in the early defense against Leishmania major infection in mice.* European journal of immunology, 1993. **23**(9): p. 2237-41.
207. Laskay, T., et al., *Early parasite containment is decisive for resistance to Leishmania major infection.* European journal of immunology, 1995. **25**(8): p. 2220-7.
208. Wakil, A.E., et al., *Interferon gamma derived from CD4(+) T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development.* J Exp Med, 1998. **188**(9): p. 1651-6.
209. Satoskar, A.R., et al., *Mice lacking NK cells develop an efficient Th1 response and control cutaneous Leishmania major infection.* J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6747-54.
210. Liese, J., U. Schleicher, and C. Bogdan, *The innate immune response against Leishmania parasites.* Immunobiology, 2008 **213**(3-4): p. 377-87.
211. Bihl, F., et al., *Primed antigen-specific CD4+ T cells are required for NK cell activation in vivo upon Leishmania major infection.* Journal of immunology, 2010. **185**(4): p. 2174-81.
212. Haeberlein, S., et al., *IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by Leishmania infantum in vivo.* Eur J Immunol, 2010 **40**(6): p. 1708-17.
213. Diefenbach, A., et al., *Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite.* Immunity, 1998. **8**(1): p. 77-87.

214. Prajeeth, C.K., et al., *Leishmania-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity.* Infection and immunity, 2011. **79**(7): p. 2699-708.
215. Bogdan, C., *Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis.* Frontiers in cellular and infection microbiology, 2012. **2**: p. 69.
216. Cenini, P., et al., *Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy.* J Infect Dis, 1993. **168**(4): p. 986-93.
217. Manna, P.P., et al., *Impairment of natural killer cell activity in Indian kala-azar: restoration of activity by interleukin 2 but not by alpha or gamma interferon.* Infect Immun, 1993 **61**(8): p. 3565-9.
218. Turhan, A., et al., *Effects of crude antigenic fractions of Leishmania major on natural killer cell cytotoxicity, interferon-gamma and interleukin-4 secretion from peripheric blood lymphocytes of unexposed individuals.* Immunol Lett, 1997 **55**(2): p. 115-8.
219. Caneda-Guzman, I.C., et al., *NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with Leishmania mexicana: a comparative study of TLRs and cytokines.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112410.
220. Akuffo, H., et al., *Natural killer cells in cross-regulation of IL-12 by IL-10 in Leishmania antigen-stimulated blood donor cells.* Clin Exp Immunol, 1999. **117**(3): p. 529-34.
221. Maasho, K., et al., *Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity.* Infect Immun, 1998 **66**(6): p. 2698-704.
222. Maasho, K., et al., *A Leishmania homologue of receptors for activated C-kinase (LACK) induces both interferon-gamma and interleukin-10 in natural killer cells of healthy blood donors.* J Infect Dis, 2000 **182**(2): p. 570-8.
223. Nylen, S., et al., *Leishmanial amastigote antigen P-2 induces major histocompatibility complex class II-dependent natural killer-cell reactivity in cells from healthy donors.* Scandinavian journal of immunology, 2004. **59**(3): p. 294-304.
224. Lieke, T., et al., *Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation.* Clinical and experimental immunology, 2008. **153**(2): p. 221-30.
225. Sassi, A., et al., *Mechanisms of the natural reactivity of lymphocytes from noninfected individuals to membrane-associated Leishmania infantum antigens.* J Immunol, 2005 **174**(6): p. 3598-607.
226. Kemp, K., et al., *Interferon-gamma production by human T cells and natural killer cells in vitro in response to antigens from the two intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Leishmania major.* Scandinavian journal of immunology, 1997. **46**(5): p. 495-9.
227. Kurtzhals, J.A., et al., *Interleukin-4 and interferon-gamma production by Leishmania stimulated peripheral blood mononuclear cells from nonexposed individuals.* Scand J Immunol, 1995. **41**(4): p. 343-9.
228. Nylen, S., et al., *Differential induction of cellular responses by live and dead Leishmania promastigotes in healthy donors.* Clin Exp Immunol, 2001. **124**(1): p. 43-53.
229. Nylen, S., et al., *Live Leishmania promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma.* Clin Exp Immunol, 2003 **131**(3): p. 457-67.
230. Akuffo, H., K. Maasho, and R. Howe, *Natural and acquired resistance to Leishmania: cellular activation by Leishmania aethiopica of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells.* Clin Exp Immunol, 1993. **94**(3): p. 516-21.
231. Becker, I., et al., *Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2.* Mol Biochem Parasitol, 2003 **130**(2): p. 65-74.
232. Shultz, L.D., et al., *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells.* J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6477-89.
233. Arva, E. and B. Andersson, *Kinetics of cytokine release and expression of lymphocyte cell-surface activation markers after in vitro stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with Streptococcus pneumoniae.* Scandinavian journal of immunology, 1999. **49**(3): p. 237-43.
234. Antas, P.R., et al., *Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002. **97**(8): p. 1097-9.
235. Leong, J.W., et al., *Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells.* Biol Blood Marrow Transplant, 2014. **20**(4): p. 463-73.
236. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.* Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
237. Passos, S., et al., *Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in Leishmania braziliensis infections.* J Infect Dis, 2015. **211**(2): p. 274-82.
238. Shantsila, E., et al., *Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology.* J Thromb Haemost, 2011. **9**(5): p. 1056-66.
239. Mattiola, I., et al., *Priming of Human Resting NK Cells by Autologous M1 Macrophages via the Engagement of IL-1beta, IFN-beta, and IL-15 Pathways.* J Immunol, 2015. **195**(6): p. 2818-28.
240. Rabinowich, H., et al., *Response of human NK cells to IL-6 alterations of the cell surface phenotype, adhesion to fibronectin and laminin, and tumor necrosis factor-alpha/beta secretion.* J Immunol, 1993. **150**(11): p. 4844-55.
241. Taub, D.D., et al., *Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytolysis.* J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3877-88.
242. Loetscher, P., et al., *Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca2+ mobilization, and enzyme release.* J Immunol, 1996. **156**(1): p. 322-7.

