

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Kleinholz, Corinna Luise:

Der Einfluss des Ly6G auf die Wechselwirkung von neutrophilen Granulozyten mit *Leishmania major*. - 2022. - 73 Bl., 19 Abb., 11 Tab., 2 Anl.

Kurzreferat

Neutrophile Granulozyten gehören als Teil der angeborenen Immunantwort zu den ersten Immunzellen, die an Infektionsorte rekrutiert werden, wo sie Krankheitserreger durch Phagozytose und zytotoxische Mechanismen bekämpfen können. Intrazelluläre Krankheitserreger wie *Leishmania major* können Neutrophile benutzen, um eine effiziente Infektion zu etablieren. Doch die dynamischen Interaktionen der Neutrophilen mit dem Erreger und anderen Immunzellen am Infektionsort sind nur unvollständig verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden genetisch veränderte Mäuse des „Catchup-Modells“ verwendet, um die Rolle von Ly6G im Kontext der Infektion mit *L. major* zu untersuchen. Ly6G ist ein Marker für Neutrophile in der Maus, ein Homolog des menschlichen CD177-Moleküls und interagiert nachweislich mit Zelladhäsionsmolekülen. Durchflusszytometrische Analysen konnten zeigen, dass eine Ly6G-Defizienz die initiale Infektionsrate von Neutrophilen, die an den Infektionsort rekrutiert wurden, verringert. Obwohl die Aufnahme von *L. major* durch anschließend rekrutierte Monozyten eng mit der gleichzeitigen Aufnahme von Neutrophilenmaterial verbunden war, wurde dieser Prozess nicht von einer Ly6G-Defizienz der Neutrophilen beeinflusst. Stattdessen wurde mittels intravitaler Zweiphotonenmikroskopie beobachtet, dass Ly6G-defiziente Neutrophile mit einer anfänglich verzögerten Rekrutierungskinetik am Infektionsort eintrafen. Da Neutrophile befähigt sind, effizient Infektionsorte zu erreichen, wird aus diesen Erkenntnissen geschlossen, dass Ly6G insbesondere die frühe Bekämpfung von Pathogenen durch das Immunsystem beeinflussen kann.

Schlüsselwörter

Neutrophile Granulozyten, Ly6G, Integrine, *Leishmania major*, Infektion, Inflammation, Zweiphotonenmikroskopie, Schwarmverhalten

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einführung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Angeborene Immunantwort	1
1.1.2 Adaptive Immunantwort	2
1.2 Neutrophile Granulozyten	4
1.3 Ly6G	6
1.4 <i>Leishmania major</i>	7
1.4.1 Erreger und Entwicklung	7
1.4.2 Krankheitsbild der Leishmaniose	10
1.4.3 Immunreaktion	10
1.4.4 Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Leishmanieninfektion	13
1.5 Zielstellung dieser Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Verbrauchsmaterialien, Laborgeräte, Mikroskope, Software	18
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Puffer und Medien	21
2.1.4 Antikörper	22
2.1.5 Versuchstiere	23
2.1.5.1 Catchup-Mäuse	23
2.1.5.2 Catchup ^{IVM-red} -Mäuse	24
2.1.6 Leishmanien	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Kultivierung und Passagierung der Leishmanien	25
2.2.2 Isolierung der metazyklischen Promastigoten für die Infektion	25
2.2.3 Infektion der Mäuse mit Leishmanien	26
2.2.4 Konfokalmikroskopie	26
2.2.4.1 Fixierung des mit <i>L. major</i> infizierten Ohrgewebes	26
2.2.4.2 Gewebequerschnitte mittels Gefriermikrotom	26
2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung von Mausohr-Querschnitten	26
2.2.4.4 Konfokalmikroskopie und Analyse der Antikörperfärbung	27
2.2.5 Durchflusszytometrie	27

2.2.5.1	Vorbereitung und Färbung der Zellen zur FACS-Analyse	28
2.2.5.2	CD45 ⁺ -Zellseparation durch an Magnetpartikel gekoppelte Antikörper	28
2.2.5.3	Datenanalyse mittels Software FlowJo X	29
2.2.6	Verdünnungsreihe	29
2.2.7	Zweiphotonenmikroskopie	29
2.2.7.1	Intravitalmikroskopie	29
2.2.7.2	Analyse der Neutrophilenrekrutierung	32
2.2.8	Statistik	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Der Einfluss von Ly6G auf die Immunantwort im Infektionsverlauf	34
3.1.1	Zusammensetzung rekrutierter Zellen am Infektionsort mit <i>L. major</i>	34
3.1.2	Ly6G-Unabhängigkeit der Pathogenanzahl im mit <i>L. major</i> infizierten Gewebe	37
3.1.3	Niedrigere Infektionsraten mit <i>L. major</i> von Ly6G-defizienten Neutrophilen zum Infektionsbeginn	37
3.2	Aufnahme von Neutrophilenmaterial und <i>L. major</i> durch aus Monozyten entstandene MΦ und DZ	39
3.2.1	Konfokalmikroskopischer Nachweis der Phagozytose von Neutrophilen und Leishmanien durch CD11c ⁺ - und CD54 ⁺ -Zellen	40
3.2.2	Ly6G-unabhängige Aufnahme von Neutrophilenmaterial nur durch mit <i>L. major</i> infizierte, aus Monozyten entstandene Phagozyten	41
3.3	Rekrutierung von Neutrophilen an den Infektionsort mit <i>L. major in vivo</i>	43
3.3.1	Übersichtsaufnahmen der Rekrutierung von Ly6G ^{+/-} - und Ly6G ^{-/-} -Neutrophilen im Vergleich	44
3.3.2	Verändertes Eintrittsverhalten der Ly6G-defizienten Neutrophilen in das mit <i>L. major</i> infizierte Gewebe	45
3.3.3	Interaktionen von Neutrophilen mit <i>L. major in vivo</i>	47
4	Diskussion	52
4.1	Der Einfluss von Ly6G auf die Immunantwort im Infektionsverlauf	52
4.2	Aufnahme von Neutrophilenmaterial nur in mit <i>L. major</i> infizierte, aus Monozyten entstandene Phagozyten: Rolle von Ly6G	53
4.3	Eintrittsverhalten von (Ly6G-defizienten) Neutrophilen in das mit <i>L. major</i> infizierte Gewebe <i>in vivo</i>	54
4.4	Limitationen	57
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	58
5	Zusammenfassung	60
	Literaturverzeichnis	61
	Publikationen	74

Danksagungen	75
Ehrenerklärung	76
Darstellung des Bildungsweges	77
Anlagen	78
1. Makro zur Bildanalyse der Zweiphotonenmikroskopie mit ImageJ (Distanz Neutrophile zu nächster <i>L. major</i>).....	78
2. Makro zur Bildanalyse der Zweiphotonenmikroskopie mit ImageJ (Distanz Neutrophile zu nächster Neutrophile).....	80

Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BV	Brillantes Violett (<i>engl. brilliant violet</i>)
B-Zelle	B-Lymphozyt
CCL	CC-Chemokinligand
CD	Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (<i>engl. cluster of differentiation</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppeldestilliertes Wasser
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced-Variante des grün fluoreszierenden Proteins (<i>engl. enhanced green fluorescent protein</i>)
EM	Emission (<i>engl. emission</i>)
EX	Erregung (<i>engl. excitation</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>engl. fetal calf serum</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>engl. fluorescence-activated cell sorting</i>)
FcR	Fc-Rezeptor
g	Mittlere Erdbeschleunigung
h	Stunde
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IVM	Intravitalmikroskopie
KL	Kutane Leishmaniose
KP-Filter	Kurzpassfilter
KR	Komplementrezeptor
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LP-Filter	Langpassfilter
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LTB4	Leukotrien B4
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G
Ly6/uPAR	Lymphocyte antigen 6/urokinase-type plasminogen activator receptor

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>engl. magnetic activated cell sorting</i>)
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl. major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein 1-Beta
m/V	Massenkonzentration = m (Masse) / V (Volumen)
M Φ	Makrophagen
NET	NET-Struktur (<i>engl. neutrophil extracellular traps</i>)
NG	Neutrophile Granulozyten
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
one-way ANOVA	Einweg-Varianzanalyse (<i>engl. one-way analysis of variance</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (<i>engl. pattern recognition receptors</i>)
PSG	Aus Promastigoten sezerniertes Gel (<i>engl. promastigote secretory gel</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
p.i.	Nach Infektion (<i>engl. post-infection</i>)
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>engl. reactive nitrogen species</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>engl. reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl. revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T _{FH}	Follikuläre T-Helferzellen
T _H	T-Helferzellen
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
two-way ANOVA	Zweiweg-Varianzanalyse (<i>engl. two-way analysis of variance</i>)
T-Zelle	T-Lymphozyt
vs	Gegenübergestellt (<i>lat. versus</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl. World Health Organization</i>)
1/100 x	Einfach/hundertfach konzentriert

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Auslösung einer adaptiven Immunantwort im Lymphknoten.	3
Abbildung 2: Abtötung von Mikroben durch Neutrophile.	5
Abbildung 3: Sagittalschnitt einer weiblichen Sandmücke mit Darstellung des PSG.	8
Abbildung 4 Lebenszyklus der Leishmanien.	9
Abbildung 5: Pro- und antiinflammatorische Zytokine bestimmen den Krankheitsverlauf der KL.	13
Abbildung 6 Modell des „Trojanischen Pferdes“ und des „Trojanischen Hasen“ in der Leishmanieninfektion.	15
Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Intravitalmikroskopie des Ohres einer Maus unter dem Zweiphotonenmikroskop.	30
Abbildung 8: Erregungs- (EX) und Emissionsspektren (EM) von EGFP und tdTomato.	31
Abbildung 9: Darstellung der Filter und Non Descanned-Detektoren (NDD) für die Zweiphotonenmikroskopie der mit <i>L. major</i> -EGFP infizierten Catchup ^{IVM-red} -Mäuse.	32
Abbildung 10: Markierung und Verfolgung der Neutrophilen mittels Software Imaris.	33
Abbildung 11: Einfluss des Ly6G auf die Zellrekrutierung an den Infektionsort mit <i>L. major</i>	36
Abbildung 12: Limitierende Verdünnung zeigt Unabhängigkeit der Pathogenzahl von <i>L. major</i> im Gewebe von der Ly6G-Expression der Neutrophilen.	37
Abbildung 13: Infektionsraten von Neutrophilen, MΦ und DZ mit <i>L. major</i> -EGFP.	39
Abbildung 14: 3D-Schnittdarstellung der Aufnahme von Neutrophilen- und Leishmanienmaterial durch CD11c ⁺ - und CD54 ⁺ -Zellen.	40
Abbildung 15: Aufnahme von tdTomato-Neutrophilenmaterial nur durch mit <i>L. major</i> -EGFP infizierte, aus Monozyten entstandene MΦ und DZ.	42
Abbildung 16: Bildaufnahmen der Rekrutierung von Ly6G ^{+/-} -und Ly6G ^{-/-} -Neutrophilen an den Infektionsort.	44
Abbildung 17: Verändertes Eintrittsverhalten der Ly6G ^{-/-} -Neutrophilen in das mit <i>L. major</i> infizierte Gewebe im zeitlichen Verlauf.	46
Abbildung 18: Analyseschema von Neutrophilen und <i>L. major</i> in Bildaufnahmen der Zweiphotonenmikroskopie.	48
Abbildung 19: Instantane Geschwindigkeit der Neutrophilen verändert sich abhängig vom Infektionszeitpunkt sowie von der Distanz zu <i>L. major</i> -EGFP.	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die unterschiedlichen krankheitsauslösenden Arten der Gattung <i>Leishmania</i>	7
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 3: Laborgeräte.....	18
Tabelle 4: Mikroskope.....	19
Tabelle 5: Software.....	19
Tabelle 6: Chemikalien.....	20
Tabelle 7: Puffer.....	21
Tabelle 8: Medien.....	21
Tabelle 9: Antikörper zur immunhistochemischen Färbung von Mausohr-Querschnitten für die Konfokalmikroskopie.....	22
Tabelle 10: Antikörper für FACS.....	22
Tabelle 11: MicroBeads® für MACS.....	23

1 Einführung

1.1 Das Immunsystem

Um sich vor Infektionen und Fremdstoffen zu schützen, besitzt der menschliche Körper ein komplexes System aus Immunzellen, Signalstoffen, Proteinen und Antikörpern (AK), die im Gewebe miteinander interagieren und letztlich dazu beitragen, dass eine wirkungsvolle Immunantwort mit anschließendem Heilungsprozess ausgelöst wird. Krankheitserreger, auch Pathogene genannt, wie Bakterien, Viren, Prionen, Pilze, Würmer oder Protozoen, können Infektionskrankheiten hervorrufen und unterschiedliche Immunreaktionen des Körpers auslösen. Aber auch körpereigene, schädigende oder funktionslose Zellen müssen erkannt und beseitigt werden, um die Gesundheit zu wahren (Rink et al. 2015).

1.1.1 Angeborene Immunantwort

Das menschliche Immunsystem lässt sich funktionell in ein angeborenes (unspezifisches) und ein adaptives (spezifisches) Immunsystem unterteilen. Bei Überwindung der äußeren Schutzmechanismen durch Pathogene zu denen neben der Haut und Schleimhaut auch Enzyme, gelöst in Körpersekreten mit antibakteriellen Eigenschaften gehören, stellt die angeborene Immunantwort die erste Verteidigungslinie des Körpers dar. Nach dem Erstkontakt lokaler Immunzellen mit dem eindringenden Pathogen erfolgt die Einwanderung weiterer Immunzellen wie den neutrophilen Granulozyten (im weiteren Text auch als „Neutrophile“ bezeichnet), die als erste Zellpopulation an den Infektionsort rekrutiert werden (vgl. 1.2). Zur zellulären Immunantwort gehören neben den Neutrophilen aber auch die darauffolgend rekrutierten Monozyten, die im Gewebe zu dendritischen Zellen (DZ) und Makrophagen (MΦ) heranreifen sowie 2 weitere Arten von Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

Neben den zellulären Bestandteilen ist auch die humorale Immunantwort, bestehend aus löslichen Faktoren, essentiell für das angeborene Immunsystem. Das Komplementsystem ist nach kaskadenartiger Aktivierung seiner gelösten proteinogenen Bestandteile in der Lage, die Erreger zur Aufnahme durch Immunzellen zu markieren (Opsonisierung), sie direkt zu bekämpfen oder die Entzündungsreaktion weiter zu verstärken (Murphy et al. 2012). Die Kommunikation und Interaktion von Immunzellen wird durch lösliche Botenstoffe, die Zytokine, gewährleistet. Eine Untergruppe sind die Chemokine, sezernierte Proteine, die Zellen aus Blutgefäßen in das infizierte Gewebe locken (Medzhitov 2008). In der Leber synthetisierte Akute-Phase-Proteine können dem Immunsystem helfen, die Entzündungsreaktion zu lokalisieren.

Ein wichtiger Mechanismus zur Pathogenentfernung ist die Phagozytose durch Neutrophile, MΦ oder DZ. Sie sind in der Lage, Pathogene über spezifische molekulare Muster (PAMPs,

engl. pathogen-associated molecular patterns) in Form von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden oder Nucleinsäuren über ihre Mustererkennungsrezeptoren, die PRRs (*engl. pattern recognition receptors*), auf ihrer Oberfläche zu erkennen (Janeway und Medzhitov 2002). Dies führt zu ihrer Aktivierung und zu einer gesteigerten Phagozytose. Dabei wird das Pathogen von der Membran des Phagozyten unter Ausbildung von Pseudopodien umschlossen und in ein Vesikel aufgenommen, das man als Phagosom bezeichnet. Pathogene können in M Φ und in Neutrophilen durch ihre Granula mit mikrobiziden Substanzen oder mithilfe der Lysosomen zerstört werden. Die intrazelluläre Abtötung von Mikroorganismen gelingt außerdem mithilfe von reaktiven Sauerstoff- (*engl. reactive oxygen species*, ROS) und seltener Stickstoffspezies (*engl. reactive nitrogen species*, RNS) (vgl. 1.2). Die Prozesse zur Entstehung der reaktiven Substanzen werden auch als „oxidative burst“ bezeichnet (Freitas et al. 2009). M Φ spielen eine wichtige Rolle bei der Etablierung einer akuten Entzündungsreaktion, indem sie proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 produzieren und somit weitere Effektorzellen mobilisieren und aktivieren (Medzhitov 2008). IL-1 β ist ein Zytokin, dessen Freisetzung nach Aktivierung der NOD-like-Rezeptoren, eine Klasse der PRRs, durch einen Multi-Proteinkomplex, das Inflammasom, gesteuert wird (Mariathasan und Monack 2007). NK-Zellen können Tumor- oder virusinfizierte Zellen abtöten, die durch fehlende Expression spezieller Membranglykoproteine, den MHC-Klasse-I-Molekülen (*engl. major histocompatibility complex*, MHC), nicht von CD8⁺-T-Zellen erkannt und abgetötet werden können.

1.1.2 Adaptive Immunantwort

Die Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem bilden DZ, die Pathogene im Gewebe aufnehmen, ihre Antigene prozessieren und sie anschließend auf ihrer Oberfläche präsentieren. Diese wandern über Lymphgefäße in das nächste periphere lymphatische Gewebe (z. B. in Lymphknoten), wo sie die adaptive Immunantwort auslösen.

Zu den antigenpräsentierenden Zellen (APZ) gehören neben den DZ auch M Φ und B-Lymphozyten (im weiteren Text auch als „B-Zellen“ bezeichnet). Die Antigene werden über MHC-Moleküle präsentiert und über den T-Zell-Rezeptor durch naive T-Lymphozyten (im weiteren Text auch als „T-Zellen“ bezeichnet) erkannt, die die zellvermittelte adaptive Immunantwort vermitteln. So werden deren Aktivierung und Differenzierung zu Effektor-T-Zellen gewährleistet (Vollmar et al. 2013). Die MHC-Klasse-I-Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Körperzellen vor und werden von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen erkannt, welche der Abtötung virenfizierter oder maligne veränderter Zellen dienen. MHC-Klasse-II-Moleküle, die nur auf APZ vorkommen, werden durch CD4⁺-T-Helferzellen erkannt. Diese entwickeln sich nach ihrer Aktivierung zu T_H1-, T_H2-, T_H17-Zellen, folliculären T-Zellen (T_{FH}) und regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und koordinieren die Immunantwort über Zytokine. Naive B-Zellen werden durch T_H1-/T_H2-/T_{FH}-Zellen aktiviert und differenzieren sich zu AK-

produzierenden Plasmazellen und vermitteln so die humorale Immunität. Die AK und Effektor-T-Zellen verlassen das periphere lymphatische Gewebe und gelangen über das Blut in das entzündete Gewebe (Rink et al. 2015) (vgl. **Abbildung 1**).

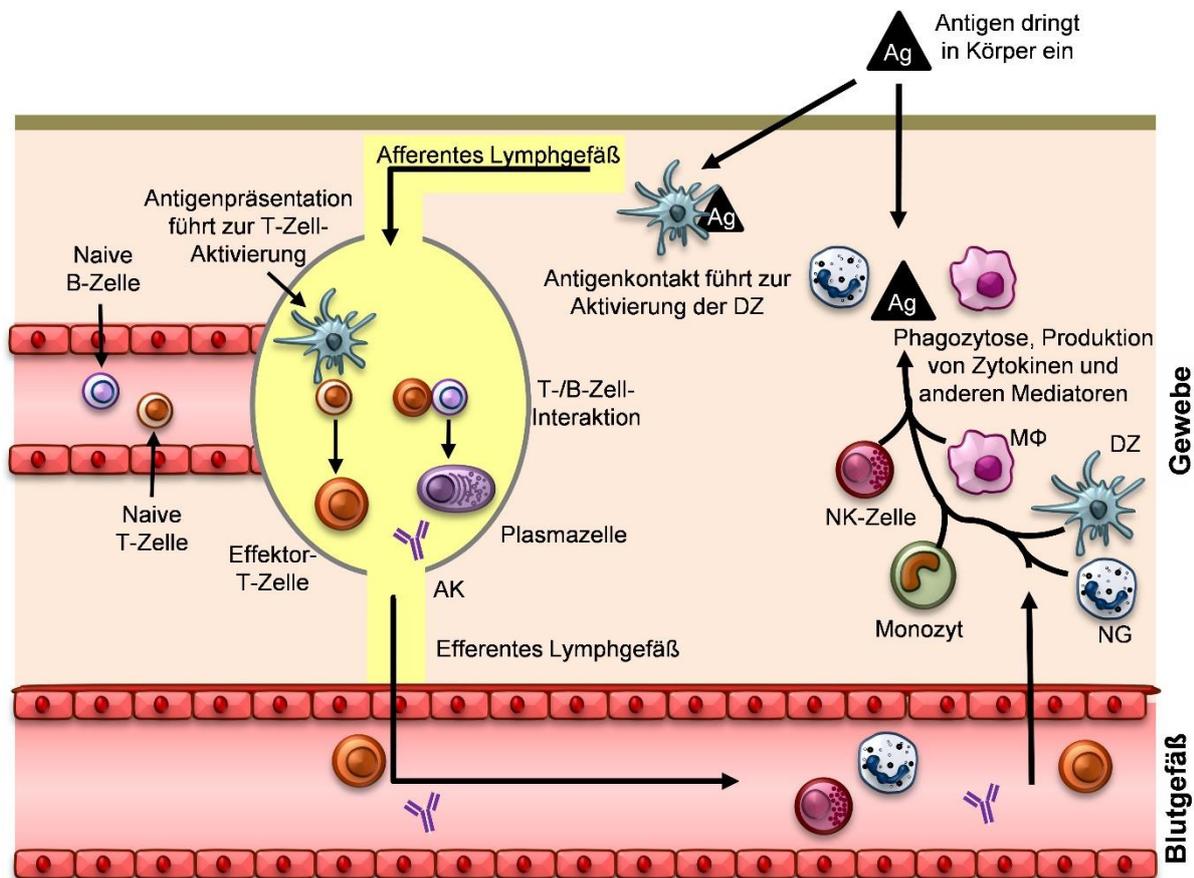


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Auslösung einer adaptiven Immunantwort im Lymphknoten.

Wenn Krankheitserreger und deren Antigene (Ag) in den Körper eindringen, nehmen dendritische Zellen (DZ) diese durch rezeptorvermittelte Phagozytose auf und werden aktiviert. Nach Wanderung in peripheres lymphatisches Gewebe, z. B. einen Lymphknoten (gelb dargestellt), werden durch Antigenpräsentation der DZ naive T-Zellen aktiviert, was zur Proliferation und Differenzierung zu Effektor-T-Zellen führt. Nach Interaktionen der T- und B-Zellen werden naive B-Zellen aktiviert und reifen zu Antikörper (AK)-produzierenden Plasmazellen heran. AK und Effektor-T-Zellen gelangen über Lymphgefäße ins Blut und wandern gemeinsam mit anderen rekrutierten Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten (NG), Monozyten, DZ, MΦ oder NK-Zellen, geleitet durch Chemokine, Zytokine oder andere Mediatoren an die ursprüngliche Infektionsstelle zur Bekämpfung des eindringenden Mikroorganismus.

Quelle: In Anlehnung an Rink et al. 2015, S. 11, einzelne Abbildungsbestandteile mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Elena A. Seiß übernommen, die ursprünglich von ihr am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie in Magdeburg entworfen wurden.

Während die Reaktionszeit der adaptiven Immunantwort wesentlich länger gegenüber der angeborenen Immunantwort ist, zeichnet sie die Bildung eines „immunologischen Gedächtnisses“ aus, das schnellere und effektivere Immunantworten bei erneuter Exposition mit dem gleichen Pathogen auslösen kann (Farber et al. 2016).

1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten bilden mit ihrem Anteil von 50-70 % den größten Anteil an den Leukozyten im Blut und sind darauf spezialisiert, Pathogene oder apoptotische Zellen zu entfernen. Sie zirkulieren in Blutgefäßen und wandern im Falle von Entzündungsreaktionen durch Chemokine und proinflammatorische Zytokine geleitet in das entsprechende Gewebe aus, um die Mikroben durch verschiedene Mechanismen unschädlich zu machen. Neutrophile werden als erste Zellen, als Teil der angeborenen Immunabwehr (vgl. 1.1.1), an Infektionsorte rekrutiert (Kobayashi und DeLeo 2009).

Damit Neutrophile infiziertes Gewebe erreichen können, müssen sie Blutgefäße verlassen. Die Extravasation wird über eine Reihe von Zelladhäsionsmolekülen sowie Chemokinen gesteuert. Zytokin-vermittelt exprimieren die Endothelzellen der Blutgefäße vermehrt P- und E-Selektine, die von Neutrophilen über ihren PSGL-1-Rezeptor gebunden werden und ein „Rollen“ entlang der Gefäßwand ermöglichen (Ley et al. 2007; McEver und Cummings 1997). Ihre Adhäsion am Gefäßendothel wird weiter über Chemokin-Rezeptorbindung verstärkt, was zu einer Verstärkung ihrer Integrinaffinität, speziell von LFA-1 und Mac-1, führt (Kuwano et al. 2010; Massena et al. 2010; Blanks et al. 1998). Neben der Adhäsion der Neutrophilen über ihre β -2-Integrine LFA-1 und Mac-1 triggern Chemokine auch ihre sich anschließende Durchwanderung durch das Gefäßendothel durch Interaktionen mit ICAM-1, ICAM-2, JAM, PECAM-1 und CD99 (Huang et al. 2006; Shaw et al. 2004; Kourtzelis et al. 2017). Nach Eintritt in das Gewebe bewegen sich Neutrophile entlang des Konzentrationsgradienten der Chemokine oder erkennen pathogenassoziierte Signale, um das entzündete Gewebe optimal zu erreichen (McDonald et al. 2010; Sarris et al. 2012; Peters et al. 2008; Liese et al. 2013). Neutrophile zeigen dabei ein über Zweiphotonenmikroskopie sichtbares, extrem koordiniertes Schwarmverhalten, was nach anfänglicher Chemotaxis lokaler Neutrophiler weiter durch Chemotaxis entfernterer interstitieller Neutrophiler verstärkt wird und letztlich zur Ansammlung vieler Neutrophiler führt in dessen Verband sie sich mit gleichen Bewegungsrichtungen z. B. zu Infektionsorten hinbewegen (Kreisel et al. 2010; Ng et al. 2011). Lämmermann et al. machten die Beobachtung, dass Leukotrien B₄ als Signalprotein wichtig für die Kommunikation der Neutrophilen untereinander ist sowie eine verstärkte Rekrutierung weiterer Neutrophiler bewirkt. Während die Fortbewegung im interstitiellen Raum über weitere Strecken integrinunabhängig zu sein scheint (Lämmermann et al. 2008), sind Integrine laut Lämmermann et al. an der lokalen Akkumulation der Neutrophilen am Infektionsort beteiligt (Lämmermann et al. 2013).

Ausgereifte Neutrophile bestehen aus einem segmentierten Kern sowie der namensgebenden Granula. Die primäre, „azurophile“ Granula enthält Myeloperoxidase, Proteasen und antimikrobielle Proteine wie Defensine zur direkten Abtötung der Mikroorganismen während

die „spezifische“, sekundäre Granula Enzyme wie Laktoferrin, Lysozym, Proteine für den NADPH-Oxidase-Komplex sowie β -2-Integrine enthält (Borregaard et al. 1983; Sengeløv et al. 1993; Nauseef 2007). Detektiert ein Neutrophiler eine Mikrobe, wird diese phagozytiert und anschließend durch Freisetzung seiner Granula sowie der Produktion von ROS kontrolliert (vgl. 1.1.1, **Abbildung 2 A**). Darüber hinaus können Neutrophile Mikroben mithilfe von Netzwerken extrazellulärer Fasern, bestehend aus DNA und antimikrobiellen Proteinen, der sogenannten NETose (*engl. neutrophil extracellular traps*), bekämpfen (Brinkmann et al. 2004) (**Abbildung 2 B**).

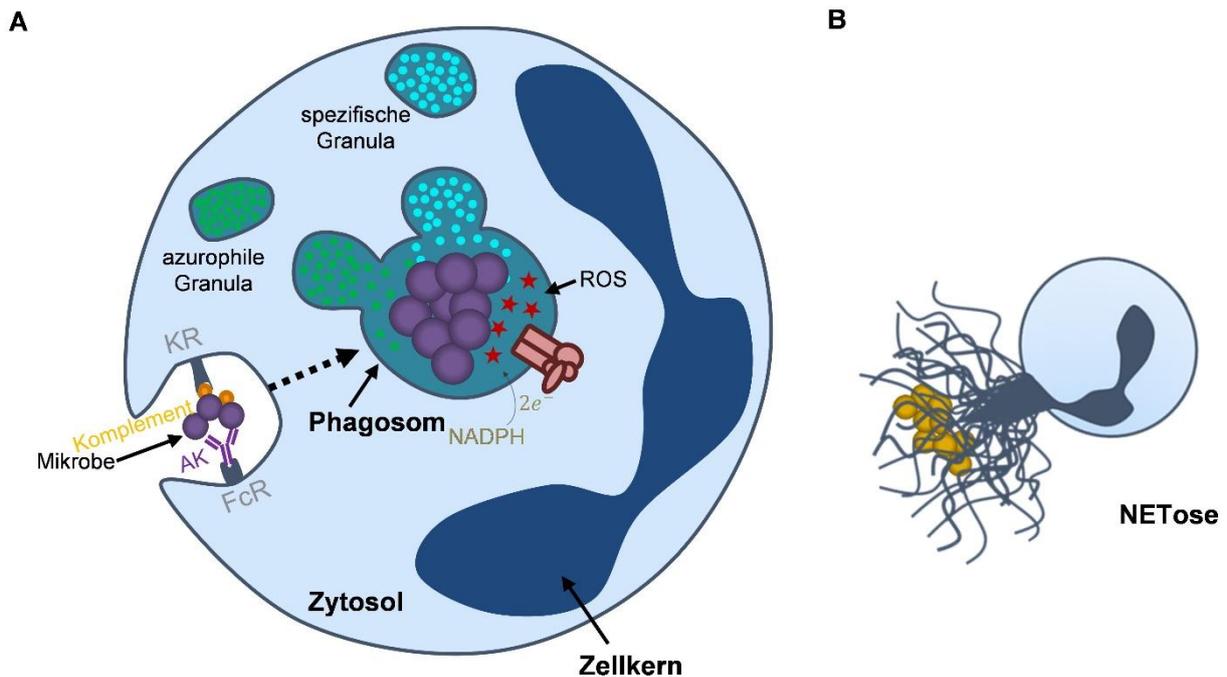


Abbildung 2: Abtötung von Mikroben durch Neutrophile.

(A) Nach Erkennung der mittels Komplement oder AK opsonisierten Mikrobe über den Komplementrezeptor (KR) oder über den Fc-Rezeptor (FcR) erfolgt ihre Aufnahme in Neutrophile unter Ausbildung eines Phagosoms. Die Phagozytose triggert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*engl. reactive oxygen species*; ROS) zur intrazellulären Abtötung der Mikrobe. Dabei katalysiert die NADPH-Oxidase (rot dargestellt) die Übertragung von Elektronen von NADPH auf Sauerstoff, wodurch hochreaktive Superoxidradikale ($O_2^{\cdot-}$) entstehen, die als Ausgangspunkt weiterer, sekundärer ROS dienen (nicht dargestellt). Darüber hinaus besitzen Neutrophile ihre namensgebenden, im Zytoplasma gespeicherten „azurophilen“ und „spezifischen“ Granula, deren mikrobizide Proteine nach ihrer Freisetzung ins Phagosom die Mikrobe abtöten können. **(B)** Darstellung der NETose.

Quelle: In Anlehnung an Kobayashi und DeLeo 2009, S. 315, einzelne Abbildungsbestandteile mit freundlicher Genehmigung von Cora Schwendele übernommen, die ursprünglich von ihr am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie in Magdeburg entworfen wurden.

Neben der primären Funktion der Neutrophilen, das Abtöten von eingedrungenen Pathogenen, spielen sie auch eine entscheidende Rolle in der Immunregulation durch ihre Möglichkeit zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Murphy et al. 2012; Tecchio et al. 2014). Die essentielle Funktion der Neutrophilen in der Bekämpfung eindringender Mikroorganismen wird bei Patient:innen deutlich, die zu wenige oder defekte Neutrophile

aufweisen und schwere Infektionsverläufe erleiden (Dinauer 2007; Burke und Lopez 2017). Neben ihrer protektiven Verteidigungsfunktion können sie aber auch bei Überaktivierung zu verstärkten pathologischen Entzündungsreaktionen z. B. im Rahmen von Schlaganfällen oder diversen Dermatosen führen (Marzano et al. 2019; Neumann et al. 2015). Noch heute sind Aspekte ihres Verhaltens und ihrer Rolle in pathologischen Prozessen nicht ausreichend erforscht.

