

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten**

**– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas A. Luger –**

**Die Rolle des Proteinase-aktivierten Rezeptors-2 (PAR<sub>2</sub>)  
in der *Leishmania major* (*L. major*) Infektion**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

Zur

Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von  
Presser, Dagmar Luise  
aus Zweibrücken

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt
1. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Martin Steinhoff
2. Berichterstatter:	PD Dr. med Johannes Weßling
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten  
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas A. Luger –  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Martin Steinhoff  
Koreferent: PD Dr. med. Johannes Weßling

## **Zusammenfassung**

Die Rolle des Proteinase-aktivierten Rezeptors-2 (PAR<sub>2</sub>)  
in der *Leishmania major* (*L. major*) Infektion

Presser, Dagmar Luise

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung des PAR<sub>2</sub>-Rezeptors für den Infektionsverlauf der experimentellen Leishmaniasis bei PAR +/+ und PAR -/- Mäusen zu analysieren. Deshalb wurden die Mechanismen einer koordinierten Immunantwort, die bei einer *L. major* spezifischen Th1-Antwort zur Resistenz und mittels Ausbildung einer Th2-Differenzierung zur Suszeptibilität gegenüber einer Infektion führen, untersucht. Somit könnte das vorliegende Modell zu einem besseren Verständnis einer erfolgreichen Immunantwort bei lokalen Hautinfektionen, aber auch nicht infektiösen entzündlichen Dermatosen im Allgemeinen dienen.

In beiden Mausstämmen kam es zu einer deutlichen Schwellung der infizierten Hinterpfoten. Die PAR +/+ Mäuse zeigten jedoch einen stärker resistenten Phänotyp, da sie ohne ulzerative Hautveränderungen nach einem zeitlich begrenzten Infektionsmaximum nahezu komplett ohne Nachweis lebender Parasiten abheilten. Bei den PAR -/- Mäusen entstanden persistierende Hautläsionen bei einem statistisch signifikant erhöhten Nachweis lebender Parasiten auch im Bereich der lokalen Lymphknotenstationen.

Der Quotient von Antigen spezifisch sekretiertem IFN $\gamma$  zu sekretiertem IL-4 bei den resistenten PAR +/+ Mäusen mit protektiver Th1-Immunantwort war signifikant höher als bei den PAR -/- Mäusen mit Th2 Typ. Zu einem sehr frühen Infektionszeitpunkt zeigte sich Gerinnungsfaktor X als Ligand des proinflammatorischen PAR<sub>2</sub> in der Haut resistenter Mäuse signifikant erhöht. Als zentrale Vermittler dieser veränderten Immunantwort konnten Makrophagen identifiziert werden. Diese können *L. major* Parasiten durch Stickstoffmonoxid (NO) Freisetzung abtöten. Die Produktion von NO wird durch Zugabe von PAR<sub>2</sub>-Liganden erhöht. Da NO die Th1-Differenzierung unterstützt, wäre dies ein möglicher Mechanismus zur Erklärung des Th1/Th2-Shifts in PAR +/+ bzw. PAR -/- Mäusen. Die infektionsbedingte Expression epidermaler PAR<sub>2</sub>-Liganden führt zur konsekutiven NO-Freisetzung in den phagozytierenden Makrophagen, einer vermehrten Th1-Differenzierung und somit zur Erregerresistenz bei PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen. In Abwesenheit von PAR<sub>2</sub> zeigt sich demgegenüber bei Ausbildung einer Th2-Antwort eine verstärkte Suszeptibilität der PAR -/- Mäuse gegenüber einer *L. major* Infektion.

Diese Erkenntnisse lassen eine Bedeutung von PAR<sub>2</sub> bei infektiösen Hauterkrankungen und der Immunantwort erkennen. Proteaseinhibitoren, die als Antagonisten von PAR<sub>2</sub> in Frage kommen sowie PAR<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten können somit zu neuen Therapieformen zur Behandlung von infektiösen Erkrankungen oder zur Immunantwort von Makrophagen führen.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2008

Aktenzeichentierexperiment: 50.0835.1.0 (G 83 / 2002)

*Gewidmet meinem kranken Vater,  
dessen innere Kraft und Stärke  
seine Krankheit zu ertragen,  
für mich Vorbild ist*

„Das Wunderbare, das einzige eigentlich Seiende, das mir begegnet,  
ist der Mensch, der er selbst ist“

Karl Jaspers

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	1
1.1	Das Immunsystem der Haut.....	1
1.2	Leishmaniose.....	2
1.2.1	Entwicklungszyklus der Leishmanien.....	3
1.2.2	Experimentelle Leishmaniasis.....	5
1.2.3	Resistenz und Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit <i>L. major</i> .....	6
1.3	Die Bedeutung von PAR <sub>2</sub> für kutane Entzündungsreaktionen .....	11
2	Zielsetzung.....	13
3	Material und Methoden.....	15
3.1	Lösungen und Puffer.....	15
3.2	Medien .....	19
3.3	Versuchstiere .....	21
3.4	Leishmanien.....	23
3.5	RNA-Isolierung.....	25
3.6	Histologische und Immunhistochemische Methoden .....	32
4	Ergebnisse .....	37
4.1	Infektionsverlauf in PAR <sub>2</sub> +/- Mäusen.....	37
4.2	Infektionsverlauf in PAR <sub>2</sub> defizienten Mäusen.....	39
4.3	Parasitenelimination in PAR <sub>2</sub> defizienten Mäusen .....	40
4.4	Zytokinsekretion.....	45
4.5	Expression von PAR <sub>2</sub> -Liganden in der Haut .....	48
4.6	Wirkung von PAR <sub>2</sub> -Liganden auf Makrophagenfunktionen .....	52
5	Diskussion .....	55
5.1	Infektionsverlauf in PAR <sub>2</sub> +/- und PAR <sub>2</sub> -/- Mäusen.....	56
5.2	Analyse der Mechanismen, die für den unterschiedlichen Infektionsverlauf in den PAR <sub>2</sub> -/- Mäusen verantwortlich sind.....	58
5.3	Mögliche Mechanismen, die für die geänderte Th-Zell-Differen- zierung in PAR <sub>2</sub> -/- Mäusen bei <i>L. major</i> Infektion verantwortlich sein können.....	61
6	Abkürzungsglossar.....	67

7	Literaturverzeichnis .....	70
8	Danksagung .....	81
9	Lebenslauf.....	83
10	Erklärung an Eides Statt.....	87

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Immunsystem der Haut

Bis zur Beschreibung des sog. Hautimmunsystems im Jahre 1997 durch BOS [12], ist man davon ausgegangen, dass die Haut lediglich im Sinne einer mechanischen und physiologischen Schutzbarriere das Eindringen körperfremder Antigene blockierte.

Man hatte die Vorstellung, dass erst nach Eindringen pathogener Antigene, deren Bekämpfung durch das Immunsystem einsetzte. Heute stellt jedoch bereits das Hautorgan selbst einen maßgeblich aktiven Bestandteil bei der immunologischen Überwachung und Abwehr dar.

Das Immunsystem setzt sich aus zellulären, humoralen und unspezifischen Bestandteilen zusammen, deren Interaktion zu einer komplexen Immunantwort führt.

Auf der Grundlage dieser Einteilung konnten Gell und Coombs deshalb allergische und Überempfindlichkeitsreaktionen vereinfacht in 4 Reaktionstypen klassifizieren [25, 39, 88, 112], die auch bei der Beschreibung unterschiedlicher Reaktionsmuster des Hautimmunsystems Bedeutung zeigen, wie beispielsweise beim allergischen Kontaktekzem.

Auch beim komplexen Ablauf einer Entzündungsreaktion beteiligen sich zelluläre, humorale und unspezifische immunologische Elemente sowie untereinander kaskadenartig reagierende, lösliche Mediatoren, die Zytokine und Chemokine.

Gelingt es Antigenen (Proteine/ Glykoproteine) in die Hautschichten einzudringen, werden sie in der Mehrzahl der Fälle zunächst phagozytiert, dann metabolisiert und in kleine, an den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC II) gebundene Untereinheiten zerlegt.



Nachdem dieser Peptid-MHC-Komplex zur Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) gewandert ist, interagiert er mit den für dieses spezifische Antigen zuständigen T-Zell-Rezeptoren (TCR).

Als Antigen präsentierende Zellen (APC) dienen mononukleäre Phagozyten (Monozyten, Makrophagen), B-Lymphozyten und dendritische Zellen [13, 72, 112], wobei die dendritische Zellpopulation der Haut sich aus Langerhanszellen und dermalen Dendrozyten zusammensetzt.

Die von Knochenmarkszellen abstammenden Langerhanszellen (LHC) machen zahlenmäßig ca. 3 – 4% der epidermischen Zellpopulation aus. Sie exprimieren die MHC-Klasse-II-Moleküle, die Rezeptoren für bestimmte Komplementfaktoren (C3b) und den Fc-Bereich von IgG und IgE, wobei ihre Hauptfunktion in der Verarbeitung und Präsentation von Antigenen besteht.

Eine spezifische Immunreaktion auf ein Antigen wird somit durch die Wechselwirkung von APC und T-Zelle über den trimolekularen TCR-Peptid-MHC-Komplex, ausgelöst.

Inwieweit möglicherweise jedoch auch Keratinozyten, die ebenfalls MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren können, bei der Antigenpräsentation eine Bedeutung haben, ist noch nicht eindeutig verstanden.

## **1.2 Leishmaniose**

Die Leishmaniose ist eine Infektionskrankheit, die durch verschiedene Spezies der intrazellulär parasitisch lebenden Protozoen der Klasse Kinetoplastea, Ordnung Trypanosomatida, Familie Trypanosomatidae, Gattung *Leishmania* verursacht wird. Von diesen Hämoflagellaten sind ca. 30 pathogene Arten bekannt [4].

Cunningham entdeckte im Jahre 1885 als Erster die Erreger der Leishmaniose, wobei sie ihren Namen aber nach dem britischen Tropenarzt Sir William Boog Leishman 1901 erhielten, der sie im Jahre 1903 zusammen mit Charles Donovan ausführlich beschrieb.

### 1.2.1 Entwicklungszyklus der Leishmanien

Die Vermehrung der Erreger erfolgt in 2 Wirten, wobei im natürlichen System das Haupterregerreservoir die Kaniden und Nagetiere bilden und die Übertragung der Parasiten durch den Biss eines Insektenvektors erfolgt. Der Wirtswechsel findet demnach zwischen den weiblichen Schmetterlingsmücken (Phlebotomus und Lutzomyia) und den Wirbeltieren (v.a. Schafe, Hunde und Menschen) statt.

Nach Angaben der WHO sind weltweit in 88 Ländern ca. 12 Millionen Menschen von dieser Infektionskrankheit betroffen. Die jährliche Inzidenz der klinisch unterschiedlichen Fälle wird mit insgesamt 2 Millionen angegeben. Abhängig von der Leishmanienspezies, werden die kutane (CL), mukokutane (MCL), viszerale (VL) oder diffus kutane (DCL) Form dieser Protozoeninfektion unterschieden.

Die Leishmanien, die mit der Blutmahlzeit aufgenommen werden, befinden sich in einem amastigoten, unbeweglichen Stadium. Sie transformieren im Mitteldarm des Insekten-Vektors innerhalb von 4 bis 25 Tagen zu promastigoten, teilungsfähigen Leishmanien. Durch Ausbildung eines Geißelapparates (Flagellum) erlangen sie außerdem die Fähigkeit zur Bewegung [91].

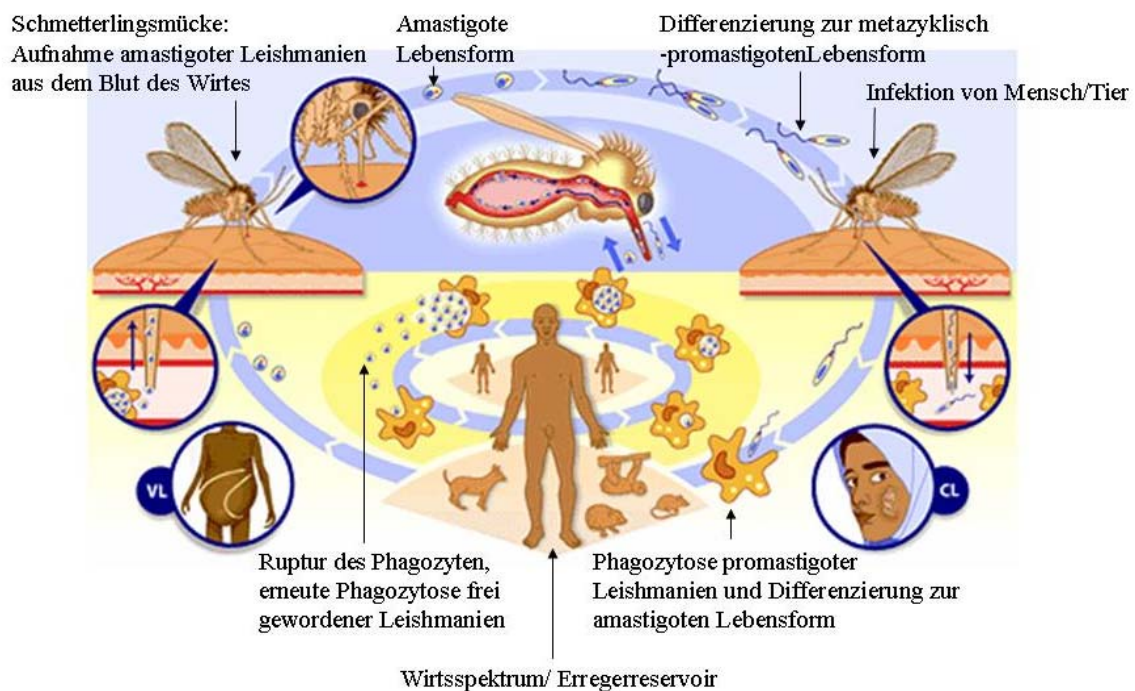
Nimmt die Schmetterlingsmücke jetzt eine erneute Blutmahlzeit ein, werden die nun metazyklisch promastigoten Leishmanien über den Speichel und zurücklaufenden Mageninhalt (Regurgitation) in die Stichwunde des Wirbeltieres oder Menschen übertragen.

In ihrer amastigoten Form sind Leishmanien obligat intrazellulär lebende Parasiten, die vermittelt über den Komplement-Rezeptor-3 (CR3) auf der Oberfläche von Phagozyten in membranständige Phagosomen aufgenommen werden [68, 94]. Sie fusionieren mit sekundären Lysosomen zu Phagolysosomen, der sogenannten parasitophoren Vakuole (PV).

In den Phagolysosomen erfolgt wiederum innerhalb von 2 – 5 Tagen eine Ausdifferenzierung zur replizierenden amastigoten Form und zwar solange, bis die Zelle rupturiert und die frei werdenden Leishmanien von neuen Makrophagen phagozytiert werden können.

Wenn körpereigene Abwehrmechanismen diesen Kreislauf nicht unterbrechen, kann es nach Infektion mit *Leishmania donovani*, *infantum* oder *chagasi*, zu einer Viszeralisierung durch die ungestoppte Ausbreitung des Parasiten in die inneren Organe und Lymphknoten kommen.

Neben dieser unbehandelt tödlich verlaufenden Organform (VL, Kala Azar), zeigt die Infektion mit *L. major* einen begrenzten lokalen Befall auf der Haut (CL, Orientbeule). Diese Geschwüre können spontan abheilen und eine lebenslange Immunität hinterlassen.



**Abbildung 1. Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus der Leishmanien.** (Modifiziert nach einer Abbildung der WHO, Life-cycle of *Leishmania*) [<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>], 2006

### 1.2.2 Experimentelle Leishmaniasis

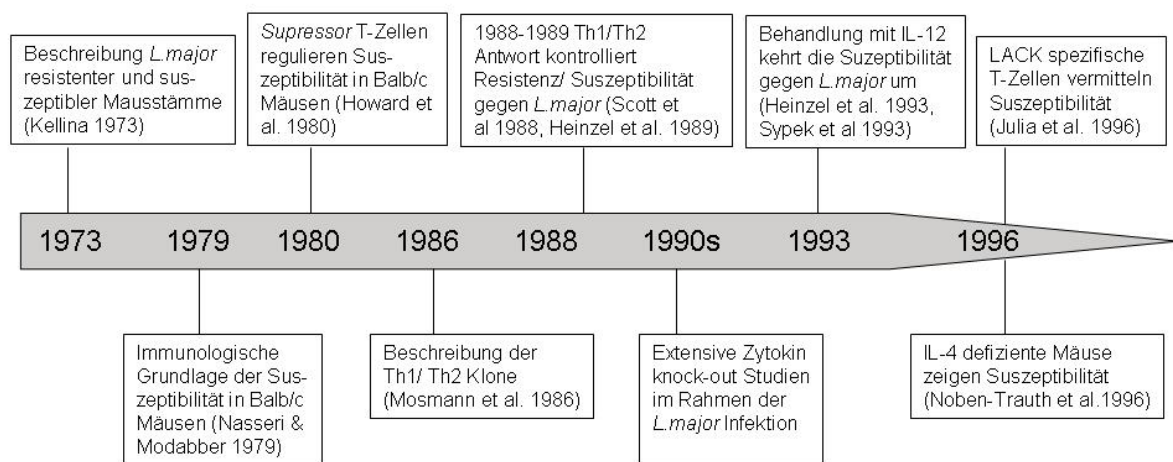
Die durch Infektion mit dem Protozoen *L. major* bei Mausinzuchtstämmen hervorgerufene experimentelle Leishmaniasis, ist ein ausgezeichnetes Modell für die Erforschung der natürlichen Infektresistenz sowie der Entwicklung einer T-Helfer 1 (Th1) bzw. T-Helfer 2 (Th2) Zell-vermittelten Immunantwort [6, 33, 49, 90].

Beim konventionellen *L. major*-Maus-Modell wird subkutan eine hohe Dosis ( $2 \times 10^5 - 2 \times 10^7$ ) *in vitro* kultivierter promastigoter Leishmanien der metazyklischen Entwicklungsphase in den Rücken oder die Hinterfußsohle der Maus injiziert.

Verwendet man nun experimentell Leishmanien unterschiedlicher Entwicklungszustände [92] oder den natürlichen Ansteckungsweg mittels Schmetterlingsmückenvektor [46] sowie alternativ intravenöse, intradermale und intranasale [8, 24, 71] Inokulationsrouten, können Unterschiede im Infektionsverlauf beobachtet werden.

Unterschiede in diesem Krankheitsbild wurden auch durch die Verwendung verschiedener Leishmanien-Stämme beobachtet [76], wobei die häufigsten verwendeten Stämme Friedlin (Jordan Valley, WHOM/IL/80/FN), IR173 (Iran, WHOM/IR/-173), LV39/Neal (Southern Russia, MRHO/SU/59/P), NIH/Seidman (West Africa, MHOM/SN/74/S), und CC-1 (Iran, MHOM/IR/83/LT252) [90] sind.

Auch die Anzahl injizierter Parasiten [30], sowie das Alter der verwendeten Versuchstiere [32], spielt eine zusätzlich wichtige Rolle beim Krankheitsgeschehen.



**Abbildung 2. Zeitliche Entwicklung des *L. major* -Maus-Modells [90]**

### 1.2.3 Resistenz und Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *L. major*

Wie bereits erwähnt, kann bei Mausinzuchtstämmen anhand von Infektionen mit *Leishmania major* als Modell die natürliche Infektoresistenz sowie die Entwicklung der Th1/Th2 Zell-vermittelten Immunantwort [6, 33, 49, 90] ausgezeichnet erforscht werden.

Dabei werden die obligat intrazellulären Parasiten von Phagozyten (Makrophagen und in einem gewissen Umfang auch dendritischen Zellen (DC)) aufgenommen. In der Antigenpräsentation sind die DC oder Langerhanszellen den Makrophagen überlegen. Die Proliferation der Leishmanien hingegen erfolgt aber in den Makrophagen, die auch die Zellen darstellen, in der die Parasiten längere Zeit beherbergt werden [11, 28].

Bei der experimentellen Leishmaniasis beschränken sich die Krankheits-symptome bei den meisten Mausstämmen (z. B. C57, BL6 oder C3H) selbst-limitierend auf die Haut und lokoregionäre Lymphknotenstationen, während sie bei Balb/c-Mäusen zu einer tödlichen Ausbreitung der Parasiten führt.

Eine Resistenz gegenüber *L. major* ist gekoppelt an die Entwicklung *L. major*-spezifischer Th1 (CD4<sup>+</sup>) [11, 43] sowie – bei initial niedriger Parasitenzahl – auch Tc1 (CD8<sup>+</sup>) -Zellen [9], da diese durch Freisetzung von Interferon (IFN) $\gamma$

die Makrophagen zur Produktion des leishmaniziden Stickstoffmonoxids (NO) anregen.

In suszeptiblen Mäusen hingegen kommt es durch Hemmung der Th1-Antwort, verursacht durch eine Vermehrung *L. major*-spezifischer Th2-Zellen, die u.a. Interleukin (IL)4, IL5, IL10 und IL13 sezernieren, zur Deaktivierung der Makrophagen-Aktivität.

Die Ursache für die inadäquate Th2-Differenzierung in den Balb/c-Mäusen ist aktuell trotz intensiver Forschung noch nicht geklärt.

Nach Beginn der Infektion wirken die entscheidenden Entzündungsmechanismen sehr schnell, sodass mit den meisten immunmodulierenden Substanzen nur innerhalb der ersten Woche eine Beeinflussung des Infektionsverlaufes möglich ist. Dabei sind vermutlich die ersten beiden Tage nach der Infektion entscheidend [10, 20, 40, 52, 109].

Von großer Bedeutung für die Th2-Differenzierung scheint die sehr frühe Produktion von IL4 zu sein, da gezeigt werden konnte, dass es im lokalen Lymphknoten bereits einen Tag nach der Infektion zur Produktion von IL-4 kommt [49, 51]. Die Quelle des IL4 scheint dabei eine Population von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die über einen V $\beta$ 4V $\alpha$ 8 T-Zell-Rezeptor, der das *L. major* Antigen LACK (Homolog der aktivierten C-Kinase) erkennt, darzustellen [49, 50]. Bemerkenswert ist, dass transgene Balb/c-Mäuse, denen die V $\beta$ 4- Kette des T-Zell-Rezeptors fehlt, eine Th1-dominierte Immunantwort zeigen und somit die Infektion kontrollieren [41] können.