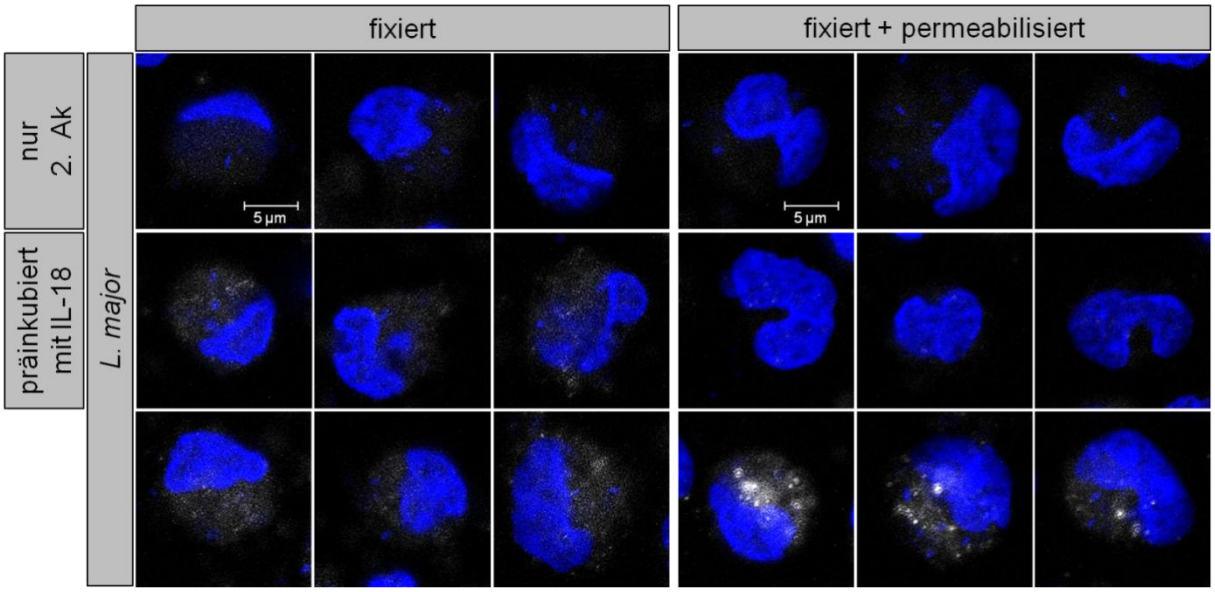
243. Laprevotte, E., et al., *Endogenous IL-8 acts as a CD16 co-activator for natural killer-mediated anti-CD20 B cell depletion in chronic lymphocytic leukemia.* Leuk Res, 2013. **37**(4): p. 440-6.
244. al-Aoukaty, A., A. Giaid, and A.A. Maghazachi, *IL-8 induces calcium mobilization in interleukin-2-activated natural killer cells independently of inositol 1,4,5 trisphosphate.* Ann N Y Acad Sci, 1995. **766**: p. 292-5.
245. Bacellar, O., et al., *IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis.* Cytokine, 2000. **12**(8): p. 1228-31.
246. Carvalho, E.M., et al., *Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis.* J Immunol, 1994. **152**(12): p. 5949-56.
247. Stonier, S.W. and K.S. Schluns, *Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses.* Immunology letters, 2010. **127**(2): p. 85-92.
248. Musso, T., et al., *Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15.* Blood, 1999. **93**(10): p. 3531-9.
249. Bellora, F., et al., *M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages.* Eur J Immunol, 2012. **42**(6): p. 1618-26.
250. Mehta, V.B., J. Hart, and M.D. Wewers, *ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage.* J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3820-6.
251. Puren, A.J., G. Fantuzzi, and C.A. Dinarello, *Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(5): p. 2256-61.
252. Akita, K., et al., *Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells.* J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26595-603.
253. Pirhonen, J., et al., *Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway.* J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7322-9.
254. Fearnley, D.B., et al., *Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation.* Blood, 1999. **93**(2): p. 728-36.
255. Bukowski, J.F., et al., *Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo.* J Immunol, 1983. **131**(3): p. 1531-8.
256. Orange, J.S., *Natural killer cell deficiency.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(3): p. 515-25; quiz 526.
257. Gonzales, C.M., et al., *Antibacterial role for natural killer cells in host defense to Bacillus anthracis.* Infection and immunity, 2012. **80**(1): p. 234-42.
258. Khan, I.A., et al., *CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following Toxoplasma gondii infection.* PLoS Pathog, 2006. **2**(6): p. e49.