1.3 Ly6G

Ly6G (*engl. lymphocyte antigen 6 complex, locus G*) ist ein spezifisch von Granulozyten exprimiertes Oberflächenprotein, das durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker in der Zellmembran muriner Neutrophiler befestigt ist und zur Ly6/uPAR (*engl. lymphocyte antigen 6/urokinase-type plasminogen activator receptor*)-Familie gehört, die über eine LU-Domäne (*engl. LU = lymphocyte antigen 6/urokinase-type plasminogen activator receptor*) verfügt (Lee et al. 2013). Auch eosinophile Granulozyten können Ly6G exprimieren (Percopo et al. 2017). Es handelt sich um ein etwa 25 kDa schweres Protein, für das bisher kein Ligand gefunden worden ist und dessen Funktion nicht abschließend geklärt ist.

Das Oberflächenprotein CD117, das ebenfalls der Ly6/uPAR-Familie angehört, wird sowohl von murinen als auch von humanen Neutrophilen exprimiert (Stroncek 2007). CD117 zeigt molekulare Assoziationen mit β -2-Integrinen, geht heterophile Bindungen mit PECAM-1 ein und gegen CD117 gerichtete AK verhindern die transendotheliale Neutrophilenmigration (Sachs et al. 2007; Jerke et al. 2011; Bai et al. 2017). CD117-Knock-out-Mäuse zeigen weniger Neutrophile im peripheren Blut sowie geringere Akkumulationen ihrer Neutrophilen bei Hautinfektionen mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Xie et al. 2015). Die funktionellen Gemeinsamkeiten von CD117 und murin exprimiertem Ly6G sind jedoch nicht abschließend geklärt.

In tierexperimentellen Arthritis- und Peritonitismodellen konnte bei Behandlung mit Ly6G-AK eine abgeschwächte Entzündungsaktivität und eine verminderte Rekrutierung von Neutrophilen beschrieben werden (Wang et al. 2012). Weiter wurde nachgewiesen, dass der Ly6G-AK eine LTB₄-induzierte Migration der Neutrophilen inhibiert. Auch hier konnte eine Kolo-kalisierung von Ly6G und β -2-Integrinen konfokalmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Expression der β -2-Integrine verringerte sich nach Zugabe eines Ly6G-AK. Daher gehen Wang et al. davon aus, dass die Rekrutierung von Neutrophilen β -2-Integrin-abhängig erfolgt (Wang et al. 2012). Die Begründung der durch β -2-Integrine verminderten Rekrutierung von Neutrophilen wurde von den Wissenschaftlern Yipp und Kubes stark angezweifelt (Yipp und Kubes 2013). Sie konnten in *in-vivo*-Experimenten in infiziertem Gewebe mit *S. aureus* keine unterschiedliche Rekrutierung von Neutrophilen nach Behandlung mit Ly6G- und Gr-1-AK nachweisen. Peter Nigrovic sieht in den Daten von Yipp und Kubes keinen Widerspruch zu

seinen eigenen (Wang et al. 2012), sondern vielmehr eine ergänzende Beobachtung. Er begründet die abweichenden Beobachtungen durch die unterschiedliche Abhängigkeit der Signalwege von β -2-Integrinen, da bei Yipp und Kubes ein anderes tierexperimentelles Modell verwendet wurde (Nigrovic 2013). Ly6G-AK scheinen selektiv nur β -2-Integrin-vermittelte und nicht β -2-Integrin-unabhängige Migration von Neutrophilen zu inhibieren (Cunin et al. 2019). Diese β -2-Integrin-Abhängigkeit scheint spezifisch vom Erreger abzuhängen und variiert mit dem Entzündungsort im Gewebe. Während diese Studien meist diverse Ly6G-AK verwendet haben, zeigen genetisch veränderte, Ly6G-defiziente Mäuse des „Catchup-Modells“ (2.1.5.1) unverändertes Migrationsverhalten ihrer Neutrophilen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in sterilen Entzündungsmodellen sowie Infektionsmodellen mit *Aspergillus fumigatus* (Hasenberg et al. 2015). Integrine übernehmen multiple Funktionen und β -2-Integrine können die Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen fördern (Kourtzelis et al. 2017). Durch die beschriebene Kolo-kalisierung von Ly6G und β -2-Integrinen wird in dieser Arbeit daher auch untersucht, ob sich eine Ly6G-Defizienz auf die Efferozytose von Neutrophilen auswirkt.

1.4 *Leishmania major*

1.4.1 Erreger und Entwicklung

Für das Infektionsmodell wird in dieser Arbeit der obligat intrazelluläre protozoische Parasit *Leishmania major* (*L. major*) verwendet. Dieser ist eine von über 20 pathogenen Arten der Gattung *Leishmania* (im weiteren Text als „L.“ abgekürzt), die zur Familie der Trypanosomatidae gehört (WHO 2022, 2010).

Die Einteilung der Leishmanienarten kann nach geografischem Vorkommen oder nach dem durch sie ausgelösten Krankheitsbild, der kutanen, der mukokutanen und der viszeralen Leishmaniose erfolgen (DTG 2010). Zur besseren Übersicht wird hier auf die Darstellung nach geografischer Verbreitung verzichtet und lediglich eine Auswahl abgebildet (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Übersicht über die unterschiedlichen krankheitsauslösenden Arten der Gattung *Leishmania*.

Krankheitsbild	Arten
Kutane Leishmaniose	<i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i>
Mukokutane Leishmaniose	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i>
Viszerale Leishmaniose	<i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i>

Quelle: In Anlehnung an WHO 2010, S. 7.

Als Vektor dient die weibliche Sandmücke der Gattung *Phlebotomus* oder *Lutzomyia*. Diese kann nach einer Blutmahlzeit eines infizierten Wirbeltiers oder Menschen die amastigote Form der Leishmanien (im weiteren Text als „Amastigoten“ bezeichnet) entweder frei oder in Phagozyten vorkommend aufnehmen. Die Amastigoten besitzen kein Flagellum und differenzieren sich vermutlich getriggert durch den pH- und den Temperaturabfall im Mitteldarm der Sandmücke zur promastigoten Form der Leishmanien (im weiteren Text als „Promastigoten“ bezeichnet) (Kamhawi 2006; Zakai et al. 1998). Dabei durchlaufen die flagellierten Promastigoten das prozyklische, das nectomonade, das leptomonade, das haptomonade und das infektiöse metazyklische Entwicklungsstadium, was als Metacyclo-genese bezeichnet wird (Rogers et al. 2002). Die Promastigoten produzieren im Darm der weiblichen Sandmücke das PSG (*engl. promastigote secretory gel*), ein muzinartiges Gel, das hauptsächlich aus fadenförmigen Proteophosphoglykanen besteht und eine Blockierung des Vorderdarms und vorderen Mitteldarms bedingt (Rogers et al. 2002; Stierhof et al. 1999). Wenn die weibliche infizierte Sandmücke eine Blutmahlzeit aufsaugen möchte, muss sie zuerst das PSG zusammen mit den darin enthaltenen Promastigoten und weiteren Speichelbestandteilen hervorwürgen, um die Blutpassage im Anschluss gewährleisten zu können (**Abbildung 3**) (Rogers et al. 2004; Bates 2007). Im PSG-Pfropfen können neben den infektiösen metazyklischen Promastigoten hauptsächlich leptomonade Promastigoten gefunden werden, sodass man vermutet, dass die Produktion des PSG hauptsächlich von ihnen ausgeht (Rogers et al. 2002). Die Speichelbestandteile der Sandmücke führen durch Immunmodulation zu einer höheren Infektiosität sowie zu größeren chronischen Läsionen bei kutaner Leishmaniose (Titus und Ribeiro 1988; Ribeiro 1989; Rohousová und Volf 2006).

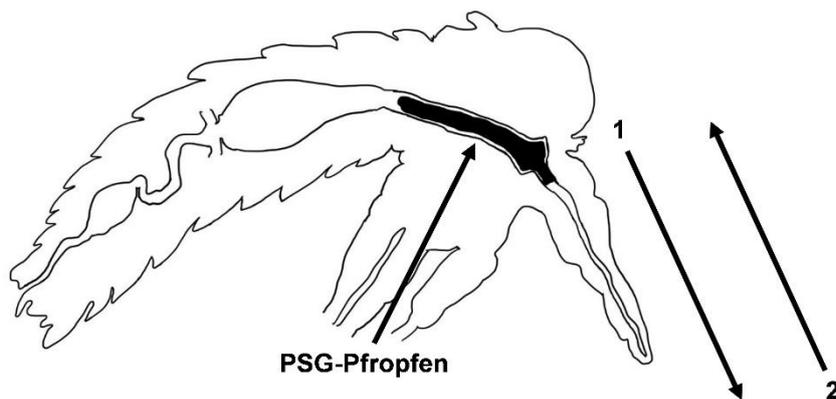


Abbildung 3: Sagittalschnitt einer weiblichen Sandmücke mit Darstellung des PSG.

Der PSG-Pfropfen befindet sich im Vorderdarm und vorderem Mitteldarm. Dieser wird zusammen mit den Promastigoten sowie weiteren Speichelbestandteilen beim Stich durch die Sandmücke in das Wirbeltier oder den Menschen regurgitiert (1), bevor die Sandmücke die Blutmahlzeit aufsaugen kann (2).

Quelle: In Anlehnung an Bates 2007, S. 1102.

Abbildung 4 stellt den Lebenszyklus der Leishmanien dar. Nachdem die metazyklischen Promastigoten über den Stich einer infizierten weiblichen Sandmücke in das Blut des Menschen gelangen, fungiert dieser als Zwischenwirt. Die Leishmanien werden durch M Φ oder DZ phagozytiert, entwickeln sich in ihnen zu Amastigoten und replizieren sich. In einer Untergruppe, den CD11c-exprimierenden Ly6C⁺CCR2⁺ Monozyten, findet nach der Aufnahme der Leishmanien ihre effizienteste intrazelluläre Vermehrung statt (Heyde et al. 2018). Befinden sich zu viele Amastigoten in den Phagozyten, führt dies zu ihrer Zerstörung und zur Freisetzung der Amastigoten in das Blut, durch das sie weitere Phagozyten infizieren können.

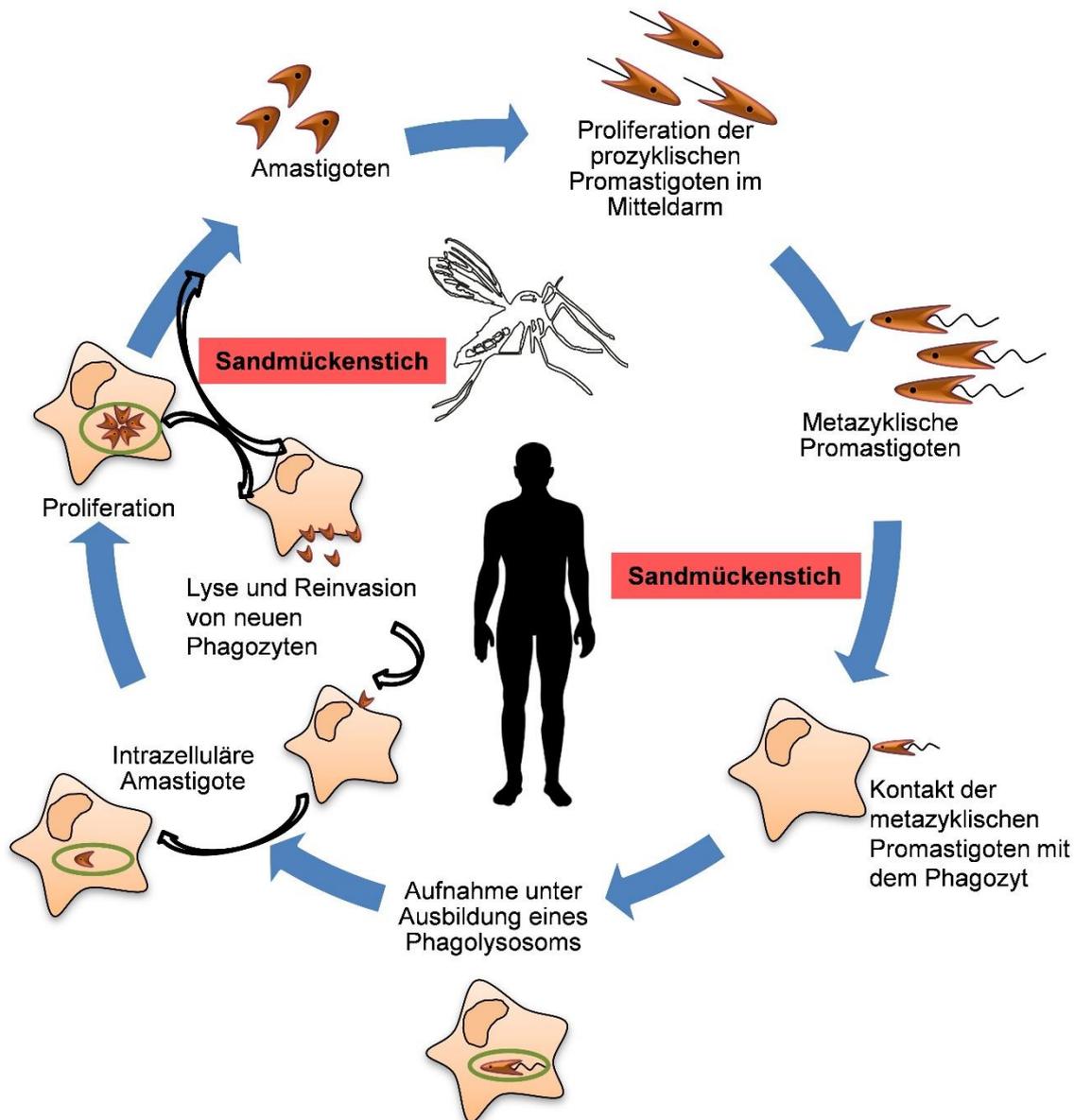


Abbildung 4 Lebenszyklus der Leishmanien.

Als Vektor und Endwirt fungiert die weibliche Sandmücke der Gattung *Phlebotomus* oder *Lutzomyia*. Hier wird schematisch der Mensch als Zwischenwirt für die Leishmanien dargestellt.

Quelle: In Anlehnung an Kaye und Scott 2011, S. 605, menschliche Darstellung von „Own alterations and File:SVG_Human_With_All_Organs.svg by Madhero88“, lizenziert unter CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=110195561>, Titel: „A simple human body silhouette“.

Der Lebenszyklus der Leishmanien schließt sich, wenn die Sandmücke, der Endwirt, Blut von einem infizierten Menschen aufsaugt und durch das Blut auch freie Amastigoten mit aufnimmt (Kaye und Scott 2011).

1.4.2 Krankheitsbild der Leishmaniose

Das durch diese Protozoen ausgelöste Krankheitsbild wird als Leishmaniose bezeichnet. Abhängig von der Leishmanienart sowie der Immunreaktion des Wirtes variieren klinische Verläufe stark (Rossi und Fasel 2018; Ameen 2010; Kaye und Scott 2011). Wie in 1.4.1 erwähnt, unterscheidet sich die klinische Manifestation in die folgenden drei Hauptformen: die kutane, die mukokutane und die viszerale Leishmaniose, wovon die letztgenannte unbehandelt meist tödlich verläuft. Laut der Weltgesundheitsorganisation (*engl. World Health Organization*; WHO) stellt die häufigste Verlaufsform die kutane Leishmaniose (KL) dar. Die verursachten Hautläsionen an exponierten Körperstellen sind meist selbstlimitierend, können jedoch unter entstellender Narbenbildung abheilen, was nicht selten zu Stigmatisierungen führt. Die KL tritt bevorzugt in Mittel- und Südamerika, im Mittelmeerraum, im Nahen Osten, in Afrika und in Südwestasien auf. Weltweit werden etwa 1 Million neue Fälle der KL jährlich registriert, was die globale Bedeutsamkeit des Krankheitsbildes unterstreicht (WHO 2022).

In einigen Fällen der Leishmaniose ist eine systemische Therapie erforderlich, jedoch sind die Therapiemöglichkeiten derzeit begrenzt. Resistenzbildung sowie toxische Nebenwirkungen derzeit etablierter medikamentöser Therapien stellen Hindernisse bei der Bekämpfung der Leishmaniose dar (Bekhit et al. 2018). Bislang nicht erfolgreich ist die Entwicklung eines sicheren und effektiv vor der Infektion schützenden Impfstoffs, was eine Lösung dieser Probleme darstellen könnte (Singh und Sundar 2012; Costa et al. 2011). Der Ansatz scheint jedoch vielversprechend zu sein und ist Gegenstand aktueller Forschung (Iborra et al. 2018).

1.4.3 Immunreaktion

Da in dieser Arbeit der Parasit *L. major* verwendet wird, wird im Folgenden bevorzugt die Immunantwort des Körpers im Rahmen der KL sowie eine Auswahl an Mechanismen, durch die Leishmanien in der Lage sind die Immunantwort zu modifizieren, dargestellt. Maßgebend für die Immunantwort und das klinische Spektrum der Leishmaniose sind einerseits die infizierende Leishmanienart und andererseits der Immunstatus des Wirtes. In Neutrophile, DZ und M Φ können die Parasiten eindringen und persistieren. Die hauptsächlichen Tötungsmechanismen des angeborenen Immunsystems gegen die intrazellulären Leishmanien sind die Produktion von ROS und RNS in Phagozyten, auf die Leishmanien mithilfe ihrer Virulenzfaktoren Einfluss nehmen können. Um eine Leishmanieninfektion wirksam kontrollieren zu können, ist ein Zusammenspiel der primären angeborenen Immunantwort sowie der sich anschließenden adaptiven Immunantwort essentiell. Das Gleichgewicht zwischen aktivierenden, proinflammatorischen Zytokinen durch T_H1- und

NK-Zellen und deaktivierenden, antiinflammatorischen Zytokinen durch T_H2 - und T_{reg} -Zellen bestimmt den klinischen Verlauf (Dubie und Mohammed 2020).

Die KL scheint in zwei Phasen zu verlaufen: die erste, 4-5-wöchige „stille“ Phase, charakterisiert durch hohe Pathogeninfektionszahlen aufgrund vermuteter fehlender Kontrolle durch die angeborene Immunantwort und die zweite „immune“ Phase, in der Pathogene abgetötet und Hautläsionen sichtbar werden (Belkaid et al. 2000). Das lösliche Komplementsystem kann neben seiner Funktion der Opsonisierung auch zur direkten Abtötung der Parasiten beitragen und nach seiner Aktivierung mehr als 90 % der Parasiten zerstören (Mosser und Edelson 1984; Domínguez et al. 2002; Elmahallawy et al. 2021). Die verbleibenden Parasiten sind dennoch fähig, eine potente Infektion auszulösen. Mittels Zweiphotonenmikroskopie konnte gezeigt werden, wie nach der Infektion mit *L. major* Neutrophile als erste Immunzellen an den Infektionsort rekrutiert werden und die Leishmanien phagozytieren (Peters et al. 2008). Leishmanien können im Inneren der Neutrophilen jedoch vital bleiben und über verschiedene Pathogenitätsfaktoren die Infektion von dort aus effizient steuern (Hurrell et al. 2015) (vgl. **1.4.4**).

Infizierte Neutrophile sezernieren das Chemokin MIP-1 β (synonym für CCL4), was zur Rekrutierung von M Φ führt (van Zandbergen et al. 2004), sowie das CCL3, was die nachfolgende Rekrutierung der DZ bewirkt (Charmoy et al. 2010). Die aus Monozyten entstandenen DZ- und M Φ -ähnlichen Phagozyten gehören zu den primären Wirtszellen der Leishmanien am Infektionsort. Der Eintritt gelingt, wenn mit Leishmanien infizierte Neutrophile Apoptosemarker exprimieren und daraufhin durch DZ und M Φ phagozytiert werden. Die Phagozytose der infizierten, apoptotischen Neutrophilen durch M Φ führt einerseits dazu, dass die M Φ nicht in direkten Kontakt mit den Leishmanien kommen, sodass ihre Aktivierung ausbleibt und andererseits wird ihre Funktion der Immunregulation mittels Zytokinproduktion durch die Aufnahme apoptotischen Materials unterdrückt (van Zandbergen et al. 2004). Die unentdeckte Aufnahme der Leishmanien innerhalb der Neutrophilen durch ihre primären Wirtszellen, die M Φ , wird daher auch als „stille Phagozytose“ bezeichnet. M Φ sezernieren daraufhin antiinflammatorisches TGF- β anstelle des proinflammatorischen Zytokine IL-1 β oder TNF- α (Fadok et al. 1998; Savill et al. 1989). Ein Virulenzfaktor der Leishmanien ist die Metalloprotease Glykoprotein 63, die ihnen hilft, die mikrobiziden Mechanismen der M Φ zu überwinden (Olivier et al. 2012). Mit Leishmanien infizierte Neutrophile werden durch Expressierung von Apoptosemarkern auch durch DZ phagozytiert, was die Aktivität der DZ reduziert (Ribeiro-Gomes et al. 2012).

Der klinische Verlauf der KL ist stark abhängig von der Interaktion der APZ mit den Leishmanien und der daraufhin ausgelösten adaptiven Immunantwort. Da eine Infektionskontrolle im Rahmen der KL nur über eine T_H1 -Zell-Immunantwort gewährleistet

werden kann, muss diese ausgelöst und verhindert werden, dass IL-4-vermittelt die T_H2 -Zell-Immunantwort dominiert, die zu schweren Infektionsverläufen bei Mäusen führen kann (Scott et al. 1988; Heinzl et al. 1989; Scott und Novais 2016; Chatelain et al. 1992). Nach Antigenpräsentation der DZ im Lymphknoten differenzieren sich naive T-Zellen unter IL-12-Stimulation durch die DZ zu $CD4^+$ - T_H1 -Zellen. Die T_H1 -Zellen wandern im Anschluss in infiziertes Gewebe und verstärken nach Antigenerkennung über MHC-II-Moleküle über die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) die Phagozytose der Erreger sowie die Produktion von RNS durch Aktivierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in Phagozyten (Müller et al. 2012; Filipe-Santos et al. 2009; Evans et al. 1993) (**Abbildung 5**). Über *in-vivo*-Proliferationsreportersysteme konnte gezeigt werden, dass RNS nicht zur direkten Abtötung der Pathogene führen, sondern über Reduzierung der Stoffwechselaktivität von *L. major* zur Kontrolle der Infektion beitragen (Müller et al. 2013).

Die geminderte Aktivität der DZ nach Phagozytose der apoptotischen, mit Leishmanien infizierten Neutrophilen führt zu verminderter Antigenpräsentation durch die DZ und somit zur eingeschränkten Ausbildung einer protektiven T_H1 -Zell-Immunantwort sowie fehlender Aktivierung von $CD8^+$ -Zellen (Ribeiro-Gomes et al. 2012; Ribeiro-Gomes et al. 2015). Obwohl $CD8^+$ -T-Zellen durch Lyse infizierter oder entarteter Zellen protektive Funktionen zugesprochen werden, ist ihre Rolle im Rahmen der KL Gegenstand kontroverser Diskussionen. Während eine starke Aktivierung der $CD8^+$ -T-Zellen mit schwierigen Krankheitsverläufen aufgrund ihrer zytolytischen Aktivität einhergeht, konnten Infektionen mit *L. major* in Mäusen erst durch ihre IFN- γ -Produktion effektiv bekämpft werden (Belkaid et al. 2002; Novais et al. 2013; Crosby et al. 2014; Scott und Novais 2016; Ruiz und Becker 2007). Neben $CD8^+$ -T-Zellen können auch NK-Zellen aktiv zur Infektionskontrolle beitragen. NK-Zellen können einerseits wie die $CD8^+$ -T-Zellen über IFN- γ -Produktion DZ aktivieren (**Abbildung 5**) und dadurch auch eine T_H1 -Zell-vermittelte Immunantwort induzieren und andererseits durch ihre zytotoxische Aktivität zur Kontrolle infizierter $M\Phi$ und DZ beitragen (Martín-Fontecha et al. 2004; Scharon und Scott 1993; Bajénoff et al. 2006; Dubie und Mohammed 2020). T_{reg} -Zellen können proinflammatorische Immunantworten inhibieren, besonders über Sekretion von IL-10 und TGF- β und konnten durch Hoseini et al. in chronischen durch *L. major* verursachten Läsionen nachgewiesen werden (Hoseini et al. 2012; Bunn et al. 2018).

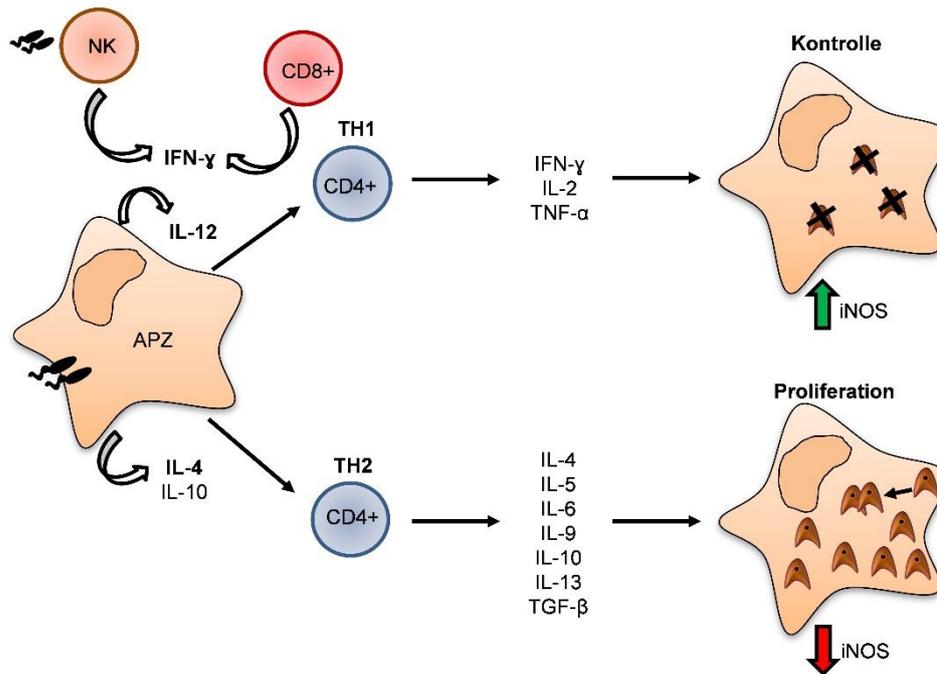


Abbildung 5: Pro- und antiinflammatorische Zytokine bestimmen den Krankheitsverlauf der KL.

Die Sekretion von IL-12 durch APZ unter Einfluss der IFN- γ -Stimulation durch NK- und CD8⁺-Zellen bewirkt eine TH1-Zell-vermittelte protektive Immunantwort, die unter anderem über IFN- γ die Produktion von RNS über Aktivierung der iNOS steuert und durch intrazelluläre Abtötung der Parasiten zur Kontrolle der Infektion beiträgt. Das Fortschreiten der Krankheit mit ungehemmter Parasitenproliferation wird mit der IL-4-induzierten TH2-Zell-vermittelten Immunantwort sowie den Zytokinen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und TGF- β in Verbindung gebracht (Ruiz und Becker 2007; Dubie und Mohammed 2020).

Quelle: In Anlehnung an Ruiz und Becker 2007, S. 672.

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Initiierung der TH1- bzw. der TH2-Zell-Immunantwort allein den entscheidenden Faktor für den Verlauf der KL darstellt. Die letzten Jahre haben gezeigt, dass dies nicht vollständig auf Krankheitsverläufe in Menschen und Mäusen übertragbar ist, die Immunantwort zur Heilung weitaus komplexer ist und alle Immunzellen mit ihren Effektorfunktionen einschließt (Rossi und Fasel 2018). Beispielsweise scheint das proinflammatorische Zytokin IL-17, das vor allem von TH17-Zellen produziert wird, auch weitreichenden Einfluss auf die Pathogenese der Leishmaniose zu nehmen (Lopez Kostka et al. 2009; Gonzalez-Lombana et al. 2013).

1.4.4 Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Leishmanieninfektion

Es wird vermutet, dass die initiale Immunantwort, die Phagozytose der Leishmanien durch Neutrophile, großen Einfluss auf den gesamten Infektionsverlauf hat (Peters und Sacks 2009). Ihre schnelle Rekrutierung sowie massive Infiltration in mit *L. major* infiziertes Gewebe kann mittels Zweiphotonenmikroskopie beobachtet werden (Peters et al. 2008). Ihre Rolle während der KL ist komplex und kann sich stark abhängig von der infizierenden Leishmanienart, ihren

Virulenzfaktoren und dem genetischen Hintergrund des infizierten Wirts sowohl pathologisch als auch protektiv auf den Krankheitsverlauf auswirken.

Erste Hinweise einer protektiven Rolle der Neutrophilen bei Infektionen mit *L. major* zeigten sich durch größere Läsionen sowie höhere Parasitenbelastung nach einer Depletion der Neutrophilen in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen (Lima et al. 1998; Passelli et al. 2021). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei mit *L. amazonensis* oder *L. braziliensis* infizierten BALB/c-Mäusen deren Neutrophile depletiert wurden (Sousa et al. 2014; Novais et al. 2009). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu nachfolgend gemachten Beobachtungen, was vermutlich durch unterschiedliche Dosierungen der infizierenden Leishmanienarten, die verschiedenen verwendeten AK zur Depletion der Neutrophilen sowie die unterschiedlichen genetischen Hintergründe der Wirte erklärbar ist (Passelli et al. 2021).

Peters et al. konnten nämlich im Gegensatz zu den vorher aufgeführten Ergebnissen zeigen, dass die Infektion mit *L. major* in C57BL/6-Mäusen bei einer Depletion der Neutrophilen weniger produktiv ausgelöst werden kann, was die kritische Rolle der Neutrophilen bei der KL unterstreicht (Peters et al. 2008). Diese Beobachtung konnte auch nach Infektion neutropenischer Mäuse mit dem Parasitenstamm *L. major* Seidman gemacht werden, die fähig waren die Infektion erfolgreich zu bekämpfen und chronische Läsionen, die normalerweise in nicht-neutropenischen C57BL/6-Mäusen auftraten, abwenden konnten (Charmoy et al. 2016). Ein Erklärungsansatz für derartige Beobachtungen ist, dass Neutrophile *L. major* als „Trojanische Pferde“ dienen, um einen „stillen Eintritt“ in ihre primären Wirtszellen, die M Φ , die etwa 2 Tage später an den Infektionsort rekrutiert werden, zu ermöglichen (van Zandbergen et al. 2004). Der verlängerte Lebenszyklus der Neutrophilen auf 2-3 Tage, die sich normalerweise nach 6-12 h einer spontanen Apoptose unterziehen, ist assoziiert mit einer durch Leishmanien induzierten Verminderung der Caspase-3-Aktivität (Aga et al. 2002). Neben der Theorie des „Trojanischen Pferdes“, existiert das Modell des „Trojanischen Hasen“ in der Leishmanieninfektion, bei dem Leishmanien sich die Phagozytose der apoptotischen Neutrophilen durch M Φ zunutze machen, indem sie dabei simultan M Φ infizieren und somit durch ihre gedämpfte Aktivität in ihnen überleben können (Ritter et al. 2009) (**Abbildung 6**).

In Vivo konnte die Infektion von M Φ durch die Aufnahme apoptotischer, mit *L. major* infizierter Neutrophiler, beschrieben durch das Modell des „Trojanischen Pferdes“, bereits nachgewiesen werden (Chaves et al. 2020). Im Infektionsmodell mit *L. mexicana* kann ihr Überleben nach Beschlagnahmung durch Neutrophile ebenfalls nachgewiesen sowie gezeigt werden, dass dadurch die Rekrutierung der für die protektive Immunantwort benötigten DZ verschlechtert wird (Hurrell et al. 2015). Im Gegensatz dazu können Neutrophile durch Interaktion mit *L. amazonensis*- und *L. braziliensis*-infizierten M Φ zur Infektionsbekämpfung und Heilung beitragen (Souza Carmo et al. 2010; Novais et al. 2009; Scott und Novais 2016). Dies

verdeutlicht die Abhängigkeit der ausgelösten Immunreaktionen von den unterschiedlichen Leishmanienarten.