Entscheidend für die gute Dokumentation der unterschiedlichen Infektionsverläufe bei resistenten und suszeptiblen Mäusen, ist die Kenntnis über die adäquate T-Helfer-Zell-Differenzierung im Lymphknoten.

Über einen möglichen Einfluss des primären kutanen Infektionsortes auf diese Differenzierung und den Krankheitsverlauf existieren nur wenige Arbeiten. Meistens befasste man sich mit der Expression von Zytokinen und Chemokinen in der infizierten murinen oder humanen Haut sowie in Infektionsstadien, in denen die Th-Zell-Differenzierung bereits erfolgt war [15, 53, 60, 61, 85, 87, 106]. Somit ist nicht auszuschließen, dass durch die dann bereits vorhandenen differen-

zierten Th1- bzw. Th2-Zellen die lokale Produktion von Zytokinen und Chemokinen beeinflusst wird, bzw. durch sie selbst bedingt ist. Dies vermutet man insbesondere für die typischerweise durch Th1- und Th2-Zellen produzierten Zytokine wie z. B. IFN $\gamma$  und IL4.

Zu einem recht frühen Zeitpunkt der murinen *L. major* Infektion (8.Tag), wurde die Expression des Th2 assoziierten Zytokins TGF $\beta$  analysiert. Es konnte nachfolgend durch immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden, dass in den suzeptibelen Balb/c-Mäusen mehr TGF $\beta$  produzierende Zellen im Infiltrat vorhanden waren [106]. Diese Beobachtung korrelierte wiederum mit einer erniedrigten Gewebeexpression der induzierbaren NO-Synthetase (NOS).

Weiter befasste man sich im humanen Modell mit der Expression kutaner Chemokine, wobei sich bemerkenswerte Unterschiede zwischen der lokalisierten und diffusen kutanen Leishmaniose-Form ergaben [87].

Die lokalisierte Form hob sich durch eine hohe Expression der Th1 assoziierten Chemokine MCP-1, MIG und IP-10 hervor, während die diffuse Form durch eine starke Expression des Th2 assoziierten Chemokins MIP1 $\alpha$  gekennzeichnet war.

Die Elimination von intrazellulären Leishmanien in humanen Monozyten kann durch MCP-1 stimuliert werden, wobei dieser Effekt durch IFN $\gamma$  verstärkt und durch IL4 gehemmt wird [86].

Ob die Unterschiede in der kutanen Expression der Chemokine, Konsequenz oder Ursache der Th-Differenzierung sind, musste zu einem Zeitpunkt unmittelbar nach Beginn der Parasiteninfektion und verständlicherweise nur in der experimentellen murinen Leishmaniasis untersucht werden.

Untersuchungen von Sunderkötter et al. konnten zeigen, dass bei Balb/c-Mäusen verglichen mit C57Bl/6-Mäusen wenige Tage nach Infektionsbeginn eine stärkere und frühere Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der infizierten Haut auftritt [7, 107, 110]. Die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung konnte dadurch untermauert werden, dass eine Behandlung von Balb/c-Mäusen zum Zeitpunkt der Infektion mit einem zytotoxischen Antikörper gegen neutrophile Granulozyten, zu einer Hemmung der Th2-Differenzierung und einer partiellen Resistenz gegenüber dem Erreger führte [110]. Hingegen

trat in resistenten C57Bl/6 und in Balb/c-Mäusen eine Depletion neutrophiler und eosinophiler Granulozyten ein, die eine beschleunigte Ausbreitung der Parasiten und somit konsekutiv eine höhere Parasitenanzahl in Haut und Lymphknoten [54] zur Folge hatte.

Eine stärkere lokale Entzündungsreaktion in C57Bl/6-Mäusen, verbunden mit Ulzerationen und einer verzögerten Erregerelimination wie bei suszeptiblen Mäusen, konnte durch die Injektion von Knochenmarkszellen (hauptsächlich neutrophilen Granulozyten und unreifen Makrophagen, die positiv für das Calcium bindende Protein S100A9 waren), herbeigeführt werden [100].

Diese Ergebnisse stehen prinzipiell in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Tacchini-Cottier et al [110], obwohl diese eine heterogene Zellpopulation verwendeten.

Größere Anteile reifer Makrophagen scheinen im frühen Infiltrat bei den resistenten C57Bl/6-Mäusen mehr als bei den suszeptiblen Mäusen hinweisend vorhanden zu sein [7, 107]. Dieser Unterschied ist transient und scheint - wahrscheinlich abhängig von der Anzahl infektiöser Leishmanien - verschieden zwischen dem ersten und vierten Tag nach Infektion einzutreten.

Es ist andererseits aber auch denkbar, dass infiltrierende Makrophagenpopulationen unterschiedliche Zytokine freisetzen und damit lokal zu einem distinkten Zytokinmilieu mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die T-Zell-Differenzierung führen.

Die Rekrutierung von Leukozyten im entzündlichen Gewebe erfolgt entscheidend durch Chemokine. Bei der Leishmaniose z. B. korreliert die frühe Einwanderung von Granulozyten und NK-Zellen positiv mit der Expression der Chemokine KC bzw. IP-10 in der infizierten Haut [69].

Der bei den Mausstämmen zu beobachtende, unterschiedliche Influx bzw. die verschiedenartige Aktivierung von frühen Effektorzellen (z. B. Granulozyten, natürliche Killerzellen, monozytäre Zellen) in das entzündliche Gewebe könnte somit durch die differenzielle Expression von Chemokinen verursacht sein. Eine Mitbeteiligung weiterer Mediatoren, wie z. B. Proteasen ist bislang nicht untersucht.



In der Haut von C57Bl/6-Mäusen, verglichen mit Balb/c-Mäusen, konnte 24h nach Infektion tatsächlich eine stärkere Expression des NK-Zell aktivierenden IP-10 gefunden werden, wobei die Behandlung von Balb/c-Mäusen mit IP-10 dann zu einer Aktivitätszunahme der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [69, 113] führte.

Weiterhin können lokal produzierte Zytokine und Chemokine die Migration von Langerhanszellen (LC) in den lokalen Lymphknoten beeinflussen [3].

Behandelte man Balb/c-Mäuse zum Zeitpunkt der Infektion mit TNF $\alpha$ , führte dies innerhalb der ersten beiden Tage danach zu einer vermehrten Migration der LC, während IL1 $\beta$  und MIP1 $\alpha$  einen umgekehrten Effekt zeigten.

Dies steht in Korrelation mit den im Lymphknoten nachweisbaren Parasitenzahlen.

MCP-1 hatte keinen Effekt auf die LC-Migration, während entsprechend die in vivo Depletion von IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zu einer Zu- bzw. Abnahme der L. major induzierten LC-Migration führte. Da die gleichen Auswirkungen auf die LC-Migration auch in Hautexplantatkulturen nachweisbar waren, geht man von der Existenz lokal in der Haut produzierter Zytokine wie IL1 $\beta$  und/ oder TNF $\alpha$  aus.

Es konnte u.a. beobachtet werden, dass die IL1 $\beta$ -Behandlung von Balb/c-Mäusen zum Zeitpunkt der Infektion eine Th1-Differenzierung förderte und damit ein deutlich milderer Infektionsverlauf [35, 116] herbeigeführt werden konnte.

Unklar bleibt allerdings, ob eine Korrelation zwischen der Fähigkeit der LC zur Migration und Phagozytose der Erreger und ihrer Eigenschaft, die Th1-Differenzierung direkt zu beeinflussen, besteht.

Anhand weiterer Beobachtungen konnte auch gezeigt werden, dass von entscheidender Bedeutung für die Th-Zell-Differenzierung und den Krankheitsverlauf der Infektionsort ist. Dies konnte einerseits dadurch belegt werden, dass bei Auftreten einer intravenösen oder intranasalen Infektion, der normalerweise resistente C57Bl/6-Mausstamm zu einem suszeptiblen Phänotyp wird [24, 71] und andererseits bei SWR/J-Mäusen die kutane Infektion im Bereich der

Schwanzbasis zur Suszeptibilität führt, jedoch im Falle der Infektion an der Fußsohle eine Eliminierung der Erreger stattfindet [70].

Anhand der vorliegenden Arbeiten, lässt sich zusammenfassend vermuten, dass auf die Th-Zell-Differenzierung entscheidend immunmodulierende Substanzen einwirken. Diese werden von am Primärort der Infektion vorliegenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen, epidermale Zellen) produziert [56, 59, 69, 110, 113, 114].

### 1.3 Die Bedeutung von PAR<sub>2</sub> für kutane Entzündungsreaktionen

Neuere Daten deuten stark darauf hin, dass Serinproteasen wie Thrombin, Cathepsin G, Tryptase, bakterielle Proteasen, Kallikreine oder Trypsine nicht nur Enzyme sind, die Proteine oder Peptide im extrazellulären Raum degradieren, sondern zusätzlich während einer Inflammation und einer Immunantwort wichtige biologische Effekte wie Zytokinfreisetzung, Chemokinaktivierung, Zellmigration, Regulation von Integrinen oder Zelladhäsionsmolekülen oder die Rekrutierung von Leukozyten und Aktivierung von Endothelzellen vermitteln [78, 83, 89].

Diese Prozesse werden spezifisch durch die Spaltung und Aktivierung von Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) im extrazellulären Raum durch o.g. Proteasen vermittelt. PARs sind G Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Bis jetzt konnten 4 PARs kloniert und charakterisiert werden. Die Aktivierung von PAR-Rezeptoren führt zur Auslösung von Signaltransduktionskaskaden, die unmittelbar an Entzündungsvorgängen, Wachstumsprozessen von Zellen oder der Immunantwort beteiligt sind (Übersicht in [102]).

Jüngste Daten weisen darauf hin, dass PAR<sub>1</sub> und PAR<sub>2</sub> bei der neurogenen Entzündung involviert sind [105]. Dem liegt der Mechanismus zugrunde, dass Proteinase auf sensorischen Neuronen PAR<sub>2</sub> aktivieren, und so Neuropeptide freisetzen, die wiederum Gefäßerweiterung und Plasmaextravasation (Ödembildung) hervorrufen. Der Ligand von PAR<sub>2</sub>, Mastzell-Tryptase, induziert auch die Infiltration des Entzündungsgebietes mit neutrophilen Granulozyten und sti-

---

muliert die Zytokinsekretion. Bei verschiedenen Entzündungen der Haut können Tryptase-freisetzende Mastzellen in enger Nähe zu PAR<sub>2</sub> exprimierenden Zellen wie Keratinozyten und Endothelzellen oder Nerven gefunden werden. Vor kurzem durchgeführte Studien an PAR<sub>2</sub>-defizienten Mäusen zeigten, dass PAR<sub>2</sub> eine wichtige Rolle bei der Kontaktdermatitis *in vivo* spielt.

Die Bedeutung von PAR-Rezeptoren bei Infektionen und der Immunantwort sind bislang wenig verstanden. Es ist bekannt, dass bakterielle Proteasen PAR<sub>2</sub> auf Epithelzellen der Gingiva aktiviert, und über die Regulation von Defensinen am Entzündungsvorgang der Gingivitis beteiligt ist. Weiter ist PAR<sub>1</sub> bei der Herpes-Virus-Infektion *in vitro* und PAR<sub>2</sub> bei der HIV-Infektion beteiligt. Eine Rolle von PAR<sub>2</sub> bei parasitären Erkrankungen ist bislang nicht untersucht.

## 2 ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die entscheidenden Mechanismen näher zu analysieren, die zur Resistenz oder Empfindlichkeit von Mäusen gegenüber *L. major* bedingter kutaner Infektionen beitragen.

Von besonderer Bedeutung für die Elimination dieses Parasiten ist die koordinierte Interaktion von unspezifischem und spezifischem Immunsystem.

Eine Resistenz ist dabei an die Entwicklung von T-Helfer (Th) Zellen des Typs I gekoppelt, während Suszeptibilität gegenüber dem Erreger durch Entwicklung einer Th2-Antwort eintritt.

In letzter Zeit konnte gezeigt werden, dass der Proteinase-aktivierte Rezeptor-2 (PAR<sub>2</sub>) an immunologischen Vorgängen in der Haut von entscheidender Bedeutung ist.

### **Ziel der Untersuchungen war es daher:**

1. die Bedeutung von PAR<sub>2</sub> bei der koordinierten Immunantwort gegenüber der *L. major* Infektion *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Deshalb wurde der Infektionsverlauf in Mäusen, in denen der PAR<sub>2</sub> genetisch depletiert wurde (PAR<sub>2</sub> knockout Maus) im Vergleich zu genetisch unveränderten Tieren, analysiert.
2. es sollte der Verlauf der lokalen Entzündungsreaktion sowie die Fähigkeit der Mäuse zur Elimination der Parasiten und der Typ der Parasiten-spezifischen adaptiven Immunantwort genau analysiert werden.
3. es sollten die Mechanismen aufgeklärt werden, über die der PAR<sub>2</sub>-Rezeptor die Immunantwort gegenüber der Leishmanien-Infektion beeinflussen kann. Der Schwerpunkt sollte dabei auf den Mechanismen liegen, die direkt in der infizierten Haut wirksam werden, da dort viele Zellen über einen funktionellen PAR<sub>2</sub> verfügen, was bei den Zellen des adaptiven Immunsystems nicht der Fall ist.

---

Angenommen wird, dass diese Ergebnisse zu neuen Erkenntnissen führen, wie Proteasen eine erfolgreiche Immunantwort gegenüber *L. major* möglich machen. Weiter hat die Untersuchung dieser Mechanismen weiterführende grundlegende Relevanz für das Verständnis der adäquaten Immunantwort auf eine lokale Infektion. Darüber hinaus können diese Ergebnisse zum besseren Verständnis von infektiösen als auch nicht-infektiösen entzündlichen Dermatosen beitragen, bei denen ein Ungleichgewicht in der adaptiven Immunantwort besteht. Somit könnte ihre Aufklärung bei Erkrankungen wie z. B. der Psoriasis oder der atopischen Dermatitis von wichtiger therapeutischer Bedeutung sein.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Lösungen und Puffer

##### **Antikörper-Lösung** (3ml-Ansatz; 1:200)

3 ml Puffer 1

31 µl steriles Schafserum

94 µl 10% v/v Triton X-100

Das Gemisch wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Unmittelbar vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 15 µl Anti-DIG-Antikörper (AP-konjugiert).

##### **Aqua bidest. Diethylpyrokarbonat (DEPC)-behandelt**

1 ml Diethylpyrokarbonat (DEPC) Reinsubstanz

1000 ml A. bidest

Das Gemisch wurde unter dem Abzug bis zur Lösung im Magnetrührer über Nacht gerührt und danach autoklaviert.

##### **Azetanhydrid (0,25%) in 0,1 mol/l Triethanolamin, pH 7,5**

894 mg Triethanolamin

60 ml A. bidest.-DEPC

pH mit HCL auf 7,5 einstellen

Das Azetanhydrid (150 µl) wurde unmittelbar vor der Inkubation zugegeben und 60 sek. gerührt.

##### **5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) 50 mg/ml** (Stammlösung)

500 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat

10 ml 100%iges Dimethylformamid

Aliquote Teile der Lösung wurden bei -20°C aufbewahrt.

**50 x Denhardts**

5 g Ficoll, 5 g bovines Serumalbumin, 5 g Polyvinylpyrrolidone, 500 ml A. bidest.-DEPC

Die steril hergestellte Lösung wurde in 50 ml aliquoten Teilen bei -20°C gelagert.

**Dextransulfat-Lösung**

2,5 g Dextransulfat, 5 ml A. bidest.-DEPC

Das Dextransulfat wurde im ca. 70°C warmen Wasserbad gelöst.

**0,5 mol/l EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0**

18,6 g di-Natrium-EDTA-Di-Hydrat (MW 372,31), 60 ml A. bidest.-DEPC

Die Lösung wurde mit 5 N NaOH auf pH 8,0 eingestellt und auf 100 ml A. bidest.-DEPC aufgefüllt.

**Farblösung (~100ml)**

450 µl NBT (Stammlösung), 350 µl BCIP (Stammlösung), 100 ml Puffer 3. Die Lösung wurde bis zum unmittelbaren Gebrauch abgedunkelt.

**Hybridisierungs-Lösung 20 ml**

10 ml 100%iges Formamid, 500 µl tRNA 20 mg/ml, 2,4 ml NaCl 5 mol/l, 200 µl ssDNS-Lösung, 400 µl 50 x Denhardts, 4 ml Dextransulfat 50%, 260 µl H<sub>2</sub>O, EDTA 0,5 mol/l, pH 8, DTT 1,25 mol/l, 100 ng/ml RNS-Sonde

**20 x MOPS Puffer**

200 mmol/l MOPS (SIGMA), 50 mmol/l Na-Acetat, 10 mmol/l EDTA, pH 8,0

Die Pufferlösung wurde mit A. bidest. auf 1000 ml angesetzt und der pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

**Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) 75 mg/ml (Stammlösung)**

1 g NBT, 13,3 ml 70%iges Dimethylformamid (14 ml 100% DMF + 6 ml A. bi-dest.)

Dies entspricht einer Stammlösung mit 75 mg/ml NBT. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

**4 %iges Paraformaldehyd (PFA), pH 7,35-7,4**

40 g Paraformaldehyd, 1000 ml 1 x PBS

Das Paraformaldehyd wurde bei ca. 60°C gelöst und nicht autoklaviert.

**10 x PBS ("Phosphate buffered saline") - Puffer (Stammlösung)**

80,0 g NaCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 g KCl, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ad 1000 ml A. bidest.

**Proteinase K-Lösung**

1 ml 1 mol/l Tris-HCl, pH 8,0, 1 ml 0,1 mol/l CaCl<sub>2</sub>

Diese Reagenzien wurden zusammen in 60 ml A. bidest.-DEPC bei 37°C vorinkubiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 4,3 µl Proteinase K (14 mg/ml) zugegeben, sodass die Verdauung eine Endkonzentration von 1 µg Prot. K/ml Verdauung aufwies.

**Puffer 1 pH 7,5**

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MW 121,14), 8,77 g NaCl (MW 58,44), 1000 ml A. bidest.

**Puffer 2 (Blockierungsreagenz)**

1,2 ml normales steriles Ziegenserum, 1,8 ml 10%iges Triton-X-100 (autoklaviert), 60 ml Puffer 1

**Puffer 3 pH 9,5 (200 ml Stammlösung)**

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 5,84 g NaCl



Die Pufferlösung wurde mit A. bidest. auf 1000 ml angesetzt und der pH mit NaOH auf 9,5 eingestellt und anschließend autoklaviert. Dann wurden folgende Substanzen zugegeben:

2,03 g  $\text{MgCl}_2+6\text{H}_2\text{O}$

#### **Puffer 4 pH 8,0**

1,21 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0,37 g EDTA- $\text{Na}_2$  (MW 372,3), 1000 ml A. bidest.

#### **RNase-Lösung**

10 ml 3 mol/l; NaCl, 600  $\mu\text{l}$  1 mol/l Tris-HCl, pH 8,0, 120  $\mu\text{l}$  0,5 mol/l EDTA- $\text{Na}_2$ , pH 8,0, 49 ml A. bidest. (steril)

Dies wurde zusammen bei 37°C vorinkubiert und unmittelbar vor Gebrauch 15  $\mu\text{l}$  RNase, DNase frei (RNase A) und 10  $\mu\text{l}$  RNase T1 zugegeben.

#### **Salmonsperm-DNS (ssDNS)-Lösung, 10mg/ml**

Das Lyophilisat (250 mg) wurde mit 25 ml Puffer 4, pH 8,0 gelöst, sodass eine Endkonzentration von 10 mg/ml erreicht wurde. Diese Lösung wurde bei 4°C gelagert.

#### **20 x SSC ("standard saline citrat") pH 7,0 (Stammlösung)**

175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat (Tri-Natrium-Di-Hydrat), ad 800 ml A. bidest.  
Der pH wurde mit 1 N HCl auf 7,0 eingestellt und auf 1000 ml A. bidest aufgefüllt.

#### **TAE-Puffer**

40mM Tris pH 8,3, 2mM EDTA

#### **1 M Tris-HCl, pH 8,0**

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MW 121,14), 100 ml A. bidest.  
Der pH wurde mit konzentrierter HCl auf 8,0 eingestellt.

### 3.2 Medien

#### Schneider's Drosophila Medium (SDM) (komplett):

iFCS (steril filtriert)	50 ml	Biowest, Nuaille, Frankreich
Penicillin/Streptomycin (50µg/ml)	5 ml	Biochrom, Berlin
L-Glutamin, 200 mM	10 ml	Biochrom, Berlin
humaner Urin	10 ml	Dr. Leukert, Münster
Schneider's Drosophila-Medium	425 ml	PromoCell, Heidelberg

Das Schneider's Drosophila-Medium und inaktiviertes fötales Kälberserum (iFCS) wurden vor ihrer Verwendung steril filtriert (Filtrationseinheit, 0,2 µm, Sarstedt).

#### Einfriermedium für Leishmanien:

Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 ml	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
iFCS (steril filtriert)	9 ml	Biowest, Nuaille, Frankreich

**Enzyme:**

Proteinase K	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
RNase A	Merck, Darmstadt
RNase T1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T3-/ T7 Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Rot
DNase I	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
<i>Taq</i> DANN Polymerase	Qiagen, Hilden
<i>RevertAid™ H Minus M-MuLVReverse Transkriptase</i>	MBI Fermentas, St. Leon Rot

Alle Enzyme wurden entsprechend der Angaben der Hersteller und den mitgelieferten Puffern eingesetzt.

Für die Real Time PCR wurde der Absolute™ qPCR SYBR Green® Mix mit der darin enthaltenen Thermo-Start® DNA Polymerase der Firma ABgene verwendet.