259. Baratin, M., et al., *Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to Plasmodium falciparum.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(41): p. 14747-52.
260. Laurenti, M.D., et al., *The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis.* Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(3): p. 323-5.
261. Akuffo, H.O. and S.F. Britton, *Contribution of non-Leishmania-specific immunity to resistance to Leishmania infection in humans.* Clin Exp Immunol, 1992. **87**(1): p. 58-64.
262. Gregory, D.J., et al., *Comparison of the effects of Leishmania major or Leishmania donovani infection on macrophage gene expression.* Infection and immunity, 2008. **76**(3): p. 1186-92.
263. Cros, J., et al., *Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors.* Immunity, 2010. **33**(3): p. 375-86.
264. Ziegler-Heitbrock, L., *Monocyte subsets in man and other species.* Cell Immunol, 2014. **289**(1-2): p. 135-9.
265. Strengell, M., et al., *IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells.* Journal of immunology, 2003. **170**(11): p. 5464-9.
266. Silverman, J.M., et al., *Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells.* J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5011-22.
267. Silverman, J.M., et al., *An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages.* J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 6): p. 842-52.
268. McConville, M.J., et al., *Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species.* Biochem J, 1995. **310 (Pt 3)**: p. 807-18.
269. Pimenta, P.F., et al., *Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of Leishmania is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(19): p. 9155-9.
270. Atayde, V.D., et al., *Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan Leishmania within the Sand Fly Midgut.* Cell Rep, 2015. **13**(5): p. 957-67.
271. Castillo, E.F., et al., *Dendritic cells support the in vivo development and maintenance of NK cells via IL-15 trans-presentation.* J Immunol, 2009. **183**(8): p. 4948-56.
272. Bellora, F., et al., *The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21659-64.
273. Beldi-Ferchiou, A., et al., *PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma.* Oncotarget, 2016. **7**(45): p. 72961-72977.

274. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.* Nature reviews. Immunology, 2003. **3**(2): p. 133-46.
275. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets.* Immunology, 2013. **140**(1): p. 22-30.
276. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.* Nature reviews. Immunology, 2011. **11**(11): p. 723-37.
277. Zahn, S., et al., *Human primary dendritic cell subsets differ in their IL-12 release in response to Leishmania major infection.* Exp Dermatol, 2010. **19**(10): p. 924-6.
278. Marovich, M.A., et al., *IL-12p70 production by Leishmania major-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process.* J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5858-65.
279. Chen, Q., M. Khoury, and J. Chen, *Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21783-8.
280. Brehm, M.A., et al., *Overcoming current limitations in humanized mouse research.* J Infect Dis, 2013. **208 Suppl 2**: p. S125-30.
281. Tzinia, A.K. and K.P. Soteriadou, *Substrate-dependent pH optima of gp63 purified from seven strains of Leishmania.* Mol Biochem Parasitol, 1991. **47**(1): p. 83-9.
282. Bouvier, J., et al., *Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of Leishmania.* Biochemistry, 1990. **29**(43): p. 10113-9.
283. Hey, A.S., et al., *The major surface glycoprotein (gp63) from Leishmania major and Leishmania donovani cleaves CD4 molecules on human T cells.* J Immunol, 1994. **152**(9): p. 4542-8.
284. Jaffe, C.L. and D.M. Dwyer, *Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from Leishmania and insect trypanosomatids.* Parasitol Res, 2003. **91**(3): p. 229-37.
285. McGwire, B.S., et al., *Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked Leishmania surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence.* J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8802-9.
286. Chaudhuri, G. and K.P. Chang, *Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania mexicana promastigotes.* Mol Biochem Parasitol, 1988. **27**(1): p. 43-52.
287. Della Chiesa, M., et al., *Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus?* Blood, 2012. **119**(2): p. 399-410.
288. Wiesmayr, S., et al., *Decreased NKp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLD.* European journal of immunology, 2012. **42**(2): p. 541-50.
289. Mavilio, D., et al., *Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2886-91.
290. Gonzalez, V.D., et al., *Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment.* J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6612-8.
291. Cruz, A.R., et al., *Immune evasion and recognition of the syphilis spirochete in blood and skin of secondary syphilis patients: two immunologically distinct compartments.* PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(7): p. e1717.
292. Nguyen, S., et al., *Persistence of CD16+/CD56-/2B4+ natural killer cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in ocular myasthenia gravis.* J Neuroimmunol, 2006. **179**(1-2): p. 117-25.