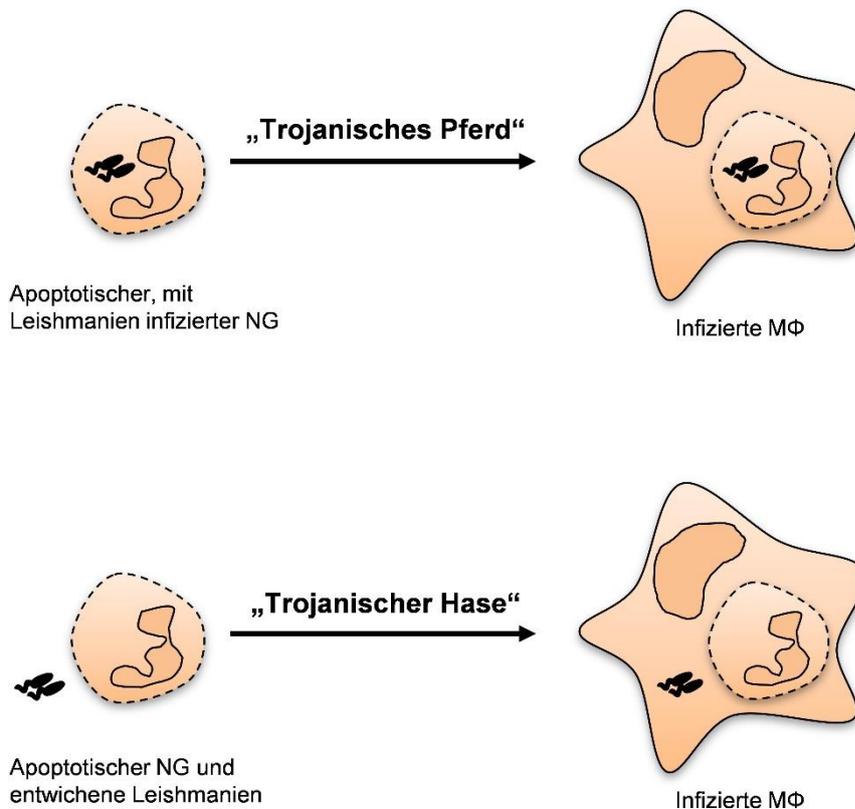


Abbildung 6 Modell des „Trojanischen Pferdes“ und des „Trojanischen Hasen“ in der Leishmanieninfektion.

Durch die Phagozytose von infizierten, apoptotischen neutrophilen Granulozyten (NG) durch MΦ gelangen die Leishmanien unentdeckt in ihre primäre Wirtszelle, die MΦ, weswegen den Neutrophilen in dieser Theorie die Rolle des „Trojanischen Pferdes“ zugesprochen wird. In der Theorie des „Trojanischen Hasen“ „verstecken“ sich Leishmanien hinter den apoptotischen NG, um die MΦ nach Aufnahme des apoptotischen Materials, in einer Phase der herunterregulierten Aktivität, zu infizieren und in ihnen überleben zu können.

Quelle: In Anlehnung an Ritter et al. 2009, S. 507, einzelne Abbildungsbestandteile ursprünglich entworfen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas J. Müller, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Magdeburg.

Interessanterweise konnte bei Infektionen mit *L. mexicana* nachgewiesen werden, dass die intrazelluläre Vermehrung der Leishmanien neben den primären Wirtszellen, den DZ und MΦ, bei chronischen Verläufen ebenfalls in Neutrophilen stattfinden kann (Hurrell et al. 2017). Dies scheint auch abhängig von der Leishmanienart zu sein, da Replikationen von *L. major* in Neutrophilen schlechter möglich sind (Regli et al. 2020).

Dass Mikroorganismen die protektiven Funktionen der Neutrophilen, wie die Phagozytose mit folgender Abtötung, z. B. durch Blockierung ihrer Produktion von ROS, umgehen können, konnte bei einigen Pathogenen gezeigt werden (Urban et al. 2006; Dupré-Crochet et al. 2013). Auch Leishmanien gelingt es die Funktionen der Neutrophilen zu beeinflussen und den Abtötungsmechanismen der Neutrophilen auszuweichen, um in ihnen überleben zu können

(Hurrell et al. 2016; Regli et al. 2017). Nachfolgend werden einige Pathogenitätsfaktoren der Leishmanien beispielhaft dargestellt. Die apoptotische promastigote Form der Leishmanien exprimiert Phosphatidylserin als „Iss-mich“ Signal und kann damit Effektorfunktionen der Neutrophilen ausschalten, um den nicht-apoptotischen Parasiten ein Überleben in ihnen zu ermöglichen (van Zandbergen et al. 2006). Ein Virulenzfaktor der promastigoten Form der Leishmanien ist ihre Hülle bestehend aus Lipophosphoglykanen, die vor komplementvermittelten Angriffen schützt, die NADPH-Oxidase zur Bildung von ROS in Neutrophilen (vgl. **Abbildung 2**) blockieren kann und einen noch nicht abschließend geklärten Einfluss auf die Fusion der Lysosomen mit dem Phagosom hat (Forestier et al. 2014; Puentes et al. 1990; Desjardins und Descoteaux 1997; Forestier et al. 2011). Im Rahmen von Infektionen mit *L. amazonensis* konnte nachgewiesen werden, dass die Reaktionen der Neutrophilen gegenüber amastigoten und promastigoten Formen der Leishmanien unterschiedlich waren und dass Amastigote die Abtötungsmechanismen abwehren konnten (Carlsen et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnten amastigote Formen von *L. braziliensis* durch Neutrophile effizient getötet werden (Carlsen et al. 2015; Hurrell et al. 2017). Neben der Phagozytose können einige Leishmanienarten, z. B. *L. amazonensis*, mittels NETose bekämpft werden (Guimarães-Costa et al. 2009). NET können jedoch durch Endonukleasen aus Speicheldrüsen der Sandmücken zerstört werden, was den Leishmanien ermöglicht in Neutrophilen zu überleben (Chagas et al. 2014).

Zu den Funktionen der Neutrophilen gehören neben der intrazellulären Abtötung von Pathogenen auch die Immunregulation über Zytokinfreisetzung und diverse Zellinteraktionen, sodass sie auch adaptive Immunantworten beeinflussen können (Mantovani et al. 2011; Oualha et al. 2019). In mit *L. major* infizierten BALB/c-Mäusen konnte in Abwesenheit von Neutrophilen eine Heilung sowie eine verminderte T_H2-Zell-Immunantwort beobachtet werden, weswegen vermutet wird, dass Neutrophile einen stimulierenden Einfluss zugunsten der T_H2-Zell-Immunantwort bei KL haben (Tacchini-Cottier et al. 2000). Daneben trugen auch die Interaktionen von Neutrophilen mit T_H17-Zellen zu chronischen Infektionsverläufen von BALB/c-Mäusen mit *L. mexicana* bei (Pedraza-Zamora et al. 2017).

Die beschriebenen protektiven und pathologischen Rollen der Neutrophilen im Rahmen von Leishmanieninfektionen sowie die Beeinflussung ihrer Effektorfunktionen durch Leishmanien zeigen, dass ihre Pathophysiologie während der Infektion näher untersucht werden sollte, um sich ihre gezielte Steuerung in der Bekämpfung der Erkrankung zunutze machen zu können.

1.5 Zielstellung dieser Arbeit

Die Funktionen des Oberflächenproteins Ly6G sind Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht abschließend geklärt. Ly6G wird bislang hauptsächlich zur Identifizierung oder Depletion muriner Neutrophiler verwendet und in humanen Neutrophilen existiert das Homolog CD177. Es konnte gezeigt werden, dass über Ly6G-AK-Bindung die Rekrutierung von Neutrophilen über β -2-Integrin-abhängige Mechanismen blockiert werden kann (Wang et al. 2012). Existierende Studien, die die Rolle des Ly6G untersucht haben, verwendeten oftmals diverse AK zur Depletion von Ly6G. Um spezifisch den Einfluss des Oberflächenproteins Ly6G auf die Interaktionen von Immunzellen untersuchen zu können, werden in dieser Arbeit genetisch veränderte Mäuse des „Catchup-Modells“ verwendet, deren homozygote Formen kein Ly6G und deren heterozygote Formen eine \approx 50%ige Reduktion in der Ly6G-Expression aufweisen (2.1.5). Der genetische Ly6G-Mangel zeigte *in vivo* zumindest in sterilen Entzündungsmodellen sowie Mykosen keine Veränderungen der Neutrophilenmigration (Hasenberg et al. 2015). Inwieweit der genetische Ly6G-Mangel die Dynamik von Neutrophilen im Infektionsmodell mit dem protozoischen Parasiten *L. major* verändert, wurde bislang nicht untersucht. Aus diesen Gründen wird in der vorliegenden Arbeit ein Infektionsmodell mit *L. major* verwendet (2.1.6) und die Interaktionen von *L. major* mit Neutrophilen werden *in vivo* mittels Zweiphotonenmikroskopie beobachtet (2.2.7). Neutrophile werden als erste Immunzellen an den Infektionsort rekrutiert und phagozytieren die Erreger (Peters et al. 2008). Infizierte Neutrophile werden nach etwa 2 Tagen durch DZ und M Φ aufgenommen, was den weiteren Infektionsverlauf beeinflusst (Ribeiro-Gomes et al. 2012). β -2-Integrine können als Rezeptoren der Efferozytose dienen und somit die Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen initiieren (Kourtzelis et al. 2017). Daher wird in dieser Arbeit mittels FACS-Analyse untersucht (2.2.5), inwieweit die Phagozytose von infizierten, apoptotischen Neutrophilen durch DZ und M Φ sowie die initiale Phagozytose von *L. major* durch Neutrophile von ihrem Oberflächenprotein Ly6G beeinflusst werden.

Die zentralen Fragestellungen, die in dieser Forschungsarbeit geprüft werden, sind:

1. Hat Ly6G Einfluss auf die Immunantwort gegen *L. major* im Infektionsverlauf? Verändert Ly6G die initiale Phagozytose von *L. major* durch Neutrophile (3.1)?
2. Wird die Phagozytose von mit *L. major* infizierten Neutrophilen durch DZ und M Φ bei einer Ly6G-Defizienz modifiziert (3.2)?
3. Verändern sich bei einer Ly6G-Defizienz die Rekrutierungskinetik der Neutrophilen bei ihrer Migration in *L. major*-infiziertes Gewebe und ihre Interaktionen mit *L. major in vivo* (3.3)?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien, Laborgeräte, Mikroskope, Software

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Ort
Deckgläser 24 x 50 mm	IDL, Nidderau, DE
Einmal-Insulinspritzen Omnican® 50	Braun, Melsungen, DE
Falcon® Zellsieb (70 µm, Nylon)	Corning, Inc., Corning, USA
Falcon® 5 ml-Röhrchen (FACS)	Corning, Inc., Corning, USA
LS Columns (MACS)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
Menzel-Gläser SUPERFROST® (Objektträger)	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Pipettenspitze 100-1000 µl	Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, USA
Pipettenspitze 2-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitze 0,1-10 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Pre-Separation Filters, 70 µm (MACS)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
T25-Zellkulturflaschen (Grundfläche 25 cm ²)	Corning, Inc., Corning, USA
Well-Platte (96)	TPP, Trasadingen, CH
15 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 3: Laborgeräte.

Laborgeräte	Hersteller, Ort
Heratherm Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Incubating Cooling Orbital Shaker	VWR, Darmstadt, DE
Leica CM 3050 (Kryostat)	Leica Microsystems, Wetzlar, DE

MATERIAL UND METHODEN

MACS® MultiStand (Ständer)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
Heraeus Multifuge 1 S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NanoFil 35G Needle 2PK (Mikroinjektionsspritze)	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA
Neubauer Zählkammer (Kammertiefe: 0,1 mm, Kleinstquadrat: 0,0025 mm ²)	LO - Laboroptik Ltd, Lancing, GB
QuadroMACS Separator (Separationseinheit)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Wasserbad W22	Labortechnik Medingen, Dresden, DE
Zentrifuge 1-16K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, DE
Durchflusszytometer	
FACSAria™ III	BD Biosciences, Heidelberg, DE
LSRFortessa™	BD Biosciences, Heidelberg, DE

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 4: Mikroskope.

Mikroskope	Hersteller, Ort
Konfokalmikroskop	
HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL (Objektiv)	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Leica TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Zweiphotonenmikroskop	
LSM 700	Zeiss, Oberkochen, DE
Mai Tai DeepSee Ti:Sa Laser	Spectra-Physics, Santa Clara, USA
W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC VIS-IR (Objektiv)	Zeiss, Oberkochen, DE
Durchlichtmikroskop	
Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, DE

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 5: Software.

Software	Hersteller, Ort
BD FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg, DE
DisclT	(Moreau et al. 2012)

MATERIAL UND METHODEN

Fiji	NIH, http://rsb.info.nih.gov/ij/
FlowJo X	FlowJo, LLC, Ashland, USA
Imaris	Bitplane, Oxford Instruments, Belfast, GB
Las X	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA
ZEN acquisition	Zeiss, Oberkochen, DE

Quelle: Eigene Darstellung.

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien.

Substanz	Hersteller, Ort
Acepromazin, Vetranquil® 1 %	Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, DE
Adenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
AngioSPARK® 680	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA
BD FACS Flow™ Trägerflüssigkeit	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD FACS™ Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD FACS™ Clean	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Biopterin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Biotin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Bovines Serumalbumin (= Albumin Fraktion V)	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
DNase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Erdnuss-Agglutinin	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Ethanol (99 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Fetal Calf Serum (FCS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Hemin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Hygromycin B (50 µg/µl)	Invitrogen, Waltham, USA
Isofluran CP®, 1 ml/ml	CP-Pharma, Burgdorf, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ketamin 10 %	Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, DE

MATERIAL UND METHODEN

Kollagenase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Liquid Blocker	Daido Songyo Co., Tokio, JP
M119 medium	Biochrom GmbH, Berlin, DE
NaHCO ₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
PBS Dulbecco (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
RPMI 1640 medium	Merck, Darmstadt, DE
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura, AV Alphen aan den Rijn, NL
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Vectashield®	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Vidisic® Augengel	Bausch + Lomb GmbH, Berlin, DE
Xylazin, Rompun® 2 %	Bayer AG, Leverkusen, DE

Quelle: Eigene Darstellung.

2.1.3 Puffer und Medien

Tabelle 7: Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Blockierpuffer in PBS	10 % (m/V) Bovine Serum Albumin
FACS/MACS-Puffer in PBS	0,5 % (m/V) FCS 1 mM EDTA
PBS in ddH ₂ O, pH 7,4	140 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 8: Medien.

Medien	Zusammensetzung
<i>Leishmania</i> -Kulturmedium	1 x M199 10 mM Adenin 100 x Penicillin/Streptomycin 5 mg/ml Hemin 1 mg/ml Biotin

MATERIAL UND METHODEN

	2 mg/ml Biopterin
	7,5 % (m/V) NaHCO ₃
<i>Leishmania</i> -Wachstumsmedium	<i>Leishmania</i> -Kulturmedium
	10 % (m/V) FCS

Quelle: Eigene Darstellung.

2.1.4 Antikörper

Tabelle 9: Antikörper zur immunhistochemischen Färbung von Mausohr-Querschnitten für die Konfokalmikroskopie.

Die AK wurden in Blockier-Puffer verdünnt.

Antikörper	Spezies/Klon	Hersteller	Verdünnung	Markierung
CD11c (purified hamster anti-mouse)	HL3	BD Biosciences, Heidelberg, DE	1:100	keine
CD54 (purified hamster anti-mouse)	3E2	BD Biosciences, Heidelberg, DE	1:100	keine
goat anti-armenian hamster IgG (H+L)	polyklonal	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA	1:200	AF647

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 10: Antikörper für FACS.

Die AK wurden in FACS/MACS-Puffer verdünnt.

Antikörper	Spezies/Klon	Hersteller	Verdünnung	Markierung
CD11b	M1/70	BioLegend, Koblenz, DE	1:400	APC-Cy7
CD11c	N418	BioLegend	1:200	APC
CD16/32	93	BioLegend	1:200	keine (Fc-Block)
CD45	30-F11	BioLegend	1:200	PerCP/Cy5.5
CD45.2	104	BioLegend	1:200	PerCP/Cy5.5
Ly6C	HK1.4	BioLegend	1:200	PE-Cy7
Ly6G	1A8	BioLegend	1:200	BV421
I-A/I-E (MHC II)	M5/114.15.2	BioLegend	1:200	BV510

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 11: MicroBeads® für MACS.

Der AK wurde in FACS/MACS-Puffer verdünnt.

Antikörper	Spezies/Klon	Hersteller	Verdünnung
CD45	30F11.1	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE	1:20

Quelle: Eigene Darstellung.

2.1.5 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammten aus eigener Zucht und wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (*engl. specific-pathogen-free, SPF*) im Pawlow-Haus auf dem Campus des Universitätsklinikums der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gehalten.

Alle tierexperimentellen Verfahren wurden nach Prüfung und Genehmigung des Tierversuchsantrages durch die Ethikkommission des Amtes für Veterinärwesen des Landes Sachsen-Anhalt unter den Aktenzeichen IMKI/G/03-1253/14 und IMKI/G/01-1314/15 in Übereinstimmung mit den Rechtsvorschriften der Europäischen Union (Richtlinie des EU-Rates 499 2010/63/EU) und der Bundesrepublik Deutschland (gemäß § 8, Abs. 1 TierSchG und TierSchVersV) durchgeführt. Alle Tierversuche wurden nach den ARRIVE-Richtlinien durchgeführt. Für die Experimente wurden männliche und weibliche Mäuse in einem Alter von 8-15 Wochen genutzt.

Die Haltung der Tiere erfolgte in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus mit Dämmerungsphasen. Den Mäusen wurde Grundfutter sowie Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

2.1.5.1 Catchup-Mäuse

Um die Rolle des Ly6G-Proteins untersuchen zu können, wurde eine genetisch veränderte Maus kreiert. Die C57BL/6-Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato)Arte))-Maus des sogenannten „Catchup-Modells“ wurde für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendet (Hasenberg et al. 2015).

Die Mauslinie zeichnet sich dadurch aus, dass das Exon 1 des Ly6G gegen das Cre-T2A-tdTomato-Gen ausgetauscht wird, das für eine Cre-Rekombinase und das fluoreszierende Protein tdTomato codiert (Shaner et al. 2004). Getrennt werden sie durch das sich autokatalytisch spleißende T2A-Peptid (Szymczak et al. 2004).

Heterozygote Catchup-Mäuse (Ly6G^{+/-}) weisen eine ≈ 50%ige Reduktion in der Expression des Oberflächenproteins Ly6G und genetisch veränderte Neutrophile auf, die durch das tdTomato markiert sind. Ein vollständiges Fehlen des Ly6G findet man bei homozygoten Catchup-Mäusen (Ly6G^{-/-}).

Die entsprechenden Kontrolltiere (Ly6G^{+/+}) sind Wurfgeschwister (*engl. littermate*) und weisen gleiche Expressionslevel des tdTomatos auf, besitzen jedoch Ly6G auf beiden Allelen durch das homozygote Fehlen der Cre-Rekombinasen.

2.1.5.2 Catchup^{IVM-red}-Mäuse

Nach der Verkreuzung der Catchup-Maus mit einer Reportermaus, die durch den Cre-aktivierbaren CAG-Promotor im ROSA26 Locus hohe Expressionslevel von tdTomato aufweist (Madisen et al. 2010), erhält man die sogenannten Catchup^{IVM-red}-Mäuse. Mit diesen Mäusen war es möglich, die Interaktionen von Neutrophilen mit Leishmanien *in vivo* in der Zweiphotonenmikroskopie zu beobachten. Mit der Durchflusszytometrie konnten Zellpopulationen aus diesen Mäusen differenziert werden, die Neutrophile phagozytiert haben.

2.1.6 Leishmanien

Für die Experimente dieser Arbeit wurde der Parasitenstamm *Leishmania major* LRC-L137 V121 als Wildtyp oder mit Expression der enhanced-Variante des grün fluoreszierenden Proteins (*engl. enhanced green fluorescent protein*, EGFP) durch Einbau in einen rRNA-kodierenden Abschnitt (Mißlitz et al. 2000), verwendet, der von Toni Aebischer aus dem Robert Koch Institut in Berlin, zur Verfügung gestellt wurde. Die Expression des EGFP in den transfizierten Stämmen geht mit der Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid-Antibiotikum Hygromycin B einher, die über das im Genom integrierte Vektorfragment pLEXSY-hyg2 gewährleistet wird. Durch die Zugabe des Antibiotikums Hygromycin B in das *Leishmania*-Wachstumsmedium (2.1.3) des Parasiten und den ständigen Selektionsdruck wird sichergestellt, dass das Plasmid mit der Information für die Produktion des EGFP und der Hygromycin B-Resistenz erhalten bleibt (Bolhassani et al. 2011).

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Passagierung der Leishmanien

Die Langzeitlagerung der Leishmanien erfolgte in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff. Bei Wiederaufnahme der kryokonservierten Leishmanien in Kultur wurden diese zunächst 30 min zum Auftauen auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Kultivierung in T25-Zellkulturflaschen (Grundfläche 25 cm²) mit einer 1:200-Verdünnung in 10 ml *Leishmania*-Wachstumsmedium (2.1.3) im Inkubator bei 26°C. Bei *L. major*-EGFP wurde 6 µl des Antibiotikums Hygromycin B hinzugefügt (vgl. 2.1.6). Nach 2 Tagen wurden 2 ml der Leishmanien mit 8 ml *Leishmania*-Wachstumsmedium passagiert. Nach weiteren 5 Tagen wurde die Verdünnung bei Passagierung in neues *Leishmania*-Wachstumsmedium erneut auf 1:200 herabgesetzt und erfolgte weiterhin alle 7 Tage mit Überführung der Parasiten in eine neue Zellkulturflasche, um ein Überwachsen der Kultur zu vermeiden. Nach maximal 6 Passagen wurden die Leishmanien-Kulturen inaktiviert und entsorgt.

2.2.2 Isolierung der metazyklischen Promastigoten für die Infektion

Die Isolierung der Leishmanien im hochinfektiösen, metazyklischen und promastigoten Stadium, die sich durch ein langes Flagellum und einen kürzeren Zellkörper auszeichnen, erfolgte in der post-logarithmischen Wachstumsphase durch Negativselektion mittels Erdnuss-Agglutinin 7 Tage nach Passagierung.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur (RT). Die Kultur wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1000 x g, 10 min). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml *Leishmania*-Wachstumsmedium resuspendiert und 50 µl Erdnuss-Agglutinin (1 mg/ml) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Suspension zentrifugiert (100 x g, 10 min). Der Überstand mit den sich darin befindenden metazyklischen Promastigoten wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Um eine ausreichende Versorgung der Parasiten mit Medium sicherzustellen, wurden diese auf 10 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1000 x g, 10 min). Es folgte die Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit anschließender Zentrifugation (1000 x g, 5 min). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Parasiten in 1 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert (1000 x g, 5 min). Es folgte die Aufnahme des Pellets in 50 µl PBS.

Zur Bestimmung der genauen Pathogenanzahl wurden 10 µl einer 1:40-Verdünnung in 4%igem PFA in eine Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm, Fläche der Kleinstquadrate 0,0025 mm²) gegeben. Die Berechnung der Pathogenanzahl erfolgte durch folgende Formel:

$$\text{Pathogenanzahl} = \frac{\text{Zellzahl aus 4 Quadranten} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Volumen [ml]} \cdot 10^4}{4}$$

Je nach gezählter Pathogenanzahl und Zielkonzentration für die Infektion wurde das Volumen mit PBS angepasst.

2.2.3 Infektion der Mäuse mit Leishmanien

Vor der Infektion der Mäuse mit Leishmanien wurden sie mit 100 mg Ketamin und 10 mg Xylazin pro kg Körpergewicht (Arras et al. 2001) mit einer Einmal-Insulinspritze mit integrierter Kanüle intraperitoneal anästhesiert. Die Infektion der Mäuse erfolgte in allen Experimenten subkutan am Ohr. Dazu wurde das Ohr auf einer Klebefläche unter dem Lichtmikroskop befestigt. Mithilfe einer Mikroinjektionsspritze konnte das zu injizierende Volumen dosiert werden.

Im weiteren Verlauf wurde mithilfe eines klinischen Beurteilungsblattes (sog. Score Sheet) der aktuelle Tierstatus des infizierten Tieres bewertet.

2.2.4 Konfokalmikroskopie

2.2.4.1 Fixierung des mit *L. major* infizierten Ohrgewebes

Drei Tage nach der Infektion wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Anästhesie erfolgte vorher mit Isofluran. Die Ohren wurden mithilfe einer Schere abgeschnitten und für 2 h in 1 ml 4%igen PFA fixiert. Anschließend wurden sie in 20%ige Saccharose in PBS-Lösung gelegt, bevor sie in 2,5 ml Proberöhrchen halbgefüllt mit Tissue-Tek® O.C.T.™-Medium mit der Schnittseite nach unten überführt wurden. Flüssigstickstoff wurde zum Schockgefrieren der Proben verwendet, bevor die Lagerung bei -80 °C erfolgte.

2.2.4.2 Gewebequerschnitte mittels Gefriermikrotom

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden von den in Tissue-Tek® O.C.T.™-Medium gefrorenen Mausohren 20 µm dicke Querschnitte bei einer Kühltemperatur von -20 °C und einer Oberflächentemperatur von -25 °C mit dem Kryostat Leica CM 3050 angefertigt. Die Schnitte wurden auf SUPERFROST®-Objektträger gezogen und anschließend 2 h bei RT getrocknet.

2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung von Mausohr-Querschnitten

Die Färbeschritte erfolgten bei RT. Zunächst wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem Liquid Blocker umkreist. Danach wurden sie mit PBS gewaschen und 10 min mit 0,2 % Triton X-100 in PBS zur Permeabilisierung inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit PBS, bevor sie 1 h in Blockierpuffer (**Tabelle 7**) inkubiert wurden, um unspezifische AK-Bindungen zu vermeiden.

Der Primär-AK (**Tabelle 9**) wurde in einer 1:100-Verdünnung in Blockierpuffer hinzu pipettiert. Die Schnitte wurden mit einer Alufolie abgedeckt, damit die Farbstoffe nicht ausbleichen und nach 1 h mit PBS ausgewaschen, bevor mit dem Sekundär-AK AF647 in einer

1:200-Verdünnung in Blockierpuffer gefärbt wurde. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen, bevor sie mit DAPI in einer Konzentration von 1:10000 in PBS für 10 min inkubiert wurden. Dieser Farbstoff reichert sich bevorzugt in AT-reichen DNA-Regionen an und dient hier der Kernfärbung. Abschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit einem Tropfen Vectashield® versehen, der ein Ausbleichen der Fluoreszenzproteine verhindern soll. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Die Mikrotomschnitte können in dieser Form 1 Woche im Dunkeln bei 4 °C gelagert werden.

2.2.4.4 Konfokalmikroskopie und Analyse der Antikörperfärbung

Die fixierten und gefärbten Zellen konnten mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP8 bei 40-facher Vergrößerung mit dem Objektiv HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL analysiert werden. Es gehört zu den Fluoreszenzmikroskopen und ermöglicht eine dreidimensionale Bildgebung. Dazu wird neben den zweidimensionalen Ebenen x und y die weitere vertikale Ebene z geschaffen, indem das Präparat an bestimmten Punkten in mehreren Schichten nacheinander mit einem Laser beleuchtet wird. Das emittierte Licht der jeweiligen Fokusebene wird durch eine Lochblende detektiert, welche Streulicht der darüber- oder darunterliegenden Schichten herausfiltert und so ein hochkontrastiertes Schnittbild erzeugt (Murphy et al. 2012, S. 733–734).

Es wurden Laser mit Wellenlängen von 405 nm, 488 nm (Argon-Laser), 561 nm und 633 nm genutzt. Als Negativkontrollen dienten Präparate, die ohne Primär-AK gefärbt wurden. Anhand dieser konnten die Laserintensitäten eingestellt werden, die für die Betrachtung der AK-Färbungen verwendet wurden. Zur Auswertung diente die ImageJ-Software, mithilfe derer aus dem z-Stapel, der Gesamtheit der z-Ebenen eines Präparates, einzelne Schnittebenen analysiert werden konnten.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der näheren Untersuchung von Zellsuspensionen z. B. mithilfe von Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (*engl. fluorescence-activated cell sorting, FACS*). In der Immunologie dient sie vor allem der Differenzierung von Subpopulationen einer Probe, indem Fluorochrom-gekoppelte AK verwendet werden, die an spezifische Oberflächenproteine der zu analysierenden Zellpopulationen binden.

Während jede Zelle einer Probe einzeln eine Messkammer durchläuft, wird sie mit Laserlicht angestrahlt, woraufhin es gestreut wird. Während das Vorwärtsstreulicht eine Unterscheidung der Zellen nach relativer Größe ermöglicht, erlaubt die Seitwärtsstreuung eine Differenzierung anhand ihrer Granularität. Gleichzeitig wird der an sie gebundene Fluoreszenzfarbstoff angeregt und emittiert Licht in seiner spezifischen Wellenlänge.

2.2.5.1 Vorbereitung und Färbung der Zellen zur FACS-Analyse

Nach erfolgter Anästhesie mit Isofluran wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die infizierten Mausohren wurden mit einer Schere abgeschnitten, mit Pinzetten in eine ventrale und eine dorsale Hautschicht getrennt und in RPMI 1640 Medium mit 1 mg/ml Kollagenase und 50 µg/ml DNase für 1 h auf einem Thermomixer bei 37 °C und 600 rpm enzymatisch verdaut. Anschließend wurde die Probe mit dem Kolben einer Spritze durch ein Nylon-Zellsieb (70 µm) gedrückt, um die Zellen freizusetzen. Nach Zentrifugation mit 300 x g für 10 min bei 4 °C folgten Waschschriffe mit PBS und FACS/MACS-Puffer (**Tabelle 7**). Bei manchen Experimenten erfolgte vor der Färbung der Zellen mit Fluoreszenzstoff-markierten AK eine Zellisolation von CD45⁺-Zellen mittels MACS-Methode (vgl. **2.2.5.2**). Um unspezifische, falsch-positive AK-Färbungen zu vermeiden bzw. zu reduzieren, wurden die Proben mit Fc-Block (CD16/32-AK) für 15 min in 1:200-Verdünnung auf Eis gelagert. Anschließend wurden die AK (**Tabelle 10**) hinzupipettiert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (573 x g, 5 min, 4 °C) wurden die Proben in 300 µl FACS/MACS-Puffer resuspendiert und nach Filtration in FACS-Röhrchen zur Messung überführt.

Rekrutierte Zellpopulationen infizierter Catchup-Mäuse wurden am LSR Fortessa-Durchflusszytometer mit Lasern der Wellenlängen 405 nm 488 nm 640 nm analysiert. Das FACS ARIA III-Durchflusszytometer wurde bei Infektionen von Catchup^{IVM-red}-Mäusen verwendet mit Lasern der Wellenlängen 405 nm 488 nm 561 nm 633 nm. Hierbei konnte das Fluoreszenzsignal der tdTomato-markierten Neutrophilen der Catchup^{IVM-red}-Mäuse mit Laserlicht einer Wellenlänge von 561 nm angeregt werden und mit einer Emission von 582/15 nm detektiert werden. Die Detektion des EGFP-Signals der Leishmanien erfolgte nach Anregung durch den 488 nm-Laser bei einer Lichtemission von 530/30 nm.

2.2.5.2 CD45⁺-Zellseparation durch an Magnetpartikel gekoppelte Antikörper

Für einige FACS-Analysen wurden aus den Proben CD45⁺-Zellen durch magnetische Zellseparation (*engl. magnetic activated cell sorting, MACS*) aufgereinigt. Dadurch konnte die Autofluoreszenz der Proben vermindert und die Phagozytose von Neutrophilen und Leishmanien durch DZ und MΦ genauer quantifiziert werden (vgl. **3.2.2**) Die an Magnetpartikel gekoppelten AK bezeichnet man als MicroBeads[®] und diese haben einen Durchmesser von etwa 100 nm (Miltenyi et al. 1990).

Die Proben wurden mit CD45 MicroBeads[®] in einer Verdünnung von 1:20 (**Tabelle 11**) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen der Proben mit FACS/MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (573 x g, 5 min, 4 °C) wurden die Proben in 500 µl FACS/MACS-Puffer resuspendiert und in die LS Säulen gefüllt, die vorher mit PBS durchgespült wurden. Diese befanden sich in einem magnetischen Feld und wurden 3-mal mit je 3 ml gespült. Bei der hier durchgeführten Positivselektion befanden sich die gesuchten

Zellen anschließend in der Säule. Die Säulen wurden aus dem magnetischen Feld herausgenommen und die Zellen mithilfe eines Stempels und 5 ml FACS/MACS-Puffer zügig herausgespült. Nach Zentrifugation (300 x g, 10 min, 4 °C) der aufgereinigten CD45⁺-Zellen wurden sie in 1 ml FACS/MACS-Puffer resuspendiert und gefärbt wie unter **2.2.5.1** beschrieben.

