

**Geschlechtsspezifische Transkriptomanalyse muriner neutrophiler
Granulozyten während der hepatischen Amöbiasis**

vorgelegt von
David Teodor Moamenpour

[REDACTED]

[REDACTED]

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie
der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

In Zusammenarbeit mit dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

31. AUGUST 2022

Inhalt

I. Abbildungsverzeichnis.....	III
II. Tabellenverzeichnis.....	V
III. Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Abstract.....	1
2. Einleitung.....	1
2.1 Das angeborene Immunsystem.....	1
2.1.1 Die Zellen des angeborenen Immunsystems im Blut	1
2.1.2 Neutrophile Granulozyten	2
2.1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei Erkrankungen	4
2.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	5
2.2.1 Amöbenleberabszess.....	5
2.2.2 Geschlechtsdimorphismus im Amöbenleberabszess	6
2.2.3 Neutrophile Granulozyten während eines Amöbenleberabszesses	7
2.2.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede des angeborenen Immunsystems in Bezug auf neutrophile Granulozyten.....	8
2.3 Transkriptomanalyse.....	9
2.3.1 Hauptkomponentenanalyse.....	9
2.3.2 Heatmaps	10
2.3.3 Volcano-Plots	11
2.3.4 Venn-Diagramm.....	12
2.4 Zielsetzung.....	13
3. Material und biologische Proben.....	14
3.1 Mäuse.....	14
3.2 Geräte.....	14
3.3 Verbrauchsmaterialien.....	15
3.4 Reagenzien.....	15
3.5 Fluoreszenzmarkierte Antikörper.....	15
3.6 Puffer und Medien	16
3.7 Verwendete Kits	17
4. Methoden.....	17
4.1 Organentnahme aus den C57BL/6J Mäusen*.....	17
4.1.1 Tötung und Blutentnahme aus den Mäusen*	17
4.1.2 Entnahme der Beine der Mäuse	18
4.2 Infektion der Mäuse mit <i>E. histolytica</i> *.....	18
4.2.1 Kultivierung und Vorbereitung von <i>E. histolytica</i> für die Operation*	18

4.2.2 Operation für die Infektion der C57BL/6J Mäuse mit <i>E. histolytica</i> *	18
4.2.3 Kontrolle der Abszesse nach der Operation	19
4.3 Isolation neutrophiler Granulozyten aus murinem Blut	19
4.3.1 Aufreinigung der Leukozyten	19
4.3.2 Färbung für die durchflusszytometrische Analyse	20
4.3.3 Durchflusszytometrische Analyse*	20
4.3.4 Aufnahme der neutrophilen Granulozyten in TRIzol	21
4.4 RNA Isolation mit RNEasy MinElute Kit	21
4.5 Analyse der Qualität und Menge der RNA	22
4.5.1 RNA Analyse am Nanodrop 2000	22
4.5.2 RNA Analyse am 2100 Bioanalyzer	22
4.5.2.1 Vorbereitungen	22
4.6 RNA-Sequenzierung*	23
4.7 Bioinformatische Analyse	23
5. Ergebnisse	23
5.1 Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten in murinem Blut	23
5.2 Qualität und Menge der isolierten RNA	30
5.3 Ergebnisse der Transkriptomanalyse	35
5.3.1 Naive Männchen verglichen mit naiven Weibchen	36
5.3.2 Naive Männchen verglichen mit ALA Männchen	38
5.3.3 Naive Weibchen verglichen mit ALA Weibchen	40
5.3.4 ALA Männchen verglichen mit ALA Weibchen	42
5.3.5 Vergleich der hoch- und herunterregulierten Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut	44
6. Diskussion	45
6.1 Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten	46
6.2 Qualität und Menge der RNA	47
6.3 Geschlechtsdimorphismus im Genexpressionsprofil neutrophiler Granulozyten während eines Amöbenleberabszesses	48
6.3.1 Naive Männchen verglichen mit naiven Weibchen	48
6.3.2 Naive Männchen verglichen mit ALA Männchen	48
6.3.3 Naive Weibchen verglichen mit ALA Weibchen	49
6.3.4 ALA Männchen verglichen mit ALA Weibchen	50
6.3.5 Interpretation	51
7. Literatur- und Quellenverzeichnis	52
8. Danksagung	55
9. Eidesstattliche Erklärung	56