8 ANHANG

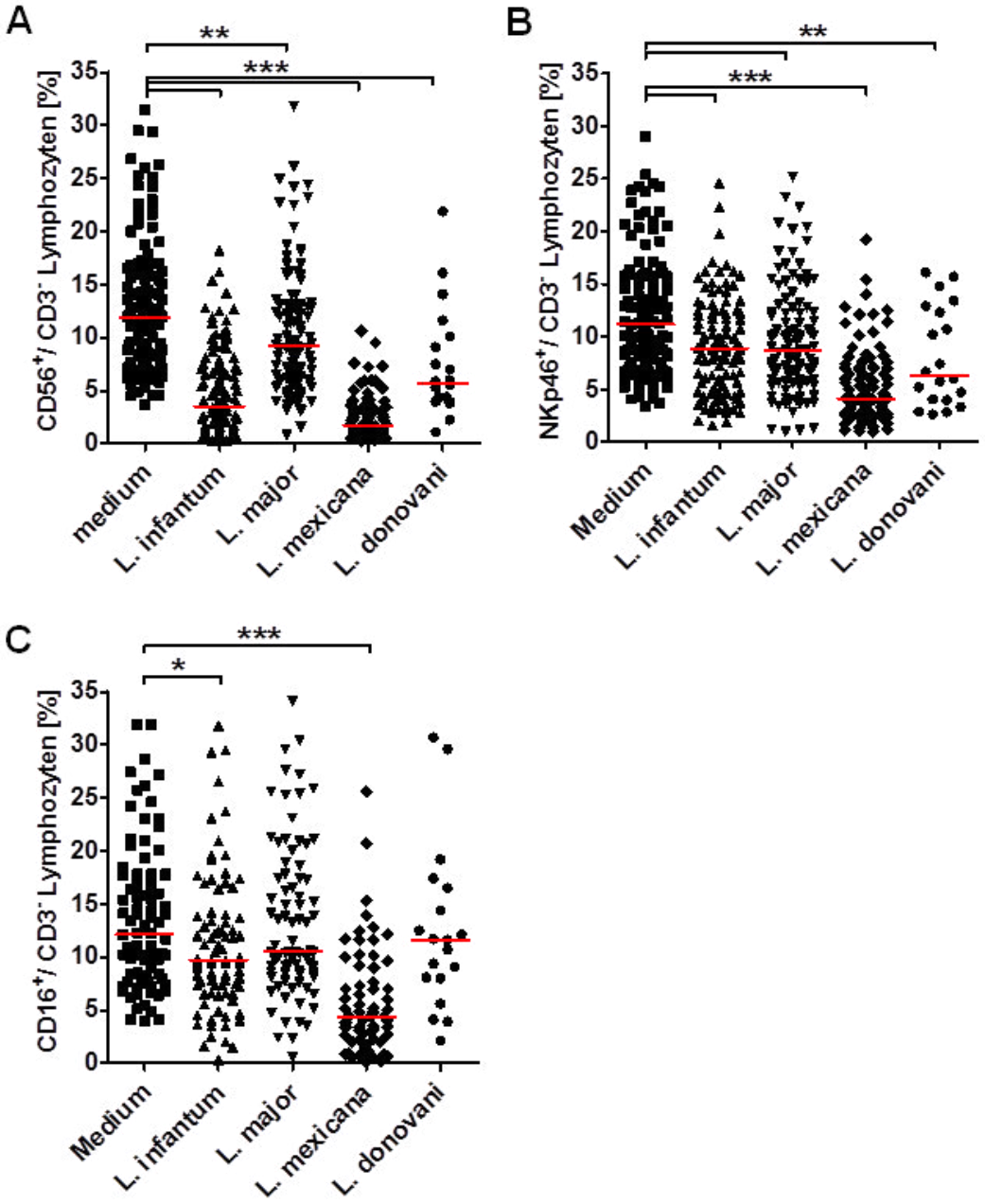


Anhang 1: Isotypkontrollen der neutralisierenden Antikörper und Antiseren
Isotypkontrollen wurden entweder direkt zu der PBMC-*Leishmania* Kokultur zugegeben (A) oder mit Zellkulturüberständen vorinkubiert, bevor diese zu den Zellen zugegeben wurden (B/C/D) und die CD69-Expression auf den NK-Zellen im FACS bestimmt.
(A/B) Kontrolle für anti-IL-1β, anti-IL-12, anti-IL-15, anti-IL-18 Antikörper. Mittelwert ± SEM von 2/2/2/1 **(A)** und 14/3/3/3/2/14 **(B)** Spendern.
(C) Kontrolle für anti-IL-6-Antikörper. Mittelwert ± SEM von 4/3/4/4/4/4 Spendern.
(D) Kontrolle für anti-IFN-α/β Antiseren. Mittelwert ± SEM von 6/2/2/1/1/6 Spendern.