2.2.5.3 Datenanalyse mittels Software FlowJo X

Die durchflusszytometrischen Daten wurden nach manuell eingestellter Kompensation mit dem Setzen von sogenannten Gates in Punktauftragung (*engl. Dotplot*) der spezifischen Oberflächenproteine mit der Software FlowJo X ausgewertet. Gates sind die manuell durch den Untersucher gesetzten Fenster und dienen der Abgrenzung der positiven von der negativen Restpopulation. Dies ermöglicht das Herausfiltern von gesuchten Zielpopulationen aus Zellsuspensionen.

2.2.6 Verdünnungsreihe

Um die Parasitenbelastung im mit *L. major*-EGFP infizierten Ohrgehör zu analysieren, wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Nach Passierung der enzymatisch verdauten Ohren durch ein Nylon-Zellsieb (70 µm) (vgl. **2.2.5.1**) wurden 10 % der generierten Zellsuspension zentrifugiert (3500 x g, 5 min, RT) und in *Leishmania*-Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension 18-mal in 1:2-Verdünnungsschritten mit *Leishmania*-Wachstumsmedium. Diese Verdünnungsreihe wurde für jede Probe vierfach durchgeführt. Die 100 µl-Proben wurden in 96-Well-Platten für zwei Wochen bei 26°C inkubiert und die anfängliche Parasitenanzahl aus der höchsten Verdünnung mittels Durchlichtmikroskopie bestimmt.

2.2.7 Zweiphotonenmikroskopie

Die Catchup^{IVM-red}-Maus erlaubte es, den Einfluss des Ly6G auf die Dynamik der Neutrophilen bei ihrer Rekrutierung an den Infektionsort mit *L. major* mittels Zweiphotonenmikroskopie *in vivo* zu verfolgen. Diese ist die am weitesten verbreitete Methode der Intravitalmikroskopie. Dadurch war es möglich, fluoreszenzmarkierte Zellen in Echtzeit im lebenden Organismus aufzunehmen und die zeitlichen Abläufe der komplexen Interaktionsprozesse zwischen Neutrophilen und *L. major* zu analysieren.

2.2.7.1 Intravitalmikroskopie

Um einen tiefen und ruhigen Schlaf der Maus während der Intravitalmikroskopie zu erreichen, wurde zusätzlich zur Anästhesie der vorherigen Infektion 3 mg des Neuroleptikums und Sedativums Acepromazin pro kg Körpergewicht injiziert. Um Blutgefäße *in vivo* darstellen zu können wurden in einigen Aufnahmen zusätzlich 50 µl des Fluorophors AngioSPARK® 680

über den retrobulbären Venenplexus appliziert. Das Ohr wurde wie in **Abbildung 7** dargestellt fixiert und die Maus auf einer Wärmeplatte bei 37 °C gelagert.

Zwischen Deckglas und Ohr wurde Vidisic® Augengel appliziert, um ein Vorkommen von Luft zu verhindern. Sowohl nach ca. 60 min als auch nach ca. 180 min wurde die Maus mit 50 % der Initialdosis der erfolgten Anästhesie mit 100 mg Ketamin und 10 mg Xylazin pro kg Körpergewicht nachdosiert. Nach dem Versuch wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

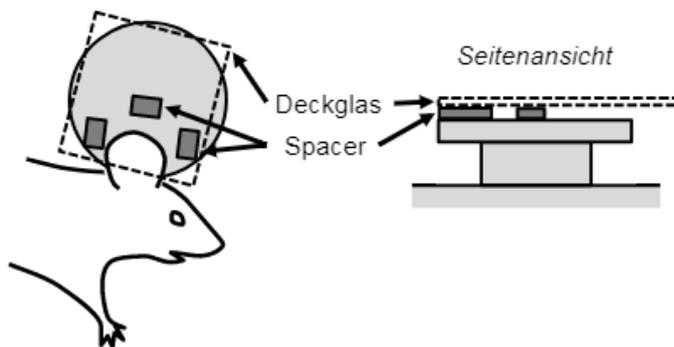


Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Intravitalmikroskopie des Ohres einer Maus unter dem Zweiphotonenmikroskop.

Die Abstandshalter (*engl. spacer*) wurden in der Nähe des Ohres befestigt. Sie vermieden eine zu hohe Druckbelastung des Ohres durch das Deckglas während der Mikroskopie.

Quelle: Abbildung ursprünglich entworfen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas J. Müller, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Magdeburg.

Zur Zweiphotonen-Bildgebung wurde das Mikroskop LSM 700 mit dem Objektiv W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC VIS-IR und dem Laser Mai Tai DeepSee Ti:Sa verwendet. Durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen, die in der Summe die gleiche Energie haben wie ein einzelnes Photon, kann das Fluoreszenzmolekül angeregt werden. In den Experimenten dieser Arbeit wurde für die Anregung der tdTomato-markierten Neutrophilen und der EGFP-markierten Leishmanien im Gewebe daher eine Wellenlänge von 980 nm gewählt (**Abbildung 8**).

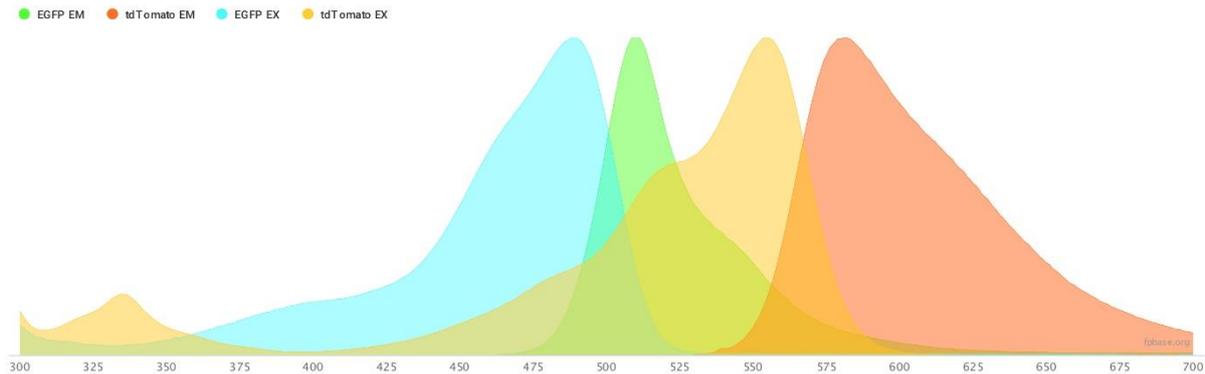


Abbildung 8: Erregungs- (EX) und Emissionsspektren (EM) von EGFP und tdTomato.

Durch die Verwendung einer Wellenlänge von 980 nm können die tdTomato-markierten Neutrophilen und die EGFP-markierten Leishmanien gleichzeitig angeregt werden.

Quelle: <https://www.fpbases.org/spectra/> (abgerufen am 23.08.2019).

Die hohe Photonendichte, die durch gepulstes Laserlicht gewährleistet wird, wird nur in der Fokusebene erreicht, was ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe und Phototoxizität in den umliegenden Schichten verhindert. Durch die räumlich begrenzte Anregung der Moleküle entsteht ein hochkontrastiertes Bild. Höhere Eindringtiefen gegenüber der Konfokalmikroskopie werden durch die Verwendung von langwelligem Laserlicht erreicht. Die Schichten des Gewebes werden nacheinander durch ein schrittweises Bewegen in der vertikalen z-Ebene (vgl. **2.2.4.4**) abgerastert und im Computer im Nachhinein zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt (Murphy et al. 2012, S. 733–734).

Abbildung 9 stellt den Versuchsaufbau schematisch dar. Das emittierte Signal wurde vom Objektiv aufgefangen, über dichroitische Strahlteiler spektral aufgetrennt und nach Durchgang weiterer Filter detektiert. Der erste Langpassfilter (LP-Filter) ließ Strahlung mit höherer Wellenlänge als 625 nm hindurch und detektierte das Signal der mit AngioSPARK® 680-markierten Blutgefäße. Der nachfolgende Dichroit spaltete das Signal bei einer Wellenlänge von 490 nm und detektierte nach Durchgang durch einen Kurzpassfilter (KP-Filter) Wellenlängen unter 485 nm und damit die Frequenzverdopplung (*engl. second harmonic generation*), die Kollagen-Fasern oder Myosin in der quergestreiften Muskulatur zur besseren Orientierung im Präparat sichtbar machte. Der am Ende eingesetzte LP 560-Filter ermöglichte die Differenzierung zwischen den kurzwelligeren Signalen der EGFP-exprimierenden Leishmanien und den längerwelligen Signalen der tdTomato-markierten Neutrophilen.

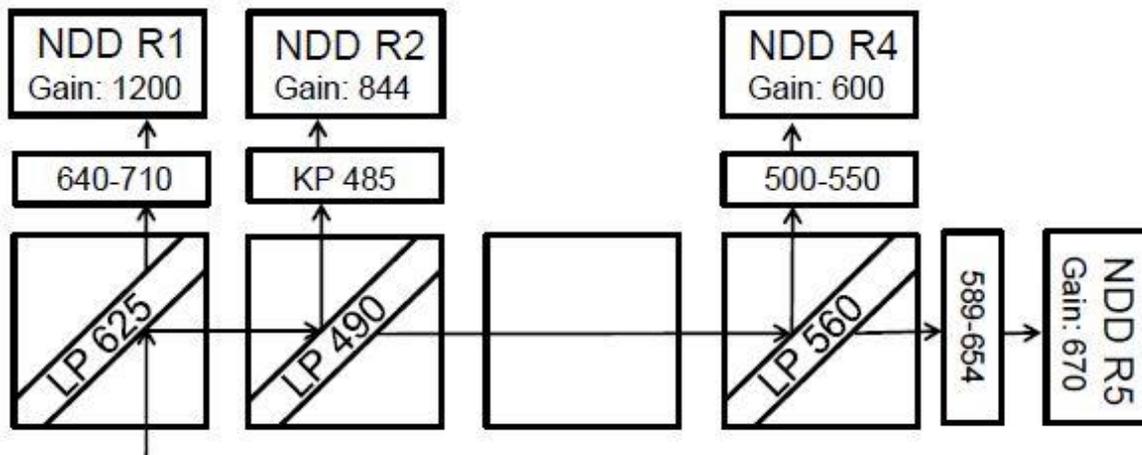


Abbildung 9: Darstellung der Filter und Non Descanned-Detektoren (NDD) für die Zweiphotonenmikroskopie der mit *L. major*-EGFP infizierten Catchup^{IVM-red}-Mäuse.

Die Laserleistung (18 %) und die Verstärkerspannung am Detektor (*engl. gain*) wurden je nach Tagesbedingungen nachjustiert. Zur besseren Übersicht sind die Zahlenangaben der Wellenlängen der Strahlungen ohne die Einheit nm angegeben.

Quelle: Abbildung ursprünglich entworfen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas J. Müller, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Magdeburg.

Die bis zu dreistündigen Aufnahmen wurden mit der Software ZEN acquisition 30 min nach dem Infektionszeitpunkt gestartet und umfassten einen 36 μm dicken z-Stapel mit 10 Schichten. Übersichtsbilder von dem gesamten Infektionsort konnten mit der „Tile-Scan“-Funktion generiert werden (3.3.1). Die Aufnahme benachbarter Orte der Probe und das Zusammenfügen dieser Bilder hinterher ermöglichte die Abbildung eines großen Bereiches der Probe in hoher Auflösung. Diese Bilder umfassten einen 76 μm dicken z-Stapel mit 20 Schichten.

2.2.7.2 Analyse der Neutrophilenrekrutierung

Die Auswertung erfolgte mit der Analysesoftware Imaris. Mit der Option „Isosurface“ konnten Oberflächen aus Gruppen nahe beieinander liegender Voxels generiert werden. So konnten die Neutrophilen markiert und ihnen mittels „Tracking“-Funktion über den aufgenommenen Zeitraum Positionen mit x- und y- Koordinaten zugeordnet werden (**Abbildung 10**).

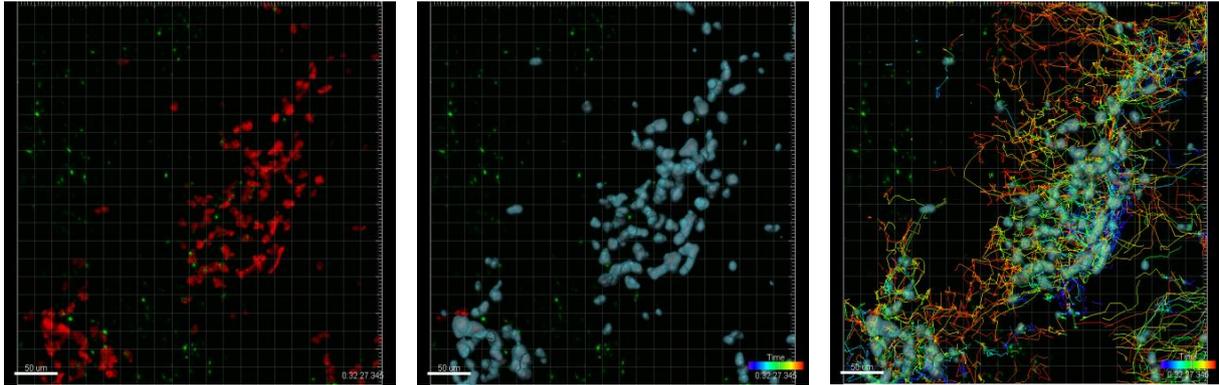


Abbildung 10: Markierung und Verfolgung der Neutrophilen mittels Software Imaris.

Links: Originalbild einer Infektionsstelle mit tdTomato-markierten Neutrophilen und EGFP-markierten Leishmanien; mittig: Oberflächenmarkierung der Neutrophilen; rechts: „Tracking“ ihrer Oberflächen.

Quelle: Screenshot während der Analysen mit der Software Imaris.

2.2.8 Statistik

Die Auswertung und Erstellung der Graphen der erhobenen Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8. Nach überprüfter Normalverteilung der Daten wurde der Mittelwert bestimmt. Die Analyse von zwei Versuchsgruppen erfolgte durch einen ungepaarten t-Test. Bei mehr als zwei Versuchsgruppen wurde die Einweg-Varianzanalyse (*engl. one-way analysis of variance, one-way ANOVA*) mit Bonferroni-Korrektur oder die Zweiweg-Varianzanalyse (*engl. two-way analysis of variance, two-way ANOVA*) mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Die statistische Signifikanz ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und ns, für nicht signifikant, aufgeführt.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Juli 2021 unter dem Titel „Ly6G deficiency alters the dynamics of neutrophil recruitment and pathogen capture during *Leishmania major* skin infection“ in Scientific reports der Nature Publishing Group publiziert (Kleinholz et al. 2021).

3.1 Der Einfluss von Ly6G auf die Immunantwort im Infektionsverlauf

Die Anwesenheit von Neutrophilen zu Beginn der Immunantwort prägt die über Wochen verlaufende Leishmanieninfektion entscheidend (Hurrell et al. 2015). Die hauptsächlich infizierten Zellpopulationen nach Infektion mit *Leishmania major* stellen die Neutrophilen und die von Monozyten abstammenden M Φ und DZ dar (León et al. 2007; Trez et al. 2009; Scott und Novais 2016). Um den Einfluss des Oberflächenproteins Ly6G auf Veränderungen der Immunantwort im Infektionsverlauf beurteilen zu können, wurde die Zusammensetzung rekrutierter Zellen am Infektionsort, die Pathogenanzahl im Gewebe und die Zellinfektionsraten in der initialen Immunantwort 2 Tage, der frühen Immunantwort 7 Tage und in der späten Immunantwort 28 Tage nach Infektion (*engl. post-infection; p.i.*) mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden heterozygote (Ly6G^{+/-}) und homozygote (Ly6G^{-/-}) Catchup- und Catchup^{IVM-red}-Mäuse mit 1×10^6 metazyklischen *L. major*-EGFP in einem Volumen von 5 μ l pro Ohr infiziert (**2.2.3**). Für die Kompensationskontrollen aller an AK gebundenen Fluorochrome wurden Kontrolltiere (Ly6G^{+/+}) mit *L. major* vom Wildtyp und für die Kompensation des EGFP-Signals mit *L. major*-EGFP infiziert. Für die FACS-Analyse wurden die isolierten Zellen mit einem CD45-AK zur Identifizierung der Leukozyten sowie mit Ly6G-, Ly6C-, CD11b-, CD11c- und MHC-Klasse II-AK zur Charakterisierung der Zelluntergruppen gefärbt.

3.1.1 Zusammensetzung rekrutierter Zellen am Infektionsort mit *L. major*

Mithilfe von FACS-Analysen konnten die Subpopulationen der rekrutierten Leukozyten an den Infektionsort zu den Zeitpunkten 2, 7 und 28 Tage p.i. mit *L. major* quantifiziert werden. Um Ly6G-defiziente Neutrophile identifizieren zu können, wurde in dieser Arbeit eine Ly6G-unabhängige Analysestrategie gewählt, in der Neutrophile nach Vorselektion von CD45⁺- und MHCII⁺-Zellen über intermediäre Ly6C-Signale aus CD11b⁺-Zellen selektiert werden konnten (**Abbildung 11 A**). Interessanterweise ließen sich zwischen 2 und 28 Tagen p.i. keine Unterschiede in der Neutrophilenrekrutierung zwischen homo- und heterozygoten Catchup-Mäusen nachweisen (**Abbildung 11 B**). Da gezeigt werden konnte, dass Neutrophile Einfluss auf die nachfolgende Rekrutierung der von Monozyten abstammenden M Φ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁻, MHCII⁺) und DZ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺) haben (Hurrell et al. 2015), wurde auch ihr Anteil an den rekrutierten CD45⁺-Zellen am Infektionsort zu den gleichen

Infektionszeitpunkten untersucht (**Abbildung 11 C**). Während sich zu frühen Infektionszeitpunkten keine Unterschiede zwischen homo- und heterozygoten Catchup-Mäusen feststellen ließen, war der Anteil der von Monozyten abstammenden DZ an zum Infektionsort rekrutierten Leukozyten an Tag 28 p.i. in den homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup-Mäusen signifikant um 30 % vermindert im Vergleich zu den heterozygoten (Ly6G^{+/-}) Catchup-Mäusen (**Abbildung 11 D, E**). Die Ly6G-Expression hat demnach einen Einfluss auf die Rekrutierung von DZ an den Infektionsort.

Da gezeigt werden konnte, dass sich die Ly6C- und CD11b-Oberflächenexpressionen je nach Neutrophilenaktivierung verändern können (Jutila et al. 1994; Dudeck et al. 2021), wurde in dieser Arbeit das mittlere Fluoreszenzsignal dieser Marker in Ly6G-defizienten Tieren bestimmt und mit Ly6G-suffizienten Tieren verglichen. Während sich in den CD11b-Anteilen keine Unterschiede zeigten, konnte ein geringer, aber signifikant erhöhter Wert in der Ly6C-Expression in Ly6G-defizienten Tieren nachgewiesen werden (**Abbildung 11 F**).

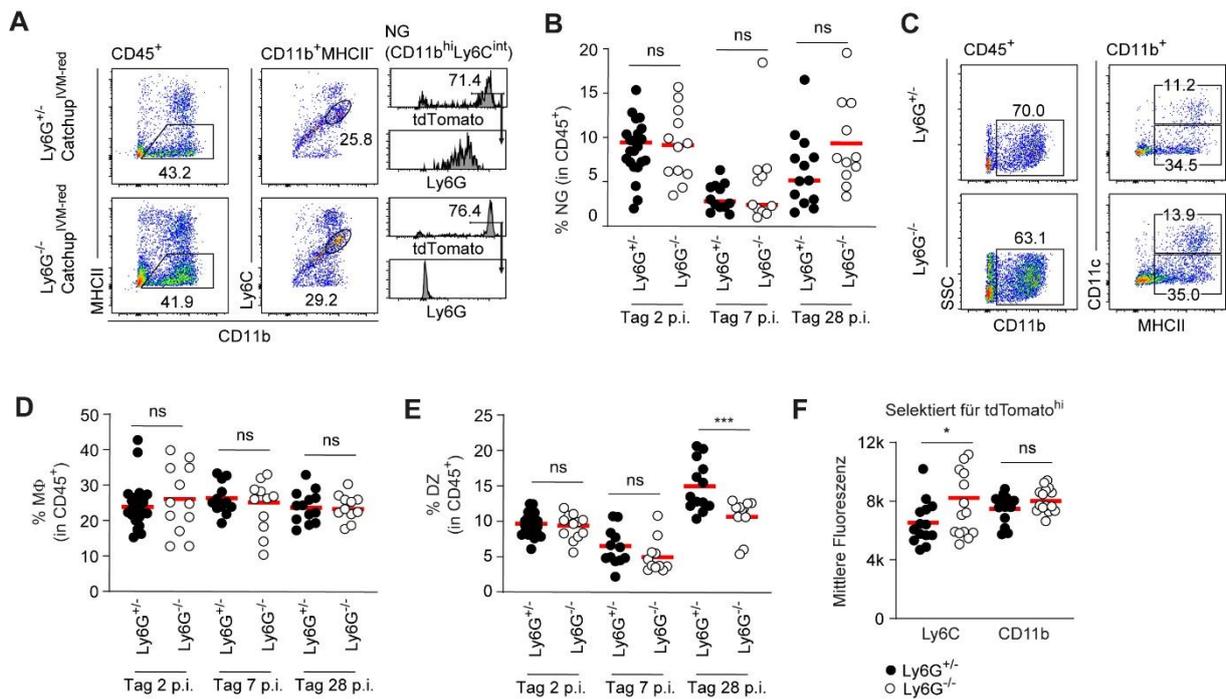


Abbildung 11: Einfluss des Ly6G auf die Zellrekretierung an den Infektionsort mit *L. major*.

Durchflusszytometrische Daten heterozygoter (Ly6G^{+/-}) und homozygoter (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäuse 2 Tage und Catchup-Mäuse 7 und 28 Tage p.i. mit 1 x 10⁶ metazyklischen *L. major*-EGFP pro Ohr. Zellen der Ly6G-suffizienten Tiere sind durch schwarze Symbole und Zellen der Ly6G-defizienten Tiere sind durch weiße Symbole dargestellt.

(A) Analysestrategie zur Ly6G-unabhängigen Detektion der neutrophilen Granulozyten (NG) aus CD45⁺, MHCII⁺, CD11b⁺-Zellen mit intermediären Ly6C-Signalen (links und mittig). Die Histogramme (rechts) stellen die quantifizierten tdTomato- und Ly6G-Signale der selektierten NG (CD11b^{hi}, Ly6C^{int}) in heterozygoten (Ly6G^{+/-}; oben) und homozygoten (Ly6G^{-/-}; unten) Catchup^{IVM-red}-Mäusen dar. **(B)** Anteil [in %] der NG an rekrutierten CD45⁺-Zellen in Ly6G-suffizienten und Ly6G-defizienten Tieren. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; ns, nicht signifikant; bestimmt durch two-way ANOVA (Zeitpunkt, Genotyp) mit Bonferroni-Korrektur für den Genotyp. Daten wurden aus sechs unabhängigen Experimenten gesammelt. **(C)** Analysestrategie zur Identifizierung der aus Monozyten entstandenen MΦ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺) und DZ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺). **(D-E)** Vergleich der Anteile [in %] der DZ und MΦ an rekrutierten Leukozyten (CD45⁺-Zellen) zwischen Ly6G-suffizienten und Ly6G-defizienten Tieren. Auffällig war der signifikant geringere Anteil von DZ an CD45⁺-Zellen in homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup-Mäusen an Tag 28 p.i. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; ***p < 0,001; ns, nicht signifikant; bestimmt durch two-way ANOVA (Zeitpunkt, Genotyp) mit paarweiser Bonferroni-Korrektur. Daten wurden aus sechs unabhängigen Experimenten gesammelt. **(F)** Mittlere Fluoreszenzsignale von Ly6C und CD11b in tdTomato-markierten NG. Die Oberflächenexpression von Ly6C war in Ly6G-defizienten Tieren gering, aber signifikant erhöht. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; *p < 0,05; ns, nicht signifikant; bestimmt durch one-way ANOVA mit paarweiser Bonferroni-Korrektur.

Daten wurden aus sechs unabhängigen Experimenten gesammelt.

Quelle: Abbildung adaptiert aus Kleinholz et al. 2021.

3.1.2 Ly6G-Unabhängigkeit der Pathogenanzahl im mit *L. major* infizierten Gewebe

Durch eine Verdünnungsreihe (vgl. 2.2.6) mit schrittweisem Herabsetzen der Konzentration der Mikroorganismen in flüssigen Nährmedien konnte die Grenzverdünnung ermittelt werden und daraus die anfängliche Pathogenanzahl innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen abgeleitet werden. Wie **Abbildung 12** zeigt, konnten dabei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, die auf ein Vorhandensein von Ly6G zurückzuführen sind.

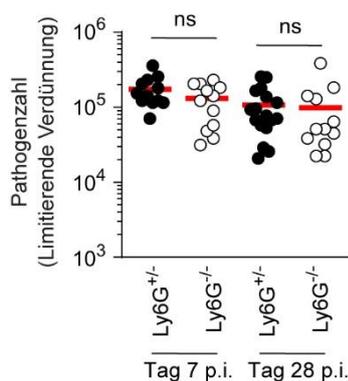


Abbildung 12: Limitierende Verdünnung zeigt Unabhängigkeit der Pathogenzahl von *L. major* im Gewebe von der Ly6G-Expression der Neutrophilen.

Vergleich der Pathogenzahl mittels limitierender Verdünnung von heterozygoten ($Ly6G^{+/-}$) und homozygoten ($Ly6G^{-/-}$) Catchup-Mäusen bei früher Immunantwort 7 Tage p.i. und bei später Immunantwort 28 Tage p.i. nach vorheriger Infektion mit 1×10^6 metazyklischen *L. major*-EGFP pro Ohr.

Die nachweisbare Anzahl an Pathogenen war 7 Tage p.i. höher als 28 Tage p.i. Weder ein Infektionszeitraum von 7 Tagen noch von 28 Tagen zeigte signifikante Unterschiede in der Pathogenzahl zwischen heterozygoten (schwarze Symbole) und homozygoten (weiße Symbole) Catchup-Mäusen. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; ns, nicht signifikant; bestimmt durch two-way ANOVA (Zeitpunkt, Genotyp) mit Bonferroni-Korrektur für den Genotyp.

Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten gesammelt.

Quelle: Abbildung adaptiert aus Kleinholz et al. 2021.

3.1.3 Niedrigere Infektionsraten mit *L. major* von Ly6G-defizienten Neutrophilen zum Infektionsbeginn

Inwieweit eine Ly6G-Defizienz die Infektion der M Φ , DZ und insbesondere der Neutrophilen durch *L. major*-EGFP beeinflussen könnte, ist bislang unbekannt. Durch die in **Abbildung 11 A, C** dargestellte Analysestrategie zur Identifizierung der Neutrophilen, M Φ und DZ konnten anschließend ihre Zellinfektionsraten bestimmt und abhängig von ihrer Ly6G-Expression miteinander verglichen werden. Dabei zeigten die Ly6G-defizienten Neutrophilen der homozygoten Catchup^{IVM-red}-Mäuse zum Zeitpunkt 2 Tage p.i. signifikant um 40 %

verringerte Infektionsraten im Vergleich zu Ly6G-suffizienten Neutrophilen (**Abbildung 13 B**). Dies ist aussagekräftig, da **Abbildung 11 B** zeigt, dass die absoluten Werte der Neutrophilen zu diesem Zeitpunkt annähernd identisch sind und daher unabhängig vom Vorkommen des Ly6G zu sein scheinen. An den Tagen 7 und 28 p.i. mit *L. major*-EGFP war dies nicht mehr sichtbar. Die Aufnahme an Parasiten in MΦ und DZ war zu allen drei Zeitpunkten nicht signifikant unterschiedlich zwischen heterozygoten (Ly6G^{+/-}) und homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup-Mäusen (**Abbildung 13 C, D**). Daher könnte es sein, dass Ly6G-defiziente Mäuse den langfristigen Infektionsverlauf mit *L. major* mit gleicher Effizienz wie Ly6G-suffiziente Mäuse bewältigen können. Ly6G-defiziente Neutrophile phagozytieren aber weniger *L. major* zu frühen Infektionszeitpunkten. Mittels Konfokalmikroskopie konnte die Phagozytose einer in Grün dargestellten EGFP-exprimierenden *L. major* durch einen in Rot dargestellten tdTomato-exprimierenden Neutrophilen beispielhaft gezeigt werden (**Abbildung 13 E**).

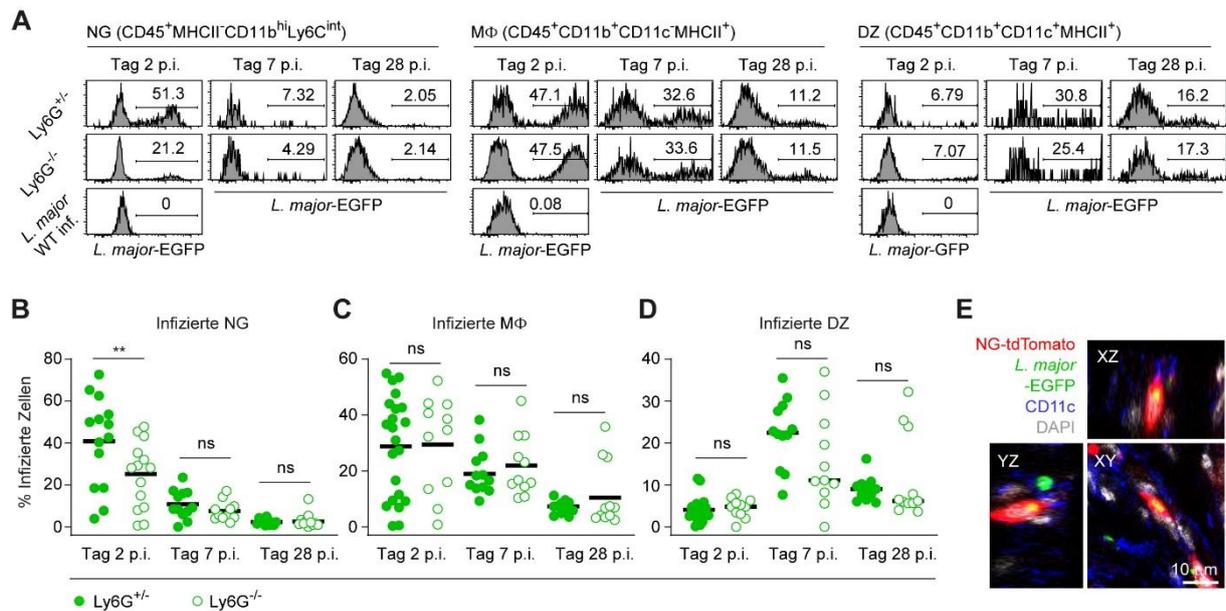


Abbildung 13: Infektionsraten von Neutrophilen, MΦ und DZ mit *L. major*-EGFP.

Durchflusszytometrische Analyse heterozygoter (Ly6G^{+/-}) und homozygoter (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäuse 2 Tage und Catchup-Mäuse 7 und 28 Tage p.i. mit 1 x 10⁶ metazyklischen *L. major*-EGFP pro Ohr.

(A) Histogramme quantifizieren das *L. major*-EGFP Signal in den zuvor selektierten (**Abbildung 11 A, C**) neutrophilen Granulozyten (NG) (CD45⁺, MHCII⁻, CD11b^{hi}, Ly6C^{int}), MΦ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁻, MHCII⁺) und DZ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺). **(B-D)** Zellinfektionsraten [in %] von NG **(B)**, MΦ **(C)** und DZ **(D)**. Zellen der Ly6G-suffizienten Tiere sind durch grüne Symbole und Zellen der Ly6G-defizienten Tiere sind durch weiß, grün umrandete Symbole dargestellt. Ly6G^{-/-}-Neutrophile zeigten eine signifikant geringere Infektionsrate 2 Tage p.i. im Vergleich zu Ly6G^{+/-}-Neutrophilen **(B)**. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; **p < 0,01; ns, nicht signifikant; bestimmt durch two-way ANOVA (Zeitpunkt, Genotyp) mit Bonferroni-Korrektur für den Genotyp. Daten wurden aus sechs unabhängigen Experimenten gesammelt. **(E)** 3D-Schnittdarstellung einer phagozytierten, in Grün dargestellten EGFP-exprimierenden *L. major* durch einen in Rot dargestellten tdTomato-exprimierenden NG mittels Konfokalmikroskopie von Catchup^{IVM-red}-Mausohren 3 Tage p.i. mit 1 x 10⁴ *L. major*-EGFP pro Ohr. Projektion der dreidimensionalen Bilder mit z-Ebenen im Abstand von 1 µm. Maßstabsbalken, 10 µm.

Quelle: Abbildung adaptiert aus Kleinholz et al. 2021.