**Oligonukleotide:**

Für die Amplifikation der cDNA mittels PCR wurden folgende Intron-überspannende Oligonukleotide mit Hilfe der Primer-Express-Software erstellt und ihre Synthese bei der MWG Biotech, Ebersberg, in Auftrag gegeben. Die erhaltenen Primer-Lyophilisate wurden nach Herstellerangaben mit DEPC-behandeltem A. bidest. gelöst und ebenfalls mit DEPC-A. bidest. auf eine Konzentration von 15 pmol/µl eingestellt. Diese Gebrauchslösungen wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

FXF (Faktor X)	5' -AAG GAA ATC TGG AAA GAG AGT GTA TGG-3'
FXR	5' -TGG TCG CCG TCT TTA TAT TTG G-3'
GAPDH3F	5' -GGT CCT CAG TGT AGC CCA AGA TG-3'
GAPDH3R	5' -TGG CCT TCC GTG TTC CTA CC-3'

**Plasmid:**

RNA-Sonde	Vektor	Größe (bp)	Linearisiert mit (Orientierung)
FX, nt 257-1859 von BC003877.1	pBluesscript-II- SK®	1602	Bam HI (T3, as)/ Sall (T7, s)

Das FX-Plasmid wurde von Dr. Jan Ehrchen (Institut für Experimentelle Dermatologie, Münster) zur Verfügung gestellt.

**Molekularbiologische Kits:**

Microarray Target Amplification Kit®	Roche, Mannheim
Microarray Target Purification Kit®	Roche, Mannheim
Mini Quick Spin Columns®	Roche, Mannheim
DIG RNA Labeling Mix®, 10 x conc.	Roche, Mannheim
Rneasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy® Micro Kit	Qiagen, Hilden
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit®	Genomed, Löhne
JETSTAR Plasmid Purification Kit® - Mini	Genomed, Löhne
JETSTAR Plasmid Purification Kit® - Maxi	Genomed, Löhne
RNA 6000 NanoChip® Kit	Agilent, Waldbronn

**3.3 Versuchstiere**

Die Versuchstiere wurden entsprechend den Bestimmungen gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 (BGBl. IS. 1105) gehalten und behandelt. Das Versuchsvorhaben wurde von der Bezirksregierung Münster

(Aktenzeichen 50.0835.1.0; G 83 / 2002) genehmigt. Als Versuchstiere wurden acht bis zehn Wochen alte weibliche Balb/c- und C57Bl/6-Mäuse von der Firma Harlan und Winkelmann, Borcheln und Charles River Laboratories, Sulzfeld bezogen. Sie wurden in Makrolonkäfigen (Typ III) im Zentraltierstall des Instituts für Experimentelle Dermatologie bei einer Raumtemperatur von +20°C, relativer Luftfeuchtigkeit von 55% ± 5%, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden durch Kunstlicht bei 300 Lux, gehalten. Entkeimtes Trinkwasser aus Flaschen, sowie pelletiertes Futter stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

### **Probenmaterial**

Die Proben wurden nach Euthanasie der Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 225 µl Ketanest® (5mg/ml) und 25 µl Rompun® (2%) entnommen.

### **Fußsohlenhaut (Gesamthaut)**

Die Fußsohlenhaut (im weiteren Verlauf als Gesamthaut bezeichnet) der Hinterläufe wurde vom Mittelfußknochen gelöst, in Kryogefäße überführt und in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gehalten.

### **Hinterfüße**

Die Hinterfüße wurden zur Herstellung von Gefrierschnitten für die *in situ* Hybridisierung (ISH) verwendet. Sie wurden in Höhe des Sprunggelenkes abgetrennt, in OCT-Medium (Tissue-Tek®, Sakura, Zoeterwoude) eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden sie bei -80°C gelagert.

### **Generelle Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit *L. major***

Sämtliche Arbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank in Schutzkleidung durchgeführt. Infektiöse Materialien, wie Flüssigkeiten und Verbrauchsmaterialien, wurden speziell gekennzeichnet, gesondert gesammelt und anschließend in dafür vorgesehenem Verpackungsmaterial autoklaviert. Vor und nach jedem Arbeiten mit infektiösem Material wurden Instrumente und Arbeitsbänke mit 0,5 %igem Lyso FD 10 (Schülke & Mayr, Norderstedt) desinfiziert.

### 3.4 Leishmanien

Der verwendete *L. major* Stamm MHOM/IL/81/FE/BNI wurde von Frau Prof. Dr. Heidrun Moll, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

#### **Propagierung von *L. major***

Für die Propagierung von *L. major* wurden promastigote Leishmanien in stationärer Phase verwendet.  $2 \times 10^7$  Leishmanien wurden in 50  $\mu$ l PBS aufgenommen und subkutan und plantar in den Hinterfuß einer Balb/c Maus injiziert. Nach 2 – 3 Wochen waren sichtbar abszedierte Granulome am Infektionsort erkennbar. Für die Ernte des Fußes wurde das Tier euthanasiert, der Fuß mit 70% Ethanol gesäubert und in Höhe des Sprunggelenkes abgetrennt. Der Fuß wurde in eine mit SDM-Medium befüllte Petrischale überführt, die im Abszess enthaltenen Leishmanien ausgestrichen und anschließend für 10 min bei  $1125 \times g$ ,  $20^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 2 – 3 Tagen im Brutschrank bei  $27^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  wurden 17 ml Medium hinzugegeben und die Kultur in eine T75-Flasche überführt.

#### **Kultur von *L. major***

Sobald die Leishmanien eine Dichte von ca.  $5 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht hatten, wurden die Kulturen in einem Verhältnis von 1:10 umgesetzt. Dafür wurde der Inhalt der T75-Kulturflasche in ein 50 ml Bluecap Röhrchen überführt und für 10 min,  $1125 \times g$ ,  $20^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium aufgenommen und 1/10 (100 $\mu$ l) des Volumens auf 15 ml frisches Medium in einer neuen T75-Flasche gegeben und wie beschrieben inkubiert. Die Infektiosität der verwendeten Leishmanien wurde durch regelmäßige Passagierung durch Balb/c-Mäuse gewährleistet (maximal 10 Passagen *in vitro*).

### **Auszählung von *L. major***

Der Inhalt einer T75 Flasche wurde pelletiert und mit PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in PBS aufgenommen, mit 1% Paraformaldehyd verdünnt und die Parasiten anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurde der Mittelwert der Parasitenzahlen aus vier großen Zählfeldern gebildet. Die Zellzahl wurde wie folgt ermittelt:

$$\begin{aligned}\text{Absolute Anzahl der Leishmanien} &= n \times 10^4 \times 1000 / \text{ml} \\ &= n \times 10^7 / \text{ml}\end{aligned}$$

(n = Mittelwert der ausgezählten Leishmanien)

### **Limiting dilution assay von *L. major***

Die Quantifizierung von *L. major* erfolgte durch einen *limiting dilution assay* [111]. Die Milzen und Lymphknoten wurden in 5ml SDM Medium aufgenommen und mit einem Rotor-Stator Homogenisator homogenisiert. Anschließend wurde der Homogenisator mit 70% Ethanol und mit PBS gewaschen. Die Hinterfüße wurden in eine Petrischale mit 5ml Medium überführt und die Fußsohle mit einem Skalpell zerkleinert. Die Suspension der Milzen und Lymphknoten wurde auf zwei 96-well Platten 1:2 bis zu 24 Verdünnungsstufen weiter verdünnt. Die Hinterfüße wurden 1:20 vorverdünnt und wie oben aufgetragen. Für jedes Probenmaterial wurden je Maus Vierfachansätze angesetzt. Die Platten wurden mit Parafilm und Deckel abgedeckt. Nach einer Woche Inkubation bei 27°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Platten ausgewertet, indem die Verdünnungsstufe bestimmt wurde, in der noch Leishmanien unter dem Lichtmikroskop sichtbar waren. Ausgehend von dieser Verdünnungsstufe wurde die Anzahl der Parasiten nach folgendem Schema berechnet:

## Milzen und Lymphknoten

Erste Verdünnung 100 µl unverdünnt ~ 1 Parasit, also 50 Parasiten in 5 ml.

## Füße

Erste Verdünnung 100 µl 1:20 ~ 1 Parasit, also 20\*50 = 1000 Parasiten in 5 ml.

### 3.5 RNA-Isolierung

#### RNA-Isolierung aus Gesamthautproben

Die Isolierung der RNA erfolgte durch die *Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction* [22]. Dazu wurde die in flüssigem Stickstoff gelagerte Haut von zwei Fußsohlen zuerst in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert. Das Pulver wurde in eine 1,2 ml TRIzol® Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) enthaltende Zellkulturschale auf Eis überführt. Das Lysat wurde mehrmals in einem Potter homogenisiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Das im TRIzol® enthaltene Phenol und Guanidinium-isothiocyanat bewirken eine Zellyse, wodurch DNA, RNA und Proteine frei werden. Nach 3-minütiger Zentrifugation (12000 x g) wurde der Überstand zur vollständigen Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe, 5 min. bei RT inkubiert. Danach wurden 0,2 Volumenteile Chloroform zugegeben, das Gemisch 15 sek. lang kräftig geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Durch die Zentrifugation bei 4°C, 12000 x g für 20 Minuten, bilden sich drei Phasen. Eine untere rote Phenol-Chloroform Phase, eine weiße proteinhaltige Interphase und eine farblose wässrige obere, RNA enthaltene Phase. Diese obere Schicht wurde abgenommen, und mit 500 µl Isoopropanol eine halbe Stunde bei 4°C gefällt. Nach der Zentrifugation bei 12000 x g für 20 min bildete sich ein gelartiges Pellet, das mit 1ml 75% Ethanol gewaschen wurde und nochmal zentrifugiert wurde. Am Ende wurde der Überstand verworfen, das Pellet für 5 min in einem Heizblock bei 37°C getrocknet und in 100µl DEPC-Aqua bidest. eluiert. Dieses Eluat wurde anschließend mit dem RNeasyMiniKit® nochmals gereinigt. Bei diesem Verfahren wird die Nukleinsäure an Silikatmembranen gebunden. Durch Wahl geeigneter Puffer



bindet vor allem RNA, während genomische DNA weitgehend ungebunden bleibt. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die in 100  $\mu$ l DEPC-Aqua bidest. gelöste RNA wurde in 350  $\mu$ l RLT Puffer mit 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, Steinheim) aufgenommen. Auf das gut gemischte Lysat wurde 350  $\mu$ l 70%-iger Ethanol gegeben. Die resultierende, klar-visköse Lösung wurde auf ein RneasyMiniSpin<sup>®</sup> Säulchen gegeben und 15 sek. bei 8000 x g zentrifugiert. Die aufgefangene Lösung wurde verworfen und 350  $\mu$ l des ersten Waschpuffers RW1 hinzugegeben. Die Säule wurde wieder 15 sek. bei 8000 x g zentrifugiert. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule mit 30 Units RNase freier DNase in 70  $\mu$ l RDD Puffer beladen. Dieser 15 minütige Inkubationsschritt bei RT bewirkt, dass etwaige an die Säule gebundene DNA Moleküle in kurze Stücke verdaut werden und somit beim folgenden Waschgang von der Membran entfernt werden. Dies geschieht durch weitere 350  $\mu$ l des Waschpuffers RW1 und einer Zentrifugation von 15 sek. bei 8000 x g. Dieser Waschschrift wurde mit 500  $\mu$ l eines zweiten Waschpuffers, RPE zweimal wiederholt, wobei die Säule beim zweiten Mal für 2 min bei 10000 x g zentrifugiert wurde. Danach wurde die gebundene RNA mit 52  $\mu$ l DEPC-Aqua bidest. in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß eluiert. 2  $\mu$ l wurden für die spektralphotometrische Analyse verwendet, der Rest bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### **Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA- und RNA-Spektralphotometrie:**

Die Konzentration und Reinheit von DANN und RNA lassen sich durch spektral-photometrische Messungen bestimmen [5]. Die Messungen erfolgten im Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg) bei 260nm in speziellen Kunststoffküvetten (Qiagen, Hilden).

Für die Konzentration gilt:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times n \times f$$

(c = Konzentration der (unverdünnten) DNA-Lösung;  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  = optische Dichte bei 260 nm; n = Eichfaktor: 50  $\mu\text{g/ml}$  für dsDNA, 33 für ssDNA, 40 für RNA; f = Verdünnungsfaktor der gemessenen DNA-Lösung)

Idealerweise liegt der Quotient von  $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$  bei 1,8. Abweichungen von diesem Wert beruhen auf Kontaminationen durch Proteine.

### **Quantitative PCR – Real Time PCR**

Bei der *Real Time*-Analyse (*Real Time RT-PCR* oder QRT-PCR) wird nicht das Endprodukt untersucht, sondern das Entstehen dieses Produktes im Verlauf der PCR [37]. Das Prinzip dieser Methode ist, dass mit jedem Amplifikationsschritt durch den Einsatz fluoreszierender Farbstoffe ein vom Gerät detektierbares Signal generiert wird, welches mit der jeweils vorhandenen Menge an PCR-Produkten korreliert. Der Anstieg der Fluoreszenz wird während jedes Zyklus gemessen, mit dem Ergebnis, dass der Ablauf und nicht das Endergebnis der Reaktion nachvollzogen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der interkalierende Farbstoff SYBR-Green (absolute™ qPCR SYBR Green® MIX, ABgene) verwendet. Dieser fluoreszierende Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA [66]. Der Farbstoff wird durch einen Laser zur Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge angeregt, die wiederum von einer Fozelle detektiert wird. Die Spezifität wird anhand einer Dissoziationskurve überprüft [84], indem das PCR-Produkt nach dem letzten Zyklus durch langsame Erhitzung bis zum Schmelzpunkt denaturiert wird. Durch den Schmelzpunkt können die Längen der im Re-

aktionsgemisch vorhandenen PCR-Produkte und damit die Spezifität der Reaktion bestimmt werden. Für die Amplifikation der sogenannten *housekeeping* Gene GAPDH und RPL wurde die cDNA 1:100 und für die Zielgene 1:10 mit DEPC-Aqua bidest. verdünnt, und im ABI prism 7900 HT-RealTime-PCR (Applied Biosystems, Weiterstadt) als Doppelbestimmungen für jedes Gen durchgeführt. Das Pipettieren der 384-well PCR Platten (ABgene, Hamburg) erfolgte durch den Genesis 150 Workstation Pipettierroboter (Tecan, Crailsheim).

### Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen
cDNA	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer, 50 pmol/µl	0,2 µl
<i>Reverse</i> Primer, 50 pmol/µl	0,2 µl
SYBR-Green Mastermix, enthält SYBR <sup>®</sup> <i>Green Dye</i> I, Thermo -Start <sup>®</sup> DNA Polymerase, dNTPs und Puffer	5 µl
DEPC-Aqua bidest.	2,3 µl
Endvolumen	10 µl

### Real Time PCR Programm

Schritt	Aktion	Inkubationszeit	Temperatur
1.	Denaturierung	15 min	95°C
2.	Denaturierung	15 sek	95°C
3.	Anlagerung	1 min	60°C
4.	40 Zyklen von Schritt 2-3		
5.	Denaturierung	15 sek	95°C
6.	Anlagerung	15 sek	60°C
7.	Denaturierung	15 sek	95°C

### Auswertung der Real Time PCR – Relative Quantifizierung

Grundlage für die Quantifizierung einer Reaktion ist der *Cycle-threshold* (Ct)-Wert, welcher die Zyklenanzahl angibt, mit der das Fluoreszenz Signal das doppelte Niveau der Hintergrundfluoreszenz (baseline) erreicht hat. Er steht in direkter Beziehung zur Ausgangsmenge der eingesetzten DNA. Ist der Ct-Wert niedrig, ist die eingesetzte Menge DNA groß. Ist der Ct-Wert hoch, so ist die Ausgangsmenge an DNA klein. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit einem oder mehreren nicht regulierter sogenannter *housekeeping* Gene (Referenzgene) - hier der Mittelwert aus GAPDH und RPL - normalisiert. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt. Die Expression des zu untersuchenden Gens wird dabei auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen, bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT PCR innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Regulationsfaktor, N-fold) erfolgte über die sog.  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Methode. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$ ). Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta\text{Ct}$  Wert der unbehandelten Kontrolle, der  $\Delta\text{Ct}$  Wert der experimentell behandelten Proben abgezogen; man kommt zum sog. „*delta-delta CT*“ Berechnungsmodell  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct Unbehandelt} - \Delta\text{Ct Behandelt})$ . Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel:

$$\text{Regulationsfaktor (N-fold)} = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (\text{siehe [55]})$$

Dieses Berechnungsschema setzt eine Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus. In einigen Fällen würde die Berechnung des n-folds jedoch zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Dies ist z.B. gegeben, wenn die Expression von Zielgenen in der nicht behandelten Probe sehr gering ist. In diesen Proben ist der Ct-Wert dementsprechend hoch, so dass nach dem „*delta-delta CT*“ Berechnungsmodell eine stärkere Expression gemessen würde, als tatsächlich vorhanden ist. In diesem Falle, wie auch für den Fall, dass Ct-Werte des Referenzgens außerhalb des messbaren Bereichs lagen, wurde die relative Kopienzahl der behandelten Probe in Bezug auf GAPDH/RPL berechnet. Dies erfolgte durch Anwendung der Formel:

$$2^{\Delta Ct^* - 1} / \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### **DIG-markierte RNA-Sondensynthese (*in vitro*-Transkription)**

Für die Synthese der Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonden wurde der “DIG RNA Labeling Mix, 10 x konz.” (Roche) sowie die entsprechende T3-RNA-Polymerase bzw. T7-RNA-Polymerase (beide: Roche) verwendet (Tab. 14). Hierbei synthetisieren die entsprechenden RNA Polymerasen in Gegenwart von markierten Nukleotiden (hier: DIG-11-UTP) einzelsträngige RNA-Sonden (Ribosonden, *riboprobes*). Die Menge an DNA, die in die Sondensynthese eingesetzt wurde, lag durchschnittlich bei 1 µg/Ansatz.

### Ansatz für die Synthese von DIG-markierten RNA-Sonden

Reagenzien	Menge	Hersteller
Dann	x µl	
DIG RNA <i>labeling</i> Mix	2 µl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
10 x Transkriptionspuffer	2 µl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DEPC-Aqua bidest. auf 11 µl	x µl	
RNasin, 40U/µl	1 µl	Fermentas, St. Leon Rot
RNA Polymerase (T3 oder T7)	2 µl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Endvolumen	20 µl	

Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden 2 µl DNAse I (60U), RNase-frei zur Entfernung der Template-DNA zugegeben und 15–30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Sonden bei -80°C bis zur Sondenhydrolyse gelagert.

### Sondenhydrolyse

Bei Sonden, die größer als 250 nt sind, muß die synthetisierte RNA fragmentiert werden, damit sie in der Lage ist, in die Zellen einzudringen. Die Ideallänge ist 200 nt.

Die Zeit T (in min) der alkalischen Hydrolyse wurde folgendermaßen berechnet:

$$T = L_0 - L_f / k \times L_0 \times L_f$$

( $L_0$  = Ausgangslänge der RNA (in kb);  $L_f$  = Gewünschte Fragmentlänge in kb (0,2);  
K = Konstante (0,11))

Die Hydrolyse erfolgte bei 60°C durch Zugabe des gleichen Volumens 0,2 mol/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 10,2. Anschließend wurde die Reaktion durch Neutralisation mit 1/20 des Volumens Essigsäure (100 %) gestoppt und auf Eis gelagert. Der Erfolg der Hydrolyse wurde auf einem 2% MOPS Gel kontrolliert.

### **Aufreinigung der fragmentierten Sonden**

Die Aufreinigung erfolgte durch die Mini Quick Spin Columns<sup>®</sup> der Firma Roche. Hierzu wurden die Säulen entsprechend der Angaben des Herstellers präpariert, indem die Sephadex Matrix im Puffer zunächst durch energisches Invertieren der Säule homogen resuspendiert wurde. Im nächsten Schritt wurde der Puffer unter Druckentwicklung aus der Säule entfernt. Nach Abfluss des Puffers wurde die Säule in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 min und RT bei 1000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt und mit den hydrolysierten Sonden beladen. Das Eluat wurde nach 4 minütiger Zentrifugation bei 1000 x g aufgefangen, spektralphotometrisch gemessen und bis zur *in situ* Hybridisierung bei -80°C gelagert.

## **3.6 Histologische und Immunhistochemische Methoden**

### **Kryoschnitte (Gefriergewebeschnitte)**

Ein Kryostat (SLEE Technik) diente zur Gewinnung von 9 µm dicken transversalen Hinterfußschnitten für die *in situ* Hybridisierung. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Superfrost<sup>®</sup> Plus, Langenbrinck, Emmendingen) aufgenommen und bis zur Prähybridisierung bei -80°C gelagert.

### ***In situ* Hybridisierung (ISH)**

Die ISH ist ein Verfahren, um die mRNA in einem Gewebe sichtbar zu machen. Bei einer solchen Färbung werden nur diejenigen Zellen angefärbt (hybridisiert), in denen das zu untersuchende Gen aktiv ist und in denen daher die mRNA im Cytoplasma vorliegt. Für diese Sichtbarmachung der mRNA wurden die unter 3.5 synthetisierten DIG-markierten RNA-Sonden verwendet. Das Digoxigenin kann mithilfe eines Antikörpers, der mit einem Enzym gekoppelt ist, erkannt werden. Das Enzym, meistens alkalische Phosphatase oder Peroxidase, kann dann durch Zusatz von Reagenzien einen Farbstoff umsetzen, der kovalent im Gewebe gebunden bleibt und sich daher nicht durch Diffusion verteilt.

### **Fixierung und Prähybridisierung**

Die Gefrierschnitte wurden 30 min luftgetrocknet und anschließend in 4% Paraformaldehyd/PBS-Lösung in einer Küvette für 1 Stunde unter Rühren bei RT fixiert. Durch dreimaliges Eintauchen für je 10 min in 1 x PBS wurden die Schnitte gewaschen. Eine Behandlung mit Proteinase K (1 µg/ml) Lösung bei RT für 10 min, bewirkte eine Proteolyse sowie den Aufschluss der Zellmembran. Nach erneutem Waschen in A. bidest. wurde für 10 min mit 4% Paraformaldehyd nachfixiert. Die Acetylierung fand nach Waschen in Aqua bidest. und PBS durch 10 minütige Inkubation in 0,1 mol/l TAE und 0,25% Essigsäureanhydrid statt. Nach weiteren A. bidest und PBS Waschgängen, wurden die Schnitte durch sukzessives Eintauchen in 50% und 70% Ethanolösung entwässert. Die Schnitte wurden mindestens 30 min an der Luft getrocknet und anschließend direkt zur Hybridisierung verwendet.