Anhang 2: Kontrollen der IL-18-Färbung von Monozyten

Monozyten wurden negativ aus PBMCs aufgereinigt und mit *L. major* in einem Verhältnis von 1:10 für 20 h kokultiviert. Nach Adhäsion auf Adhäsionsobjektträgern und Fixierung mit Formaldehyd bzw. zusätzlicher Permeabilisierung mit Methanol wurde IL-18 (weiß) auf und in den Zellen angefärbt. Der Zellkern ist in blau dargestellt. Die oberste Reihe zeigt die Kontrolle, bei der nur der unspezifische Zweit-Antikörper verwendet wurde. In der zweiten Reihe wurde der IL-18-Antikörper vor Verwendung mit IL-18 präabsorbiert. Es sind je drei Zellen eines Spenders exemplarisch dargestellt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind repräsentativ für drei Experimente mit unterschiedlichen Spendern.



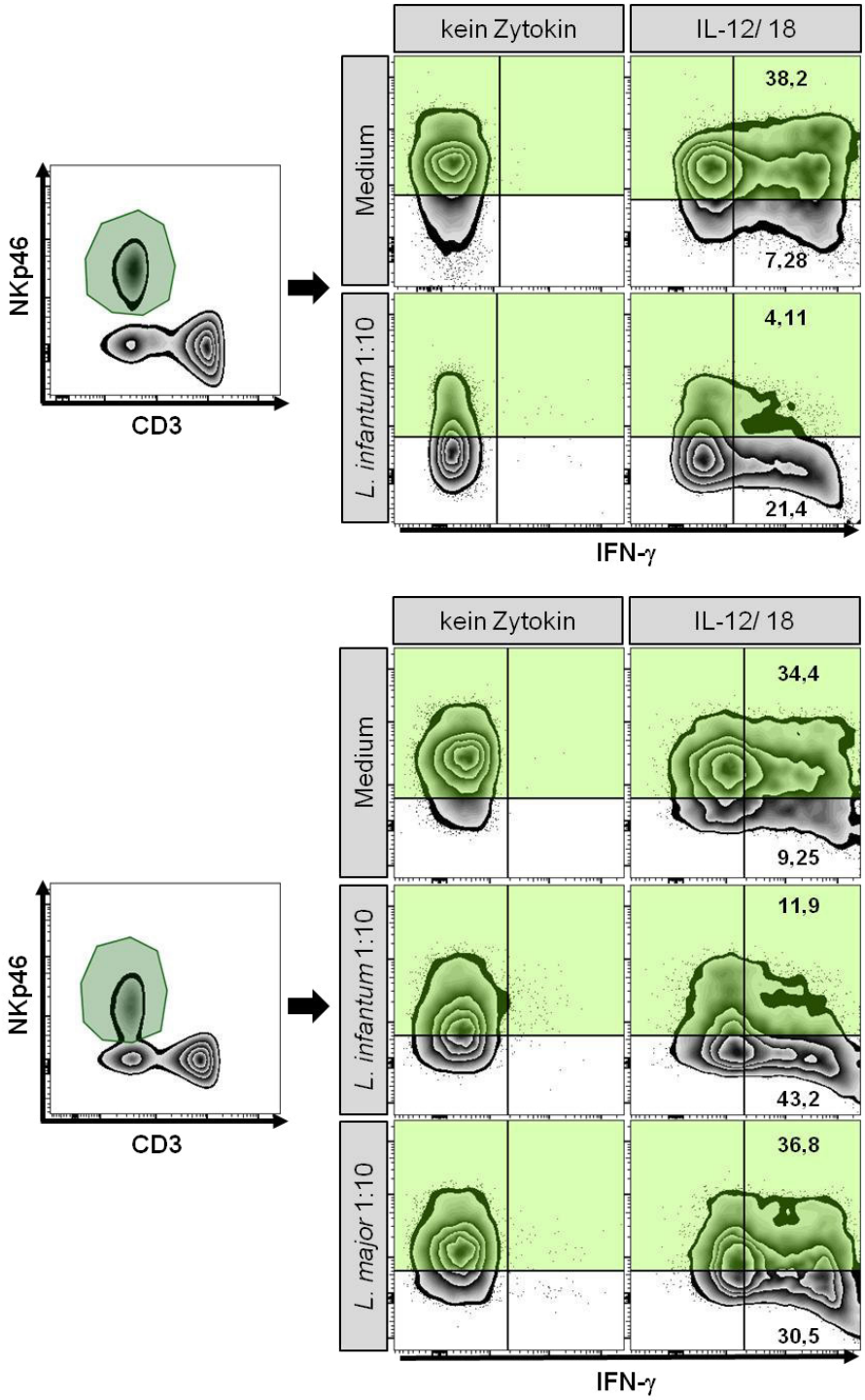
Anhang 3: Leishmanien bewirken eine unterschiedliche Reduktion von NK-Zell-Oberflächenmarkern