3.2 Aufnahme von Neutrophilenmaterial und *L. major* durch aus Monozyten entstandene MΦ und DZ

Peters et al. konnten zeigen, dass nach Infektion der Haut mit der infektiösen Form des Parasiten *L. major*, den metazyklischen Promastigoten, die Neutrophilen schnell an den Infektionsort rekrutiert werden, den Parasiten in sich aufnehmen und somit zur ersten Verteidigungslinie des Immunsystems gehören. Einige Tage nach der Infektion verbleibt der Parasit vorrangig in von Monozyten abstammenden Phagozyten, den MΦ oder DZ (Peters et al. 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Infektion dieser Phagozyten mit

L. major mit der Aufnahme von infizierten Neutrophilen assoziiert war (Ribeiro-Gomes et al. 2012). Die beobachtete signifikant geringere Infektionsrate der Ly6G-defizienten Neutrophilen zum frühen Infektionsbeginn nach 2 Tagen (**3.1.3**) könnte demnach durch einen bei Ly6G-Defizienz veränderten Zell-zu-Zell-Transfer in die an den Infektionsort rekrutierten, von Monozyten abstammenden M Φ und DZ zustande kommen.

3.2.1 Konfokalmikroskopischer Nachweis der Phagozytose von Neutrophilen und Leishmanien durch CD11c⁺- und CD54⁺-Zellen

Die gleichzeitige Aufnahme von *L. major*-EGFP und tdTomato-markiertem Neutrophilenmaterial durch Phagozyten wurde mit der Konfokalmikroskopie näher untersucht. Zur immunhistochemischen Färbung der Mausohr-Querschnitte (**2.2.4.3**) wurden verschiedene Primär-AK getestet. Zur Darstellung der Zellgrenzen erwiesen sich die Färbungen mit den Primär-AK CD11c und CD54 mit nachfolgender Applikation des Sekundär-AK AF647 am besten. Mit konfokalmikroskopischen Bildern konnte tatsächlich in mit *L. major*-EGFP (grüne Darstellung) infizierten Zellen (blaue Darstellung) kolokalisiertes tdTomato-Material von Neutrophilen (rote Darstellung) nachgewiesen werden (**Abbildung 14 A**). Einige dieser Zellen waren auch positiv für den Zellmarker CD11c der DZ (**Abbildung 14 B**). Zum Nachweis der spezifischen AK-Färbung wurde eine Negativkontrolle mit Färbung des Sekundär-AK ohne vorherige Färbung mit dem Primär-AK angefertigt (**Abbildung 14 C**).

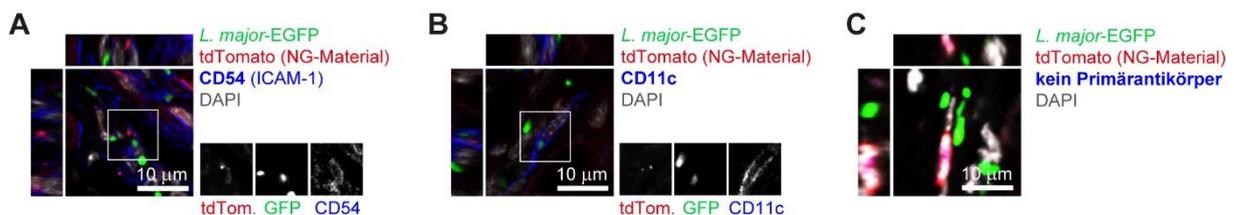


Abbildung 14: 3D-Schnittdarstellung der Aufnahme von Neutrophilen- und Leishmanienmaterial durch CD11c⁺- und CD54⁺-Zellen.

Konfokalmikroskopie von Catchup^{IVM-red}-Mausohren 3 Tage p.i. mit 1×10^4 *L. major*-EGFP in 1 μ l. Projektion der dreidimensionalen Bilder mit z-Ebenen im Abstand von 1 μ m. Maßstabsbalken, 10 μ m. Darstellung von *L. major*-EGFP in Grün, tdTomato-markiertem Material der neutrophilen Granulozyten (NG) in Rot, der AK-Färbung in Blau und DAPI-markierten Bereichen in Grau.

(A, B) Durch Färbung des Gewebes mit CD54-AK **(A)** oder CD11c-AK **(B)** und dem Sekundär-AK AF647 konnten Phagozyten sichtbar gemacht werden. Die Bilder zeigen gleichzeitiges Vorhandensein von EGFP-exprimierenden Leishmanien und tdTomato-markiertem Neutrophilenmaterial in CD54⁺- bzw. CD11c⁺-Zellen. Die gemeinsame Aufnahme von *L. major*-EGFP und Neutrophilenmaterial durch Phagozyten war demnach sichtbar. **(C)** Die Negativkontrolle besteht aus der Färbung mit dem Sekundär-AK AF647 ohne vorherige Färbung mit einem Primär-AK. Das Nicht-Vorhandensein von blau fluoreszierenden Anteilen dient dem Nachweis der spezifischen AK-Färbungen.

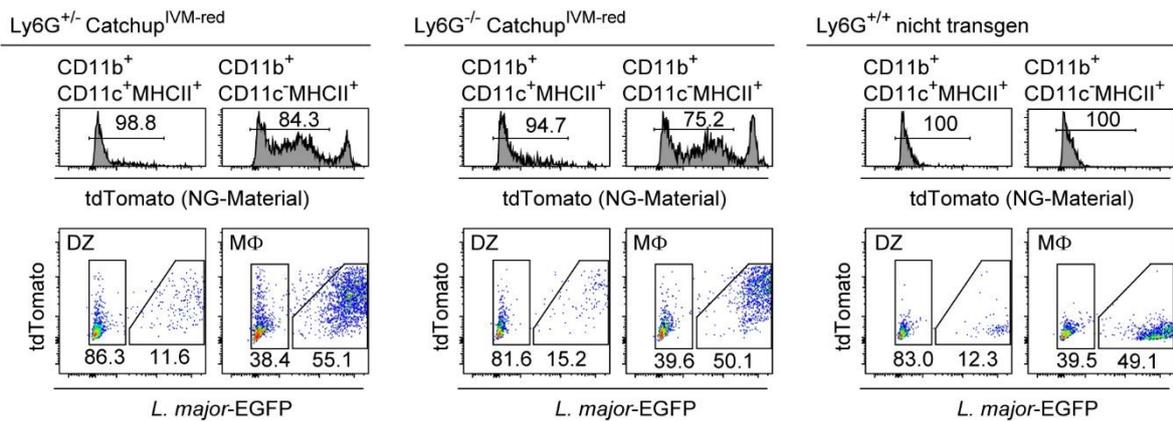
Quelle: Abbildung adaptiert aus Kleinholz et al. 2021.

3.2.2 Ly6G-unabhängige Aufnahme von Neutrophilenmaterial nur durch mit *L. major* infizierte, aus Monozyten entstandene Phagozyten

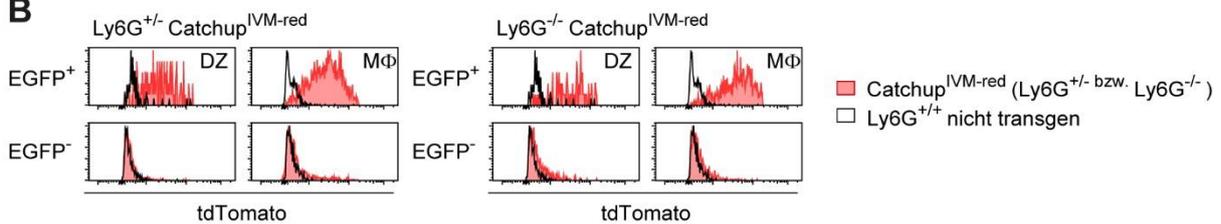
Die gemeinsame Phagozytose von Neutrophilen und Leishmanien durch CD11c⁺- und CD54⁺-Zellen konnte mit konfokalmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden. Inwieweit dieser Prozess durch die Expression des Oberflächenproteins Ly6G auf Neutrophilen beeinflusst werden könnte, wurde durch FACS-Analysen näher spezifiziert und quantifiziert. Neutrophile der heterozygoten (Ly6G^{+/-}) und homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäuse zeigen detektierbare rote Fluoreszenzsignale ihres tdTomatos (vgl. **2.1.5**) (Hasenberg et al. 2015). Um ihre gemeinsame Aufnahme mit *L. major* in MΦ oder DZ in Abhängigkeit von Ly6G näher analysieren zu können, wurden heterozygote (Ly6G^{+/-}) und homozygote (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäuse mit 1 x 10⁶ metazyklischen *L. major*-EGFP in einem Volumen von 5 µl pro Ohr infiziert (**2.2.3**) und das mittlere tdTomato-Fluoreszenzsignal in den infizierten und nicht-infizierten Phagozyten 2 Tage p.i. ausgewertet. Dies diente der Messung der quantitativen Aufnahme von tdTomato-markierten Neutrophilen durch DZ und MΦ. Zu diesem Zeitpunkt ist die Aufnahme von *L. major* der Neutrophilen durch aus Monozyten entstandene Phagozyten zu erwarten (Peters et al. 2008).

Die isolierten Zellen wurden mit einem CD45.2-AK zur Abgrenzung der Leukozyten und mit Ly6G-, Ly6C-, CD11b-, CD11c- und MHC-Klasse II-AK für die Analysen gefärbt. Anhand dieser Marker lassen sich MΦ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁻, MHCII⁺) und DZ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺) voneinander abgrenzen. Die FACS-Analysen zeigten, dass nur mit *L. major* infizierte (EGFP⁺) MΦ und DZ tdTomato-markiertes Neutrophilenmaterial aufnahmen (**Abbildung 15 B**). Die mit *L. major*-EGFP infizierten, nicht transgenen Kontrolltiere (Ly6G^{+/+}), deren Neutrophile durch das homozygote Fehlen der Cre-Rekombinasen auf beiden Allelen keine tdTomato-Fluoreszenzsignale ausstrahlen, dienten der Überprüfung des spezifischen tdTomato-Fluoreszenzsignals in infizierten Zellen und stellten sicher, dass dies nicht durch eine spektrale Überlappung von EGFP und tdTomato zustande kam. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Übergang von *L. major* von Neutrophilen in MΦ oder DZ zu frühen Infektionszeitpunkten gemeinsam mit Neutrophilenmaterial auftritt. Wie erwartet zeigten sich signifikant höhere mittlere tdTomato-Fluoreszenzsignale in GFP⁺-MΦ und GFP⁺-DZ der homo- und heterozygoten Catchup^{IVM-red}-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren (Ly6G^{+/+}) (**Abbildung 15 C, D**). Signifikante Unterschiede zwischen homo- und heterozygoten Catchup^{IVM-red}-Mäusen konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 15 C, D**). Eine durch eine Ly6G-Defizienz veränderte Phagozytose von mit *L. major* infizierten Neutrophilen durch an den Infektionsort rekrutierte DZ oder MΦ konnte also nicht bestätigt werden.

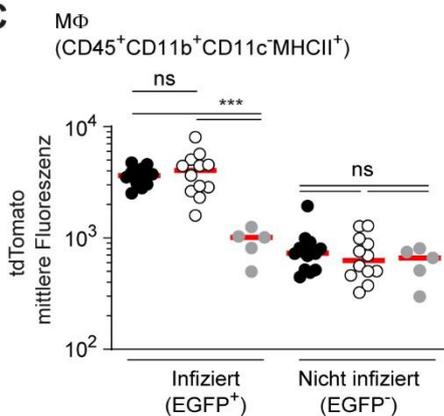
A



B



C



D

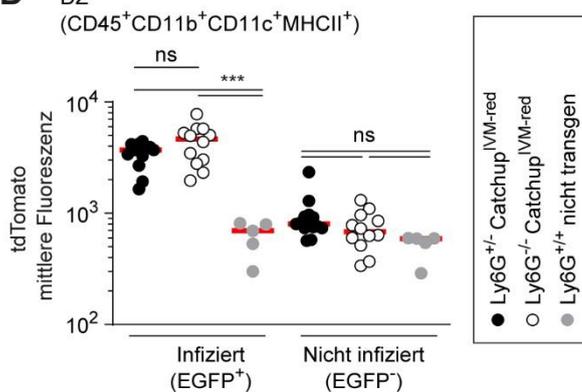


Abbildung 15: Aufnahme von tdTomato-Neutrophilenmaterial nur durch mit *L. major*-EGFP infizierte, aus Monozyten entstandene MΦ und DZ.

FACS-Analyse von heterozygoten (Ly6G^{+/-}) (links dargestellt), homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäusen (mittig dargestellt) und nicht transgenen Kontrolltieren (Ly6G^{+/+}) (rechts dargestellt) 2 Tage p.i. mit 1 x 10⁶ metazyklischen *L. major*-EGFP pro Ohr.

(A) Analysestrategie für an den Infektionsort rekrutierte, mit *L. major* infizierte MΦ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺) und DZ (CD45⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺). Nach der vorherigen Aufreinigung von CD45⁺-Zellen mittels MACS-Methode wurden CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺-Zellen selektiert. Diese wurden nach der Stärke ihrer von neutrophilen Granulozyten (NG) abstammenden tdTomato-Fluoreszenzsignale sortiert. Die Neutrophilen, die die Subpopulation mit den stärksten Signalen darstellen, wurden ausgeschlossen (obere Reihe). Die MΦ und DZ konnten jeweils in eine mit *L. major* infizierte (EGFP⁺) und in eine nicht-infizierte (EGFP⁻) Population unterteilt werden (untere Reihe). **(B)** In Rot dargestellt ist das quantifizierte tdTomato-Signal in mit *L. major* infizierten (EGFP⁺) und nicht-infizierten (EGFP⁻) DZ und MΦ von heterozygoten (Ly6G^{+/-}) (links) und homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäusen (rechts). In Schwarz ist das quantifizierte tdTomato-Signal aus nicht transgenen

Kontrolltieren (Ly6G^{+/+}) gegenübergestellt. Nur mit *L. major* infizierte, EGFP⁺-MΦ und -DZ nahmen tdTomato-markiertes Neutrophilenmaterial auf, denn in EGFP⁻-Zellpopulationen war dies nicht nachweisbar. Mit *L. major*-EGFP infizierte, nicht transgene Kontrolltiere (Ly6G^{+/+}), deren Neutrophile keine tdTomato-Fluoreszenzsignale senden, dienten der Überprüfung der spezifischen tdTomato-Fluoreszenzsignale in infizierten Zellen. Dies stellte sicher, dass diese nicht durch eine spektrale Überlappung von EGFP und tdTomato zustande kamen. **(C, D)** Dargestellt ist das mittlere Fluoreszenzsignal des tdTomatos [in willkürlichen Einheiten] in infizierten (EGFP⁺) und nicht infizierten (EGFP⁻) MΦ **(C)** und DZ **(D)** als Maß für die Menge an phagozytierten tdTomato-markierten Neutrophilen. Das mittlere Fluoreszenzsignale der tdTomato-markierten Neutrophilen in EGFP⁺-MΦ und EGFP⁺-DZ der hetero- (schwarze Symbole) und homozygoten (weiße Symbole) Catchup^{IVM-red}-Mäuse war dabei signifikant höher als das der nicht transgenen Kontrolltiere (graue Symbole) durch die fehlende tdTomato-Fluoreszenz der Neutrophilen in diesen Tieren. Zwischen hetero- und homozygoten Catchup^{IVM-red}-Mäusen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des mittleren tdTomato-Fluoreszenzsignals nachweisen. Dies spricht für die Ly6G-Unabhängigkeit der Aufnahme von tdTomato-markiertem Neutrophilenmaterial durch aus Monozyten entstandene MΦ und DZ. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; ***p < 0,001; ns, nicht signifikant; bestimmt durch one-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche.

Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten gesammelt.

Quelle: Abbildung adaptiert aus Kleinholz et al. 2021.

3.3 Rekrutierung von Neutrophilen an den Infektionsort mit

L. major in vivo

Das Oberflächenprotein Ly6G scheint an diversen Integrin-Interaktionen sowie an der Extravasation von Neutrophilen beteiligt zu sein (Wang et al. 2012; Yipp und Kubes 2013; Nigrovic 2013; Cunin et al. 2019). Nach Infektion von Gewebe mit *L. major* werden in den ersten Stunden viele Neutrophile an den Infektionsort rekrutiert. Eine mögliche Integrin-Interaktion von Ly6G könnte sich auf die Rekrutierungskinetik der Neutrophilen an den Infektionsort auswirken, weswegen in dieser Arbeit Ly6G-defiziente und Ly6G-suffiziente Neutrophile bei ihrer Migration in mit *L. major* infiziertes Gewebe mittels Zweiphotonenmikroskopie analysiert wurden. Auch der Trend des geringeren Anteils an infizierten Neutrophilen bei Ly6G-Defizienz 2 Tage p.i. (**Abbildung 13**) legt nahe, dass das Oberflächenprotein Ly6G Einfluss auf die Interaktion der Neutrophilen mit Leishmanien haben könnte und begründet ebenfalls die Analyse der Wechselwirkungen zwischen Neutrophilen und *L. major* mit der Zweiphotonenmikroskopie *in vivo*. Für die Zweiphotonenmikroskopie wurden heterozygote (Ly6G^{+/-}) und homozygote (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäuse anästhesiert und an 2 Infektionsstellen pro Ohr mit 1×10^4 metazyklischen *L. major*-EGFP in einem Volumen von 0,5 µl mit einer Mikroinjektionsspritze infiziert (**2.2.7.1**).

3.3.1 Übersichtsaufnahmen der Rekrutierung von Ly6G^{+/+}- und Ly6G^{-/-}-Neutrophilen im Vergleich

Mit der „Tile-Scan“-Funktion konnte die Rekrutierung der Neutrophilen an den Infektionsort analysiert werden. Dies ist ein erweiterter Scan-Modus der Zweiphotonenmikroskopie, der es ermöglicht mehrere benachbarte Ausschnitte nacheinander zu scannen und hinterher durch die Software zu einem großen Bildausschnitt zusammenzufügen. Die Aufnahmen entsprechen der 9-fachen Größe der Aufnahmen unter **3.3.2**. In diesen Filmaufnahmen konnten unterschiedliche Bewegungsmuster der Neutrophilen beobachtet werden. Während sich die Ly6G^{+/+}-Neutrophilen kontinuierlich aus verschiedenen Richtungen zum Infektionsort bewegten, verließen die Ly6G^{-/-}-Neutrophilen nach Akkumulation in den Blutgefäßen diese scheinbar gerichtet innerhalb ihres Zellverbandes, vergleichbar mit einem schwarmähnlichen Verhalten (**Abbildung 16**).

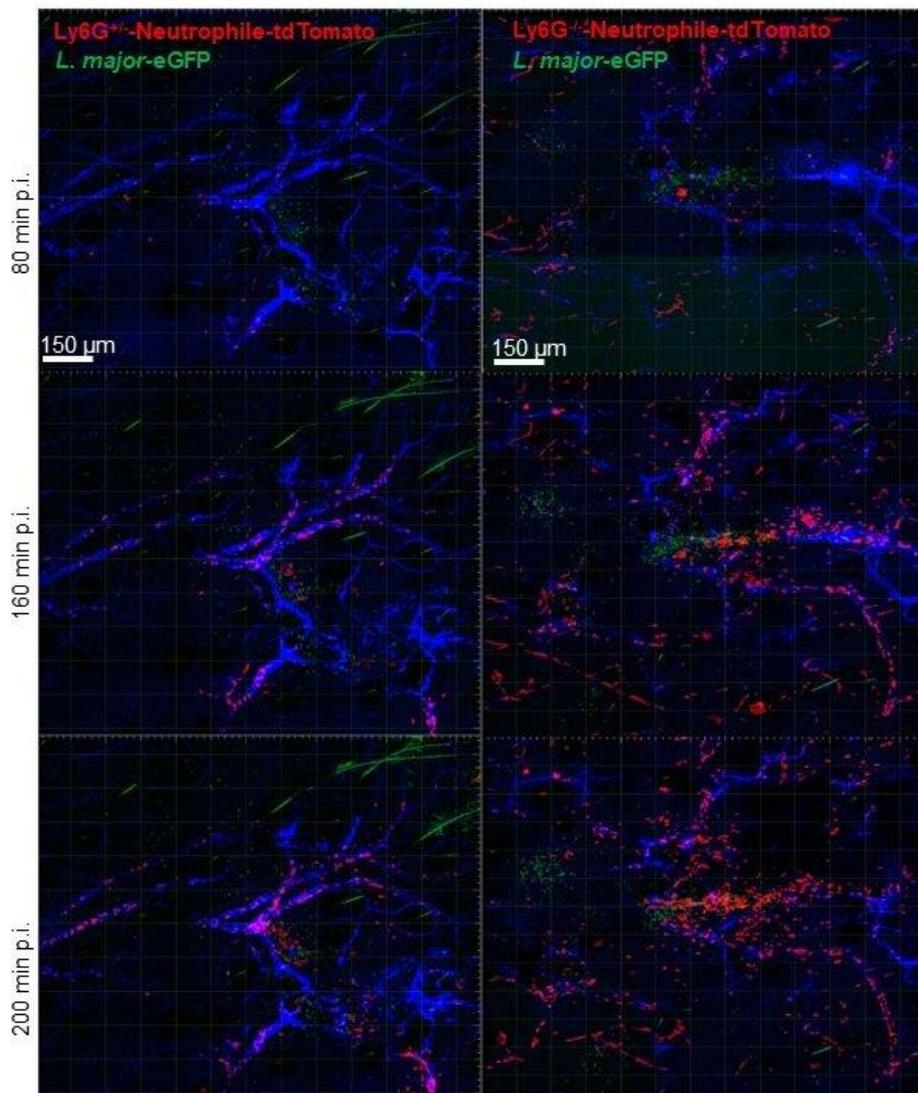


Abbildung 16: Bildaufnahmen der Rekrutierung von Ly6G^{+/+}-und Ly6G^{-/-}-Neutrophilen an den Infektionsort mit *L. major* in vivo.

Intravitale Zweiphotonenmikroskopie im „Tile-Scan-Modus“ von heterozygoten (Ly6G^{+/-}) und homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mausohren 80, 160 und 200 min p.i. mit 1×10^4 *L. major*-EGFP. Darstellung der Blutgefäße mit AngioSPARK® 680 in Blau, der *L. major*-EGFP in Grün und der tdTomato-exprimierenden Neutrophilen in Rot. Die Projektion der dreidimensionalen Bilder umfasst eine Gewebedicke von 76 μm mit 20 z-Ebenen im Abstand von 4 μm und wurde in ca. 34 s pro z-Ebene aufgenommen. Maßstabsbalken, 150 μm . Über die Blutgefäße wurden Neutrophile an den Infektionsort rekrutiert. Während sich die Ly6G^{+/-}-Neutrophilen von verschiedenen Seiten kontinuierlich an den Infektionsort näherten, ließ sich bei den Ly6G^{-/-}-Neutrophilen nach einer primären Anhäufung in nahe gelegenen Blutgefäßen ein konzertiertes schwarmähnliches Austrittsverhalten der Blutgefäße beobachten. Quelle: Eigene Darstellung.

3.3.2 Verändertes Eintrittsverhalten der Ly6G-defizienten Neutrophilen in das mit *L. major* infizierte Gewebe

Zur Quantifizierung dieses Verhaltens wurden über mehrere Stunden nach dem Infektionszeitpunkt Filme aufgenommen und Neutrophile mit der Software Imaris pro Zeitpunkt ausgezählt (**2.2.7.2**). Wie schon vorher beobachtet (Peters et al. 2008), wurden auch hier Neutrophile effektiv rekrutiert und akkumulierten innerhalb der ersten beiden Stunden am Infektionsort, um *L. major* zu phagozytieren (**Abbildung 17 A**). Innerhalb 1-2 h konnten viel höhere Eintrittsraten der Ly6G^{+/-}-Neutrophilen in das Gewebe im Vergleich zu den Ly6G^{-/-}-Neutrophilen beobachtet werden (**Abbildung 17 A, B**). Interessanterweise wurde die initiale niedrigere rekrutierte Anzahl an Neutrophilen der homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäuse nach 2-3 h durch höhere Eintrittsraten ihrer Neutrophilen kompensiert (**Abbildung 17 B, C**). Dies zeigte sich auch im eher linearen Anstiegsverlauf der Anzahl rekrutierter Ly6G^{+/-}-Neutrophiler (erste und zweite Reihe) pro Bildvolumen über die Zeit, während die Ly6G^{-/-}-Neutrophilen (dritte und vierte Reihe) einen eher exponentiellen Anstiegsverlauf hatten (**Abbildung 17 B**). Dies ist mit einem konzertierten schwarmähnlichen Verhalten der Ly6G^{-/-}-Neutrophilen, das bereits im „Tile-Scan-Modus“ gesehen werden konnte, vereinbar (**Abbildung 16**). Während die Ly6G^{+/-}-Neutrophilen konstante Eintrittsraten über die Zeit zeigten, war der Anstieg der Ly6G^{-/-}-Neutrophilen im Vergleich in der Zeit zwischen 60-120 min p.i. um 50 % vermindert und zwischen 120-180 min p.i. mehr als verdoppelt (**Abbildung 17 C**). Die Geschwindigkeiten der Neutrophilen waren zum Zeitpunkt 120-180 min p.i. signifikant höher im Vergleich zum Zeitpunkt 60-120 min p.i., aber blieben von einer Ly6G-Defizienz unbeeinflusst (**Abbildung 17 D**). Demnach wäre es vorstellbar, dass Ly6G keinen direkten Einfluss auf die interstitielle Migration der Neutrophilen hat, aber auf den Austritt der Neutrophilen aus den Blutgefäßen.

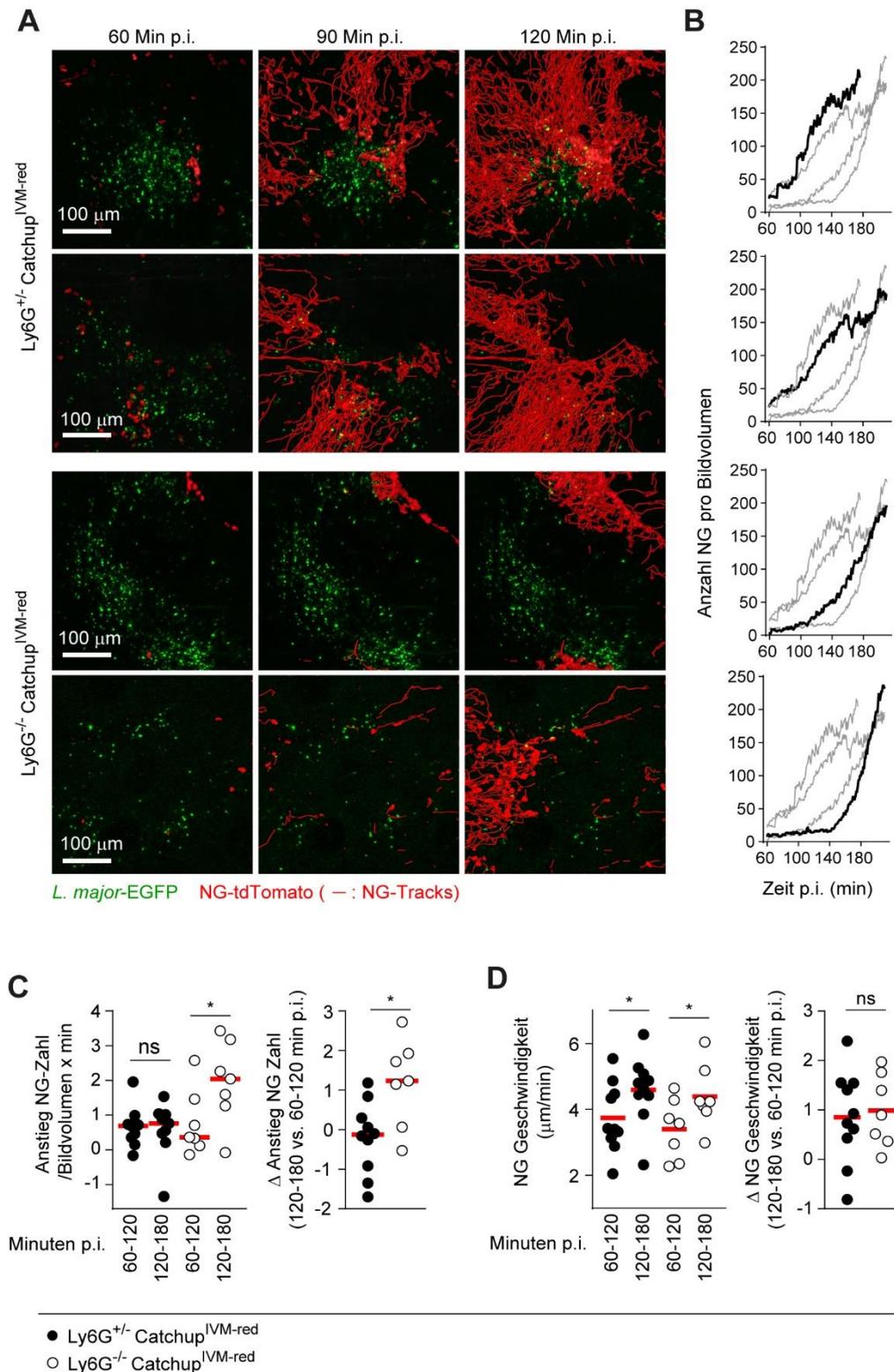


Abbildung 17: Verändertes Eintrittsverhalten der Ly6G^{+/-}-Neutrophilen in das mit *L. major* infizierte Gewebe im zeitlichen Verlauf.

Zweiphotonenmikroskopie nach Infektion heterozygoter (Ly6G^{+/-}) und homozygoter (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäuse mit 1×10^4 metazyklischen *L. major*-EGFP pro Ohr.

(A) Bilddaten der Zweiphotonenmikroskopie zu den Zeitpunkten 60 min, 90 min und 120 min p.i. von tdTomato-markierten neutrophilen Granulozyten (NG) (Ly6G^{+/-}-NG in der ersten und zweiten Reihe, Ly6G^{-/-}-NG in der dritten und vierten Reihe jeweils rot dargestellt) bei ihrer Migration in mit *L. major*-EGFP (grün dargestellt) infiziertes

Gewebe. NG wurden in unter 2 h an den Infektionsort rekrutiert. Die roten NG-Verlaufsspuren (*engl. tracks*) zeigen ihre akkumulierten Migrationswege im Laufe der Zeit. Jede Projektion der dreidimensionalen Bilder umfasst eine Gewebedicke von 36 μm mit 10 z-Ebenen im Abstand von 4 μm und wurde in ca. 34 s pro z-Ebene aufgenommen. Maßstabsbalken, 100 μm . **(B)** Die oberen beiden Graphen zeigten eher lineare Verläufe der Anzahl an Ly6G^{+/}-NG pro Bildvolumen im Infektionsverlauf. In den unteren beiden Graphen ließen sich eher exponentielle Anstiege an rekrutierten Ly6G^{+/}-NG pro Bildvolumen im Infektionsverlauf über die Zeit beobachten. Schwarze Kurven gehören jeweils zu den links dargestellten Bilddaten in **A**. Die grauen Kurven gehören zu den anderen Bilddaten aus **A** und sind zum Vergleich mit dargestellt. **(C)** Linke Abbildung: Anstieg der NG-Zahl pro Bildvolumen pro Minute zu den Zeitpunkten 60-120 min p.i. und 120-180 min p.i. Bei den NG der homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäuse (weiße Symbole) zeigte sich zum Zeitpunkt 120-180 min p.i. ein signifikant erhöhter Anstieg ihrer NG-Zahl pro Bildvolumen/Minute im Vergleich zum Zeitpunkt 60-120 min p.i. Die initiale niedrigere Anzahl der rekrutierten Ly6G^{-/-}-NG wurde nach 2-3 h durch höhere Eintrittsraten ihrer NG kompensiert. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle zur Analyse mittels Zweiphotonenmikroskopie. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; *p < 0,05; ns, nicht signifikant; bestimmt durch one-way ANOVA und paarweiser Bonferroni-Korrektur. Rechte Abbildung: signifikant erhöhter Anstieg der Zahl an NG in homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäusen (weiße Symbole) zum Zeitpunkt 120-180 min p.i. vs. 60-120 min p.i. im Vergleich zu heterozygoten (Ly6G^{+/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäusen (schwarze Symbole). Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle zur Analyse mittels Zweiphotonenmikroskopie. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; *p < 0,05; bestimmt durch ungepaarten t-Test. **(D)** Linke Abbildung: instantane Geschwindigkeiten der NG zu den Zeitpunkten 60-120 min p.i. und 120-180 min p.i. Diese waren sowohl in Ly6G-defizienten (weiße Symbole) als auch in Ly6G-suffizienten (schwarze Symbole) Tieren zum Zeitpunkt 120-180 min p.i. signifikant gegenüber dem Zeitpunkt 60-120 min p.i. erhöht. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle zur Analyse mittels Zweiphotonenmikroskopie. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; *p < 0,05; bestimmt durch one-way ANOVA und paarweiser Bonferroni-Korrektur. Rechte Abbildung: Vergleich der instantanen Geschwindigkeiten der NG von Ly6G-defizienten (weiße Symbole) mit NG von Ly6G-suffizienten (schwarze Symbole) Tieren zu den Zeitpunkten 120-180 min p.i. vs. 60-120 min p.i. Dies waren nicht signifikant unterschiedlich. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle zur Analyse mittels Zweiphotonenmikroskopie. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; ns, nicht signifikant; bestimmt durch ungepaarten t-Test.