### **Hybridisierung**

Die prähybridisierten Schnitte wurden mit den in der Hybridisierungslösung verdünnten DIG-markierten RNA-Sonden überschichtet, als Verdunstungsschutz mit einem Deckgläschen bedeckt und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 56°C inkubiert. Die Konzentration der eingesetzten Sonde lag durchschnittlich bei 100 – 200 ng/ml Hybridisierungsmix.

### **Posthybridisierung**

Die Deckgläschen wurden durch Eintauchen in 2 x SSC entfernt, die Objektträger wurden in 2 x SSC und 1 x SSC gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C in der RNase Lösung inkubiert. Es schlossen sich Waschschriffe mit sinkender Ionenstärke an (bis 0,2 x SSC) und ein Waschschriff bei hoher Temperatur (60°C in 0,2 x SSC). Danach wurden die Objektträger einmal in 0,2 x SSC und anschließend in Puffer 1 (s. Puffer und Lösungen) gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation in Puffer 2 (s. Puffer und Lösungen) Blockierungsreagenz zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsplätze. Die Proben wurden vorsichtig mit 100 µl Anti-Dig Antikörperlösung überschichtet und bei



4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Es schloss sich eine zwei-stündige Inkubation bei 37°C und anschließend zweimaliges Waschen in Puffer 1 an. Die alkalische Phosphatase wurde durch kurzes Waschen in Puffer 3 aktiviert und die Objektträger 3 – 6 Stunden in der Farblösung, im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen in Puffer 4 (s. Puffer und Lösungen) im Dunkeln bei RT gestoppt. Danach wurden sie für 10 sek. in Hämaun Lösung getaucht und anschließend 3mal für 5 min. in H<sub>2</sub>O gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Glycergel<sup>®</sup> (Dako, Hamburg) eingedeckelt. Das Ergebnis wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und mit einer Kamera dokumentiert.

### **Präparation von aus Knochenmark stammenden Makrophagen (BMDMs)**

Zur Isolierung der aus Knochenmark stammenden Makrophagen wurden weibliche C57Bl/6-Mäuse getötet und ihre von Gewebepartikeln befreiten Femur- und Tibiaknochen herausgetrennt. Um das Knochenmark zu gewinnen, wurden die Knochen vorsichtig mit 2 - 3 ml eiskalter HBSS mittels einer 10 ml Spritze und 25er Kanüle gespült. Die Erythrocyten wurden durch osmotischen Druck dezimiert, die Zellen mit HBSS gewaschen, durch Zentrifugieren gesammelt und zu je  $1 \times 10^6$  Zellen/ml DMEM mit 2 mMol Glutamin, 0.1 ml nicht essentieller Aminosäuren, Antibiotika und 10%iger durch Hitze inaktivierter FCS (Biochrom, Berlin, Makrophagenmedium) kultiviert.

Die Zellen wurden in Teflonbeuteln (Heraeus, Hanau, Germany) kultiviert und mit 10%igem Nährboden unter Zusatz von 10%igem L-Zellen aufbereitetem Nährboden, der M-CSF enthält, versorgt. Nach 6 Tagen wurden die Teflonbeutel auf Eis gelegt, um die anhaftenden Zellen zu lösen, die dann vorsichtig entfernt und anschließend durch Zentrifugieren aufgefangen wurden. Die gesamte Zellsuspension wurde bei 25 g für 5 min zentrifugiert. Dann wurde wiederum der Überstand verworfen und der Zelniederschlag mit 3 ml angereicherter DMEM suspendiert. Nach der Ernte wurden die Makrophagen komplett in DMEM auf Eis gelagert, um Zellschäden bzw. den Zelltod vor den abschließenden Versuchen zu vermeiden.

### **NO Freisetzung**

Die Stimulierung von Makrophagen mit IFN $\gamma$  und LPS führt zur typischen Aktivierung der Makrophagen-Steuerungsfunktionen. Die Produktion hochaktiver Stickoxide ist eines der Kennzeichen der Makrophagenaktivierung. Die Stickoxidfreisetzung wurde als Nitritkonzentration mittels Mikroplattenuntersuchung unter Benutzung des Griess Reagenz wie in Ding et al [29] beschrieben, gemessen. Ausgereifte Makrophagen wurden somit in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  / ml ausplattiert und blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 500 U/ml IFN $\gamma$  und 100 ng/ml LPS, 100 ng/ml LPS stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach 24 h wurde *L. major* zur einen Hälfte der Zellkulturen im Verhältnis 5:1 zugegeben, um dann die Nitritkonzentration nach 24 h zu messen.

### **Cytokine Bestimmung mit *L. major*- spezifischen CD4+ T Zellen**

Acht Wochen nach der Infektion mit *L. major* wurden die Mäuse getötet und die Milz unter antiseptischen Bedingungen entfernt. Eine Einzelzellsuspension wurde vorbereitet und CD4+ T-Zellen wie beschrieben generiert [32]. Die Zellreinigung erfolgte durch Passage mit einer Nylonwolle-Säule, und die anschließende Entfernung kontaminierter Zellen erfolgte durch Anwendung des MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) sowie einem automatischen magnetischen Zellsortierer (entsprechend den Anweisungen des Herstellers auto MACS; Miltenyi Biotec).

Die von Knochenmark gereinigten DCs wurden von C57BL/6J-Mäusen generiert [94]. Knochenmark wurde isoliert und in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF für 6 Tage kultiviert. DCs ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden mit sLmAg Äquivalent zu  $5 \times 10^6$  *L. major* für 48 h inkubiert.

Um die Cytokinsekretion überprüfen zu können, wurden DC und CD4+ T-Zellen im Verhältnis 5:1 gemischt und in RPMI1640 plus 2 mM Glutamin, 50  $\mu$ M Mercaptoethanol und 10% FCS für 48 h kultiviert. Der Nährmediumüberstand wurde nach Herstelleranweisungen mittels CBA Assay (BD Pharmingen) untersucht.

**Statistische Analyse**

Die Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt, außer anders angezeigt. Die statistische Analyse wurde mittels Student's t Test mit unabhängigen Stichproben bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Infektionsverlauf in PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen

Der genetische Hintergrund kann bei der Analyse von transgenen Tiermodellen innerhalb dessen die Mutation erfolgte, von entscheidender Bedeutung sein. Die PAR<sub>2</sub> -/- Mäuse wurden mindestens über 10 Generationen auf den C57Bl/6 Hintergrund gekreuzt. Der für die Generierung der genetisch PAR<sub>2</sub> depletierten Mäuse verwendete SV129- sowie der C57Bl/6-Mausstamm ist bereits gegenüber einer subkutanen Infektion mit *L. major* als resistent beschrieben. Zur Bestätigung und zwecks Austestung der Infektiosität der verwendeten Parasiten erfolgte zunächst ein Infektionsversuch in den Mäusen, die über einen funktionellen PAR<sub>2</sub>-Rezeptor auf dem entsprechenden Genotyp verfügen.

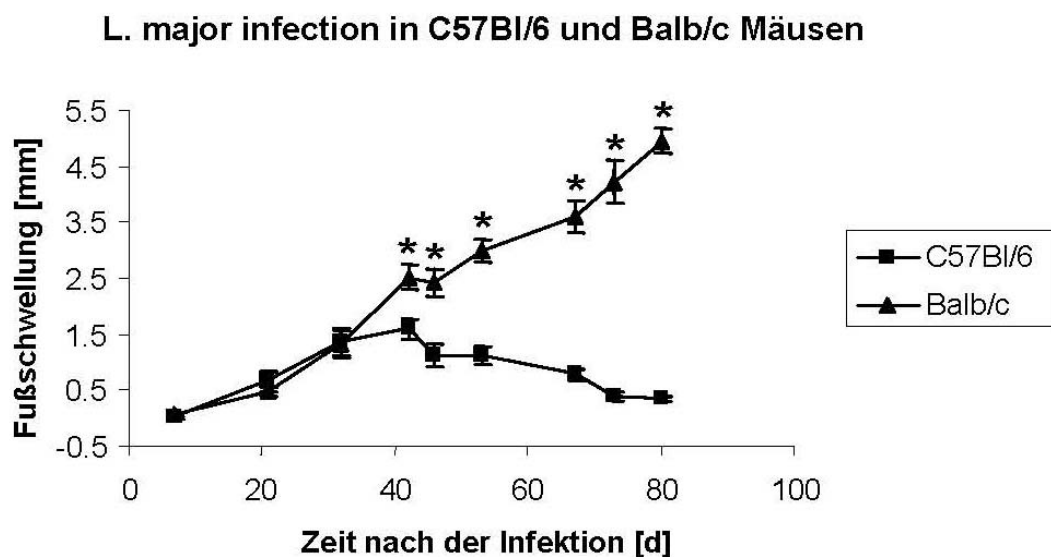
Es erfolgte eine subkutane Infektion in die linke Hinterpfote von je  $2 \times 10^7$  promastigoten *L. major* Parasiten (in 50µl PBS) bei 6 PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen auf einem resistenten genetischen Hintergrund (C57Bl/6).

Zum Vergleich wurde eine parallele Infektion von 6 suszeptiblen Balb/c-Mäusen ausgelöst, als interne Kontrolle wurden 50µl PBS in die rechte Hinterpfote injiziert. Anschließend wurde - wie im Material und Methoden Teil beschrieben, die durch die Infektion bedingte Fußschwellung mittels Differenzmessung der Hinterpfoten bestimmt.

In den ersten 3 Wochen postinfektionem kam es - wie erwartet - in beiden Mausstämmen zu einer deutlichen Schwellung der infizierten Hinterpfote (Abbildung 3). Es ließen sich aber in den ersten 4 Wochen nach der Infektion keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen nachweisen. In den PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen erreichte die Schwellung 6 Wochen nach der Infektion ein Maximum. In der Folge heilten die Läsionen in 5 weiteren Wochen nahezu komplett ab. Bei keiner Maus entstanden im Verlauf der Infektion ulzerative Hautveränderungen.

Im Gegensatz dazu kam es bei den suszeptiblen Balb/c-Mäusen im Verlauf zu einer progredienten Schwellung des Fußes. Ab der 8. Woche kam es bei allen Mäusen zu einer Ulzeration der infizierten Hinterpfoten. Die Balb/c-Mäuse mussten wegen der Progredienz der Ulzeration nach 80 Tagen getötet werden. Die Unterschiede in der gemessenen Fußschwellung zwischen PAR<sub>2</sub> +/+ und Balb/c-Mäusen waren ab dem 42. Tag bis zum Ende des Experimentes 80 Tage nach der Infektion statistisch hoch signifikant (Abbildung 3).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PAR<sub>2</sub> +/+ Mäuse einen resistenten Phänotyp gegenüber einer *L. major* Infektion zeigen. Im Gegensatz zu suszeptiblen Mäusen, die nicht heilende, ulzerierte Hautläsionen entwickeln, verläuft die Infektion in den PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen in Form einer zeitlich begrenzten Schwellung, die komplett abheilt.

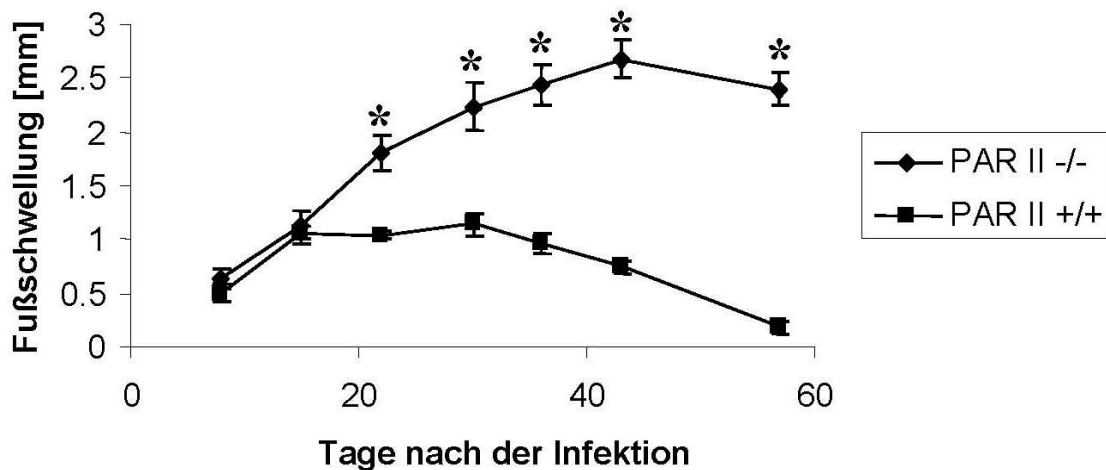


**Abbildung 3. Verlauf der Fußschwellung in C57BI/6 (PAR<sub>2</sub> +/+) Mäusen im Vergleich zu Balb/c-Mäusen.** Dargestellt ist der Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwertes für jeweils 6 Mäuse. (\*= p < 0,05 Student's T-Test für ungepaarte Proben.)

#### 4.2 Infektionsverlauf in PAR<sub>2</sub> defizienten Mäusen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die PAR<sub>2</sub> +/+ Mäuse resistent gegenüber einer subkutanen Infektion mit  $2 \times 10^7$  promastigoten *L. major* Parasiten sind, konnten die Infektionsversuche auf PAR<sub>2</sub> -/- Mäuse ausgeweitet werden.

Wie oben beschrieben, wurden je 6 PAR<sub>2</sub> -/- und 5 PAR<sub>2</sub> +/+ Mäuse mit  $2 \times 10^7$  promastigoten *L. major* Parasiten infiziert und der Infektionsverlauf anhand der Fußschwellung analysiert (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Verlauf der Fußschwellung in PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen.** Dargestellt ist der Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwertes für jeweils 6 Mäuse. (\*=  $p < 0,05$  Student's T-Test für ungepaarte Proben).

In den ersten beiden Wochen nach der Infektion konnte kein signifikanter Unterschied in der Fußschwellung zwischen PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen nachgewiesen werden. Ab der dritten Woche jedoch zeigten die PAR<sub>2</sub> -/- Mäuse eine deutlich stärkere Schwellung der Füße. Die Schwellung bei den PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen erreichte nach ca. 4 Wochen ihr Maximum. Anschließend bildeten sich

die Läsionen wie bereits beschrieben, innerhalb von 60 Tagen bis zur kompletten Abheilung zurück.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen eine bis 6 Wochen nach der Infektion progrediente Schwellung, die anschließend nur gering rückläufig war. Bei 3 von 6 Mäusen kam es zu einer kleinen Ulzeration der Hinterpfote, die jedoch wieder abheilte.

Die Frage, ob es bei den PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen zu einer verzögerten Abheilung kommt, oder ob eine chronische, nicht heilende Läsion vorliegt, wurde in einem weiteren Experiment untersucht. 3 PAR<sub>2</sub><sup>+/+</sup> und 3 PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse wurden deshalb wie oben beschrieben infiziert. Die Fußschwellung wurde 4 Monate nach der Infektion gemessen. Hier zeigte sich bei den PAR<sub>2</sub><sup>+/+</sup> Mäusen keine messbare Schwellung, während bei den PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen auch zu diesem späten Zeitpunkt noch eine signifikante Fußschwellung (1,9 +/- 0,6 mm) detektiert werden konnte.

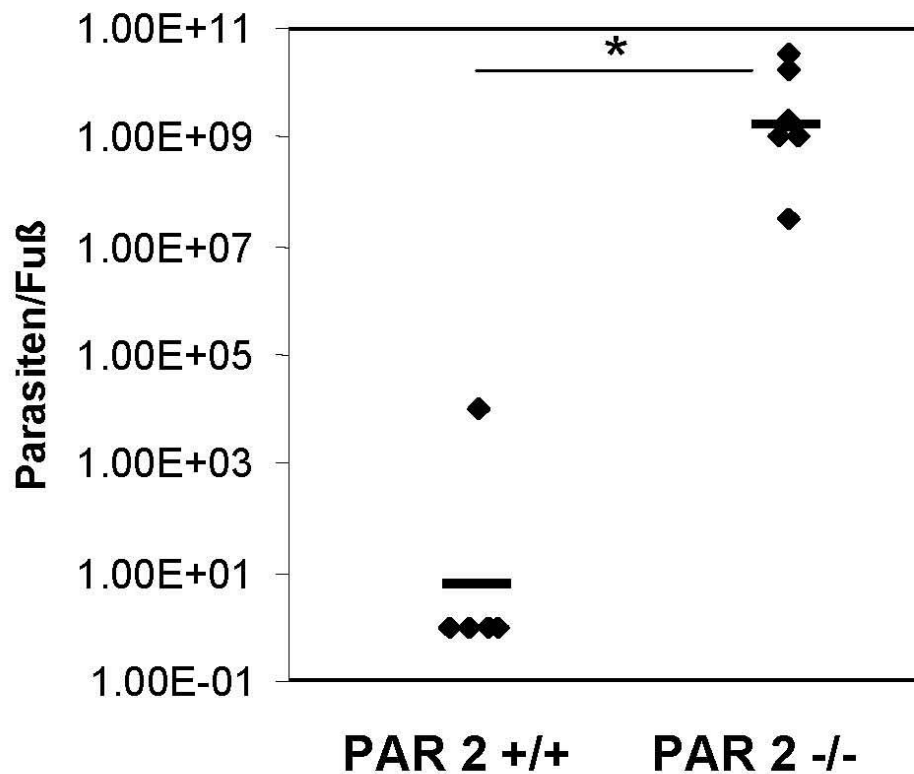
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen im Gegensatz zu PAR<sub>2</sub><sup>+/+</sup> Mäusen nach einer Infektion mit  $2 \times 10^7$  promastigoten *L. major* Parasiten chronische, nicht heilende, Hautläsionen entstehen.

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob dieser unterschiedliche Infektionsverlauf auch mit einer verminderten Fähigkeit der PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse die Parasiten zu eliminieren, einhergeht.

### 4.3 Parasitenelimination in PAR<sub>2</sub> defizienten Mäusen

Um die Fähigkeit der PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse zur Eliminierung der Leishmanien zu untersuchen, wurden die infizierten Tiere 60 Tage nach der Infektion mit  $2 \times 10^7$  promastigoten Leishmanien getötet. Die Anzahl der Parasiten im infizierten Fuß wurde durch limitierte Verdünnungsanalyse (LDA) wie unter Material und Methoden beschrieben, bestimmt (Abbildung 5).

Während sich bei 4 von 5 PAR<sub>2</sub><sup>+/+</sup> Mäusen keine lebenden Parasiten mehr nachweisen ließen, fanden sich bei den PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen in jedem der 6 Tiere eine hohe Anzahl lebender Leishmanien.



**Abbildung 5. Anzahl der lebenden *L. major* Parasiten in den Hinterfüßen von PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen 60 Tage nach der Infektion.** Die Diamanten entsprechen der Parasitenanzahl pro Fuß in einer individuellen Maus. Der Stern kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen.  $p < 0.001$  Wilcoxon Test für unverbundene Stichproben.

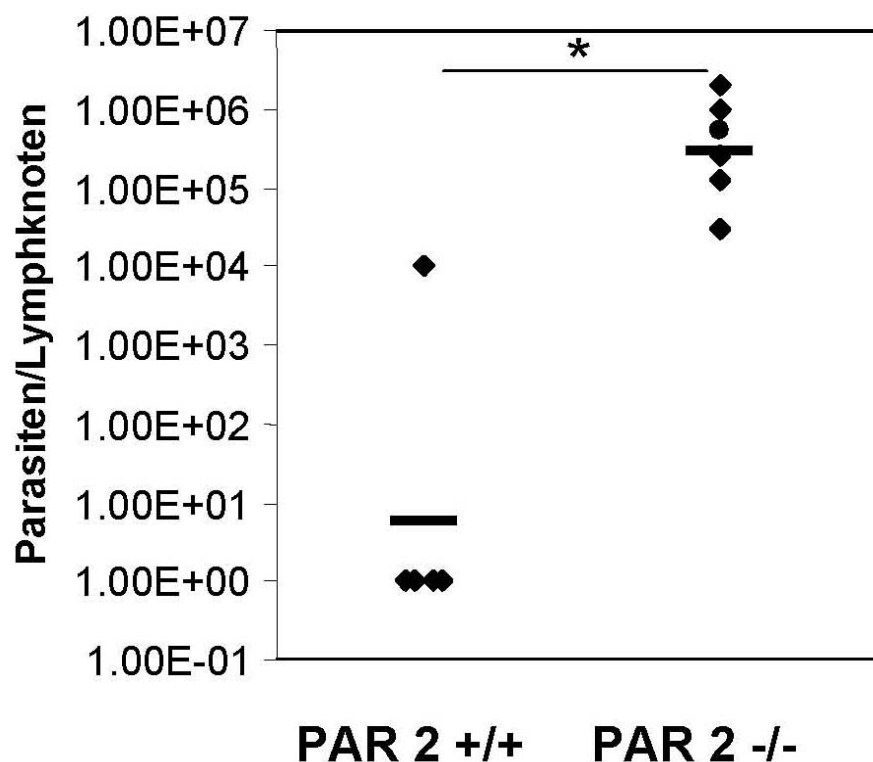
Die Unterschiede in der Parasitenanzahl zwischen den PAR<sub>2</sub> +/+ und den PAR<sub>2</sub> -/- Tieren waren statistisch hoch signifikant.

Eine Bestimmung der lebenden Parasiten wurde auch in den Füßen der 3 PAR<sub>2</sub> +/+ und 3 PAR<sub>2</sub> -/- Mäuse durchgeführt, bei denen der Infektionsverlauf bis 4 Monate nach Injektion der Parasiten verfolgt wurde. Auch hier konnten in allen 3 PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen lebende Parasiten nachgewiesen werden, während in den Füßen der PAR<sub>2</sub> +/+ Mäuse keine detektierbar waren. Somit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass in Übereinstimmung mit der verstärkten lokalen Schwellungsreaktion und der persistierenden Entzündung in PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen eine deutlich verminderte Fähigkeit zur Elimination der Parasiten besteht. Bis zu 4 Monate nach der Infektion war keine vollständige Elimination der



Parasiten erfolgt. Jedoch muss in Langzeitversuchen weiter untersucht werden, ob die Mäuse nach einer noch längeren Zeit dazu in der Lage sind.