PBMCs wurden mit Leishmania Promastigoten in einem Verhältnis von 1:10 für 20 h kokultiviert und die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle von NK-Zellen im FACS analysiert.

(A) Prozentsatz an $CD56^+/CD3^-$ Zellen. Mittelwert ± SEM von 126/114/109/93/20 Spendern.

(B) Prozentsatz an $NKp46^+/CD3^-$ Zellen. Mittelwert ± SEM von 126/114/109/91/20 Spendern.

(C) Prozentsatz an $CD16^+/CD3^-$ Zellen. Mittelwert ± SEM von 91/82/80/64/19 Spendern.



Anhang 4: IFN-γ-Produktion von NK-Zellen ist unabhängig von der CD56-Expression.
PBMCs wurden mit Leishmanien alleine oder zusätzlich IL-12/ 18 für 20 h stimuliert und über ICS die Produktion von IFN-γ im FACS bestimmt. Die NK-Zellen wurden über die Marker $NKp46^+$ und $CD3^-$ detektiert. Gezeigt sind Analysen von zwei unterschiedlichen Spendern.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christian Bogdan für die Vergabe des Themas meiner Dissertation und die Doktorandenstelle, die es mir ermöglichte, die Arbeiten in seinem Institut durchzuführen. Durch sein fundiertes Wissen war es mir möglich, viele fachliche Probleme zu lösen.
Desweiteren danke ich Frau Prof. Dr. Anja Taubert für Ihre Bereitschaft, mich als externe Doktorandin zu betreuen, und für ihre Unterstützung während einigen schwierigen Phasen der Doktorarbeit.
Ich danke meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau PD Dr. Ulrike Schleicher für die Betreuung meiner praktischen Arbeit und ihre fachliche und häufig auch moralische Unterstützung.
Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Martin Herrmann als Leiter des Graduiertenkollegs des SFB16 für die Vermittlung eines fundierten Hintergrunds der immunologischen Fragestellungen.
Besonderer Dank gilt auch Andrea Debus und Heidi Sebald, die immer ein offenes Ohr hatten, wenn es technische und sonstige Probleme zu lösen galt.
Ich danke meinen Kolleginnen Dominique und Pia, die mich auf dem ersten Abschnitt meiner Doktorandenzeit begleitet haben. Vielen Dank auch an Stephanie und Katrin, nicht nur für die Bereicherung der täglichen Arbeit, sondern auch für gemeinsame Unternehmungen in der Freizeit.
Mein Dank geht auch an alle Mitarbeiter des Mikrobiologischen Instituts, die mich fachlich oder mit Materialien bei meiner Arbeit unterstützt haben.
Ganz besonderer Dank geht an alle unermüdlichen Blutspender, die nicht sofort die Flucht ergriffen haben, wenn der "kleine Vampir" wieder vor der Tür stand. Ohne euch wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen!
Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeder Lebenslage unterstützt haben.

ERKLÄRUNG

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."