Daten wurden aus 17 unabhängigen Experimenten gesammelt.

Quelle: Abbildung adaptiert aus Kleinholz et al. 2021.

3.3.3 Interaktionen von Neutrophilen mit *L. major* in vivo

Um die Rekrutierungskinetik der Neutrophilen und ihre Interaktionen mit *L. major* im infizierten Gewebe quantifizieren zu können, wurden in den Bildaufnahmen der Zweiphotonenmikroskopie zunächst die Neutrophilen und *L. major* mittels der Software Imaris, wie unter 2.2.7.2 beschrieben, markiert. Nach der Datenkonversion in einen Zytometriedatensatz mittels DiscIT Software konnten anschließend mithilfe von Makro-Programmierungen von ImageJ (einsehbar in **Anlagen**) die instantanen Geschwindigkeiten der Neutrophilen, die Distanzen der Neutrophilen zur jeweils nächsten *L. major*, die Distanzen der Neutrophilen zur jeweils nächsten Neutrophilen sowie der Winkel α der Bewegungsrichtungen nächst gelegener Neutrophiler berechnet werden (**Abbildung 18**).

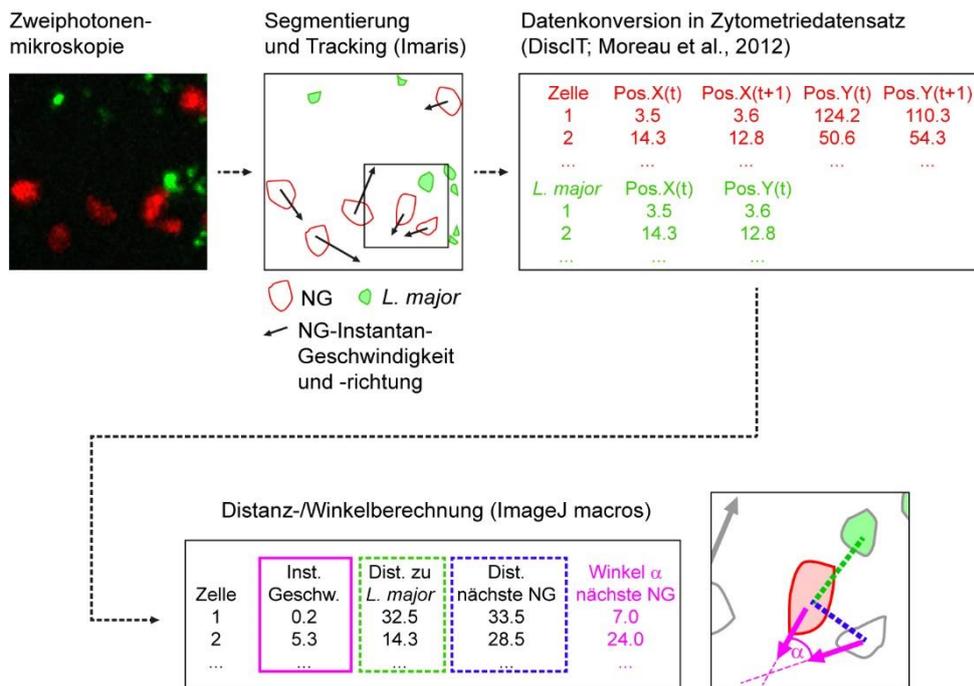


Abbildung 18: Analyseschema von Neutrophilen und *L. major* in Bildaufnahmen der Zweiphotonenmikroskopie.

Die neutrophilen Granulozyten (NG) (rot dargestellt) und *L. major* (grün dargestellt) aus den Bildaufnahmen der Zweiphotonenmikroskopie wurden mit der Imaris Software markiert (Segmentierung) und der Verlauf der NG in den Filmen mittels 3D-„Tracking“-Funktion verfolgt. So konnte jeder markierten Zelle eine Position mittels x- und y-Koordinate zugeordnet werden. Die DiscIT Software erlaubte die Datenkonversion in einen Zytometriedatensatz (Moreau et al. 2012). Die „Tracking“-Funktion lieferte neben den Positionen (Pos.) einer markierten Zelle zum Zeitpunkt t auch die Positionen zum Zeitpunkt t+1 und ermöglichte es daher ihre Richtung nachzuverfolgen. Da *L. major* nicht „getrackt“ wurde, sind lediglich die Positionen zum Zeitpunkt t bestimmt worden. Mithilfe von Makro-Programmierungen von ImageJ (Makro 1 und 2 einsehbar in **Anlagen**) konnten daraus die instantane Geschwindigkeit des NG (rosa dargestellt), die Distanz des NG zur nächsten *L. major* (grün dargestellt), die Distanz des NG zum nächsten NG (blau dargestellt) und der Winkel α der Bewegungsrichtungen nächstgelegener NG (rosa dargestellt) berechnet werden. Die farbliche Kodierung dient der besseren Übersicht. Diese Analyseprozedur wurde für die Datengenerierung der gezeigten Ergebnisse in **Abbildung 19** verwendet.

Quelle: Abbildungsbestandteile ursprünglich entworfen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas J. Müller, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Magdeburg.

Nach der Phagozytose von *L. major* durch Neutrophile reduziert sich die Geschwindigkeit der Neutrophilen stark (Peters et al. 2008). Um diese frühen Interaktionen von *L. major* mit Neutrophilen genauer untersuchen zu können, wurden die instantanen Geschwindigkeiten der Neutrophilen in Abhängigkeit von ihrer Distanz zu nächster *L. major* zu verschiedenen Infektionszeitpunkten nach dem in **Abbildung 18** dargestellten Schema analysiert. Dabei wurde zwischen einem Kontakt der Neutrophilen mit *L. major* mit Distanzen $<5 \mu\text{m}$ und keinem Kontakt der Neutrophilen mit *L. major* mit Distanzen $>5 \mu\text{m}$ unterschieden und diese in Ly6G-suffizienten und Ly6G-defizienten Tieren miteinander verglichen (**Abbildung 19 A**). Sowohl

die Distanzen der Neutrophilen zu *L. major*-EGFP als auch der Infektionszeitpunkt beeinflussten die instantanen Geschwindigkeiten der Neutrophilen signifikant, jedoch übte der Genotyp keinen Einfluss darauf aus (**Abbildung 19 B, C**). Obwohl die anfängliche Rekrutierung der Ly6G^{-/-}-Neutrophilen zum Infektionsort mit *L. major* verlangsamt war (**Abbildung 17**), ergab die Analyse der instantanen Geschwindigkeiten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von Ly6G.

Zur Analyse eines möglichen schwarmähnlichen Verhaltens wurden Neutrophile ausgewählt, deren Distanzen zum nächsten Neutrophilen 5-15 µm betragen, was etwa dem Zelldurchmesser eines Neutrophilen entspricht (**Abbildung 19 D**). Für diese kurzen Distanzen ist ein Schwarmverhalten sehr wahrscheinlich (Lämmermann et al. 2013). Eine komplett zufällige Bewegung der Neutrophilen würde einen durchschnittlichen Winkel zwischen den verglichenen Bewegungsvektoren von 90° ergeben. Der beobachtete Winkel von 60° oder weniger zeigte dabei deutlich, dass sich die jeweils verglichenen Neutrophilen in die gleiche Richtung bewegten, was auch vorher schon phänotypisch beobachtet werden konnte (**Abbildung 16**). Auffällig ist dabei, dass unter den Neutrophilen mit mittlerer und hoher Geschwindigkeit ($v_2 = 2-8 \mu\text{m}/\text{min}$ sowie $v_3 = 8-16 \mu\text{m}/\text{min}$) der Winkel α zwischen den Bewegungsvektoren benachbarter Neutrophiler für Ly6G^{-/-}-Neutrophile kleiner war als für Ly6G^{+/-}-Neutrophile (signifikant für $v_2 = 2-8 \mu\text{m}/\text{min}$, **Abbildung 19 E**). Dies könnte auf ein geschwindigkeitsabhängiges schwarmähnliches Verhalten von Neutrophilen bei einer Ly6G-Defizienz hindeuten.

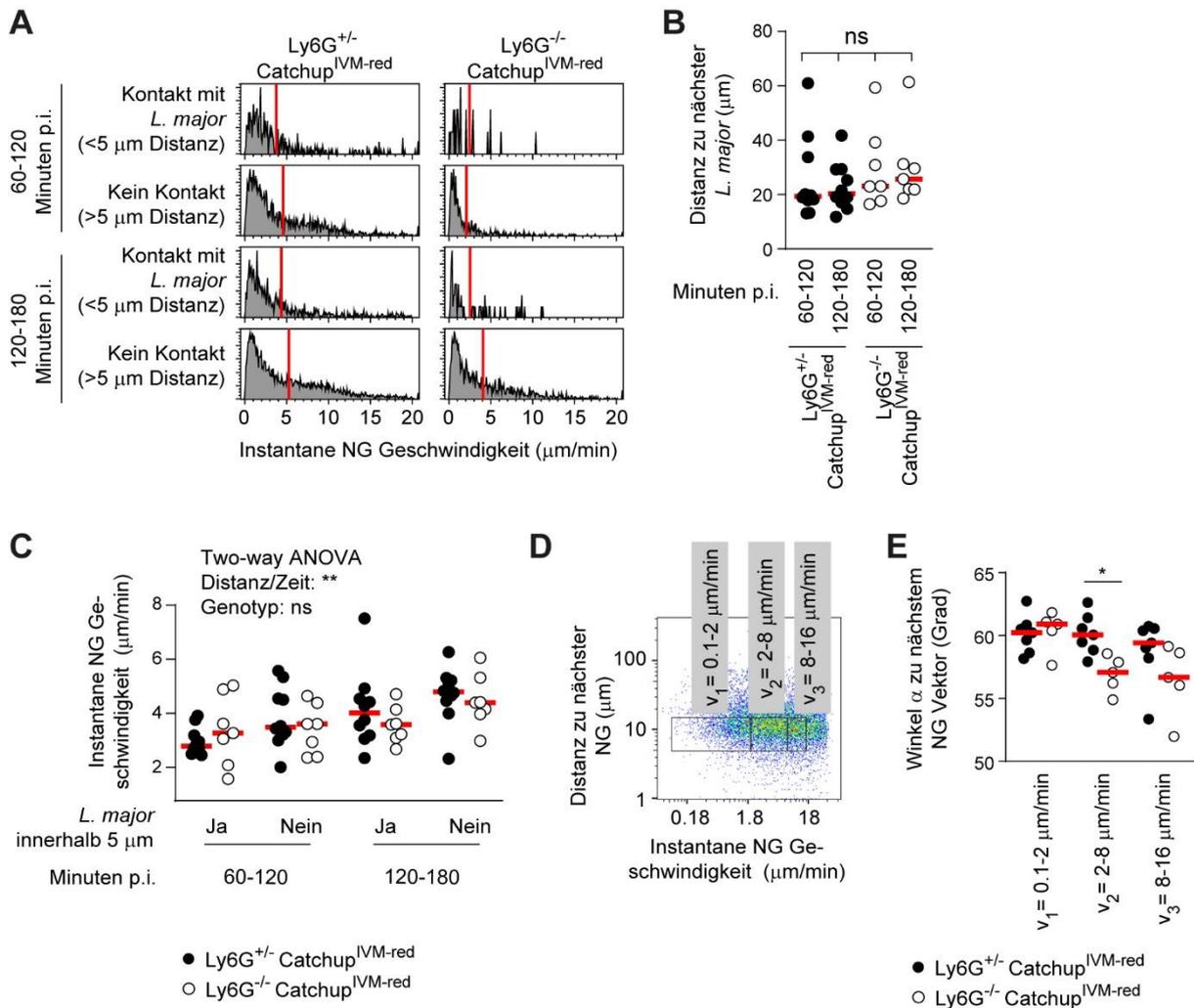


Abbildung 19: Instantane Geschwindigkeit der Neutrophilen verändert sich abhängig vom Infektionszeitpunkt sowie von der Distanz zu *L. major*-EGFP.

Zweiphotonenmikroskopie nach Infektion heterozygoter ($Ly6G^{+/-}$) und homozygoter ($Ly6G^{-/-}$) $Catchup^{IVM-red}$ -Mäuse mit 1×10^4 metazyklischen *L. major*-EGFP pro Ohr. Jede Projektion der dreidimensionalen Bilder umfasst eine Gewebesdicke von $36 \mu m$ mit 10 z-Ebenen im Abstand von $4 \mu m$ und wurde in ca. 34 s pro z-Ebene aufgenommen. **(A)** Dargestellt ist die quantitative Verteilung der instantanen Geschwindigkeiten der neutrophilen Granulozyten (NG) (in $\mu m/min$), die Kontakt mit *L. major*-EGFP hatten (entsprechend einer Distanz von $<5 \mu m$) sowie derer, die keinen Kontakt mit *L. major*-EGFP hatten (entsprechend einer Distanz von $>5 \mu m$) zu den Zeitpunkten 60-120 min p.i. und 120-180 min p.i. in heterozygoten ($Ly6G^{+/-}$) (links dargestellt) und homozygoten ($Ly6G^{-/-}$) $Catchup^{IVM-red}$ -Mäusen (rechts dargestellt). **(B)** Analyse der mittleren Distanzen von NG zu nächst gelegener *L. major*-EGFP zu den Zeitpunkten 60-120 min p.i. und 120-180 min p.i. in heterozygoten ($Ly6G^{+/-}$) (schwarze Symbole) und homozygoten ($Ly6G^{-/-}$) $Catchup^{IVM-red}$ -Mäusen (weiße Symbole). Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle zur Analyse mittels Zweiphotonenmikroskopie. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; ns, nicht signifikant; bestimmt durch one-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche. **(C)** Analyse der instantanen Geschwindigkeiten der NG (in $\mu m/min$) zu den Zeitpunkten 60-120 min p.i. und 120-180 min p.i. in Abhängigkeit von *L. major*-EGFP in einer Reichweite von $5 \mu m$. $Ly6G^{-/-}$ -NG sind durch schwarze und $Ly6G^{+/-}$ -NG durch weiße Symbole dargestellt. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle zur Analyse mittels Zweiphotonenmikroskopie. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; $**p < 0,01$; ns, nicht signifikant. Die two-way ANOVA-Analyse ergab, dass die Distanz von NG zu *L. major*-EGFP und der Infektionszeitpunkt einen

ERGEBNISSE

signifikanten Einfluss auf die instantane Geschwindigkeit der NG hatten, jedoch übte der Genotyp keinen Einfluss darauf aus. **(D)** Selektion von NG, die Distanzen von 5-15 μm zum nächsten NG haben, entsprechend etwa dem Zelldurchmesser eines NG. Es wurden drei Populationen verschiedener instantaner Geschwindigkeiten (v_{1-3}) unterschieden. **(E)** Ly6G^{-/-}-Neutrophile (weiße Symbole) mit $v_2 = 2-8 \mu\text{m}/\text{min}$ und $v_3 = 8-16 \mu\text{m}/\text{min}$ zeigten kleinere Winkel α der Bewegungsrichtungen nächst gelegener NG als Ly6G^{+/-}-Neutrophile (schwarze Symbole), was auf ein mögliches schwarmähnliches Verhalten hindeuten könnte. Dies ist signifikant nachweisbar für $v_2 = 2-8 \mu\text{m}/\text{min}$. Jeder Punkt steht für eine unabhängige Infektionsstelle zur Analyse mittels Zweiphotonenmikroskopie. Horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert; * $p < 0,05$; ns, nicht signifikant; bestimmt durch two-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur.

Daten wurden aus 17 unabhängigen Experimenten gesammelt.

Quelle: Abbildung adaptiert aus Kleinholz et al. 2021.

4 Diskussion

Die Funktionen des murinen Oberflächenproteins Ly6G der Neutrophilen, das als wichtiger Marker zur Identifikation und Depletion von Neutrophilen gilt, sind noch nicht ausreichend erforscht (Hickey 2012; Hasenberg et al. 2015). Es ist unklar, ob es möglicherweise mit für die Neutrophilenrekrutierung verantwortlich ist oder deren Phagozytose von Pathogenen ermöglicht. Obwohl in humanen Neutrophilen nur ein Homolog (CD177) existiert, dessen Funktionen vermutlich nicht komplett identisch zu dem Oberflächenprotein Ly6G sind, kann die Erforschung des Ly6G-Proteins und seiner Unterschiede zu CD177 im Rahmen von Immunreaktionen weitreichende Kenntnisse zur Funktion von Neutrophilen für die präklinische Forschung, die Anwendung im klinischen Kontext sowie langfristig verbesserte Therapieoptionen mit sich bringen.

Um den Einfluss des Oberflächenproteins Ly6G der Neutrophilen auf Immunreaktionen näher untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit das „Catchup-Mausmodell“ vor dem genetischen C57BL/6-Hintergrund, deren homozygote Mäuse Ly6G-defizient sind, verwendet (Hasenberg et al. 2015). Diese Mäuse wurden mit *L. major*, einem Erreger der KL, infiziert und die ausgelösten Immunreaktionen analysiert (Kleinholz et al. 2021). In diesem weitreichend beschriebenen Infektionsmodell kann *L. major* effizient bekämpft werden, was wichtig ist, da die Immunantwort der Leishmanieninfektion, und damit auch die Rolle der Neutrophilen als erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems, stark abhängig sowohl vom verwendeten Mausstamm als auch von der Leishmanienart ist (Sacks und Noben-Trauth 2002; Müller et al. 2012; Scott und Novais 2016; Peters et al. 2008). Die Interaktionen von Neutrophilen und möglichen Wirtszellen mit *L. major* am Infektionsort sind Gegenstand immunologischer Forschung (Ribeiro-Gomes et al. 2004; Ribeiro-Gomes et al. 2012; Ribeiro-Gomes et al. 2015).

4.1 Der Einfluss von Ly6G auf die Immunantwort im Infektionsverlauf

Die Rolle der Neutrophilen in der KL wird kontrovers diskutiert, da sie sich sowohl protektiv als auch pathologisch auf ihre Verläufe auswirken können (vgl. 1.4.4) (Peters et al. 2008; Peters und Sacks 2009; Chen et al. 2005; Tacchini-Cottier et al. 2000; Laskay et al. 2008). Es konnte nachgewiesen werden, dass die β -2-Integrin-abhängige Migration von Neutrophilen durch Ly6G-AK-Bindung blockiert werden kann (Wang et al. 2012). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der CR3, bestehend aus β -2- und α_M -Integrinen, Einfluss auf die Aktivierung der Phagozyten und die Aufnahme von Pathogenen hat (Wright et al. 1988; Hondalus et al. 1993; Ishibashi et al. 1994). Durch die Beeinflussung der β -2-Integrin-Expression durch Ly6G wurde

die Hypothese aufgestellt, dass die initialen Interaktionen der Immunzellen mit *L. major* bei einer Ly6G-Defizienz verändert sein könnten. Insbesondere sollte geklärt werden, ob Ly6G die Phagozytose von *L. major* durch Neutrophile beeinflusst. Daher wurde in dieser Arbeit zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten in einem Zeitraum von 28 Tagen untersucht, inwieweit Ly6G Einfluss auf die Zellrekrutierung, die Pathogenanzahl im mit *L. major* infizierten Gewebe sowie die jeweiligen Zellinfektionsraten im Infektionsverlauf haben könnte.

2 Tage nach Infektionsbeginn zeigten sich tatsächlich Ly6G-defiziente Neutrophile, trotz unveränderter Pathogenanzahl bei einer Ly6G-Defizienz (**Abbildung 12**), signifikant geringer im Vergleich zu Ly6G-suffizienten Neutrophilen mit *L. major*-EGFP infiziert (**Abbildung 13**). Während der Anteil der rekrutierten Neutrophilen an CD45⁺-Zellen zum Infektionsort von einer Ly6G-Defizienz unbeeinflusst war, konnte an Tag 28 p.i. gezeigt werden, dass signifikant weniger DZ in Ly6G-defizienten Tieren an den Infektionsort rekrutiert wurden (**Abbildung 11**). Dies spricht dafür, dass initiale Veränderungen in der Interaktion von Neutrophilen mit *L. major* zu Infektionsbeginn die nachfolgende adaptive Immunantwort beeinflussen, was auch in anderen Studien bereits belegt werden konnte (Hurrell et al. 2015; León et al. 2007). Aufgrund der leicht erhöhten Ly6C-Expression in Ly6G-defizienten Neutrophilen (**Abbildung 11**), dessen Expression nicht bei Monozytenaktivierung, jedoch bei Neutrophilenaktivierung steigt (Jutila et al. 1994), hätte man erwarten können, dass auch eine verstärkte Rekrutierung der Neutrophilen stattfindet. Dies konnte in den Ergebnissen jedoch nicht bestätigt werden, könnte aber ein Hinweis für die bei einer Ly6G-Defizienz veränderte Dynamik der Neutrophilenrekrutierung sein (vgl. 4.3). Die Ly6G-unabhängige Pathogenzahl könnte darauf hindeuten, dass andere ausgleichende Mechanismen die oben beschriebenen Veränderungen der initialen Interaktion der Neutrophilen mit *L. major* 2 Tage p.i. sowie deren Einfluss auf die verminderte Rekrutierung von DZ in Ly6G-defizienten Tieren an Tag 28 p.i. kompensieren können, was auch für andere Immundefizienzen bei Leishmanieninfektionen bereits gezeigt werden konnte (Vieira et al. 1996; Nashleanas et al. 1998; Murray et al. 2000).

4.2 Aufnahme von Neutrophilenmaterial nur in mit *L. major* infizierte, aus Monozyten entstandene Phagozyten: Rolle von Ly6G

Nach der Gewebeinfektion mit *L. major* werden Neutrophile schnell rekrutiert, phagozytieren den Parasiten und sind durch ihre Granula befähigt, Mikroorganismen direkt abzutöten. Dennoch ist es *L. major* möglich, durch verschiedene Ausweichstrategien der Abtötung zu entkommen und sie als Übergangswirtszelle bis zum Erreichen ihrer finalen Wirtszellen, den aus Monozyten entstandenen DZ- und MΦ-ähnlichen Phagozyten, zu nutzen. Daher werden Neutrophile auch als „Trojanische Pferde“ beschrieben, in denen sich *L. major* unentdeckt vor

anderen Immunzellen aufhalten kann und nach Apoptosesignalen der Neutrophilen „still“ mit in die MΦ aufgenommen werden kann (vgl. **1.4.4**) (van Zandbergen et al. 2004; Laskay et al. 2003). *In-vivo*-Bildgebung konnte eine zweite Ausweichstrategie aufzeigen. Laut dem Modell des „Trojanischen Hasen“ entweichen Leishmanien apoptotischen Neutrophilen, um dann simultan zu ihrer Aufnahme in MΦ, durch die herunterregulierte MΦ-Aktivität, eine produktive Infektion auslösen zu können (Ritter et al. 2009). Durch die von *L. major* induzierte Apoptose der Neutrophilen und Chemokinsekretion werden letztlich MΦ und DZ rekrutiert und ihre gemeinsame Aufnahme getriggert (Ribeiro-Gomes et al. 2012; van Zandbergen et al. 2004; Peters et al. 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Efferozytose der Neutrophilen entscheidenden Einfluss auf die nachfolgende adaptive Immunantwort nimmt (Lim et al. 2020). Vor dem Hintergrund der Erkenntnis, dass die β -2-Integrine Mac-1 und KR4 (CD11c/CD18) ebenfalls als Efferozytoserezeptoren fungieren können (Kourtzelis et al. 2017), wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Phagozytose von mit *L. major* infizierten Neutrophilen durch DZ und MΦ bei einer Ly6G-Defizienz verändert sein könnte.

Nach Infektion mit *L. major* von heterozygoten (Ly6G^{+/+}) und homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{IVM-red}-Mäusen, deren Neutrophile detektierbare rote Fluoreszenzsignale ihres tdTomato aufweisen, konnte mittels FACS-Analyse Folgendes nachgewiesen werden: Nur mit *L. major* infizierte (EGFP⁺), aus Monozyten entstandene MΦ und DZ nahmen das tdTomato-markierte Neutrophilenmaterial auf, was bei EGFP⁻-MΦ und -DZ nicht nachweisbar war (**Abbildung 15**). Für die Nachweisbarkeit von Neutrophilenmaterial nur in mit *L. major* infizierten MΦ und DZ erscheinen zwei Erklärungen denkbar: Entweder bewirkt *L. major* selbst die gleichzeitige Aufnahme von Neutrophilen durch die Phagozyten, oder *L. major* hemmt in ihrer Anwesenheit den Abbau der Neutrophilen in den von ihnen infizierten Phagozyten. Unterschiede zwischen Ly6G-suffizienten und Ly6G-defizienten Tieren konnten nicht nachgewiesen werden. Ly6G scheint nach diesen Ergebnissen zufolge eher nicht als „Iss-Mich-Signal“ für nachfolgend rekrutierte MΦ und DZ im Rahmen der Infektion mit *L. major* zu fungieren. Die Möglichkeit, dass aber *L. major* selbst die Efferozytose der Neutrophilen induziert, wäre eine wichtige Hypothese, die in zukünftigen Studien näher untersucht werden sollte.

4.3 Eintrittsverhalten von (Ly6G-defizienten) Neutrophilen in das mit *L. major* infizierte Gewebe *in vivo*

Das Oberflächenprotein Ly6G scheint an der β -2-Integrin-abhängigen Migration von Neutrophilen in das infizierte Gewebe beteiligt zu sein (Wang et al. 2012; Yipp und Kubes 2013; Nigrovic 2013; Cunin et al. 2019). Während β -2-Integrine an der Extravasation der Neutrophilen beteiligt sind, verläuft ihre interstitielle Migration weitestgehend Integrin-unabhängig (Kourtzelis et al. 2017; Sixt et al. 2001; Lämmermann et al. 2008; Renkawitz und

Sixt 2010). Daher wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob die Rekrutierungskinetik der Neutrophilen bei ihrer Migration in das mit *L. major* infizierte Gewebe durch Ly6G beeinflusst wird. Die beobachtete geringere Infektionsrate Ly6G-defizienter Neutrophiler zum Infektionsbeginn nach 2 Tagen (**Abbildung 13**) könnte durch eine veränderte Interaktion der Neutrophilen mit *L. major* bei einer Ly6G-Defizienz bedingt sein. Daher wurden neben der Rekrutierung der Neutrophilen in heterozygoten (Ly6G^{+/-}) und homozygoten (Ly6G^{-/-}) Catchup^{I^{VM}-red}-Mäusen auch ihre Interaktionen mit *L. major in vivo* mittels Zweiphotonenmikroskopie beobachtet und analysiert.

In Übersichtsaufnahmen ließ sich eine primäre Anhäufung Ly6G-defizienter Neutrophiler in nahe gelegenen Blutgefäßen zum Infektionsort mit *L. major* aufzeichnen, nach der sie diese anscheinend mit einem konzertierten schwarmähnlichen Verhalten, im Vergleich zu Ly6G-suffizienten Neutrophilen, zum Infektionsort hin verlassen (**Abbildung 16**). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass man verschiedene Subpopulationen von Neutrophilen äußerst präzise anhand ihrer Verhaltensmorphologien identifizieren kann (Crainiciuc et al. 2022). In den Bildaufnahmen mit Darstellung der Verlaufspuren der Neutrophilen im zeitlichen Verlauf (**Abbildung 17**) konnte dieser Phänotyp erneut beobachtet werden: 1-2 h p.i. zeigten Ly6G-defiziente Neutrophile niedrigere Eintrittsraten in das mit *L. major* infizierte Gewebe im Vergleich zu den Ly6G-suffizienten Neutrophilen, welche nach 2-3 h p.i. durch höhere Eintrittsraten der Ly6G-defizienten Neutrophilen kompensiert wurden. Demnach führen über die Zeit akkumulierte, ausreichend starke Entzündungssignale letztlich auch bei Ly6G-defizienten Tieren zur ausreichenden Extravasation ihrer Neutrophilen, um mit *L. major* infiziertes Gewebe zu erreichen. Die instantane Neutrophilengeschwindigkeit blieb im Infektionsverlauf von einer Ly6G-Defizienz unbeeinflusst (**Abbildung 17**), was für eine Ly6G-unabhängige interstitielle Migration der Neutrophilen spricht und im Einklang zur bereits beschriebenen Integrin-unabhängigen interstitiellen Migration von Leukozyten steht (Sixt et al. 2001; Lämmermann et al. 2008; Renkawitz und Sixt 2010). Der verspätete Eintritt der Ly6G-defizienten Neutrophilen in das mit *L. major* infizierte Gewebe lässt aber vermuten, dass Ly6G die Extravasation der Neutrophilen beeinflusst.

Die beobachtete geringere Infektionsrate Ly6G-defizienter Neutrophiler zum Infektionsbeginn nach 2 Tagen (**Abbildung 13**) könnte demnach auch durch die verspätete Extravasation bzw. den verzögerten Gewebeeintritt der Neutrophilen durch veränderte Integrin-Interaktionen bei einer Ly6G-Defizienz bedingt sein (Cunin et al. 2019). An den Tagen 7 und 28 p.i. konnte man folglich keine veränderten Infektionsraten der Neutrophilen in Abhängigkeit von Ly6G mehr sehen, da die über die Zeit akkumulierten Entzündungssignale eine mögliche verschlechterte initiale Bekämpfung von *L. major* durch Neutrophile ausreichend zu kompensieren scheinen. Es wäre auch denkbar, dass Ly6G-defiziente Neutrophile durch ihre verspätete Ankunft im mit

L. major infizierten Gewebe (**Abbildung 17 B**), im Vergleich zu Ly6G-suffizienten Neutrophilen, weniger Zeit haben, *L. major* zu phagozytieren und daher geringer infiziert sind. Andererseits könnte der verspätete Eintritt Ly6G-defizienter Neutrophiler in das mit *L. major* infizierte Gewebe auch mit einem veränderten Reifungszustand der Neutrophilen einhergehen, was Einfluss auf ihre Phagozytoseaktivität haben könnte (Hidalgo et al. 2019). Der veränderte Reifungszustand könnte ebenfalls mit der beobachteten erhöhten Ly6C-Expression Ly6G-defizienter Neutrophiler (**Abbildung 11 F**) als Zeichen einer erhöhten Neutrophilenaktivierung in Verbindung gebracht werden (Jutila et al. 1994).

Da sich die Geschwindigkeit der Neutrophilen nach Phagozytose von *L. major* stark reduziert (Peters et al. 2008), wurden instantane Geschwindigkeiten der Neutrophilen in Abhängigkeit von der Distanz zu nächstgelegener *L. major* und mögliche Unterschiede bei Ly6G-Defizienz untersucht. Die Interaktionsanalysen zeigten, dass sowohl die Distanz zur nächsten *L. major* als auch der Infektionszeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die instantanen Geschwindigkeiten der Neutrophilen hatten (**Abbildung 19**). Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von Ly6G. Obwohl Ly6G-defiziente Neutrophile das mit *L. major* infizierte Gewebe verspätet erreichten (**Abbildung 17**), blieb ihre instantane Geschwindigkeit von Ly6G unbeeinflusst.

Um den in den Übersichtsaufnahmen (**Abbildung 16**) beobachteten Phänotyp, dass Ly6G-defiziente Neutrophile die Blutgefäße anscheinend mit einem konzertierten schwarmähnlichen Verhalten im Vergleich zu Ly6G-suffizienten Neutrophilen zum Infektionsort hin verlassen, näher zu quantifizieren, wurden die Bewegungsvektoren von Neutrophilen bestimmt, deren Distanzen zum nächsten Neutrophilen 5-15 μm betragen, und ihre Winkel α zueinander errechnet. Lämmermann et al. konnten zeigen, dass für diese Distanzen ein Schwarmverhalten sehr wahrscheinlich ist (Lämmermann et al. 2013). Die Untersuchungen belegen, dass Ly6G-defiziente Neutrophile mit mittleren und hohen Geschwindigkeiten kleinere Winkel α zwischen den Bewegungsvektoren benachbarter Neutrophiler als Ly6G-suffiziente Neutrophile hatten (**Abbildung 19**). Als Erklärung wäre denkbar, dass die höhere Dichte akkumulierter, Ly6G-defizienter Neutrophiler vor Extravasation zu einer verstärkten Kommunikation der Neutrophilen untereinander führt, weswegen sie sich mit kleineren Winkeln α ihrer Bewegungsvektoren zum Infektionsort bewegen. Diese Vermutung steht jedoch im Kontrast zu Beobachtungen, die zeigen, dass die Verluste der Integrine LFA-1 und Mac-1 mit einer gehemmten Akkumulation der Neutrophilen einhergeht (Lämmermann et al. 2013). Allerdings verwendeten Lämmermann et al. für ihre Versuche LFA-1- und Mac-1-defiziente Mäuse sowie eine fokale Gewebeschädigung durch einen kurzen Zwei-Photonen-Laserpuls (80 mW), um die Neutrophilenrekrutierung darzustellen, was aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Methodiken zu anderen Ergebnissen geführt haben könnte.