In resistenten Mäusen verläuft die experimentelle Leishmaniasis in Form einer lokalen Infektion. Da sich allerdings auch Parasiten in den drainierenden Lymphknoten nachweisen lassen, wurde im Folgenden auch die Anzahl lebender Leishmanien in dem die Hinterpfote drainierenden Popliteallymphknoten analysiert (Abbildung 6).



**Abbildung 6.** Anzahl der lebenden *L. major* Parasiten in den Lymphknoten von  $PAR_2$  +/+ und  $PAR_2$  -/- Mäusen 60 Tage nach der Infektion. Die Quadrate entsprechen der Parasitenanzahl pro Lymphknoten in einer individuellen Maus. Der Stern kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen  $PAR_2$  +/+ und  $PAR_2$  -/- Mäusen.  $p < 0.001$  Wilcoxon Test für unverbundene Stichproben.

In den lokalen Lymphknoten zeigte sich ein ähnliches Bild wie in den Füßen. Es fiel auf, dass die Lymphknoten in den PAR<sub>2</sub> +/+ Tieren ein ca. 3 x größeres Volumen als die Lymphknoten von PAR<sub>2</sub> -/- Mäuse hatten. Dieser Größenunterschied korrelierte statistisch signifikant mit der detektierten Parasitenanzahl: bei 4 von 5 PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen ließen sich keine lebenden Parasiten mehr nachweisen, während bei den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen in jedem der 6 Tiere eine hohe Anzahl lebender Leishmanien im lokalen Lymphknoten detektiert werden konnte. Die Unterschiede in der Parasitenanzahl zwischen den PAR<sub>2</sub> +/+ und den PAR<sub>2</sub> -/- Tieren waren ebenfalls statistisch hoch signifikant. Zusammenfassend bestätigte sich die deutlich verminderte Fähigkeit der PAR -/- Mäuse zur Elimination von *L. major*.

In genetisch resistenten Mäusen bleibt die Infektion mit *L. major* auf die Haut und die lokalen Lymphknoten beschränkt. Hingegen ist ein entscheidendes Kriterium der Suszeptibilität, dass es zu einer Generalisation der Erreger in den betroffenen Mäusen kommt. Daher wurde auch die Anzahl der lebenden Parasiten in den Milzen der PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäuse 60 Tage nach der Infektion durch LDA bestimmt. Wie erwartet, konnten dabei bei keiner PAR<sub>2</sub> +/+ Maus lebende Parasiten in der Milz nachgewiesen werden (Abbildung 7). Im Gegensatz dazu ließen sich aus den Homogenaten der Milzen von 2 der 5 PAR<sub>2</sub> -/- Mäuse lebende Parasiten kultivieren.

Dieser Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz, ist aber dennoch bedeutsam, da sich bei Mäusen auf dem C57Bl/6-Hintergrund (wie den PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen) zu diesem Zeitpunkt der Infektion nie Parasiten in viszeralen Organen nachweisen lassen. Um das Ausmaß der Viszeralisierung zu bestimmen, wurden zusätzlich auch zur Untersuchungen auf Parasiten, Knochenmark und Leber kultiviert. Hier ließen sich weder bei den PAR<sub>2</sub> +/+ noch bei den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen lebende Parasiten nachweisen.

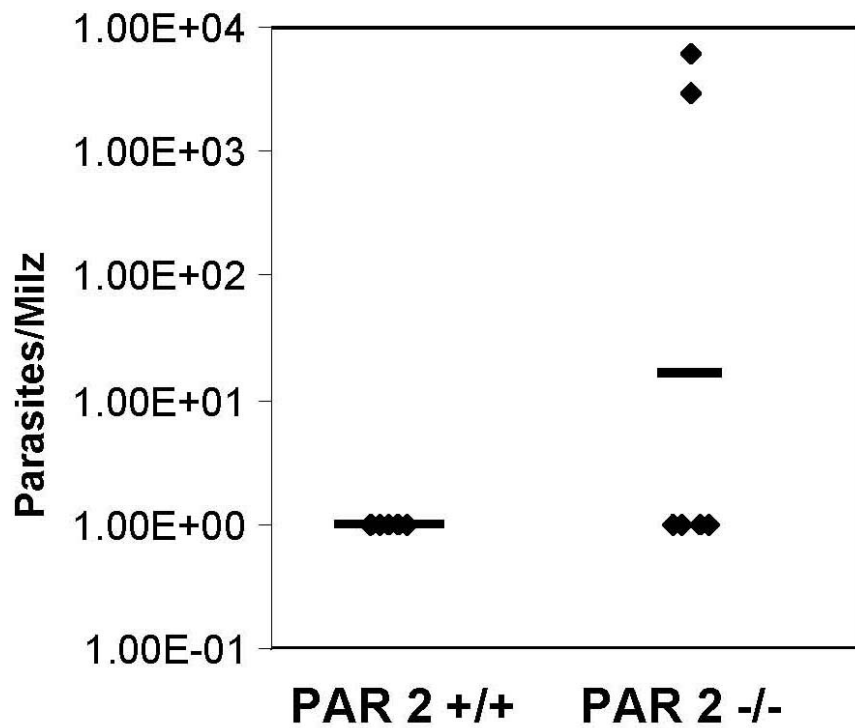


Abbildung 7. Anzahl der lebenden *L. major* Parasiten in den Milzen von PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen 60 Tage nach der Infektion. Die Diamanten entsprechen der Parasitenanzahl pro Milz in einer individuellen Maus.

#### 4.4 Zytokinsekretion

Es konnte weiter gezeigt werden, dass die PAR<sub>2</sub> <sup>-/-</sup> Mäuse eine verstärkte entzündliche Reaktion im Verlauf der experimentellen Leishmaniasis aufweisen. Dies korrelierte positiv mit einer deutlich eingeschränkten Fähigkeit dieser Mäuse, die Parasiten zu eliminieren.

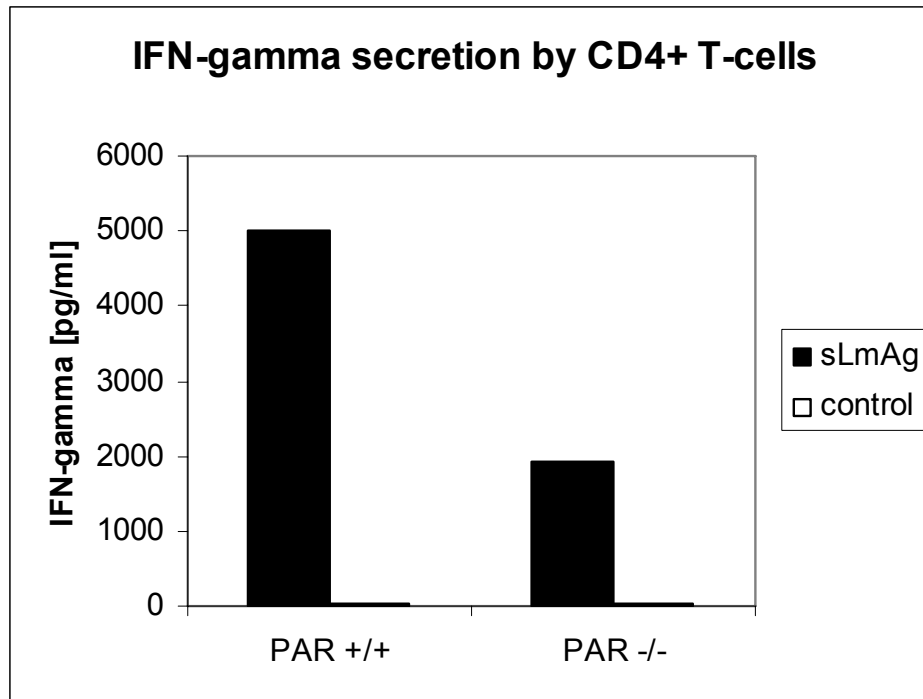
Von fundamentaler Bedeutung für die Eliminierung der Parasiten ist eine Aktivierung der Makrophagen durch Th1 - Zellen [11, 43]. Sie sekretieren Interferon (IFN $\gamma$ ) und TNF $\alpha$ , wodurch die Makrophagen zur Produktion des leishmaniziden NO aktiviert werden.

In suszeptiblen Mäusen kommt es im Gegensatz dazu zu einer Vermehrung L. major-spezifischer Th2-Zellen, die u.a. Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10 und IL-13 sezernieren. Dadurch wird eine Th1-Antwort gehemmt und Makrophagen deaktiviert. Aus diesem Grunde wurde der Typ der Th-Antwort auf die Leishmanien durch Analyse des Zytokinmuster (IL4 und IFN $\gamma$ ) bestimmt. Hierfür wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den Milzen der 6 Wochen infizierten Tiere isoliert und *in vitro* mit Leishmania-Antigen beladenen dendritischen Zellen kokultiviert (siehe Material und Methoden). Die sekretierten Zytokine im Überstand wurden durch CBA Assay bestimmt.

Es zeigte sich dabei in den PAR<sub>2</sub> <sup>-/-</sup> Mäusen eine geringere Antigen spezifische Sekretion von IFN $\gamma$  (Abbildung 8) und eine höhere Antigen spezifische Sekretion von IL4 (Abbildung 9). Bedeutsam zur Beurteilung der Frage, ob eine Th1- oder Th2-Antwort vorliegt, ist dabei das Verhältnis von Antigen spezifisch sekretierten IFN $\gamma$  zu sekretiertem IL4. Zum Vergleich erfolgte hier auch eine Analyse des Zytokinsekretionsmusters in Balb/c-Mäusen, von denen bekannt ist, dass sie mit einer Th2-Antwort reagieren. Hierfür wurden die Mittelwerte des Quotienten aus drei unabhängigen Versuchen gebildet.

Dabei zeigt sich in den PAR<sub>2</sub> <sup>+/+</sup> Mäusen wie erwartet ein hoher Wert für den IFN $\gamma$  / IL4 Quotienten. In den PAR<sub>2</sub> <sup>-/-</sup> Tieren liegt dieser Quotient zwar noch höher als bei den Balb/c-Mäusen, die eine komplette Th2-Antwort zeigen, er ist aber gegenüber den PAR<sub>2</sub> <sup>+/+</sup> Mäusen sehr deutlich reduziert. Der Unterschied

zwischen PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen ist statistisch hoch signifikant (Abbildung 10).



**Abbildung 8.** IFN $\gamma$  Sekretion von isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit *L. major* Antigen beladenen dendritischen Zellen.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus den Milzen 6 Wochen infizierter Mäuse isoliert und anschließend 5 Tage mit *L. major* Antigen beladenen dendritischen Zellen inkubiert. Die sekretierten Zytokine wurden mittels CBA Assay bestimmt und die antigenabhängige IFN-Sekretion von PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen dargestellt. Der Versuch wurde 3 x mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

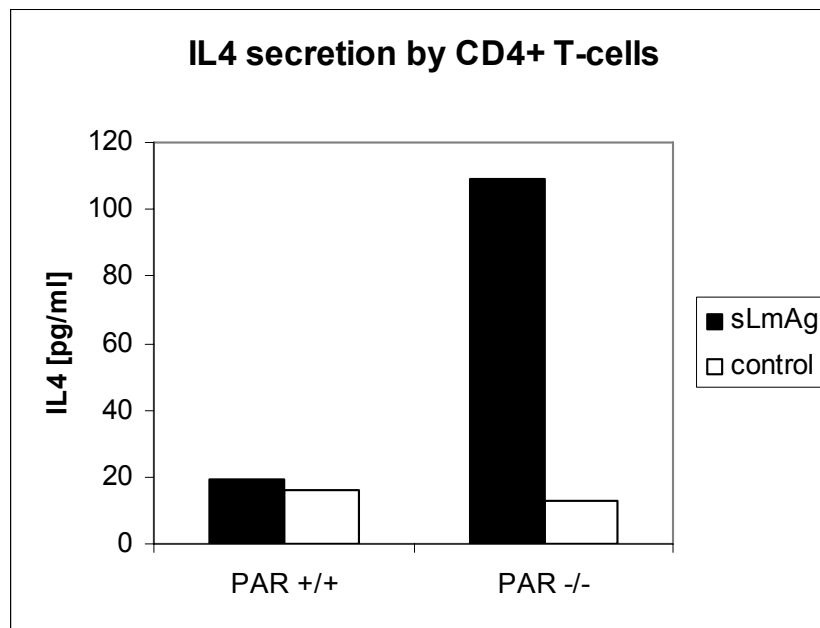


Abbildung 9. IL4 Sekretion von isolierten CD4+ T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit *L. major* Antigen beladenen dendritischen Zellen

CD4+ T-Zellen wurden aus den Milzen 6 Wochen infizierter Mäuse isoliert und anschließend 5 Tage mit *L. major* Antigen beladenen dendritischen Zellen inkubiert. Die sekretierten Zytokine wurden mittels CBA Assay bestimmt und die antigenabhängige IL4 Sekretion von PAR<sub>2</sub> +/+ und PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen wurde dargestellt. Der Versuch wurde 3 x mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

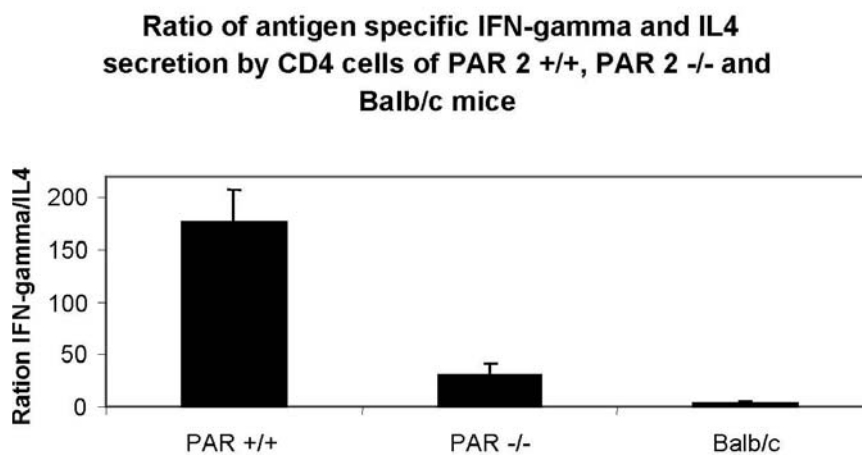


Abbildung 10. Zytokinsekretion von isolierten CD4+ T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit *L. major* Antigen beladenen dendritischen Zellen.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus den Milzen 6 Wochen infizierter Mäuse isoliert und anschließend 5 Tage mit *L. major* Antigen beladenen dendritischen Zellen inkubiert. Die sekretierten Zytokine wurden mittels CBA Assay bestimmt und der Quotient aus IFN $\gamma$  und IL4 dargestellt.

#### 4.5 Expression von PAR<sub>2</sub>-Liganden in der Haut

Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass es in den PAR<sub>2</sub> <sup>-/-</sup> Mäusen zu einer Verschiebung der spezifischen Immunantwort in Richtung eines Th2-Typs kommt, sollte analysiert werden, welche Mechanismen für diesen Effekt verantwortlich sind.

Die Expression eines funktionell aktiven PAR<sub>2</sub> auf Zellen des spezifischen Immunsystems ist bislang nicht beschrieben. Daher erscheint ein Effekt auf Ebene der T-Zellen unwahrscheinlich. Eher erscheint es möglich, dass über den PAR<sub>2</sub>-Rezeptor-Signale vermittelt werden, die während der Initiierung der spezifischen Immunantwort, auf die Zellen des unspezifischen Immunsystems wirken. Von diesen Zellen wie z. B. den Makrophagen ist bekannt, dass sie PAR<sub>2</sub> exprimieren [99].

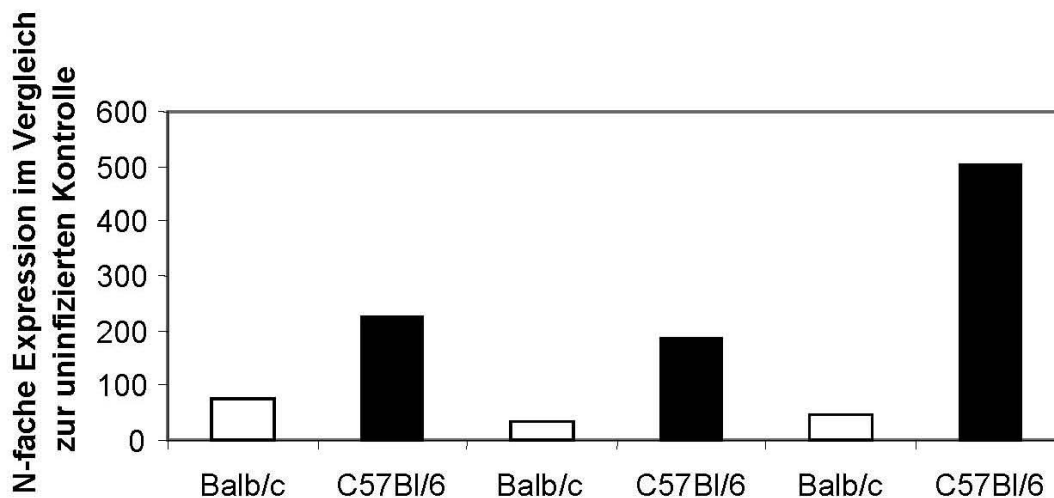
Da die entscheidenden Mechanismen, die den Typ der adaptiven Immunantwort bestimmen, in den ersten Tagen der Infektion wirken, müssen sich aus diesem Grunde die vorliegenden Untersuchungen auf die sehr frühe Phase der Infektion fokussieren.

Es ist bekannt, dass PAR<sub>2</sub> von vielen Zellen in der Haut exprimiert wird [31]. Um dieses näher zu charakterisieren, führten wir zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion (16h) eine genomweite Untersuchung der Genexpression in der Haut mittels sogenannter „Microarray Analyse“ durch. Es dabei konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit Leishmanien zu einer massiven Induktion der mRNA eines Liganden des PAR<sub>2</sub>, dem Gerinnungsfaktor Xa (Faktor Xa) führt. Diese Induktion fiel in genetisch resistenten C57Bl/6-Mäusen deutlich stärker aus, als in den suszeptiblen Balb/c-Mäusen. Aufgrund dieser Daten wurde die Expression des Gerinnungsfaktors X in der Haut mithilfe der „Real-Time“ PCR untersucht, um die Daten der „Microarray-Analyse“ zu bestätigen.

Hierbei konnte eindeutig bestätigt werden, dass es 16h nach der Infektion mit *L. major* zu einer massiven Induktion der mRNA des Gerinnungsfaktors Xa (F. Xa) kommt (Abbildung 11).

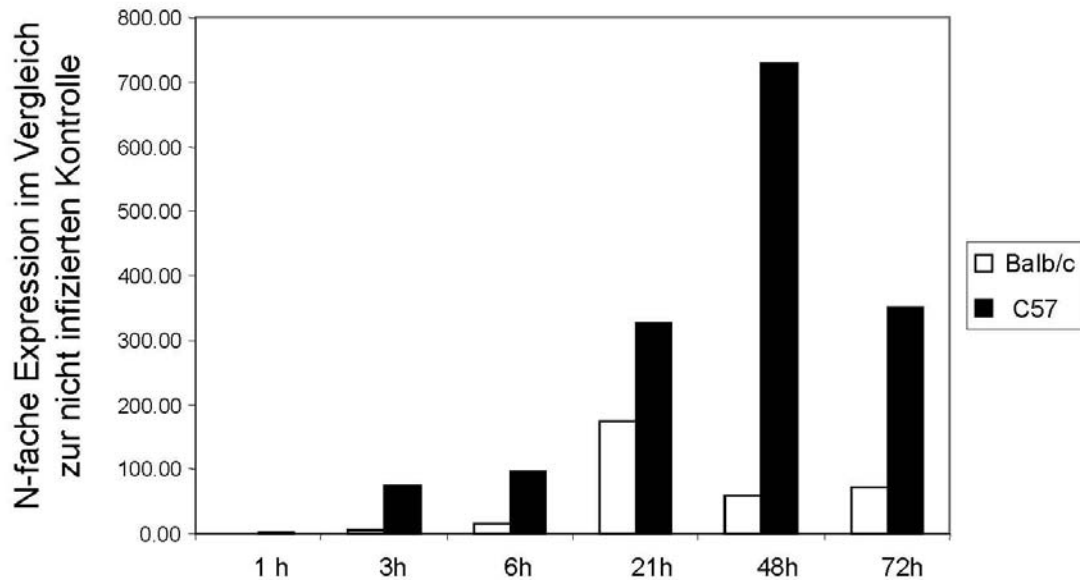
In der infizierten Haut konnten dabei bis zu 500fach erhöhte Transkriptspiegel von F. Xa detektiert werden. Ebenso ließ sich bestätigen, dass diese Induktion in genetisch resistenten C57Bl/6-Mäusen signifikant stärker ausfällt. Im Durchschnitt kam es in den resistenten C57Bl/6-Mäusen zu einer 5-fach stärkeren Expression des Gerinnungsfaktors X als in den suszeptiblen Balb/c-Mäusen.

Die deutlich stärkere Expression eines Liganden des PAR<sub>2</sub> in der Frühphase der *L. major* Infektion in den C57Bl/6-Mäusen, bei denen es zur Ausbildung einer protektiven Th1 Immunantwort kommt, ist ein weiteres Indiz dafür, dass über den PAR<sub>2</sub>-Effekte vermittelt werden, die eine spezifische Immunantwort über Makrophagen-Aktivierung beeinflussen können.



**Abbildung 11. mRNA Expression des Gerinnungsfaktors X in der Haut von resistenten C57Bl/6 sowie von suszeptiblen Balb/c-Mäusen.** Dargestellt ist die N-fache Expression des Gerinnungsfaktors X im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle. Ausgefüllte Balken: Expression in C57Bl/6-Mäusen, freie Balken: Expression in Balb/c-Mäusen





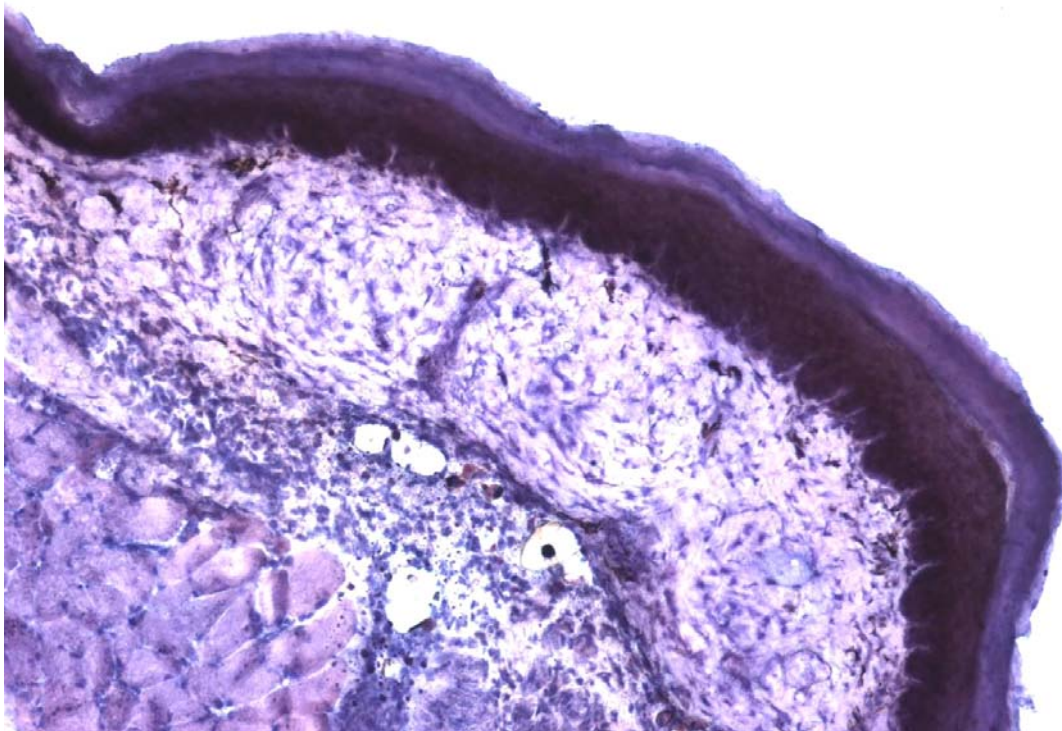
**Abbildung 12.** mRNA Expression des Gerinnungsfaktors X in der Haut von resistenten C57BI/6 sowie von suszeptiblen Balb/c-Mäusen. Dargestellt ist die N-fache Expression des Gerinnungsfaktors X im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle.

Die Mechanismen, die für die T-Helfer-Zell-Differenzierung von Bedeutung sind, wirken in den ersten Tagen der Infektion. Es wurde daher der zeitliche Verlauf der mRNA Expression des Gerinnungsfaktors X in der Haut von C57BI/6 und Balb/c-Mäusen untersucht (Abbildung 12). Dabei zeigte sich, dass es bereits 3 Stunden nach der Infektion bei den resistenten Mäusen zu einer deutlichen Induktion der mRNA des Gerinnungsfaktors X kommt. Die Expression steigt dabei bis zu 48 Stunden nach der Infektion deutlich an, wobei sich zu jedem Zeitpunkt eine deutlich stärkere Expression in den C57BI/6-Mäusen nachweisen lässt. Am 3. Tag nach der Infektion gehen die Transkriptspiegel des Gerinnungsfaktors X wieder zurück.

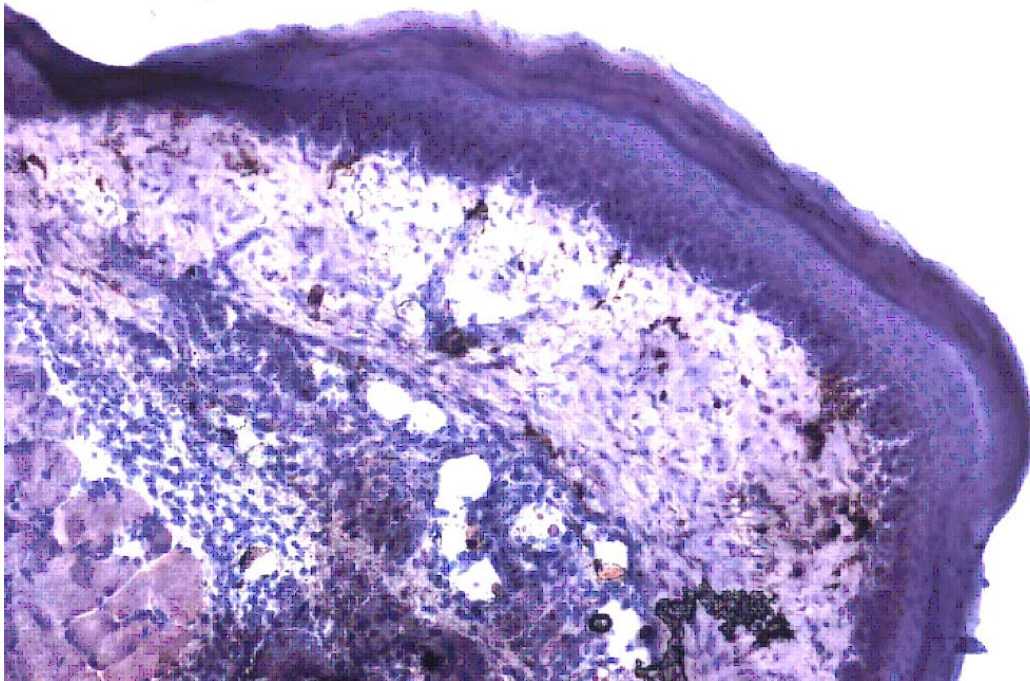
Es konnte gezeigt werden, dass am Ort der Infektion in den ersten 3 Tagen ein Ligand des PAR<sub>2</sub> exprimiert wird. Es sollte daher als Nächstes geklärt werden, welche Zelltypen in der infizierten Haut den Gerinnungsfaktor X exprimieren.

Um diese Frage zu beantworten, wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer *in vitro* transkribierten Gerinnungsfaktor X mRNA Sonde durchgeführt.

Dabei konnte mRNA des Gerinnungsfaktors X in den basalen und suprabasalen Keratinozyten der Epidermis nachgewiesen werden (Abbildung 13, Abbildung 14).



**Abbildung 13.** *In situ* Hybridisierungsnachweis der mRNA Expression des Gerinnungsfaktors X in der Haut von C57Bl/6-Mäusen 16h nach der *L. major* Infektion. Dargestellt ist das Signal welches mit der „antisense“ Sonde erhalten wurde. Es zeigt sich eine dunkelviolette Färbung in den basalen und suprabasalen Keratinozyten.



**Abbildung 14.** *In situ* Hybridisierungsnachweis der mRNA Expression des Gerinnungsfaktors X in der Haut von C57Bl/6-Mäusen 16h nach der *L. major* Infektion. Dargestellt ist das Signal welches mit der „sense“ Sonde erhalten wurde.

#### 4.6 Wirkung von PAR<sub>2</sub>-Liganden auf Makrophagenfunktionen

Es konnte gezeigt werden, dass es in den ersten Stunden nach einer Infektion mit *L. major* zu einer Expression eines Liganden des PAR<sub>2</sub>-Rezeptors in der infizierten Haut kommt. Es wurde durch *in situ* Hybridisierung dargestellt, dass dieser Ligand in den Keratinozyten produziert wird.

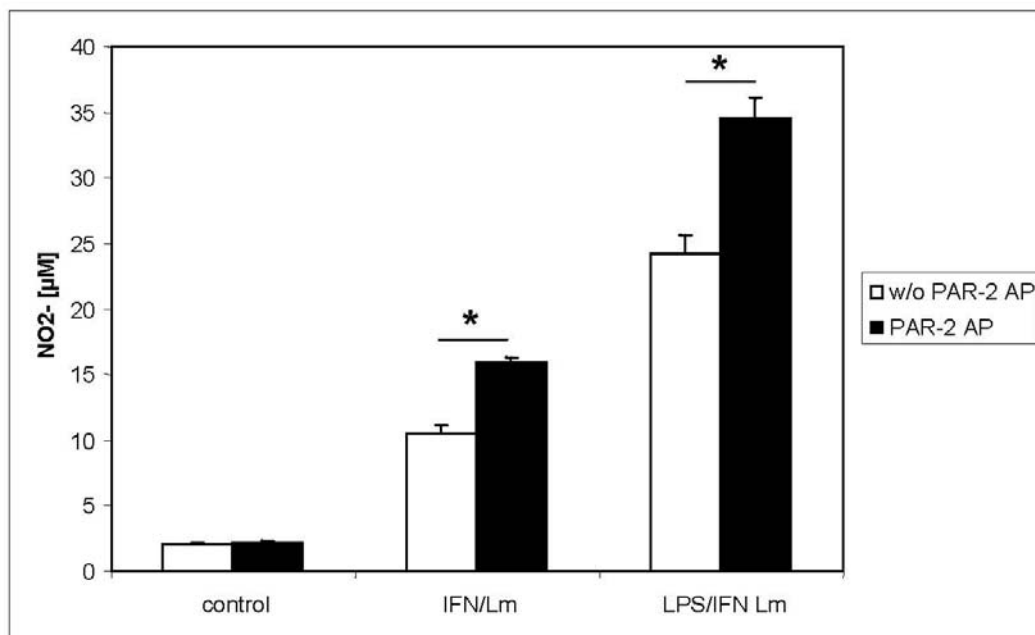
Die Abwesenheit des PAR<sub>2</sub> führt in der *L. major* Infektion zu einer Th<sub>2</sub>-Differenzierung. Da die Th-Zellen nicht über einen funktionellen PAR<sub>2</sub>-Rezeptor verfügen, müssen andere Zelltypen an der Vermittlung der PAR<sub>2</sub>-Wirkung beteiligt sein. Die dendritischen Zellen wandern bei der Infektion aus dem Gewebe aus und treten im Lymphknoten in direkte Wechselwirkung mit den Th-Zellen. Sie wären also hervorragend geeignet, um Signale aus dem infizierten Gewebe

an die T-Zellen zu übermitteln. Es konnte jedoch von mehreren Gruppen übereinstimmend gezeigt werden, dass reife dendritische Zellen nicht über einen funktionellen PAR<sub>2</sub>-Rezeptor verfügen.

Im Gegensatz dazu exprimieren Makrophagen PAR<sub>2</sub>-Rezeptoren und stellen darüber hinaus auch den Zelltyp dar, welcher initial *L. major* Parasiten phagozytiert. Damit erscheint eine Wirkung der PAR<sub>2</sub> Liganden auf die dermalen Makrophagen wahrscheinlich. Das wichtigste Effektormolekül, durch das die Makrophagen *L. major* abtöten können, ist dabei Stickstoffmonoxid (NO), das zusätzlich auch in der Lage ist, die Th-Differenzierung zu beeinflussen. Daher wurde die Sekretion von NO in An- und Abwesenheit von einem synthetischen Liganden des PAR<sub>2</sub> in Makrophagen analysiert (Abbildung 15).

Es konnte gezeigt werden, dass es durch Zugabe des PAR<sub>2</sub>-Liganden zu einer erhöhten NO-Freisetzung kommt, wobei jedoch zumindest ein weiterer Stimulus vorhanden sein muss.

Ein möglicher Mechanismus, bei dem die Infektion mit *L. major* zu einer Expression von PAR<sub>2</sub>-Liganden in der Epidermis führt, kann somit vorgeschlagen werden. Durch ihn kann es zu einer Freisetzung von NO in den Makrophagen, die *L. major* phagozytieren, kommen. Dieses NO kann dann die Th1-Differenzierung fördern und so zur Resistenz gegenüber dem Erreger beitragen.



**Abbildung 15. NO-Produktion von Knochenmarksmakrophagen.** Die Produktion von NO nach Stimulation mit den angegebenen Substanzen wurde mittels Griess'schem Reagenz gemessen.

## 5 DISKUSSION

Die Infektion suszeptibler und resistenter Mausstämme mit *L. major* (experimentelle Leishmaniasis) ist eine Modellerkrankung und dient der Untersuchung einer angeborenen Resistenz und der Entwicklung einer Th2- oder Th1-Antwort [90]. Zusätzlich hat sie zur Entdeckung mehrerer, insbesondere für chronische Entzündungen wichtiger Pathomechanismen geführt.

Die Infektion verläuft bei den meisten Mausstämmen (z. B. C57/BL6 oder C3H) in Form einer limitierten Erkrankung, die auf die Haut und lokale Lymphknoten beschränkt ist. Im Gegensatz dazu kommt es bei Balb/c-Mäusen zu einer tödlichen Ausbreitung der Parasiten.

Die Resistenz gegenüber *L. major*, ist an die Entwicklung *L. major*-spezifischer Th1 (CD4+) und - bei initial niedriger Parasitenzahl - auch Tc1 (CD8+) Zellen [90] gekoppelt. Sie aktivieren durch Freisetzung von Interferon (IFN) $\gamma$  die Makrophagen zur Produktion des leishmaniziden Stickstoff-Monoxids.

In suszeptiblen Mäusen hingegen kommt es zu einer Vermehrung *L. major*-spezifischer Th2-Zellen, die u.a. IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 sezernieren. Dadurch wird eine Th1 Antwort gehemmt und Makrophagen spezifisch und effektiv deaktiviert. Allerdings bleibt zu kommentieren, dass an der Ausbildung einer Th1- oder einer Th2-Antwort mehrere Faktoren beteiligt sind, die noch nicht vollständig verstanden sind [104].

In den letzten 20 Jahren sind wichtige Schritte aufgeklärt worden, insbesondere was die Interaktionen zwischen Antigen präsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen betrifft. Maßgeblich sind letztendlich das lokale Zytokinmilieu (v.a. ein Überwiegen von IL12 für die Th1 Antwort) und kostimulatorische Signale (CTLA 4) bei der Th2 Antwort beteiligt. Die Wirkung mancher Zytokine wie z. B. IL-4 hängt hierbei vom Zeitpunkt ihres Auftretens ab. Über eine Stimulation der IL-12 Sekretion dendritischer Zellen (DC) wirkt es früh nach der Infektion Th1 induzierend, während es zu späteren Zeitpunkten eine Th1 Antwort unterdrückt

[10]. In einigen entscheidenden Punkten ist jedoch noch nicht geklärt, wie es im Einzelnen zu einem Th-1 oder einem Th2-fördernden Milieu kommt.

Sicher ist, dass die entscheidenden Mechanismen am ehesten in den ersten beiden Tagen nach Beginn der Infektion zum Tragen kommen. Dies ist der Zeitraum, in dem durch immunmodulierende Substanzen eine Umkehr des Infektionsverlaufes erreicht werden kann [90, 110]. Aufgrund dieser Tatsache rückt zunehmend die instruktive Rolle des initial aktivierten, unspezifischen Abwehrsystems auf die T-Zell-Differenzierung in den Blickpunkt.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass neben Zyto- und Chemokinen auch Proteinasen eine entscheidende Komponente dieses unspezifischen Abwehrsystems darstellen können. Ihre Wirkung wird dabei über Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelt. Insbesondere stellt PAR<sub>2</sub> einen wichtigen Mediator proinflammatorischer Signale im Rahmen von kutanen Entzündungsreaktionen dar [14, 64, 96, 103, 105].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Bedeutung des PAR<sub>2</sub> für den Verlauf der experimentellen Leishmaniasis zu analysieren. Dazu wurde der Infektionsverlauf vergleichend in PAR<sub>2</sub> *+/+* und PAR<sub>2</sub> *-/-* Mäusen analysiert.

### **5.1 Infektionsverlauf in PAR<sub>2</sub> *+/+* und PAR<sub>2</sub> *-/-* Mäusen**

Der Infektionsverlauf wurde durch wöchentliche Messung der Fußschwellung nach subkutaner Injektion von *L. major* in die Hinterpfote der Mäuse analysiert. Es zeigte sich eine deutlich stärkere kutane Entzündungsreaktion in den PAR<sub>2</sub> *-/-* Mäusen auf dem genetisch resistenten C57Bl/6 Hintergrund. Eine deutlich stärkere Fußschwellung korreliert in der experimentellen Leishmaniasis üblicherweise auch mit einer deutlich höheren Anzahl lebender Parasiten im entzündeten Gewebe [90]. Dies kann als Ausdruck einer geringer ausgebildeten Fähigkeit der Tiere zur Elimination der Parasiten angesehen werden. Es gibt jedoch auch Beispiele, in denen die lokale Entzündungsreaktion und die Parasiteneliminierung nicht unbedingt positiv korrelieren, wie im Fall der Mäuse, die eine genetische Depletion des für die Granulozytenextravasation wichtigen Adhäsionsmoleküls CD18 tragen [94].

Da der PAR2-Rezeptor auch auf dermalen Gefäßen exprimiert wird [103] kann nicht ausgeschlossen werden, dass die stärkere Schwellungsreaktion durch eine veränderte Permeabilität der kutanen Blutgefäße bedingt ist. Die Anzahl der lebenden Parasiten im entzündeten Gewebe wurde daher mittels der limitierten Verdünnungsanalyse bestimmt, wobei hier die stärkere kutane Entzündungsreaktion sehr gut mit einer um mehrere Zehnerpotenzen höheren Anzahl vitaler Leishmanien korrelierte. Daraus kann geschlossen werden, dass die stärkere entzündliche Reaktion in den PAR<sub>2</sub> -/-Mäusen am ehesten durch die höhere Parasitenanzahl und nicht durch eine vaskuläre Wirkung von PAR<sub>2</sub> vermittelt wird.

Die Abwesenheit des PAR2-Rezeptors im nicht-infektiösen kutanen Entzündungsmodell der allergischen Kontaktdermatitis führte zu einer geringeren Plasmaextravasation und einer geringeren entzündlichen Reaktion [96]. Auch dies spricht gegen eine über den kompletten Verlauf der Reaktion relevante vaskuläre Wirkung des PAR<sub>2</sub> bei der *L. major* Infektion. In den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen fand sich somit eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit der Mäuse zur Parasiteneliminierung.

Um grundsätzlich einen transienten Effekt auszuschließen, wurden in Kontrollversuchen einige Tiere nach der Infektion über mehrere Monate beobachtet. Tatsächlich zeigte sich auch zu diesen sehr späten Beobachtungszeitpunkten immer noch eine entzündliche Schwellung der Füße, verbunden mit einer weiterhin hohen Anzahl lebender Parasiten. Bei Fehlen des PAR<sub>2</sub> sind die Mäuse also nicht mehr in der Lage, die Parasiten zu eliminieren.

Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass es in den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen vereinzelt auch zu einer Disseminierung der Leishmanien in die Milz kommt. Somit können diese Mäuse auch nicht mehr die Infektion auf die Haut und die lokalen Lymphknoten begrenzen, wie dies normalerweise in allen genetisch resistenten Tieren der Fall ist [47, 90].

Eine Viszeralisierung ist typisch für genetisch suszeptible Tiere wie die Balb/c-Mäuse. In diesen Mäusen unterbleibt eine Aktivierung der infizierten Makrophagen durch IFN $\gamma$ , da es zu einer Differenzierung von IL4 produzierenden Th2



Zellen kommt [20, 41]. Die fehlende Aktivierung der Makrophagen führt zu einer generalisierten Infektion. Dabei finden sich bei den suszeptiblen Balb/c-Mäusen im Gegensatz zu resistenten Mäusen, bereits wenige Stunden nach der Infektion, Parasiten in den inneren Organen [47]. Die Unfähigkeit der Mäuse zur Begrenzung der Infektion könnte eventuell nicht nur Folge sondern auch Ursache der veränderten spezifischen Immunantwort sein.

Zusammengefasst ähnelt der Infektionsverlauf in PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen dem der suszeptiblen Balb/c-Mäuse. Es kommt allerdings nicht zu einer progressiven und in einer Ulzeration mündenden Schwellung der infizierten Füße, sondern zu einer chronisch stabilen Entzündung. Außerdem entsteht nur in einigen Mäusen eine Viszeralisierung der Parasiten. Diese nimmt aber dann auch nicht das Ausmaß wie bei den Balb/c-Mäusen an, bei denen sich sehr viele Parasiten in nahezu allen inneren Organen finden lassen. Dennoch findet sich ein qualitativ anderer Infektionsverlauf als in resistenten Mäusen, bei denen die Entzündung immer abheilt und es nie zu einer Viszeralisierung kommt.

## **5.2 Analyse der Mechanismen, die für den unterschiedlichen Infektionsverlauf in den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen verantwortlich sind.**

Von Bedeutung für die Resistenz gegen Leishmanien sind viele Zelltypen sowohl des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystems [2, 42, 48, 59, 62, 69, 97, 107, 110, 113, 115, 116, 118]. Dabei sind die Makrophagen und mehr noch die Th1 Zellen von übergeordneter Bedeutung. Makrophagen stellen die einzigen Zellen dar, in der die Leishmanien zu proliferieren vermögen und längere Zeit intrazellulär beherbergt werden [11, 28].

Um die Parasiten endgültig zu eliminieren, muss in den Makrophagen das leishmanizide Stickstoffmonoxid (NO) induziert werden, das die Parasiten, die in den Phagolysosomen überleben und proliferieren, abtöten kann [106, 118]. Die Induktion von NO kann in der Frühphase der Infektion durch sogenannte natürliche Killerzellen erfolgen [47, 69]. Für eine effektive Elimination ist aber von Th1-Zellen gebildetes IFN $\gamma$  zwingend erforderlich [108, 117]. Die übergeordnete Bedeutung der Th1-Zellen kommt in den suszeptiblen Balb/c-

Mäusen zum Ausdruck, indem eine fehlgeleitete Differenzierung der Th-Zellen in einen Th2-Subtyp stattfindet und es aufgrund der ausbleibenden Makrophagenaktivierung schließlich zum fatalen Infektionsverlauf kommt. Ebenso konnte dabei auch eindeutig gezeigt werden, dass eine effektive Stimulation der Makrophagen durch Th1-Zellen auch in genetisch suszeptiblen Mäusen zu einem resistenten Phänotyp führt [20, 41, 93, 95, 116].