4.4 Limitationen

Zur Analyse des Einflusses von Ly6G auf die Immunantwort im Infektionsverlauf wurden in dieser Arbeit passend zum Höhepunkt der Pathogenzahlen nach 2-3 Wochen p.i. mit *L. major* die Zeitpunkte 2, 7 und 28 Tage p.i. gewählt, damit die initiale Immunantwort, die frühe Immunantwort sowie die späte Immunantwort während gleichzeitiger adaptiver Immunantwort miterfasst werden. Ein zusätzlicher Analysezeitpunkt nach mindestens 10 Wochen p.i. wäre auch bereichernd gewesen, um ebenfalls den Einfluss des Oberflächenproteins Ly6G auf chronische Verläufe der KL zu prüfen. Für die Untersuchungen der Interaktionen von MΦ und DZ mit Neutrophilen wurde der Zeitpunkt 2 Tage p.i. gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt der Transfer von *L. major* aus Neutrophilen in DZ und MΦ zu erwarten ist. Die Neutrophilenrekrutierung erreicht ihren Höhepunkt 24 h p.i. (Hurrell et al. 2015; Ribeiro-Gomes et al. 2012; Falcão et al. 2015), weswegen die Bestimmung der Infektionsraten der Neutrophilen auch zu diesem Zeitpunkt geeignet gewesen wäre, was für zukünftige Studien mit berücksichtigt werden könnte.

Wichtig zu erwähnen ist außerdem, dass die natürliche Infektion mit *L. major* über die Sandmücke durch ihr PSG und weitere Speichelbestandteile beeinflusst wird, die chemotaktisch wirken und zu einer verstärkten Rekrutierung von Neutrophilen und MΦ führen (Teixeira et al. 2005). Im Vergleich zur experimentellen intradermalen Inokulation geht die natürliche Infektion auch mit einer stärker lokalisierten und länger anhaltenden Reaktion der Neutrophilen an der Inokulationsstelle einher (Peters et al. 2009). Die in dieser Arbeit verwendeten Infektionsdosen von *L. major* unterscheiden sich daher zur natürlichen, durch die Sandmücke übertragenen, niedrigeren Infektionsdosen mit etwa 5×10^3 - 10^4 (Kimblin et al. 2008). Zur Kompensation der durch den Sandmückenspeichel vermittelten verstärkten Neutrophilenrekrutierung wurde für die FACS-Analysen ein Hochdosisinfektionsmodell mit 1×10^6 *L. major* gewählt und für die Zweiphotonenmikroskopie wurde mit 1×10^4 *L. major* intradermal infiziert, was auch in anderen Studien zu einer ausreichenden Rekrutierung der analysierten Immunzellen führte (Hurrell et al. 2015; Peters et al. 2008). Für die Übertragbarkeit der Erkenntnisse der Modellversuche hinsichtlich der Rolle der Neutrophilen und ihres Ly6G auf die durch natürliche Infektion hervorgerufene KL wären demnach neben dem genetischen Hintergrund der Wirtszelle sowie der infizierten Leishmanienart (vgl. **1.4.3**) auch die Infektionsdosis sowie die veränderte Neutrophilendynamik als Reaktion auf den Stich der Sandmücke mit zu berücksichtigen.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnten mit dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse zur Rolle des Oberflächenproteins Ly6G der Neutrophilen während der Infektion mit *L. major* generiert werden. Die Hypothese, dass Ly6G als „Iss-mich-Signal“ für nachfolgend rekrutierte DZ und M Φ zur Phagozytose von mit Leishmanien infizierten Neutrophilen fungieren könnte, konnte durch diese Arbeit nicht bestätigt werden. Die Aufnahme von Neutrophilenmaterial war zwar lediglich in mit *L. major* infizierten DZ und M Φ nachweisbar, passierte aber unabhängig von Ly6G. Es konnte allerdings die beeinträchtigte Phagozytose von *L. major* durch Ly6G-defiziente Neutrophile während der initialen Immunantwort nach 2 Tagen nachgewiesen werden, höchstwahrscheinlich aufgrund der verzögerten Rekrutierung Ly6G-defizienter Neutrophiler an den Infektionsort. Es wird daher vermutet, dass Ly6G Einfluss auf die Extravasation der Neutrophilen nimmt. Außerdem konnte bei Ly6G-defizienten Neutrophilen ein geschwindigkeitsabhängiges konzertiertes schwarmähnliches Austrittsverhalten der Blutgefäße bei ihrer Migration in mit *L. major* infiziertes Gewebe beobachtet werden.

In früheren Studien konnte demonstriert werden, dass der genetische Ly6G-Mangel *in vivo* keine Veränderung der Neutrophilenmigration in sterilen Entzündungsmodellen, Mykosen, experimentellen Autoimmunenenzephalopathien und Psoriasis-ähnlichen Infektionsmodellen zeigt (Hasenberg et al. 2015). Neutrophile nehmen eine kontrovers diskutierte Rolle während der Leishmanieninfektion ein (Peters et al. 2008) und beeinflussen den gesamten Infektionsverlauf (Peters und Sacks 2009). Auch ihre nachfolgende Interaktion mit M Φ und DZ wirkt sich entscheidend auf die sich anschließende adaptive Immunantwort aus (Ribeiro-Gomes et al. 2012; Ribeiro-Gomes et al. 2015). Diese Arbeit hat erstmalig den Einfluss des genetischen Ly6G-Mangels auf die Dynamik von Neutrophilen im Infektionsmodell mit dem protozoischen Parasiten *L. major* sowie seine Bedeutung für die Immunantwort im Infektionsverlauf untersucht.

Neben den bereits beschriebenen Auswirkungen von Ly6G auf Integrin-Interaktionen (Wang et al. 2012; Yipp und Kubes 2013; Nigrovic 2013; Cunin et al. 2019) deuten kürzlich publizierte Studien auf neue, bisher unerkannte Funktionen von Ly6G hin. Einzelzell-RNA-Sequenzierungen konnten zeigen, dass eine Ly6G-AK-Behandlung nicht, wie vorher angenommen, zu einer vollständigen Depletion von Neutrophilen führt, da schnelle, sich erneuernde Neutrophile im Knochenmark unbeeinflusst davon blieben, sondern eine phänotypische Verschiebung der Neutrophilenpopulationen in Bezug auf den mit dem zirkadianen Rhythmus verbundenen Neutrophilenumsatz bewirkt (Boivin et al. 2020; Vafadarnejad et al. 2020). Da viele der Erkenntnisse über Ly6G auf vermeintlicher Ly6G-AK-Depletion basieren, wäre es wichtig, in zukünftigen Studien auch die Rolle dieser

verschiedenen Neutrophilensubpopulationen in Bezug auf die Kontrolle intrazellulärer Pathogene zu untersuchen.

Auch die Mechanismen und veränderten Integrin-Interaktionen, die zur verspäteten Extravasation Ly6G-defizienter Neutrophiler führen, sollten in zukünftigen Studien identifiziert werden. Ebenso wäre es bedeutsam, zu erforschen, ob sich ein genetischer Mangel anderer Integrine noch stärker auf die Extravasation von Neutrophilen bei ihrer Migration zu Infektionsorten auswirken könnte. Sofern sich eine Ly6G-Überexpression realisieren lässt, wäre es faszinierend, zu analysieren, ob Neutrophile noch schneller aus Blutgefäßen austreten können, um Infektionsorte effizient zu erreichen und welche Auswirkungen dies auf Infektionsverläufe mit *L. major* oder anderen Pathogenen hätte.

Das konzertierte schwarmähnliche Verhalten Ly6G-defizienter Neutrophiler bei ihrer Migration in mit *L. major* infiziertes Gewebe wirft weitere Fragen auf, z. B. welche Vorgänge auf zellulärer Ebene diese Dynamik bewirken. Außerdem sollte in zukünftigen Studien der Phänotyp des geschwindigkeitsabhängigen konzertierten schwarmähnlichen Verhaltens von Ly6G-defizienten Neutrophilen bei ihrer Rekrutierung auch im Kontext anderer Infektionsmodelle und in größeren Stichproben auf Reproduzierbarkeit überprüft werden.

Inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse langfristig auch auf menschliche Infektionsverläufe mit *L. major* übertragen werden können, bleibt aufgrund funktioneller Unterschiede zwischen humanen und murinen Neutrophilen unklar (Regli et al. 2017; Bruijnzeel et al. 2015). Dennoch machen derzeit fehlende Impfmöglichkeiten, ineffektive oder stark nebenwirkungsbehaftete Behandlungsmethoden und Resistenzen gegenüber Medikamenten der Leishmaniose (vgl. **1.4.2**) deutlich, dass es essentiell ist, die lokalen Immunantworten und Interaktionen der beteiligten Zellen im Rahmen einer KL näher zu charakterisieren. Zukünftig könnten Liganden von Ly6G erforscht werden und wichtige Unterschiede zwischen Infektionen in Mausmodellen und menschlichen Krankheiten aufgedeckt werden, um langfristig die Qualität präklinischer Experimente zu verbessern. Diese Arbeit und ihre publizierten Ergebnisse (Kleinholz et al. 2021) konnten eine wichtige Rolle für das auf murinen Neutrophilen vorkommende Ly6G, bezogen auf die Förderung der frühen Bekämpfung von *L. major* durch das Immunsystem, aufzeigen. Weitere Studien werden erforderlich sein, um die Funktionen des Oberflächenproteins Ly6G und dessen Rolle für die Dynamik in Immunreaktionen noch besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die als Teil der angeborenen Immunantwort an den Infektionsort mit *Leishmania major* rekrutiert werden. Durch ihre Granula sind sie befähigt, Pathogene nach der Phagozytose in ihrem Inneren abzutöten. Ihre Rolle während der Leishmanieninfektion wird kontrovers diskutiert und kann sich abhängig von der infizierenden Leishmanienart und dem genetischen Hintergrund des infizierten Wirts sowohl pathologisch als auch protektiv auf den Krankheitsverlauf auswirken. Wie es *L. major* mithilfe von Neutrophilen gelingen könnte, ihre finalen Wirtszellen, die aus Monozyten entstandenen DZ- und M Φ -ähnlichen Phagozyten, zu erreichen, wird kontrovers diskutiert. Diese Arbeit hat untersucht, inwieweit das Oberflächenprotein Ly6G der murinen Neutrophilen, das mit zahlreichen Zelladhäsionsmolekülen interagiert und für das ein Homolog (CD177) in humanen Neutrophilen existiert, die Immunantwort gegenüber *L. major* im Infektionsverlauf beeinflusst.

Für die Analysen wurden genetisch veränderte Mäuse des „Catchup-Modells“, deren homozygote Formen kein Ly6G exprimieren und deren heterozygote Formen eine \approx 50%ige Reduktion in der Ly6G-Expression aufweisen, mit hochinfektiösen metazyklischen Promastigoten von *L. major* infiziert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten signifikant um 40 % verringerte Infektionsraten der Ly6G-defizienten Neutrophilen 2 Tage p.i. sowie einen um 30 % verminderten Anteil der DZ an zum Infektionsort rekrutierten Leukozyten an Tag 28 p.i. in Ly6G-defizienten Tieren im Vergleich zu Ly6G-suffizienten Tieren. Konfokalmikroskopische Bilder konnten die gleichzeitige Aufnahme von tdTomato-markiertem Neutrophilenmaterial und EGFP-exprimierender *L. major* in CD11c⁻ und CD54⁺-Zellen nachweisen. Die Aufnahme von Neutrophilenmaterial war zwar lediglich in mit *L. major* infizierten DZ und M Φ nachweisbar, passierte aber unabhängig von Ly6G. Mittels Zweiphotonenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Ly6G-defiziente Neutrophile nach Akkumulation in den Gefäßen verspätet den Infektionsort erreichten: Während der Anstieg der Ly6G-suffizienten Neutrophilen pro Bildvolumen zwischen den Zeitpunkten 60-120 min p.i. und 120-180 min p.i. nahezu unverändert war, war im Vergleich der Anstieg der Ly6G-defizienten Neutrophilen in der Zeit zwischen 60-120 min p.i. um 50 % vermindert und zwischen 120-180 min p.i. mehr als verdoppelt.

Die Ergebnisse konnten die Hypothese der bei einer Ly6G-Defizienz veränderten Phagozytose von mit *L. major* infizierten Neutrophilen durch DZ und M Φ nicht bestätigen. Es konnte aber gezeigt werden, dass eine Ly6G-Defizienz die initiale Phagozytose von *L. major* durch Neutrophile beeinträchtigt, höchstwahrscheinlich aufgrund der verzögerten Rekrutierung der Ly6G-defizienten Neutrophilen. Daher wird vermutet, dass Ly6G durch seinen Einfluss auf die Extravasation zur frühen Bekämpfung intrazellulärer Pathogene beiträgt. Zukünftige Studien sollten diese Erkenntnisse auch im Kontext anderer Infektionsmodelle auf Reproduzierbarkeit überprüfen, um die Rolle des Ly6G für die Dynamik in Immunreaktionen weiter aufzuklären.

Literaturverzeichnis

- 1 Aga, Eresso; Katschinski, Dörthe M.; van Zandbergen, Ger; Laufs, Helmut; Hansen, Birgit; Müller, Kerstin; Solbach, Werner; Laskay, Tamás (2002): Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. In: *The Journal of Immunology* 169 (2), S. 898–905. DOI: 10.4049/jimmunol.169.2.898.
- 2 Ameen, M. (2010): Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. In: *Clinical and experimental dermatology* 35 (7), S. 699–705. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2010.03851.x.
- 3 Arras, M.; Autenried, P.; Rettich, A.; Spaeni, D.; Rüllicke, T. (2001): Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice. Drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. In: *Comparative medicine* 51 (5), S. 443–456.
- 4 Bai, Ming; Grieshaber-Bouyer, Ricardo; Wang, Junxia; Schmider, Angela B.; Wilson, Zachary S.; Zeng, Liling; Halyabar, Olha et al. (2017): CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. In: *Blood* 130 (19), S. 2092–2100. DOI: 10.1182/blood-2017-03-768507.
- 5 Bajénoff, Marc; Breart, Béatrice; Huang, Alex Y. C.; Qi, Hai; Cazareth, Julie; Braud, Veronique M.; Germain, Ronald N.; Glaichenhaus, Nicolas (2006): Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. In: *The Journal of Experimental Medicine* 203 (3), S. 619–631. DOI: 10.1084/jem.20051474.
- 6 Bates, Paul A. (2007): Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. In: *International journal for parasitology* 37 (10), S. 1097–1106. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.
- 7 Bekhit, Adnan A.; El-Agroudy, Eman; Helmy, Aliaa; Ibrahim, Tamer M.; Shavandi, Amin; Bekhit, Alaa El-Din A. (2018): *Leishmania* treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. In: *European journal of medicinal chemistry* 160, S. 229–244. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.10.022.
- 8 Belkaid, Y.; Mendez, S.; Lira, R.; Kadambi, N.; Milon, G.; Sacks, D. (2000): A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. In: *The Journal of Immunology* 165 (2), S. 969–977. DOI: 10.4049/jimmunol.165.2.969.
- 9 Belkaid, Yasmine; Stebut, Esther von; Mendez, Susana; Lira, Rosalia; Caler, Elisabet; Bertholet, Sylvie; Udey, Mark C.; Sacks, David (2002): CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. In: *The Journal of Immunology* 168 (8), S. 3992–4000. DOI: 10.4049/jimmunol.168.8.3992.
- 10 Blanks, James E.; Moll, Thomas; Eytner, Ruth; Vestweber, Dietmar (1998): Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates β 2-integrin mediated cell attachment to ICAM-1. In: *European journal of immunology* 28 (2), S. 433–443. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<433::AID-IMMU433>3.0.CO;2-U.
- 11 Boivin, Gael; Faget, Julien; Ancey, Pierre-Benoit; Gkasti, Aspasia; Mussard, Julie; Engblom, Camilla; Pfirschke, Christina et al. (2020): Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. In: *Nature communications* 11 (1), S. 2762. DOI: 10.1038/s41467-020-16596-9.
- 12 Bolhassani, Azam; Taheri, Tahereh; Taslimi, Yasaman; Zamanilui, Soheila; Zahedifard, Farnaz; Seyed, Negar; Torkashvand, Fatemeh et al. (2011): Fluorescent *Leishmania* species. Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in

- vivo studies. In: *Experimental parasitology* 127 (3), S. 637–645. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.12.006.
- 13 Borregaard, N.; Heiple, J. M.; Simons, E. R.; Clark, R. A. (1983): Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. In: *The Journal of cell biology* 97 (1), S. 52–61. DOI: 10.1083/jcb.97.1.52.
 - 14 Brinkmann, Volker; Reichard, Ulrike; Goosmann, Christian; Fauler, Beatrix; Uhlemann, Yvonne; Weiss, David S.; Weinrauch, Yvette; Zychlinsky, Arturo (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663), S. 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
 - 15 Bruijnzeel, Piet L. B.; Uddin, Mohib; Koenderman, Leo (2015): Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? In: *Journal of leukocyte biology* 98 (4), S. 549–556. DOI: 10.1189/jlb.3VMR1214-600RR.
 - 16 Bunn, Patrick T.; Montes de Oca, Marcela; Labastida Rivera, Fabian de; Kumar, Rajiv; Ng, Susanna S.; Edwards, Chelsea L.; Faleiro, Rebecca J. et al. (2018): Distinct Roles for CD4+ Foxp3+ Regulatory T Cells and IL-10-Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 201 (11), S. 3362–3372. DOI: 10.4049/jimmunol.1701582.
 - 17 Burke, Victoria E.; Lopez, Fred A. (2017): Approach to skin and soft tissue infections in non-HIV immunocompromised hosts. In: *Current opinion in infectious diseases* 30 (4), S. 354–363. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000378.
 - 18 Carlsen, Eric D.; Hay, Christie; Henard, Calvin A.; Popov, Vsevolod; Garg, Nisha Jain; Soong, Lynn (2013): *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. In: *Infection and immunity* 81 (11), S. 3966–3974. DOI: 10.1128/IAI.00770-13.
 - 19 Carlsen, Eric D.; Jie, Zuliang; Liang, Yuejin; Henard, Calvin A.; Hay, Christie; Sun, Jiaren; Matos Guedes, Herbert de; Soong, Lynn (2015): Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance. In: *Journal of innate immunity* 7 (4), S. 354–363. DOI: 10.1159/000373923.
 - 20 Chagas, Andrezza C.; Oliveira, Fabiano; Debrabant, Alain; Valenzuela, Jesus G.; Ribeiro, José M. C.; Calvo, Eric (2014): Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits X1a contact activation in human plasma. In: *PLoS pathogens* 10 (2), e1003923. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003923.
 - 21 Charmoy, Melanie; Hurrell, Benjamin P.; Romano, Audrey; Lee, Sang Hun; Ribeiro-Gomes, Flavia; Riteau, Nicolas; Mayer-Barber, Katrin et al. (2016): The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. In: *European journal of immunology* 46 (4), S. 897–911. DOI: 10.1002/eji.201546015.
 - 22 Charmoy, Mélanie; Brunner-Agten, Saskia; Aebischer, David; Auderset, Floriane; Launois, Pascal; Milon, Geneviève; Proudfoot, Amanda E. I.; Tacchini-Cottier, Fabienne (2010): Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. In: *PLoS pathogens* 6 (2), e1000755. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000755.
 - 23 Chatelain, R.; Varkila, K.; Coffman, R. L. (1992): IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. In: *The Journal of Immunology* 148 (4), S. 1182–1187.

- 24 Chaves, Mariana M.; Lee, Sang Hun; Kamenyeva, Olena; Ghosh, Kashinath; Peters, Nathan C.; Sacks, David (2020): The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection transmitted by sand fly bite. In: *PLoS pathogens* 16 (11), e1008674. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008674.
- 25 Chen, Lin; Zhang, Zhi-Hui; Watanabe, Tadashi; Yamashita, Takao; Kobayakawa, Takatoshi; Kaneko, Akira; Fujiwara, Hiromi; Sendo, Fujiro (2005): The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. In: *Parasitology international* 54 (2), S. 109–118. DOI: 10.1016/j.parint.2005.02.001.
- 26 Costa, Carlos Henrique Nery; Peters, Nathan C.; Maruyama, Sandra Regina; Brito, Eldo Cardoso de; Santos, Isabel Kinney Ferreira de Miranda (2011): Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. In: *PLoS neglected tropical diseases* 5 (3), e943. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000943.
- 27 Crainiciuc, Georgiana; Palomino-Segura, Miguel; Molina-Moreno, Miguel; Sicilia, Jon; Aragonés, David G.; Li, Jackson Liang Yao; Madurga, Rodrigo et al. (2022): Behavioural immune landscapes of inflammation. In: *Nature* 601 (7893), S. 415–421. DOI: 10.1038/s41586-021-04263-y.
- 28 Crosby, Erika J.; Goldschmidt, Michael H.; Wherry, E. John; Scott, Phillip (2014): Engagement of NKG2D on bystander memory CD8 T cells promotes increased immunopathology following *Leishmania major* infection. In: *PLoS pathogens* 10 (2), e1003970. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003970.
- 29 Cunin, Pierre; Lee, Pui Y.; Kim, Edy; Schmider, Angela B.; Cloutier, Nathalie; Pare, Alexandre; Gunzer, Matthias et al. (2019): Differential attenuation of $\beta 2$ integrin-dependent and -independent neutrophil migration by Ly6G ligation. In: *Blood advances* 3 (3), S. 256–267. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018026732.
- 30 Desjardins, M.; Descoteaux, A. (1997): Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. In: *The Journal of Experimental Medicine* 185 (12), S. 2061–2068. DOI: 10.1084/jem.185.12.2061.
- 31 Dinauer, Mary C. (2007): Disorders of neutrophil function: an overview. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 412, S. 489–504. DOI: 10.1007/978-1-59745-467-4_30.
- 32 Domínguez, Mercedes; Moreno, Inmaculada; López-Trascasa, Margarita; Toraño, Alfredo (2002): Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. In: *The Journal of Experimental Medicine* 195 (4), S. 451–459. DOI: 10.1084/jem.20011319.
- 33 DTG (2010): AWMF-Leitlinie: Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland. Online verfügbar unter https://www.dtg.org/images/Leitlinien_DTG/Leitlinie_Kutane_Leishmaniasis.pdf, zuletzt geprüft am 15.02.2022.
- 34 Dubie, Teshager; Mohammed, Yasin (2020): Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. In: *Journal of immunology research* 2020, S. 2496713. DOI: 10.1155/2020/2496713.
- 35 Dudeck, Jan; Kotrba, Johanna; Immler, Roland; Hoffmann, Aaron; Voss, Martin; Alexaki, Vasileia Ismini; Morton, Lorena et al. (2021): Directional mast cell degranulation of tumor necrosis factor into blood vessels primes neutrophil extravasation. In: *Immunity* 54 (3), 468-483.e5. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.12.017.

- 36 Dupré-Crochet, Sophie; Erard, Marie; Nüße, Oliver (2013): ROS production in phagocytes: why, when, and where? In: *Journal of leukocyte biology* 94 (4), S. 657–670. DOI: 10.1189/jlb.1012544.
- 37 Elmahallawy, Ehab Kotb; Alkhalidi, Abdulsalam A. M.; Saleh, Amira A. (2021): Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 139, S. 111671. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111671.
- 38 Evans, T. G.; Thai, L.; Granger, D. L.; Hibbs, J. B. (1993): Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. In: *The Journal of Immunology* 151 (2), S. 907–915.
- 39 Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Konowal, A.; Freed, P. W.; Westcott, J. Y.; Henson, P. M. (1998): Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. In: *Journal of Clinical Investigation* 101 (4), S. 890–898. DOI: 10.1172/JCI1112.
- 40 Falcão, Sarah A. C.; Weinkopff, Tiffany; Hurrell, Benjamin P.; Celes, Fabiana S.; Curvelo, Rebecca P.; Prates, Deboraci B.; Barral, Aldina et al. (2015): Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. In: *PLoS neglected tropical diseases* 9 (3), e0003601. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003601.
- 41 Farber, Donna L.; Netea, Mihai G.; Radbruch, Andreas; Rajewsky, Klaus; Zinkernagel, Rolf M. (2016): Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. In: *Nature reviews. Immunology* 16 (2), S. 124–128. DOI: 10.1038/nri.2016.13.
- 42 Filipe-Santos, Orchidée; Pescher, Pascale; Breart, Béatrice; Lippuner, Christoph; Aebischer, Toni; Glaichenhaus, Nicolas; Späth, Gerald F.; Bousso, Philippe (2009): A dynamic map of antigen recognition by CD4 T cells at the site of *Leishmania major* infection. In: *Cell host & microbe* 6 (1), S. 23–33. DOI: 10.1016/j.chom.2009.04.014.
- 43 Forestier, Claire-Lise; Gao, Qi; Boons, Geert-Jan (2014): *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4, S. 193. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00193.
- 44 Forestier, Claire-Lise; Machu, Christophe; Loussert, Celine; Pescher, Pascale; Späth, Gerald F. (2011): Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. In: *Cell host & microbe* 9 (4), S. 319–330. DOI: 10.1016/j.chom.2011.03.011.
- 45 Freitas, Marisa; Lima, José L. F. C.; Fernandes, Eduarda (2009): Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. In: *Analytica chimica acta* 649 (1), S. 8–23. DOI: 10.1016/j.aca.2009.06.063.
- 46 Gonzalez-Lombana, Claudia; Gimblet, Ciara; Bacellar, Olivia; Oliveira, Walker W.; Passos, Sara; Carvalho, Lucas P.; Goldschmidt, Michael et al. (2013): IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. In: *PLoS pathogens* 9 (3), e1003243. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003243.
- 47 Guimarães-Costa, Anderson B.; Nascimento, Michelle T. C.; Froment, Giselle S.; Soares, Rodrigo P. P.; Morgado, Fernanda N.; Conceição-Silva, Fátima; Saraiva, Elvira M. (2009): *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (16), S. 6748–6753. DOI: 10.1073/pnas.0900226106.
- 48 Hasenberg, Anja; Hasenberg, Mike; Männ, Linda; Neumann, Franziska; Borkenstein, Lars; Stecher, Manuel; Kraus, Andreas et al. (2015): Catchup. A mouse model for

- imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. In: *Nature methods* 12 (5), S. 445–452. DOI: 10.1038/nmeth.3322.
- 49 Heinzl, F. P.; Sadick, M. D.; Holaday, B. J.; Coffman, R. L.; Locksley, R. M. (1989): 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. In: *The Journal of Experimental Medicine* 169 (1), S. 59–72. DOI: 10.1084/jem.169.1.59.
- 50 Heyde, Sandrina; Philipsen, Lars; Formaglio, Pauline; Fu, Yan; Baars, Iris; Höbbel, Guido; Kleinholz, Corinna L. et al. (2018): CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient *Leishmania* proliferation and cell-to-cell transmission. In: *PLoS pathogens* 14 (10), e1007374. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007374.
- 51 Hickey, Michael J. (2012): Has Ly6G finally found a job? In: *Blood* 120 (7), S. 1352–1353. DOI: 10.1182/blood-2012-06-435164.
- 52 Hidalgo, Andrés; Chilvers, Edwin R.; Summers, Charlotte; Koenderman, Leo (2019): The Neutrophil Life Cycle. In: *Trends in Immunology* 40 (7), S. 584–597. DOI: 10.1016/j.it.2019.04.013.
- 53 Hondalus, M. K.; Diamond, M. S.; Rosenthal, L. A.; Springer, T. A.; Mosser, D. M. (1993): The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-1 to bind to mammalian cells. In: *Infection and immunity* 61 (7), S. 2919–2929. DOI: 10.1128/iai.61.7.2919-2929.1993.
- 54 Hoseini, Shervin G.; Javanmard, Shaghayegh H.; Zarkesh, Sayyed H.; Khamesipour, Ali; Rafiei, Laleh; Karbalaie, Khadijeh; Nilforoushzade, Mohamadali et al. (2012): Regulatory T-cell profile in early and late lesions of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. In: *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 17 (6), S. 513–518.
- 55 Huang, Miao-Tzu; Larbi, Karen Y.; Scheiermann, Christoph; Woodfin, Abigail; Gerwin, Nicole; Haskard, Dorian O.; Nourshargh, Sussan (2006): ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. In: *Blood* 107 (12), S. 4721–4727. DOI: 10.1182/blood-2005-11-4683.
- 56 Hurrell, Benjamin P.; Beaumann, Manon; Heyde, Sandrina; Regli, Ivo B.; Müller, Andreas J.; Tacchini-Cottier, Fabienne (2017): Frontline Science. *Leishmania mexicana* amastigotes can replicate within neutrophils. In: *Journal of leukocyte biology : JLB* 102 (5), S. 1187–1198. DOI: 10.1189/jlb.4HI0417-158R.
- 57 Hurrell, Benjamin P.; Regli, Ivo B.; Tacchini-Cottier, Fabienne (2016): Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. In: *Trends in parasitology* 32 (5), S. 392–401. DOI: 10.1016/j.pt.2016.02.003.
- 58 Hurrell, Benjamin P.; Schuster, Steffen; Grün, Eva; Coutaz, Manuel; Williams, Roderick A.; Held, Werner; Malissen, Bernard et al. (2015): Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. In: *PLoS pathogens* 11 (5), e1004929. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004929.
- 59 Iborra, Salvador; Solana, José Carlos; Requena, José María; Soto, Manuel (2018): Vaccine candidates against leishmania under current research. In: *Expert review of vaccines* 17 (4), S. 323–334. DOI: 10.1080/14760584.2018.1459191.
- 60 Ishibashi, Y.; Claus, S.; Relman, D. A. (1994): Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). In: *The Journal of Experimental Medicine* 180 (4), S. 1225–1233. DOI: 10.1084/jem.180.4.1225.

- 61 Janeway, Charles A.; Medzhitov, Ruslan (2002): Innate immune recognition. In: *Annual review of immunology* 20, S. 197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
- 62 Jerke, Uwe; Rolle, Susanne; Dittmar, Gunnar; Bayat, Behnaz; Santoso, Sentot; Sporbert, Anje; Luft, Friedrich; Kettritz, Ralph (2011): Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (9), S. 7070–7081. DOI: 10.1074/jbc.M110.171256.
- 63 Jutila, Davin B.; Kurk, Sandy; Jutila, Mark A. (1994): Differences in the expression of Ly-6C on neutrophils and monocytes following PI-PLC hydrolysis and cellular activation. In: *Immunology Letters* 41 (1), S. 49–57. DOI: 10.1016/0165-2478(94)90056-6.
- 64 Kamhawi, Shaden (2006): Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? In: *Trends in parasitology* 22 (9), S. 439–445. DOI: 10.1016/j.pt.2006.06.012.
- 65 Kaye, Paul; Scott, Phillip (2011): Leishmaniasis. Complexity at the host-pathogen interface. In: *Nature reviews. Microbiology* 9 (8), S. 604–615. DOI: 10.1038/nrmicro2608.
- 66 Kimblin, Nicola; Peters, Nathan; Debrabant, Alain; Secundino, Nagila; Egen, Jackson; Lawyer, Phillip; Fay, Michael P. et al. (2008): Quantification of the infectious dose of Leishmania major transmitted to the skin by single sand flies. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29), S. 10125–10130. DOI: 10.1073/pnas.0802331105.
- 67 Kleinholz, Corinna L.; Riek-Burchardt, Monika; Seiß, Elena A.; Amore, Jonas; Gintschel, Patricia; Philipsen, Lars; Bouso, Philippe et al. (2021): Ly6G deficiency alters the dynamics of neutrophil recruitment and pathogen capture during Leishmania major skin infection. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 15071. DOI: 10.1038/s41598-021-94425-9.
- 68 Kobayashi, Scott D.; DeLeo, Frank R. (2009): Role of neutrophils in innate immunity. A systems biology-level approach. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 1 (3), S. 309–333. DOI: 10.1002/wsbm.32.
- 69 Kourtzelis, Ioannis; Mitroulis, Ioannis; Renesse, Janusz von; Hajishengallis, George; Chavakis, Triantafyllos (2017): From leukocyte recruitment to resolution of inflammation. The cardinal role of integrins. In: *Journal of leukocyte biology* 102 (3), S. 677–683. DOI: 10.1189/jlb.3MR0117-024R.
- 70 Kreisel, Daniel; Nava, Ruben G.; Li, Wenjun; Zinselmeyer, Bernd H.; Wang, Baomei; Lai, Jiaming; Pless, Robert et al. (2010): In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (42), S. 18073–18078. DOI: 10.1073/pnas.1008737107.
- 71 Kuwano, Yoshihiro; Spelten, Oliver; Zhang, Hong; Ley, Klaus; Zarbock, Alexander (2010): Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. In: *Blood* 116 (4), S. 617–624. DOI: 10.1182/blood-2010-01-266122.
- 72 Lämmermann, Tim; Afonso, Philippe V.; Angermann, Bastian R.; Wang, Ji Ming; Kastenmüller, Wolfgang; Parent, Carole A.; Germain, Ronald N. (2013): Neutrophil swarms require LTβ4 and integrins at sites of cell death in vivo. In: *Nature* 498 (7454), S. 371–375. DOI: 10.1038/nature12175.
- 73 Lämmermann, Tim; Bader, Bernhard L.; Monkley, Susan J.; Worbs, Tim; Wedlich-Söldner, Roland; Hirsch, Karin; Keller, Markus et al. (2008): Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. In: *Nature* 453 (7191), S. 51–55. DOI: 10.1038/nature06887.