Aufgrund der herausragenden Bedeutung der Th-Zellen für den Verlauf der Leishmaniasis wurde zunächst der Typ der *L. major* spezifischen T-Zell Antwort bestimmt. Dazu wurden aus infizierten Tieren CD4 positive T-Zellen isoliert und *in vitro* mit *L. major* Antigen beladenen dendritischen Zellen restimuliert. Anschließend wurde die *L. major* abhängige Zytokinproduktion im Überstand bestimmt. In Übereinstimmung mit dieser deutlich herabgesetzten Resistenz konnte gezeigt werden, dass Th-Zellen, die aus infizierten PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen isoliert wurden, im Gegensatz zu denen aus PAR<sub>2</sub> +/+ Mäusen, eine verminderte antigenspezifische Sekretion von IFN $\gamma$  zeigen bei deutlich verstärkter Sekretion von IL-4.

Um die Ausrichtung der Th-Zell- Differenzierung zu bewerten, ist dabei das Verhältnis dieser beiden Zytokine wichtiger als die absolut produzierten Mengen, da auch in Mäusen, die eine Th2-Zell-Antwort zeigen, mehr IFN $\gamma$  als IL4 produziert wird. Ein deutlicher Unterschied besteht aber im Quotienten aus Antigen spezifischer IFN $\gamma$  / IL4 Sekretion. Dieser liegt bei einer Th2-Antwort bei ca. 2-5 und bei der Th1-Antwort > 100 [116]. Bei den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen zeigt sich ein Zytokinmuster, das eher den suszeptiblen Balb/c-Mäusen als den resistenten C57Bl/6-Mäusen entspricht. Allerdings findet sich in Balb/c-Mäusen ein noch niedrigeres Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 Sekretion. In den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen findet also eine deutliche Verschiebung der Th-Differenzierung in Richtung einer Th2 Antwort statt, ohne das Ausmaß der prototypisch suszeptiblen Balb/c-Mäuse zu erreichen. Diese Befunde sind in sehr guter Übereinstimmung mit dem beobachteten Verlauf der Infektion in den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen zu sehen, da es nicht wie bei den resistenten C57Bl/6-Mäusen zur Ausheilung kommt, jedoch auch nicht zu so einer rapide progressiven Form, wie sie in den Balb/c-Mäusen beobachtet wird.

Aufgrund der übergeordneten Bedeutung der Th-Zellen für die Resistenz gegenüber *L. major* ist zu vermuten, dass die beobachtete Störung der Th1-Differenzierung in den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen auch die Hauptursache für diesen veränderten Infektionsverlauf darstellt. Durch die Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th2 steht weniger IFN $\gamma$  für die Aktivierung der die Leishmanien enthaltenden Makrophagen zur Verfügung. Gleichzeitig aber führt das vermehrt gebildete IL4 zu einer Deaktivierung bzw. zu einer alternativen Aktivierung der Makrophagen [1, 38, 67]. Letztlich resultiert daraus eine verminderte Fähigkeit der Makrophagen, den intrazellulären Parasiten zu eliminieren. Da Makrophagen jedoch auch einen funktionellen PAR2-Rezeptor exprimieren [23, 44, 77], kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, dass durch ihn zusätzlich auch ein direkter Einfluss auf die Makrophagenfunktion besteht.

Es wurde daher im Folgenden untersucht, ob PAR<sub>2</sub> Liganden die Produktion des für die Elimination der Leishmanien unabdingbaren NO beeinflussen können. Dass die Produktion von NO in Gegenwart zumindest eines zusätzlichen Stimulus wie LPS und IFN $\gamma$  gesteigert ist, während die NO-Produktion in unstimulierten Makrophagen nicht beeinflusst wird, konnte gezeigt werden. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Daten von Noorbakhsh et al. Es konnte dargestellt werden, dass PAR<sub>2</sub> Liganden die mRNA des für die NO-Produktion entscheidenden Enzyms NO-Synthetase in murinen Makrophagen induzieren [77].

Demzufolge wirkt eine Ligation des PAR2-Rezeptors unterstützend auf die klassische Aktivierung der Makrophagen durch IFN $\gamma$  oder LPS [38, 67], während die Gegenwart von PAR<sub>2</sub>-Liganden alleine nicht ausreicht, um Makrophagen zu aktivieren. Daher kann vermutet werden, dass zusätzlich zu einer Beeinflussung der Th-Zell-Differenzierung, auch eine geringere Koaktivierung der Makrophagen durch PAR<sub>2</sub> Agonisten, zu der herabgesetzten Fähigkeit der Parasitenelimination beiträgt. Dies kann aber nicht die alleinige Ursache für die beobachteten Effekte sein, da eine PAR<sub>2</sub> Ligation nur die NO-Produktion in bereits aktivierten Makrophagen beeinflusst.

Zusammenfassend findet sich ein Effekt auf die Th-Zell-Differenzierung in den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen und zusätzlich *in vitro* eine Förderung der klassischen Makrophagen Aktivierung durch PAR<sub>2</sub> Liganden. Diese beiden Effekte resultieren eindeutig in einer geringeren Aktivierung der Makrophagen bei *L. major* infizierten PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen. Dies hat eine deutlich abgeschwächte Parasitenelimination zur Folge.

### **5.3 Mögliche Mechanismen, die für die geänderte Th-Zell-Differenzierung in PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen bei *L. major* Infektion verantwortlich sein können**

Die entscheidenden Mechanismen, die auf die Th-Zell-Differenzierung in der experimentellen Leishmaniasis einwirken, setzen sehr schnell nach Beginn der Infektion ein. Es konnte gezeigt werden, dass eine Beeinflussung des Infektionsverlaufes mit den meisten immunmodulierenden Substanzen nur innerhalb der ersten Infektionswoche möglich ist, wobei vermutlich die ersten zwei Tage nach der Infektion am bedeutendsten sind [10, 20, 40, 52, 109].

Inwieweit T-Zellen direkt über den PAR<sub>2</sub> beeinflusst werden können, ist umstritten. Während im humanen System kein funktioneller PAR<sub>2</sub> auf T-Zellen nachgewiesen werden konnte [44, 77], existieren Berichte über direkte Effekte der Ligation des PAR<sub>2</sub> auf T-Zellen [36, 98] im murinen System. Dies führt allerdings eher zu einem antiinflammatorischen bzw. Th2-Phänotyp, der im Gegensatz steht zu der hier beschriebenen Th2-Induktion in Abwesenheit des Rezeptors.

Insgesamt erscheint bei dieser Datenlage ein direkter Effekt des PAR<sub>2</sub> auf die Th-Zell-Differenzierung in der experimentellen Leishmaniasis eher unwahrscheinlich. Daher ist zu vermuten, dass die Abwesenheit des PAR<sub>2</sub> auf anderen Zelltypen in den ersten Tagen der Infektion für die veränderte Th-Zell-Differenzierung verantwortlich ist.

Die wichtigsten Zellen, die die Th-Zell-Differenzierung in der experimentellen Leishmaniasis beeinflussen, stellen dabei die dendritischen Zellen (DCs) dar.

Sie präsentieren das Antigen in den lokalen Lymphknoten direkt an Th-Zellen und können so unmittelbar auf die Th-Zell-Funktion einwirken [10, 62, 63].

Einige Arbeitsgruppen berichten über einen Einfluss von PAR<sub>2</sub> Liganden auf die Reifung humaner dendritischer Zellen aus isolierten Monozyten [27] und eine verzögerte Reifung in PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen *in vitro* [34]. Allerdings führte die Anwesenheit zusätzlicher entzündlicher Stimuli zu einer vollständigen Funktionsfähigkeit muriner dendritischer Zellen [34]. Zusätzlich wird übereinstimmend berichtet, dass reife dendritische Zellen nicht mehr über einen funktionellen PAR<sub>2</sub> verfügen.

Daher erscheint ein direkter Effekt des PAR<sub>2</sub> auf die dendritischen Zellen in der Infektion mit *L. major* ebenfalls eher unwahrscheinlich. Andererseits wurde beschrieben, dass dendritische Zellen in der Lage sind, Signale von anderen Zellen zu detektieren und so die erhaltenden Informationen als sogenanntes drittes Signal an Th-Zellen übermitteln. Dieses dritte Signal, welches neben dem an MHC-Molekülen gebundenen Antigen und den kostimulatorischen Signalen an T-Zellen übermittelt wird, kann z. B. in löslichen Molekülen wie dem Interleukin-12 bestehen und die Ausrichtung der Th-Differenzierung wesentlich beeinflussen [26, 45]. Daher könnten dendritische Zellen sehr gut dazu in der Lage sein, die in der Frühphase der Infektion durch die Abwesenheit des PAR<sub>2</sub> veränderten Signale in der infizierten Haut an die T-Zellen im Lymphknoten zu übermitteln und somit eine „Übersetzung“ des entzündlichen Gewebesignals in die „Sprache“ der T-Zellen vorzunehmen. Die Existenz eines „entzündlichen Gewebesignals“ und dessen entscheidende Bedeutung für die spätere adaptive Immunantwort wird insbesondere von P. Matzinger postuliert [57, 58]. Zusammenfassend erscheint ein direkter Effekt des PAR<sub>2</sub> auf die Th-Zellen und die dendritischen Zellen unwahrscheinlich.

Es ist eher zu vermuten, dass die Abwesenheit des PAR<sub>2</sub> auf anderen, direkt in der Haut vorhandenen Zellen zu einem veränderten initialen entzündlichen Signal führt, das sukzessive durch dendritische Zellen an Th-Zellen weitergegeben wird. Wenn diese Hypothese zutrifft, dann müssen innerhalb der ersten Tage

nach der *L. major* Infektion sowohl Liganden des PAR<sub>2</sub> in der Haut produziert werden, als auch PAR<sub>2</sub> exprimierende Zellen anwesend sein.

Ehrchen et al. konnten im Rahmen einer genomweiten Analyse der kutanen Genexpression 16 h nach Infektion mit *L. major* zeigen, dass in der Tat ein Ligand des PAR<sub>2</sub>, nämlich der Gerinnungsfaktor X [16, 17, 65] in der Haut signifikant hochreguliert wird. Darüber hinaus korrelierte die Expression des Gerinnungsfaktors X mit der Entwicklung einer protektiven Th1 Antwort. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass es durch Infektion mit *L. major* zu einer transienten Expression des Gerinnungsfaktor X in der Haut kommt.

Diese Expression ist zu allen untersuchten Zeitpunkten in resistenten C57Bl/6-Mäusen deutlich stärker als in suszeptiblen Balb/c-Mäusen. Dabei kommt es zu einer über die ersten beiden Tage der Infektion ansteigenden und danach wieder abfallenden mRNA Expression des Gerinnungsfaktors X. Die Expression korreliert demnach sehr gut mit dem Zeitfenster, innerhalb dessen die entscheidenden Mechanismen der Th-Zell-Differenzierung wirksam sind [10, 20, 40, 52, 109]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Gerinnungsfaktor X von basalen und suprabasalen Keratinozyten exprimiert wird.

Im Rahmen der experimentellen Leishmaniasis bleibt zunächst unklar, wie es zur Induktion des Gerinnungsfaktors X in der Epidermis kommt. Eine direkte Interaktion der subkutan applizierten Erreger und der Keratinozyten erscheint unwahrscheinlich, ist aber möglich. Eine Phagozytose von Leishmanien durch Keratinozyten wurde bisher nie beschrieben. In der Initialphase der Infektion kann eine Interaktion der Leishmanien mit den gewebsständigen Makrophagen, sowie mit den sehr schnell infiltrierenden Granulozyten erfolgen. Zusätzlich kann in begrenztem Maße eine Phagozytose der promastigoten Leishmanien durch dendritische Zellen erfolgen.

Die Phagozytose durch Makrophagen und dendritische Zellen führt dabei rasch zur Expression von Immunmodulatoren in diesen Zellen [21], wobei durch diese sekretierten Botenstoffe dann wiederum die Keratinozyten beeinflusst werden

können. Dies kann zur Produktion von weiteren immunologisch wirksamen Molekülen führen.

Physiologisch würde solch eine Interaktion sehr sinnvoll sein, da in der Frühphase der Infektion nur wenige Phagozyten am Ort der Infektion vorhanden sind. Die in großer Anzahl vorhandenen Keratinozyten könnten eine Art zellulären Verstärker darstellen, über den die Immunantwort und Rekrutierung von Monozyten schnell eingeleitet werden könnte. Zusammenfassend ist eine Beeinflussung des Immunsystems durch eine Wechselwirkung zwischen dem Gerinnungsfaktor X und dem PAR<sub>2</sub> auf vielschichtige Art und Weise möglich. Da die Induktion der epidermalen mRNA-Expression des Gerinnungsfaktors X im Rahmen der Infektion sehr stark ist, kann vermutet werden, dass dies auch zur Sekretion großer Mengen des entsprechenden Proteins in der Haut führt. Am wahrscheinlichsten erscheint eine Beeinflussung des lokalen entzündlichen Milieus durch Faktor Xa, da der PAR<sub>2</sub> in der Haut von vielen Zelltypen wie Keratinozyten, Endothelzellen, Mastzellen, Nervenfasern und auch Makrophagen exprimiert [14, 64, 96, 103, 105] wird. Durch Aktivierung des PAR<sub>2</sub> auf diesen Zellen könnte dann die Sekretion von entzündlichen Mediatoren und somit das lokale inflammatorische Milieu beeinflusst werden. Auswirken kann sich dieses lokale Milieu dann auf die kostimulotrische Aktivität sowie die Zytokinproduktion von dendritischen Zellen. So ist ein Einfluss auf die Interaktion der dendritischen Zellen mit den Th-Zellen im lokalen Lymphknoten und die Th-Differenzierung bzw. -Polarisierung in Richtung Th1 oder Th2 möglich. Alternativ ist auch eine direkte Beeinflussung der Th-Zellen im Lymphknoten mittels über die Lymphbahnen in die regionalen Lymphknoten transportierter Mediatoren denkbar. Diese Hypothese bleibt zu überprüfen.

Mögliche Signalketten könnten aufgrund der hier erhobenen Befunde somit folgendermaßen aussehen: In den ersten Stunden der Infektion wird *L. major* von Gewebsmakrophagen und Granulozyten phagozytiert. Durch lösliche Entzündungsmediatoren, die entweder von den Parasiten selbst sekretiert oder von den Makrophagen und Granulozyten produziert werden, kommt es zu einer Induktion des Gerinnungsfaktors X in der Epidermis. Dies führt zu einer Verstärkung des entzündlichen Signals, indem z. B. wie im Rahmen dieser Arbeit

gezeigt, in Makrophagen die NO-Produktion stimuliert wird. Dies ist in guter Übereinstimmung mit früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe um M. Steinhoff, in denen gezeigt wurde, dass die proinflammatorische Wirkung von PAR<sub>2</sub> Agonisten nach Injektion in die Haut über NO vermittelt wird [96]. Das NO könnte dann die Funktion dendritischer Zellen so beeinflussen, dass diese nach Migration in den drainierenden Lymphknoten die Th1-Differenzierung fördern. Dabei könnte initial die Fähigkeit dendritischer Zellen *L. major* zu phagozytieren durch NO gefördert werden [80]. Zusätzlich könnte ein Th1-induzierender dendritischer Zell-Subtyp induziert werden, der höhere Mengen des wichtigsten Th1-induzierenden Zytokins IL-12 produziert [79, 82]. Außerdem wurde beschrieben, dass PAR<sub>2</sub> Agonisten auch die Produktion proinflammatorischer, Th1 induzierender Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 und IL-12 in murinen Makrophagen oder humanen Monozyten fördern [44, 77], was ebenfalls die Generierung eines Th1 induzierenden dendritischen Zell-Subtyps vorantreiben könnte. Zusätzlich kann z. B. das NO in niedrigen Konzentrationen auch direkt auf die Th1-Differenzierung wirken, indem es die Expression des IL-12 Rezeptors auf T-Zellen erhöht [42, 73-75]. Bei den PAR<sub>2</sub> -/- Mäusen fehlen interessanterweise diese initialen, über den PAR<sub>2</sub> vermittelten entzündlichen Signale, die zu einer Inhibition der Th1-Differenzierung und dem beobachteten chronischen Krankheitsverlauf führen könnten.

Dass durch in Keratinozyten produzierte Mediatoren, wie den in dieser Arbeit beschriebenen Gerinnungsfaktor X, prinzipiell die spezifische Immunantwort beeinflusst werden kann, wurde im letzten Jahr durch ZENZ et al [119] an einem murinen Psoriasis-Modell eindrucksvoll gezeigt. Da in Psoriasis-Hautläsionen beim Menschen die Expression der Proteine JunB und c-Jun herunterreguliert wird, wurde ein transgenes Mausmodell entwickelt, in dem beide Proteine selektiv nicht mehr epidermal exprimiert werden können. Dies führte zu einer deutlichen Störung des epidermalen Zytokin-Metabolismus und zur Entwicklung von psoriasiformen Hautläsionen. Interessanterweise entwickelten die transgenen Mäuse auch arthritische Läsionen. Dieser Effekt war T-Zell-abhängig. Somit wurde elegant gezeigt, dass eine Veränderung des epi-



dermalen Metabolismus zur Generierung autoreaktiver T-Zellen führte und somit einen eindeutigen Effekt auf die spezifische Immunantwort hatte [119].

Die im Rahmen dieser Arbeit anhand der experimentellen Leishmaniasis erhaltenen Resultate könnten auch für das bessere Verständnis der Pathogenese nicht infektiöser entzündlicher Dermatosen und der möglichen Funktion des PAR<sub>2</sub> in diesen Erkrankungen bedeutsam sein.

Bei vielen entzündlichen Dermatosen mit weiterhin unklarer Pathogenese, wie bspw. der atopischen Dermatitis und der Psoriasis, liegen gleichzeitig Defekte der Th-Differenzierung und ein gestörter Metabolismus der Haut vor. Generell wird momentan davon ausgegangen, dass der Defekt der spezifischen Immunantwort dabei das primäre pathogenetische Prinzip ist. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sprechen aber dafür, dass auch in der Haut produzierte, initiale entzündliche Botenstoffe (Proteasen wie z. B. F. Xa, Kallikreine, Trypsin etc.) die spezifische Immunantwort über den PAR<sub>2</sub> beeinflussen können.

Dies besitzt große Relevanz für die Entwicklung ursächlicher Therapien. Momentan erfolgt primär eine immunsuppressive Therapie, wobei es nach Absetzen der Therapie meist schnell zu einem Rezidiv kommt. Die Entwicklung von Therapiekonzepten, die mit der Signaltransduktion über den PAR<sub>2</sub> interferieren oder die Expression von PAR<sub>2</sub> Liganden wie dem Gerinnungsfaktor X in der Haut beeinflussen, könnten von entscheidendem Nutzen für die optimierte Behandlung dieser wichtigen Erkrankungen sein. Zunächst jedoch muss überprüft werden, ob die am Mausmodell erhaltenen Resultate, auf den Menschen und auf nicht infektiöse Dermatosen übertragen werden können. Zusammenfassend resultieren aus dieser Arbeit vielfältige Ansätze für weitere Untersuchungen zur Pathogenese und mögliche Therapiekonzepte bei infektiösen, aber auch nicht infektiösen entzündlichen Dermatosen über die Manipulation von Proteasen oder PAR-Rezeptoren [18, 81, 83, 101, 102].

## 6 ABKÜRZUNGSGLOSSAR

~	ungefähr
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
<b>A. bidest.</b>	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
<b>Anti-DIG-Antikörper</b>	Anti-Digoxigenin-Antikörper
<b>APC</b>	Antigenpräsentierende Zellen
<b>Balb/c-Mäuse</b>	Mausstamm
<b>BCIP</b>	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C3b</b>	Komplementfaktor C3b
<b>C57Bl/6</b>	Mausstamm
<b>ca.</b>	circa, ungefähr
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>CL</b>	kutane Leishmaniose
<b>CR3</b>	Komplementrezeptor 3
<b>Ct-Wert</b>	Cycle-threshold-Wert
<b>d</b>	Tag
<b>DC</b>	dentritische Zellen
<b>DCL</b>	diffuse kutane Leishmaniose
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DIG</b>	Digoxigenin
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>et al.</b>	und andere
<b>FX</b>	Stuart-Prower-Faktor, Thrombokinase ,Faktor X
<b>g</b>	phys. Gravitation
<b>GAPDH</b>	Gapdh Glycerol Aldehydphosphat Dehydrogenase (Housekeeping Gen)
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HCL</b>	Salzsäure
<b>iFCS</b>	inaktiviertes fetales Kälberserum

---

<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IgE</b>	Immunglobulin E
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL</b>	Interleukin (4,5,10,12,13)
<b>IP-10</b>	Chemokin vom CXC Typ Nummer 10
<b>ISH</b>	<i>in situ</i> Hybridisierung
<b>Kb</b>	Kilobasen
<b>KC</b>	Chemokin
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>konz.</b>	Konzentration
<b>L. major/ Lm</b>	Leishmania major
<b>LACK</b>	L. major-Antigen (Homolog der aktivierten C-Kinase)
<b>LC</b>	Langerhanszellen
<b>LDA</b>	limitierte Verdünnungsanalyse
<b>Lnull</b>	Ausgangslänge RNA
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>Lux</b>	Beleuchtungsstärke
<b>MCL</b>	mukokutane Leishmaniose
<b>MCP-1</b>	Methyl-akzeptierende Chemotaxis- Proteine
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>MHC</b>	Hapthistokompatibilitätskomplex
<b>MIG</b>	Chemokin
<b>min</b>	Minute
<b>MIP1<math>\alpha</math></b>	Th2 assoziiertes Chemokin
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimol
<b>mol/l</b>	Mol pro Liter
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>N</b>	Chemische Normalität
<b>Na</b>	Natrium
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumphosphat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NBT</b>	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
<b>N-fold</b>	Regulationsfaktor

---

<b>ng/ml</b>	Nanogramm pro Milliliter
<b>NK-Zellen</b>	natürliche Killer-Zellen
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>nt</b>	Nukleotide
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAR</b>	Proteinase-aktivierter Rezeptor
<b>PAR<sub>2</sub></b>	Proteinase-aktivierter Rezeptor-2
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pg/ml</b>	Pikogramm pro Milliliter
<b>pH</b>	potentia hydrogenii
<b>PV</b>	parasitophore Vakuole
<b>QRT-PCR</b>	Quantitative PCR
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (m,mt,t)
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Real Time PCR
<b>S.</b>	Seite
<b>s.</b>	siehe
<b>S100A9</b>	Protein der S100 Familie Nt. A8
<b>SDM</b>	Schneider's Drosophila Medium
<b>sek.</b>	Sekunden
<b>sog.</b>	sogenannt
<b>SSC</b>	sStandard sSaline cCitrat Stammlösung
<b>TAE-Puffer</b>	Tris-Acetat-EDTA Puffer
<b>TCR</b>	T-Zell -Rezeptor
<b>TGF</b>	transforming growth factorTransformierender Wachstumsfaktor
<b>Th1/Th2 Zellen</b>	T- Helfer Zellen
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha
<b>Tris-HCl</b>	Tris-Salzsäure
<b>T-Zelle</b>	T-Lymphozyt
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>U/<math>\mu</math>l</b>	Einheit pro Mikroliter
<b>VL</b>	viszerale Leishmaniose
<b>WHO</b>	world health organisation (Weltgesundheitsorganisation)
<b>z. B.</b>	zum Beispiel

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169:898-905
2. Alleva DG, Kaser SB, Beller DI (1998) Intrinsic defects in macrophage IL-12 production associated with immune dysfunction in the MRL/++ and New Zealand Black/White F1 lupus-prone mice and the *Leishmania major*-susceptible BALB/c strain. *J Immunol* 161:6878-6884
3. Arnoldi J, Moll H (1998) Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Dev Immunol* 6:3-11
4. Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30:1269-1281
5. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman IG, Smith JA (1989) *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
6. Beebe AM, Cua DJ, Coffman RL (1999) Genetic control of T helper subset differentiation in *Leishmania major* infection of mice. *Microbes Infect* 1:89-94
7. Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C (1992) Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol* 52:135-142
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. *J Immunol* 165:969-977
9. Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D (2002) CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168:3992-4000
10. Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gumy A, Egeter O, Sakrauski AK, Seegmuller I, Voigt H, Launois P, Levine AD, Wagner H, Heeg K, Louis JA, Rocken M

- (2001) IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol* 2:1054-1060
11. Bogdan C, Rollinghoff M (1998) The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28:121-134
  12. Bos JD (1997) The skin as an organ of immunity. *Clin Exp Immunol* 107 Suppl 1:3-5
  13. Bos JD, Teunissen MB, Kapsenberg ML (1989) Immunology of contact dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 151:84-87; discussion 106-110
  14. Buddenkotte J, Stroh C, Engels IH, Moormann C, Shpacovitch VM, Seeliger S, Vergnolle N, Vestweber D, Luger TA, Schulze-Osthoff K, Steinhoff M (2005) Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J Invest Dermatol* 124:38-45
  15. Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J (1993) Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 91:500-505
  16. Camerer E, Huang W, Coughlin SR (2000) Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5255-5260
  17. Camerer E, Kataoka H, Kahn M, Lease K, Coughlin SR (2002) Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 277:16081-16087
  18. Cevikbas F, Steinhoff A, Homey B, Steinhoff M (2007) Neuroimmune interactions in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7:365-373
  19. Chang KP (1983) Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Int Rev Cytol Suppl* 14:267-305
  20. Chatelain R, Varkila K, Coffman RL (1992) IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J Immunol* 148:1182-1187
  21. Chaussabel D, Semnani RT, McDowell MA, Sacks D, Sher A, Nutman TB (2003) Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* 102:672-681

22. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
23. Colognato R, Slupsky JR, Jendrach M, Burysek L, Syrovets T, Simmet T (2003) Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood* 102:2645-2652
24. Constant SL, Lee KS, Bottomly K (2000) Site of antigen delivery can influence T cell priming: pulmonary environment promotes preferential Th2-type differentiation. *Eur J Immunol* 30:840-847
25. Coombs RRA, Gell PGH (1963) The classification of allergic reactions underlying disease. In: Gell PGH, Coombs RRA (eds) *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell, London, pp 317-320
26. Corthay A (2006) A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol* 64:93-96
27. Csernok E, Ai M, Gross WL, Wicklein D, Petersen A, Lindner B, Lamprecht P, Holle JU, Hellmich B (2006) Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* 107:4440-4448
28. Cunningham AC (2002) Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol* 72:132-141
29. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-2412
30. Doherty TM, Coffman RL (1996) *Leishmania major*: effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 84:124-135
31. Ehrchen J, Helming L, Varga G, Pasche B, Loser K, Gunzer M, Sunderkotter C, Sorg C, Roth J, Lengeling A (2007) Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. *Faseb J* 21:3208-3218
32. Ehrchen J, Sindrilaru A, Grabbe S, Schonlau F, Schlesiger C, Sorg C, Scharffetter-Kochanek K, Sunderkotter C (2004) Senescent BALB/c mice are able to develop resistance to *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 72:5106-5114

33. Etges R, Muller I (1998) Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. *J Mol Med* 76:372-390
34. Fields RC, Schoenecker JG, Hart JP, Hoffman MR, Pizzo SV, Lawson JH (2003) Protease-activated receptor-2 signaling triggers dendritic cell development. *Am J Pathol* 162:1817-1822
35. Filippi C, Hugues S, Cazareth J, Julia V, Glaichenhaus N, Ugolini S (2003) CD4<sup>+</sup> T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. *J Exp Med* 198:201-209
36. Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL, Morelli A, Cirino G (2001) Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13936-13941
37. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112-122, 124-115
38. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35
39. Halliwell REW, Gorman NT (1989) Nonatopic allergic skin diseases. In: *Veterinary clinical immunology*. W. B. Saunders, Philadelphia, pp 253-284
40. Heinzl FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK (1993) Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 177:1505-1509
41. Himmelrich H, Launois P, Maillard I, Biedermann T, Tacchini-Cottier F, Locksley RM, Rocken M, Louis JA (2000) In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J Immunol* 164:4819-4825
42. Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, Xu D, Feng GJ, Robinson JH, Lam C, Liew FY (1998) Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur J Immunol* 28:4062-4070
43. Jankovic D, Liu Z, Gause WC (2001) Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 22:450-457
44. Johansson U, Lawson C, Dabare M, Syndercombe-Court D, Newland AC, Howells GL, Macey MG (2005) Human peripheral blood monocytes express protease receptor-2 and



- respond to receptor activation by production of IL-6, IL-8, and IL-1{beta}. *J Leukoc Biol* 78:967-975
45. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML (1999) T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20:561-567
  46. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290:1351-1354
  47. Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W (1995) Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 25:2220-2227
  48. Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 70:826-835
  49. Launois P, Himmelrich H, Tacchini-Cottier F, Milon G, Louis JA (1999) New insight into the mechanisms underlying Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Microbes Infect* 1:59-64
  50. Launois P, Maillard I, Pingel S, Swihart KG, Xenarios I, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, MacDonald HR, Louis JA (1997) IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 6:541-549
  51. Launois P, Ohteki T, Swihart K, MacDonald HR, Louis JA (1995) In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1. *Eur J Immunol* 25:3298-3307
  52. Leiby DA, Schreiber RD, Nacy CA (1993) IFN-gamma produced in vivo during the first two days is critical for resolution of murine *Leishmania major* infections. *Microb Pathog* 14:495-500
  53. Li J, Scott P, Farrell JP (1996) In vivo alterations in cytokine production following interleukin-12 (IL-12) and anti-IL-4 antibody treatment of CB6F1 mice with chronic cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 64:5248-5254
  54. Lima GM, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MM, Abrahamsohn IA (1998) The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* 64:145-151

55. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
56. Matte C, Olivier M (2002) Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J Infect Dis* 185:673-681
57. Matzinger P (2007) Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol* 8:11-13
58. Matzinger P (2002) An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* 961:341-342
59. Mbow ML, DeKrey GK, Titus RG (2001) Leishmania major induces differential expression of costimulatory molecules on mouse epidermal cells. *Eur J Immunol* 31:1400-1409
60. Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valencia-Pacheco G, Tryon VV, Palomo-Cetina A (1994) Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62:837-842
61. Moll H (1997) The role of chemokines and accessory cells in the immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Behring Inst Mitt*:73-78
62. Moll H, Flohe S (1997) Dendritic cells induce immunity to cutaneous leishmaniasis in mice. *Adv Exp Med Biol* 417:541-545
63. Moll H, Flohe S, Rollinghoff M (1995) Dendritic cells in Leishmania major-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol* 25:693-699
64. Moormann C, Artuc M, Pohl E, Varga G, Buddenkotte J, Vergnolle N, Brehler R, Henz BM, Schneider SW, Luger TA, Steinhoff M (2006) Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol* 126:746-755
65. Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J (2006) Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 66:307-314
66. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-958, 960, 962

67. Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73:209-212
68. Mosser DM, Wedgwood JF, Edelson PJ (1985) *Leishmania* amastigotes: resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J Immunol* 134:4128-4131
69. Muller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W, Laskay T (2001) Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 190:73-76
70. Nabors GS, Farrell JP (1994) Site-specific immunity to *Leishmania major* in SWR mice: the site of infection influences susceptibility and expression of the antileishmanial immune response. *Infect Immun* 62:3655-3662
71. Nabors GS, Nolan T, Croop W, Li J, Farrell JP (1995) The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol* 17:569-579
72. Nickoloff BJ (1993) *Dermal Immune System*. CRC Press, Boca Raton
73. Niedbala W, Cai B, Liew FY (2006) Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3:iii37-40
74. Niedbala W, Wei XQ, Campbell C, Thomson D, Komai-Koma M, Liew FY (2002) Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16186-16191
75. Niedbala W, Wei XQ, Piedrafita D, Xu D, Liew FY (1999) Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. *Eur J Immunol* 29:2498-2505
76. Noben-Trauth N, Paul WE, Sacks DL (1999) IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *J Immunol* 162:6132-6140
77. Noorbakhsh F, Tsutsui S, Vergnolle N, Boven LA, Shariat N, Vodjgani M, Warren KG, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Power C (2006) Proteinase-activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Exp Med* 203:425-435
78. Ossovskaya VS, Bunnett NW (2004) Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84:579-621

79. Paolucci C, Burastero SE, Rovere-Querini P, De Palma C, Falcone S, Perrotta C, Capobianco A, Manfredi AA, Clementi E (2003) Synergism of nitric oxide and maturation signals on human dendritic cells occurs through a cyclic GMP-dependent pathway. *J Leukoc Biol* 73:253-262
80. Paolucci C, Rovere P, De Nadai C, Manfredi AA, Clementi E (2000) Nitric oxide inhibits the tumor necrosis factor alpha -regulated endocytosis of human dendritic cells in a cyclic GMP-dependent way. *J Biol Chem* 275:19638-19644
81. Paus R, Schmelz M, Biro T, Steinhoff M (2006) Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. *J Clin Invest* 116:1174-1186
82. Perrotta C, Falcone S, Capobianco A, Camporeale A, Sciorati C, De Palma C, Pisconti A, Rovere-Querini P, Bellone M, Manfredi AA, Clementi E (2004) Nitric oxide confers therapeutic activity to dendritic cells in a mouse model of melanoma. *Cancer Res* 64:3767-3771
83. Ramachandran R, Hollenberg MD (2007) Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol*
84. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245:154-160
85. Ritter U, Korner H (2002) Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 24:295-301
86. Ritter U, Moll H (2000) Monocyte chemoattractant protein-1 stimulates the killing of leishmania major by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol* 30:3111-3120
87. Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R (1996) Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 173:699-709
88. Roitt I, Brostoff J, Male D (1998) *Immunology*. CV Mosby, St. Louis
89. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M (2006) Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev* 86:1309-1379
90. Sacks D, Noben-Trauth N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-858

91. Sacks DL (1989) Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 69:100-103
92. Sacks DL, Hieny S, Sher A (1985) Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania* major promastigotes. *J Immunol* 135:564-569
93. Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM (1990) Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J Exp Med* 171:115-127
94. Schonlau F, Scharffetter-Kochanek K, Grabbe S, Pietz B, Sorg C, Sunderkotter C (2000) In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. *Eur J Immunol* 30:2729-2740
95. Scott P, Hondowicz B, Eaton A, Scharon-Kersten T (1996) The role of IL-12 in regulation of T helper cell subsets in vivo. Lessons from experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci* 795:250-256
96. Seeliger S, Derian CK, Vergnolle N, Bunnett NW, Nawroth R, Schmelz M, Von Der Weid PY, Buddenkotte J, Sunderkotter C, Metz D, Andrade-Gordon P, Harms E, Vestweber D, Luger TA, Steinhoff M (2003) Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *Faseb J* 17:1871-1885
97. Shankar AH, Titus RG (1995) T cell and non-T cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania* major. *J Exp Med* 181:845-855
98. Shichijo M, Kondo S, Ishimori M, Watanabe S, Helin H, Yamasaki T, Stevens ME, Gantner F, Bacon KB (2006) PAR-2 deficient CD4+ T cells exhibit downregulation of IL-4 and upregulation of IFN-gamma after antigen challenge in mice. *Allergol Int* 55:271-278
99. Shpacovitch V, Feld M, Bunnett NW, Steinhoff M (2007) Protease-activated receptors: novel PARTners in innate immunity. *Trends Immunol* 28:535-544
100. Steinbrink K, Schonlau F, Rescher U, Henseleit U, Vogel T, Sorg C, Sunderkotter C (2000) Ineffective elimination of *Leishmania* major by inflammatory (MRP14-positive) subtype of monocytic cells. *Immunobiology* 202:442-459

101. Steinhoff M, Bienenstock J, Schmelz M, Maurer M, Wei E, Biro T (2006) Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. *J Invest Dermatol* 126:1705-1718
102. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD (2005) Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26:1-43
103. Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW (1999) Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 8:282-294
104. Steinhoff M, Griffiths C, Church M, Luger TA (2004) Inflammation. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C (eds) *Rook's Textbook of Dermatology*. Blackwell Publishing Inc., Malden, MA, USA, pp 9.1-9.67
105. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6:151-158
106. Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C (1994) Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 180:783-793
107. Sunderkotter C, Kunz M, Steinbrink K, Meinardus-Hager G, Goebeler M, Bildau H, Sorg C (1993) Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 151:4891-4901
108. Swihart K, Fruth U, Messmer N, Hug K, Behin R, Huang S, Del Giudice G, Aguet M, Louis JA (1995) Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J Exp Med* 181:961-971
109. Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 177:1797-1802
110. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G, Louis JA (2000) An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a

- CD4<sup>+</sup> Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 165:2628-2636
111. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 7:545-555
112. Tizard IR (1996) *Veterinary Immunology: An Introduction*. WB Saunders, Philadelphia
113. Vester B, Muller K, Solbach W, Laskay T (1999) Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun* 67:3155-3159
114. von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC (1998) Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* 188:1547-1552
115. von Stebut E, Belkaid Y, Nguyen B, Wilson M, Sacks DL, Udey MC (2002) Skin-derived macrophages from *Leishmania major*-susceptible mice exhibit interleukin-12- and interferon-gamma-independent nitric oxide production and parasite killing after treatment with immunostimulatory DNA. *J Invest Dermatol* 119:621-628
116. Von Stebut E, Ehrchen JM, Belkaid Y, Kostka SL, Molle K, Knop J, Sunderkotter C, Udey MC (2003) Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J Exp Med* 198:191-199
117. Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM (1994) CD4<sup>+</sup> effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 179:1367-1371
118. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375:408-411
119. Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, Scheuch H, Angel P, Tschachler E, Wagner EF (2005) Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 437:369-375

## 8 DANKSAGUNG

Zuerst gilt mein besonderer und herzlicher Dank meinem langjährigen Chef und Förderer Herrn Prof. Dr. T. Luger, für die mir in seinem Hause gebotenen Möglichkeiten, mich menschlich und medizinisch so weiterzuentwickeln, dass ich den Arztberuf bis heute nach meinen persönlichen moralischen und ethischen Grundsätzen mit großer Überzeugung ausüben kann. Auch möchte ich für das Vertrauen, das er mir seit vielen Jahren entgegengebracht hat, danken, denn er hat die Grundlagen geschaffen, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Meinen größten Dank schulde ich allerdings meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Martin Steinhoff, der mich trotz meiner intensiven beruflichen Auslastung, unermüdlich und konsequent unterstützte, um dieses Projekt zum Erfolg zu führen.

Weiter bin ich Herrn Dr. Jan M. Ehrchen zu tiefem Dank verpflichtet, da er mir besonders bei der experimentellen Durchführung stets zur Seite stand und wertvolle Hinweise bei der Entwicklung und Durchsicht der Arbeit gab.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Steinhoff und Dr. Ehrchen danke ich für die große Hilfsbereitschaft bei der Umsetzung des Projektes in einem hervorragenden Arbeitsklima.

Weiter danke ich Herrn Christian Meß für die Hilfe bei der Durchsicht des Manuskriptes und Frau Eva Nattkemper bei den Mausexperimenten.

Herrn PD Dr. Johannes Weißling danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter anzunehmen.

Danke meinem OP Team und natürlich meinen KollegInnen und FreundInnen, insbesondere Antje, Birgit, Kathrin und Sonja, die mir das Ziel vor Augen hielten.

Dank auch an Dorothea Christiana Erxleben (1715 – 1762), die am 06. Mai 1754 als erste promovierte deutsche Ärztin einen bedeutenden Grundstein für die akademische Ausbildung von Frauen legte.



Danke den Trägern des Medizin-Nobelpreises 2007 Mario R. Capecchi, Oliver Smithies und Martin J. Evans, die die Technik der Knock-out-Mäuse entwickelt haben.

Danke meinen Eltern, meiner Schwester und Nichten, die in großer Liebe meinen Lebensweg begleiten.

Et á la fin mon mari Wulf Bieg. Danke für Deine unendliche Geduld beim unermüdlichen Zuhören und Dein konstruktives Mutmachen für alles, was das Projekt "Promo" betraf.

## **9 LEBENSLAUF**







## 10 ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Medizin der WWU Münster zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Die Rolle des Proteinase-aktivierten Rezeptors-2 (PAR<sub>2</sub>) in der Leishmania major (L. major) Infektion“

in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Martin Steinhoff, Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten, mit Unterstützung der genannten Damen und Herren ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt, die Literatur vollständig angegeben und bei der Erstellung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht und weder die vorliegende noch eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Münster, den 22.12.2007

**(Dagmar Luise Presser)**



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

### Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn  
PD Dr. Cord Sunderkötter  
Hautklinik des  
Universitätsklinikums Münster  
Von-Esmarch-Str. 58

48149 Münster

Dienstgebäude:  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Telefax: 2115  
Raum: 431  
Auskunft erteilt:  
Frau Möllers  
E-Mail:  
irmgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de  
Aktenzeichen:  
50.0835.1.0 (G 83/2002)

3. Jan. 2003

### **Tierschutz; Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Ihr Antrag vom 31.10.2002, hier eingegangen am 13.11.2002

### **Genehmigungsbescheid:**

Sehr geehrter Herr Dr. Sunderkötter,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

**„Frühphase der natürlichen Resistenzreaktion am Beispiel der experimentellen Leishmaniasis (Fortsetzung der Anträge 19/87, 44/90, 31/95 und 30/98).“**

Leiter des Versuchsvorhabens und sein/ihre Stellvertreter ist/sind:

Herr  
Prof. Dr. C. Sorg  
Institut für Experimentelle  
Dermatologie  
des Universitätsklinikums Münster  
Von-Esmarch-Str. 58  
48149 Münster

**Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300**

E-Mail: [poststelle@bezreg-muenster.nrw.de](mailto:poststelle@bezreg-muenster.nrw.de) • Internet: [www.bezreg-muenster.nrw.de](http://www.bezreg-muenster.nrw.de)  
zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525

Konten der Landeskasse Münster:

Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520  
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820  
ÖPNV ab Hbf: Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis  
Haltestelle Windthorststraße (Haus K), Linie 7 bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W).

1/3



Herr  
PD Dr. C. Sunderkötter  
Hautklinik  
des Universitätsklinikums Münster  
Von-Esmarch-Str. 58  
48149 Münster

Herr  
Dr. Jan Ehrchen  
Institut für Experimentelle Dermatologie  
des Universitätsklinikums Münster  
Von-Esmarch-Str. 58  
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum **31. 12. 2005**.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

**2.120 Mäuse.**

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Ich weise darauf hin, dass diese Genehmigung eine evtl. erforderliche Zustimmung nach dem Gentechnikgesetz für Arbeiten mit transgenen Tieren nicht einschließt.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Herr Prof. Dr. C. Sorg erhält als Mit Antragsteller ebenfalls eine Ausfertigung dieses Genehmigungsbescheides.

**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.





## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herrn  
Prof. Dr. med. J. Roth  
Institut für experimentelle Dermatologie  
Röntgenstr. 21  
48149 Münster

Dienstgebäude:  
Domplatz 6-7  
48143 Münster  
Telefon: 0251 411-0  
Durchwahl: 411-2104  
Telefax: 411-2115  
Raum: C 211  
Auskunft erteilt:  
Dirk Skoff  
E-Mail:  
Dez50@brms.nrw.de  
Aktenzeichen:  
50.0835.1.0 (G 83/2002)

13. Dezember 2006

### Tierschutz

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Verlängerung des Tierversuchs:

**„Frühphase der natürlichen Resistenzreaktion am Beispiel der experimentellen Leishmaniasis“**

Antrag ohne Datum, hier eingegangen am 27.11.2006

Mein Genehmigungsbescheid vom 03.01.2003 – Az.: 50.0835.1.0 (G 83/2002) –

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Roth,

gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum **31.12.2007**.

Die Genehmigungsdauer für o.g. Versuchsvorhaben ist nunmehr zweimal um ein Jahr verlängert worden. Eine weitere Verlängerung ist daher nicht mehr möglich, so dass die Genehmigungsdauer am 31.12.2007 ausläuft.

Mit freundlichen Grüßen

im Auftrag

Dr. Piontkowski

E-Mail: [poststelle@bezreg-muenster.nrw.de](mailto:poststelle@bezreg-muenster.nrw.de)  
Internet: [www.bezreg-muenster.nrw.de](http://www.bezreg-muenster.nrw.de)  
Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300  
**ÖPNV - Haltestellen:**  
Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20  
Bezirksregierung II, Linie 17 (Haus N)

Konten der  
Landeskasse Deutsche Bundesbank  
- Filiale Münster

BLZ: 400 000 00  
Konto: 40 001 520  
IBAN: DE34 4000 0000 0040  
0015 20  
BIC: MARKDEF1400

WestLB AG  
Münster

400 500 00  
61 820  
DE65 4005 0000  
0000 0618 20  
WELADE3M

**NRW.**