- 74 Laskay, Tamás; van Zandbergen, Ger; Solbach, Werner (2003): Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? In: *Trends in microbiology* 11 (5), S. 210–214. DOI: 10.1016/s0966-842x(03)00075-1.
- 75 Laskay, Tamás; van Zandbergen, Ger; Solbach, Werner (2008): Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. In: *Immunobiology* 213 (3-4), S. 183–191. DOI: 10.1016/j.imbio.2007.11.010.
- 76 Lee, Pui Y.; Wang, Jun-Xia; Parisini, Emilio; Dascher, Christopher C.; Nigrovic, Peter A. (2013): Ly6 family proteins in neutrophil biology. In: *Journal of leukocyte biology* 94 (4), S. 585–594. DOI: 10.1189/jlb.0113014.
- 77 León, Beatriz; López-Bravo, María; Ardavin, Carlos (2007): Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. In: *Immunity* 26 (4), S. 519–531. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.01.017.
- 78 Ley, Klaus; Laudanna, Carlo; Cybulsky, Myron I.; Nourshargh, Sussan (2007): Getting to the site of inflammation. The leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (9), S. 678–689. DOI: 10.1038/nri2156.
- 79 Liese, Jan; Rooijackers, Suzan H. M.; van Strijp, Jos A. G.; Novick, Richard P.; Dustin, Michael L. (2013): Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of *Staphylococcus aureus* skin abscess formation. In: *Cellular microbiology* 15 (6), S. 891–909. DOI: 10.1111/cmi.12085.
- 80 Lim, Kihong; Kim, Tae-Hyoun; Trzeciak, Alissa; Amitrano, Andrea M.; Reilly, Emma C.; Prizant, Hen; Fowell, Deborah J. et al. (2020): In situ neutrophil efferocytosis shapes T cell immunity to influenza infection. In: *Nature immunology* 21 (9), S. 1046–1057. DOI: 10.1038/s41590-020-0746-x.
- 81 Lima, Glória M.A.C; Vallochi, Adriana L.; Silva, Ulisses R.; Bevilacqua, Estela M.A.F; Kiffer, Maísa M.F; Abrahamsohn, Iles A. (1998): The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. In: *Immunology Letters* 64 (2-3), S. 145–151. DOI: 10.1016/S0165-2478(98)00099-6.
- 82 Lopez Kostka, Susanna; Dinges, Stephanie; Griewank, Klaus; Iwakura, Yoichiro; Udey, Mark C.; Stebut, Esther von (2009): IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (5), S. 3039–3046. DOI: 10.4049/jimmunol.0713598.
- 83 Madisen, Linda; Zwingman, Theresa A.; Sunkin, Susan M.; Oh, Seung Wook; Zariwala, Hatim A.; Gu, Hong; Ng, Lydia L. et al. (2010): A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. In: *Nature neuroscience* 13 (1), S. 133–140. DOI: 10.1038/nn.2467.
- 84 Mantovani, Alberto; Cassatella, Marco A.; Costantini, Claudio; Jaillon, Sébastien (2011): Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (8), S. 519–531. DOI: 10.1038/nri3024.
- 85 Mariathasan, Sanjeev; Monack, Denise M. (2007): Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (1), S. 31–40. DOI: 10.1038/nri1997.
- 86 Martín-Fontecha, Alfonso; Thomsen, Lindy L.; Brett, Sara; Gerard, Craig; Lipp, Martin; Lanzavecchia, Antonio; Sallusto, Federica (2004): Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. In: *Nature immunology* 5 (12), S. 1260–1265. DOI: 10.1038/ni1138.
- 87 Marzano, Angelo V.; Ortega-Loayza, Alex G.; Heath, Michael; Morse, Daniel; Genovese, Giovanni; Cugno, Massimo (2019): Mechanisms of Inflammation in

- Neutrophil-Mediated Skin Diseases. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 1059. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01059.
- 88 Massena, Sara; Christoffersson, Gustaf; Hjertröm, Elina; Zcharia, Eyal; Vlodaysky, Israel; Ausmees, Nora; Rolny, Charlotte et al. (2010): A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. In: *Blood* 116 (11), S. 1924–1931. DOI: 10.1182/blood-2010-01-266072.
- 89 McDonald, Braedon; Pittman, Keir; Menezes, Gustavo B.; Hirota, Simon A.; Slaba, Ingrid; Waterhouse, Christopher C. M.; Beck, Paul L. et al. (2010): Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6002), S. 362–366. DOI: 10.1126/science.1195491.
- 90 McEver, R. P.; Cummings, R. D. (1997): Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. In: *The Journal of clinical investigation* 100 (3), S. 485–491. DOI: 10.1172/JCI119556.
- 91 Medzhitov, Ruslan (2008): Origin and physiological roles of inflammation. In: *Nature* 454 (7203), S. 428–435. DOI: 10.1038/nature07201.
- 92 Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry* 11 (2), S. 231–238. DOI: 10.1002/cyto.990110203.
- 93 Mißlitz, Ana; Mottram, Jeremy C.; Overath, Peter; Aebischer, Toni (2000): Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 107 (2), S. 251–261. DOI: 10.1016/S0166-6851(00)00195-X.
- 94 Moreau, Hélène D.; Lemaître, Fabrice; Terriac, Emmanuel; Azar, Georges; Piel, Matthieu; Lennon-Dumenil, Ana-Maria; Bousso, Philippe (2012): Dynamic in situ cytometry uncovers T cell receptor signaling during immunological synapses and kinapses in vivo. In: *Immunity* 37 (2), S. 351–363. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.05.014.
- 95 Mosser, D. M.; Edelson, P. J. (1984): Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. In: *The Journal of Immunology* 132 (3), S. 1501–1505.
- 96 Müller, Andreas J.; Aeschlimann, Salome; Olekhovitch, Romain; Dacher, Mariko; Späth, Gerald F.; Bousso, Philippe (2013): Photoconvertible pathogen labeling reveals nitric oxide control of *Leishmania* major infection in vivo via dampening of parasite metabolism. In: *Cell host & microbe* 14 (4), S. 460–467. DOI: 10.1016/j.chom.2013.09.008.
- 97 Müller, Andreas J.; Filipe-Santos, Orchidée; Eberl, Gerard; Aebischer, Toni; Späth, Gerald F.; Bousso, Philippe (2012): CD4+ T cells rely on a cytokine gradient to control intracellular pathogens beyond sites of antigen presentation. In: *Immunity* 37 (1), S. 147–157. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.05.015.
- 98 Murphy, Kenneth P.; Janeway, Charles; Travers, Paul; Walport, Mark; Mowat, Allan; Weaver, Casey T. (2012): *Janeway's immunobiology*. 8. ed.
- 99 Murray, H. W.; Jungbluth, A.; Ritter, E.; Montelibano, C.; Marino, M. W. (2000): Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. In: *Infection and immunity* 68 (11), S. 6289–6293. DOI: 10.1128/IAI.68.11.6289-6293.2000.
- 100 Nashleanas, M.; Kanaly, S.; Scott, P. (1998): Control of *Leishmania* major infection in mice lacking TNF receptors. In: *The Journal of Immunology* 160 (11), S. 5506–5513.
- 101 Nauseef, William M. (2007): How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. In: *Immunological reviews* 219, S. 88–102. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x.

- 102 Neumann, Jens; Riek-Burchardt, Monika; Herz, Josephine; Doepfner, Thorsten R.; König, Rebecca; Hütten, Heiko; Etemire, Eloho et al. (2015): Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke. In: *Acta neuropathologica* 129 (2), S. 259–277. DOI: 10.1007/s00401-014-1355-2.
- 103 Ng, Lai Guan; Qin, Jim S.; Roediger, Ben; Wang, Yilin; Jain, Rohit; Cavanagh, Lois L.; Smith, Adrian L. et al. (2011): Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. In: *The Journal of investigative dermatology* 131 (10), S. 2058–2068. DOI: 10.1038/jid.2011.179.
- 104 Nigrovic, Peter A. (2013): Response. Ly6G: a work in progress. In: *Blood* 121 (1), S. 242–243. DOI: 10.1182/blood-2012-10-459784.
- 105 Novais, Fernanda O.; Carvalho, Lucas P.; Graff, Joel W.; Beiting, Daniel P.; Ruthel, Gordon; Roos, David S.; Betts, Michael R. et al. (2013): Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. In: *PLoS pathogens* 9 (7), e1003504. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003504.
- 106 Novais, Fernanda O.; Santiago, Rômulo C.; Báfica, André; Khouri, Ricardo; Afonso, Lilian; Borges, Valéria M.; Brodskyn, Cláudia et al. (2009): Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (12), S. 8088–8098. DOI: 10.4049/jimmunol.0803720.
- 107 Olivier, Martin; Atayde, Vanessa Diniz; Isnard, Amandine; Hassani, Kasra; Shio, Marina Tiemi (2012): *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. In: *Microbes and infection* 14 (15), S. 1377–1389. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.05.014.
- 108 Oualha, Rafah; Barhoumi, Mourad; Marzouki, Soumaya; Harigua-Souiai, Emna; Ben Ahmed, Melika; Guizani, Ikram (2019): Infection of Human Neutrophils With *Leishmania infantum* or *Leishmania major* Strains Triggers Activation and Differential Cytokines Release. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 9, S. 153. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00153.
- 109 Passelli, Katuska; Billion, Oaklyne; Tacchini-Cottier, Fabienne (2021): The Impact of Neutrophil Recruitment to the Skin on the Pathology Induced by *Leishmania* Infection. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 649348. DOI: 10.3389/fimmu.2021.649348.
- 110 Pedraza-Zamora, C. P.; Delgado-Domínguez, J.; Zamora-Chimal, J.; Becker, I. (2017): Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. In: *Parasite immunology* 39 (4). DOI: 10.1111/pim.12420.
- 111 Percopo, Caroline M.; Brenner, Todd A.; Ma, Michelle; Kraemer, Laura S.; Hakeem, Reem M. A.; Lee, James J.; Rosenberg, Helene F. (2017): SiglecF + Gr1 hi eosinophils are a distinct subpopulation within the lungs of allergen-challenged mice. In: *J Leukoc Biol* 101 (1), S. 321–328. DOI: 10.1189/jlb.3A0416-166R.
- 112 Peters, Nathan C.; Egen, Jackson G.; Secundino, Nagila; Debrabant, Alain; Kimblin, Nicola; Kamhawi, Shaden; Lawyer, Phillip et al. (2008): In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. In: *Science (New York, N.Y.)* 321 (5891), S. 970–974. DOI: 10.1126/science.1159194.
- 113 Peters, Nathan C.; Kimblin, Nicola; Secundino, Nagila; Kamhawi, Shaden; Lawyer, Phillip; Sacks, David L. (2009): Vector transmission of *leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. In: *PLoS pathogens* 5 (6), e1000484. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000484.

- 114 Peters, Nathan C.; Sacks, David L. (2009): The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. In: *Cellular microbiology* 11 (9), S. 1290–1296. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01348.x.
- 115 Puentes, S. M.; Da Silva, R. P.; Sacks, D. L.; Hammer, C. H.; Joiner, K. A. (1990): Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. In: *The Journal of Immunology* 145 (12), S. 4311–4316.
- 116 Regli, Ivo B.; Passelli, Katuska; Hurrell, Benjamin P.; Tacchini-Cottier, Fabienne (2017): Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to Escape Neutrophil Killing. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1558. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01558.
- 117 Regli, Ivo B.; Passelli, Katuska; Martínez-Salazar, Berenice; Amore, Jonas; Hurrell, Benjamin P.; Müller, Andreas J.; Tacchini-Cottier, Fabienne (2020): TLR7 Sensing by Neutrophils Is Critical for the Control of Cutaneous Leishmaniasis. In: *Cell reports* 31 (10), S. 107746. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107746.
- 118 Renkawitz, Jörg; Sixt, Michael (2010): Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. In: *EMBO reports* 11 (10), S. 744–750. DOI: 10.1038/embor.2010.147.
- 119 Ribeiro, JoséM.C. (1989): Vector saliva and its role in parasite transmission. In: *Experimental parasitology* 69 (1), S. 104–106. DOI: 10.1016/0014-4894(89)90177-X.
- 120 Ribeiro-Gomes, F. L.; Romano, A.; Lee, S.; Roffê, E.; Peters, N. C.; Debrabant, A.; Sacks, D. (2015): Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8⁺ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. In: *Cell death & disease* 6, e2018. DOI: 10.1038/cddis.2015.351.
- 121 Ribeiro-Gomes, Flavia L.; Peters, Nathan C.; Debrabant, Alain; Sacks, David L. (2012): Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. In: *PLoS pathogens* 8 (2), e1002536. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002536.
- 122 Ribeiro-Gomes, Flávia L.; Otero, Ana C.; Gomes, Nitza A.; Moniz-De-Souza, Maria Carolina A.; Cysne-Finkelstein, Lea; Arnholdt, Andrea C.; Calich, Vera L. et al. (2004): Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. In: *The Journal of Immunology* 172 (7), S. 4454–4462. DOI: 10.4049/jimmunol.172.7.4454.
- 123 Rink, Lothar; Kruse, Andrea; Haase, Hajo (2015): Immunologie für Einsteiger. 2., neu bearb. u. aktual. Aufl. Berlin: Springer Spektrum.
- 124 Ritter, Uwe; Frischknecht, Freddy; van Zandbergen, Ger (2009): Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? In: *Trends in parasitology* 25 (11), S. 505–510. DOI: 10.1016/j.pt.2009.08.003.
- 125 Rogers, M. E.; Chance, M. L.; Bates, P. A. (2002): The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. In: *Parasitology* 124 (Pt 5), S. 495–507. DOI: 10.1017/s0031182002001439.
- 126 Rogers, Matthew E.; Ilg, Thomas; Nikolaev, Andrei V.; Ferguson, Michael A. J.; Bates, Paul A. (2004): Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. In: *Nature* 430 (6998), S. 463–467. DOI: 10.1038/nature02675.
- 127 Rohousová, Iva; Volf, Petr (2006): Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. In: *Folia parasitologica* 53 (3), S. 161–171.
- 128 Rossi, Matteo; Fasel, Nicolas (2018): How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! In: *International Immunology* 30 (3), S. 103–111. DOI: 10.1093/intimm/dxx075.
- 129 Ruiz, J. H.; Becker, I. (2007): CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. In: *Parasite immunology* 29 (12), S. 671–678. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2007.00991.x.

- 130 Sachs, Ulrich J. H.; Andrei-Selmer, Cornelia L.; Maniar, Amudhan; Weiss, Timo; Paddock, Cathy; Orlova, Valeria V.; Choi, Eun Young et al. (2007): The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). In: *The Journal of biological chemistry* 282 (32), S. 23603–23612. DOI: 10.1074/jbc.M701120200.
- 131 Sacks, David; Noben-Trauth, Nancy (2002): The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (11), S. 845–858. DOI: 10.1038/nri933.
- 132 Sarris, Milka; Masson, Jean-Baptiste; Maurin, Damien; van der Aa, Lieke M.; Boudinot, Pierre; Lortat-Jacob, Hugues; Herbomel, Philippe (2012): Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. In: *Current biology : CB* 22 (24), S. 2375–2382. DOI: 10.1016/j.cub.2012.11.018.
- 133 Savill, J. S.; Wyllie, A. H.; Henson, J. E.; Walport, M. J.; Henson, P. M.; Haslett, C. (1989): Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. In: *Journal of Clinical Investigation* 83 (3), S. 865–875. DOI: 10.1172/JCI113970.
- 134 Scharton, T. M.; Scott, P. (1993): 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. In: *The Journal of Experimental Medicine* 178 (2), S. 567–577. DOI: 10.1084/jem.178.2.567.
- 135 Scott, P.; Natovitz, P.; Coffman, R. L.; Pearce, E.; Sher, A. (1988): Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. In: *The Journal of Experimental Medicine* 168 (5), S. 1675–1684. DOI: 10.1084/jem.168.5.1675.
- 136 Scott, Phillip; Novais, Fernanda O. (2016): Cutaneous leishmaniasis. Immune responses in protection and pathogenesis. In: *Nature reviews. Immunology* 16 (9), S. 581–592. DOI: 10.1038/nri.2016.72.
- 137 Sengeløv, H.; Kjeldsen, L.; Diamond, M. S.; Springer, T. A.; Borregaard, N. (1993): Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. In: *Journal of Clinical Investigation* 92 (3), S. 1467–1476. DOI: 10.1172/JCI116724.
- 138 Shaner, Nathan C.; Campbell, Robert E.; Steinbach, Paul A.; Giepmans, Ben N. G.; Palmer, Amy E.; Tsien, Roger Y. (2004): Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. In: *Nature biotechnology* 22 (12), S. 1567–1572. DOI: 10.1038/nbt1037.
- 139 Shaw, Sunil K.; Ma, Shuo; Kim, Michael B.; Rao, Ravi M.; Hartman, Charles U.; Froio, Richard M.; Yang, Lin et al. (2004): Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. In: *The Journal of Experimental Medicine* 200 (12), S. 1571–1580. DOI: 10.1084/jem.20040965.
- 140 Singh, Bhawana; Sundar, Shyam (2012): Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. In: *Vaccine* 30 (26), S. 3834–3842. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.03.068.
- 141 Sixt, M.; Hallmann, R.; Wendler, O.; Scharffetter-Kochanek, K.; Sorokin, L. M. (2001): Cell adhesion and migration properties of beta 2-integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. Relevance for leukocyte extravasation. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (22), S. 18878–18887. DOI: 10.1074/jbc.M010898200.
- 142 Sousa, L. M. A.; Carneiro, M. B. H.; Resende, M. E.; Martins, L. S.; Dos Santos, L. M.; Vaz, L. G.; Mello, P. S. et al. (2014): Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. In: *Parasite immunology* 36 (1), S. 13–31. DOI: 10.1111/pim.12078.

- 143 Souza Carmo, Erico Vinícius de; Katz, Simone; Barbiéri, Clara Lúcia (2010): Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. In: *PLoS one* 5 (11), e13815. DOI: 10.1371/journal.pone.0013815.
- 144 Stierhof, York-Dieter; Bates, Paul A.; Jacobson, Raymond L.; Rogers, Matthew E.; Schlein, Yosef; Handman, Emanuela; Ilg, Thomas (1999): Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. In: *European Journal of Cell Biology* 78 (10), S. 675–689. DOI: 10.1016/S0171-9335(99)80036-3.
- 145 Stroncek, David F. (2007): Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177. In: *Current Opinion in Hematology* 14 (6), S. 688–693. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3282efed9e.
- 146 Szymczak, Andrea L.; Workman, Creg J.; Wang, Yao; Vignali, Kate M.; Dilioglou, Smaroula; Vanin, Elio F.; Vignali, Dario A. A. (2004): Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. In: *Nature biotechnology* 22 (5), S. 589–594. DOI: 10.1038/nbt957.
- 147 Tacchini-Cottier, F.; Zweifel, C.; Belkaid, Y.; Mukankundiye, C.; Vasei, M.; Launois, P.; Milon, G.; Louis, J. A. (2000): An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. In: *The Journal of Immunology* 165 (5), S. 2628–2636. DOI: 10.4049/jimmunol.165.5.2628.
- 148 Tecchio, Cristina; Micheletti, Alessandra; Cassatella, Marco A. (2014): Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 508. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00508.
- 149 Teixeira, Clarissa R.; Teixeira, Maria Jânia; Gomes, Regis B. B.; Santos, Claire S.; Andrade, Bruno B.; Raffaele-Netto, Imbroinise; Silva, João S. et al. (2005): Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. In: *The Journal of Immunology* 175 (12), S. 8346–8353. DOI: 10.4049/jimmunol.175.12.8346.
- 150 Titus, R. G.; Ribeiro, J. M. (1988): Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. In: *Science (New York, N.Y.)* 239 (4845), S. 1306–1308. DOI: 10.1126/science.3344436.
- 151 Trez, Carl de; Magez, Stefan; Akira, Shizuo; Ryffel, Bernhard; Carlier, Yves; Muraille, Eric (2009): iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. In: *PLoS pathogens* 5 (6), e1000494. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000494.
- 152 Urban, Constantin F.; Lourido, Sebastian; Zychlinsky, Arturo (2006): How do microbes evade neutrophil killing? In: *Cellular microbiology* 8 (11), S. 1687–1696. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00792.x.
- 153 Vafadarnejad, Ehsan; Rizzo, Giuseppe; Krampert, Laura; Arampatzi, Panagiota; Arias-Loza, Anahi-Paula; Nazzal, Yara; Rizakou, Anna et al. (2020): Dynamics of Cardiac Neutrophil Diversity in Murine Myocardial Infarction. In: *Circulation research* 127 (9), e232-e249. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317200.
- 154 van Zandbergen, G.; Klinger, M.; Mueller, A.; Dannenberg, S.; Gebert, A.; Solbach, W.; Laskay, T. (2004): Cutting Edge. Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. In: *The Journal of Immunology* 173 (11), S. 6521–6525. DOI: 10.4049/jimmunol.173.11.6521.
- 155 van Zandbergen, Ger; Bollinger, Annalena; Wenzel, Alexander; Kamhawi, Shaden; Voll, Reinhard; Klinger, Matthias; Müller, Antje et al. (2006): *Leishmania* disease

- development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (37), S. 13837–13842. DOI: 10.1073/pnas.0600843103.
- 156 Vieira, L. Q.; Goldschmidt, M.; Nashleanas, M.; Pfeffer, K.; Mak, T.; Scott, P. (1996): Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. In: *The Journal of Immunology* 157 (2), S. 827–835.
- 157 Vollmar, Angelika; Zündorf, Ilse; Dinger mann, Theodor (2013): Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe ; mit 216 Tabellen. 2., völlig neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- 158 Wang, Jun-Xia; Bair, Angela M.; King, Sandra L.; Shnayder, Ruslan; Huang, Ya-Fang; Shieh, Chi-Chang; Soberman, Roy J. et al. (2012): Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a β 2-integrin-dependent mechanism. In: *Blood* 120 (7), S. 1489–1498. DOI: 10.1182/blood-2012-01-404046.
- 159 WHO (2010): Control of the Leishmaniases. Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organization (WHO Technical Report Series).
- 160 WHO (2022): Leishmaniasis. Online verfügbar unter <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, zuletzt aktualisiert am 10.02.2022, zuletzt geprüft am 15.02.2022.
- 161 Wright, S. D.; Weitz, J. I.; Huang, A. J.; Levin, S. M.; Silverstein, S. C.; Loike, J. D. (1988): Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (20), S. 7734–7738. DOI: 10.1073/pnas.85.20.7734.
- 162 Xie, Qing; Klesney-Tait, Julia; Keck, Kathy; Parlet, Corey; Borchering, Nicholas; Kolb, Ryan; Li, Wei et al. (2015): Characterization of a novel mouse model with genetic deletion of CD177. In: *Protein & Cell* 6 (2), S. 117–126. DOI: 10.1007/s13238-014-0109-1.
- 163 Yipp, Bryan G.; Kubes, Paul (2013): Antibodies against neutrophil LY6G do not inhibit leukocyte recruitment in mice in vivo. In: *Blood* 121 (1), S. 241–242. DOI: 10.1182/blood-2012-09-454348.
- 164 Zakai, H. A.; Chance, M. L.; Bates, P. A. (1998): In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. In: *Parasitology* 116 (Pt 4), S. 305–309. DOI: 10.1017/s0031182097002382.

Publikationen

Kleinholz, Corinna L.; Riek-Burchardt, Monika; Seiß, Elena A.; Amore, Jonas; Gintschel, Patricia; Philipsen, Lars; Bousso, Philippe et al. (2021): Ly6G deficiency alters the dynamics of neutrophil recruitment and pathogen capture during *Leishmania major* skin infection. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 15071. DOI: 10.1038/s41598-021-94425-9.

Heyde, Sandrina; Philipsen, Lars; Formaglio, Pauline; Fu, Yan; Baars, Iris; Höbbel, Guido; **Kleinholz, Corinna L.** et al. (2018): CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient *Leishmania* proliferation and cell-to-cell transmission. In: *PLoS pathogens* 14 (10), e1007374. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007374.

Danksagungen

Die Danksagungen sind in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Der Einfluss des Ly6G auf die Wechselwirkung von neutrophilen Granulozyten mit *Leishmania major*“

im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Andreas J. Müller, Dr. rer. nat. Monika Riek-Burchardt und Dr. rer. nat. Juliane Mohr

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 03.06.2022



Corinna Kleinholz

Darstellung des Bildungsweges

Die Darstellung des Bildungsweges ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Anlagen

1. Makro zur Bildanalyse der Zweiphotonenmikroskopie mit ImageJ (Distanz Neutrophile zu nächster *L. major*)

```
run("Clear Results");

waitForUser("Import the xls file containing the Leishmania positions with the
File/Import/Results pathway then click OK");

//Nutzeraktion: Öffnen einer Tabelle im Format: Time (Zeit), X (Koordinate), Y (Koordinate)

LeishCount=nResults();

//Bestimmung der Anzahl der Leishmanienobjekte

LeishX=newArray(LeishCount);

LeishY=newArray(LeishCount);

LeishTime=newArray(LeishCount);

// erstellt eine Tabelle im Programmspeicher

for (i=0; i<LeishCount; i++) {

    LeishX[i]=getResult("X", i);

    LeishY[i]=getResult("Y", i);

    LeishTime[i]=getResult("Time", i);

}

// lädt die Tabellendaten in den Programmspeicher

waitForUser("Import the xls file containing the Vector Data with the File/Import/Results pathway
then click OK");

//Nutzeraktion: Öffnen einer Tabelle im Format: Number (Laufnummer), X (Koordinate), Y
(Koordinate), Time (Zeit), Vbetrag (momentane Geschwindigkeit), AngleDiff (Winkelunterschied
zum Nächsten Vektor) dVectMin (Distanz zum nächsten Vektor)
```

ANLAGEN

```
NeutroCount=nResults();

for (j=0; j<NeutroCount; j++) {

//wird für jedes Neutrophilenobjekt durchgeführt

    dLeishMin= 13000000;

    //Programmtechnisches Zuweisen eines initialen Distanzwerts zum nächsten Objekt
    (dVectMin), und Winkelunterschied zum nächsten Vektor (AngleMin)

    for (k=0; k<LeishCount; k++) {

// Vergleicht das ausgewählte Neutrophilenobjekt mit jedem anderen Neutrophilenobjekt

        Xpos=getResult("X", j);
        Ypos=getResult("Y", j);
        Timepos=getResult("Time", j);

        dLeish=sqrt(((Xpos-LeishX[k])*(Xpos-LeishX[k]))+((Ypos-LeishY[k])*(Ypos-
LeishY[k])));

//errechnet die Distanz zum verglichenen Leishmanienobjekt

        if (LeishTime[k]==Timepos) {

//stellt sicher, dass nur innerhalb des gleichen Zeippunkts Objekte verglichen
werden

            if (dLeish<dLeishMin) {

//behält nur die Information des (unter den bisher verglichenen)
nächstgelegenen Objekts

                dLeishMin=dLeish;
                dLeishMinOUTPUT=1000*dLeishMin;

//skaliert die erhaltenen Werte für eine bessere Handhabbarkeit durch die
FlowJo Software

            }

        }

    }

}
```

```
}
```

```
setResult ("dLeishMin", j, round(dLeishMinOUTPUT));
```

```
//schreibt die erhaltene Distanz zur als nächstliegend ermittelten Leishmania (dLeishMin") für  
jedes Neutrophilenobjekt in die Resultatetabelle
```

```
}
```

Das Makro wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas J. Müller im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie in Magdeburg erstellt.

2. Makro zur Bildanalyse der Zweiphotonenmikroskopie mit ImageJ (Distanz Neutrophile zu nächster Neutrophile)

```
waitForUser("Import the xls file containing the Vector positions with the File/Import/Results  
pathway then click OK");
```

```
//Nutzeraktion: Öffnen einer Tabelle im Format: Number (Laufnummer), X (Koordinate), Y  
(Koordinate), Time (Zeit), VX (X-Komponente des Geschwindigkeitsvektors), VY (Y-Komponente des  
Geschwindigkeitsvektors)
```

```
VectorCount=nResults();
```

```
//Bestimmung der Anzahl der Neutrophilenobjekte
```

```
VectorX=newArray(VectorCount);
```

```
VectorY=newArray(VectorCount);
```

```
VectorTime=newArray(VectorCount);
```

```
DirectX=newArray(VectorCount);
```

```
DirectY=newArray(VectorCount);
```

```
// erstellt eine Tabelle im Programmspeicher
```

```
for (i=0; i<VectorCount; i++) {
```

```
    VectorX[i]=getResult("X", i);
```

ANLAGEN

```
VectorY[i]=getResult("Y", i);

VectorTime[i]=getResult("Time", i);

DirectX[i]=getResult("VX", i);

DirectY[i]=getResult("VY", i);

}

// lädt die Tabellendaten in den Programmspeicher

NeutroCount=nResults();

for (j=0; j<NeutroCount; j++) {

//wird für jedes Neutrophilenobjekt durchgeführt

dVectMin= 13000000;

AngleMin= 0;

//Programmtechnisches Zuweisen eines initialen Distanzwerts zum nächsten Objekt
(dVectMin), und Winkelunterschied zum nächsten Vektor (AngleMin)

for (k=0; k<VectorCount; k++) {

// Vergleicht das ausgewählte Neutrophilenobjekt mit jedem anderen Neutrophilenobjekt

Xpos=VectorX[j];

Ypos=VectorY[j];

Timepos=VectorTime[j];

DirectposX=DirectX[j];

DirectposY=DirectY[j];

dVect=sqrt(((Xpos-VectorX[k])*(Xpos-VectorX[k]))+((Ypos-VectorY[k])*(Ypos-
VectorY[k])));

//errechnet die Distanz zum verglichenen Neutrophilenobjekt

Angle=sqrt(((atan(DirectposY/DirectposX))-
(atan(DirectY[k]/DirectX[k])))*((atan(DirectposY/DirectposX))-
(atan(DirectY[k]/DirectX[k]))));

//errechnet Winkel zwischen den verglichenen Neutrophilenobjektvektoren
```

```
if (VectorTime[k]==Timepos) {  
  
    //stellt sicher, dass nur innerhalb des gleichen Zeitpunkts Neutrophilenobjekte  
    //verglichen werden  
  
    if (dVect>0) {  
  
        // verhindert Selbstvergleiche von Neutrophilenobjekten  
  
        if (dVect<dVectMin) {  
  
            //behält nur die Information des (unter den bisher verglichenen)  
            //nächstgelegenen Neutrophilenobjekts  
  
            dVectMin=dVect;  
  
            AngleMin=1000*Angle;  
  
            dVectMinOUTPUT=1000*dVectMin;  
  
            //skaliert die erhaltenen Werte für eine bessere Handhabbarkeit  
            //durch die FlowJo Software  
  
        }  
  
    }  
  
}  
  
}  
  
Betrag=sqrt((DirectposX*DirectposX)+(DirectposY*DirectposY));  
  
setResult ("Betrag", j, round(Betrag));  
setResult ("AngleDiff", j, round(AngleMin));  
setResult ("dVectMin", j, round(dVectMinOUTPUT));  
  
//schreibt den Vektorbetrag (Betrag), die erhaltene Distanz zum als nächstliegend ermittelten  
//Neutrophilenobjekt (dVectMin) sowie den Winkel zwischen den beiden Neutrophilenobjektvektoren  
// (AngleDiff) in die Resultatetabelle  
  
}
```

Das Makro wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas J. Müller im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie in Magdeburg erstellt.