I. Abbildungsverzeichnis

Abb.	Thema	Seite
1	Darstellung aller Zellen die aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entstehen	2
2	Verschiedene Mechanismen der Immunregulation durch neutrophile Granulozyten	3
3	Geschlechtsdimorphismus des angeborenen Immunsystems bezogen auf die Immunreaktion und Anfälligkeit für Erkrankungen	5
4	Lebenszyklus von <i>Entamoeba histolytica</i>	7
5	Histologische Färbung einer Leber drei Tage nach einer intrahepatischen Infektion mit <i>E. histolytica</i> Trophozoiten	9
6	Prozentualer Anteil der Ly6G ⁺ neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b ⁺ Zellen	10
7	Beispielhafte Hauptkomponentenanalyse molekularer Merkmale auf Stromazellen von Brust- und Prostatakrebsproben	11
8	Beispielhafte Heatmap humaner männlicher und weiblicher neutrophiler Granulozyten	12
9	Beispielhafter Volcano Plot der Genexpression humaner männlicher und weiblicher neutrophiler Granulozyten	13
10	Beispielhaftes Venn Diagramm der Hochregulation von <i>Brachypodium distachyon</i> Genen nach Stressinduktion	14
11	Versuchsablauf der Isolation von murinen neutrophilen Granulozyten	20
12	Isolation der total RNA aus murinen neutrophilen Granulozyten	22
13	Vier Versuchsgruppen, die für die folgenden Versuche verwendet wurden	25
14	Gating Strategie zum Abtrennen von neutrophilen Granulozyten von den restlichen Zellen	26
15	Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten aus allen CD11b ⁺ Zellen bei naiven Tieren im Blut	28
16	Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten aus allen CD11b ⁺ Zellen während einer Infektion mit <i>E. histolytica</i> im Blut	29
17	Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten aus allen CD11b ⁺ Zellen bei allen biologischen Proben im Blut	30
18	Geschlechtsdimorphismus im prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten aus allen CD11b ⁺ Zellen bei allen biologischen Proben im Blut	31
19	Gel-Elektrophorese zur Bestimmung der Größe und Qualität der aus neutrophilen Granulozyten isolierten RNA	32
20	Elektropherogramm der RNA-Ladder	33
21	Beispielhaftes Elektropherogramm einer Probe	33
22	Hauptkomponentenanalyse der vier Versuchsgruppen	36
23	Heatmap regulierter Gene neutrophiler Granulozyten isoliert aus dem Blut naiver weiblicher C57BL/6J Mäuse oder naiver männlicher C57BL/6J Mäuse	37

24	Volcano-Plot regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver Weibchen verglichen mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver Männchen	38
25	Heatmap regulierter Gene neutrophiler Granulozyten isoliert aus dem Blut naiver oder <i>E. histolytica</i> -infizierter männlicher C57BL/6J Mäuse	39
26	Volcano-Plot regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut männlicher ALA Mäuse verglichen mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver Mäuse	40
27	Heatmap regulierter Gene neutrophiler Granulozyten isoliert aus dem Blut naiver oder <i>E. histolytica</i> -infizierter weiblicher C57BL/6J Mäuse	41
28	Volcano-Plot regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut weiblicher ALA Mäuse verglichen mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver weiblicher Mäuse	42
29	Heatmap regulierter Gene neutrophiler Granulozyten isoliert aus dem Blut <i>E. histolytica</i> -infizierter weiblicher und männlicher C57BL/6J Mäuse	43
30	Volcano-Plot regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut weiblicher ALA Mäuse verglichen mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut männlicher ALA Mäuse	44
31	Venn-Diagramm der regulierten Gene in neutrophilen Granulozyten aus weiblichen ALA Mäusen und Wildtyp Mäusen verglichen mit den regulierten Genen aus männlichen ALA Mäusen und Wildtyp Mäusen	45
32	Venn-Diagramm der regulierten Gene in neutrophilen Granulozyten aus weiblichen und männlichen ALA Mäusen verglichen mit regulierten Genen aus männlichen und weiblichen Wildtyp Mäusen	46

II. Tabellenverzeichnis

Tab.	Thema	Seite
1	Verwendete Geräte	15
2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	16
3	Verwendete Reagenzien	16
4	Murine Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse	17
5	Zusammensetzung der Medien und Puffer	17
6	Zusammensetzung und Name der verwendeten Kits	18
7	Durchschnittliche Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Tier im Blut	27
8	Ergebnisse der RNA Isolation aus neutrophilen Granulozyten mit dem Nanodrop	35
9	Ergebnisse der RNA Isolation aus neutrophilen Granulozyten mit dem Bioanalyzer	36

III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AK-MM	Antikörper Mastermix
ALA	Amöbenleberabszess
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
CCL2	C-C Chemokinligand 2
CCR2	C-C Chemokinrezeptor 2
CCR2 ^{-/-}	C-C Chemokinrezeptor 2 knock-out
cRPMI	Komplettiertes RPMI
CXCL1	C-X-C Motiv Chemokinligand 1
CXCR2	C-X-C Motiv Chemokinrezeptor 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EVs	Extrazelluläre Vesikel
FC	<i>Fold change</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FoxP3	Forkead-Box-Protein P3
FSC	<i>Forward scatter</i>
IFN- γ	Interferon- γ
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NGS	Next generation sequencing
NK-Zellen	<i>Natural Killer Zellen</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSC	Sideward scatter
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TY	Trypticase yeast extract iron-serum-33
WHO	World health organisation

1. Abstract

Bereits seit einiger Zeit wurde beobachtet, dass es einen Geschlechtsdimorphismus im Immunsystem von Säugetieren gibt. Während weibliche C57BL/6J Mäuse bei einer Infektion mit dem Protozoon *Entamoeba (E.) histolytica* einen kleinen Abszess in der Leber bilden, ist bei männlichen C57BL/6J Mäusen das Gegenteil der Fall. Zudem wurde entdeckt, dass sich eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten während einer Infektion mit *E. histolytica* in der Leber ansammeln. Diese Arbeit beschäftigt sich mit neutrophilen Granulozyten, einer Untergruppe der weißen Blutkörperchen und somit Teil des angeborenen Immunsystems. Um die Rolle neutrophiler Granulozyten bei der geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Ausbildung des Amöbenleberabszesses im Mausmodell für die Erkrankung zu untersuchen, wurde eine Transkriptomanalyse der mRNA neutrophiler Granulozyten durchgeführt. Dazu wurden die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver als auch *E. histolytica* -infizierter weiblicher und männlicher C57BL/6J Mäuse isoliert. Aus den neutrophilen Granulozyten wurde die komplette RNA isoliert und sequenziert, sodass eine bioinformatische Analyse der regulierten Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut durchgeführt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass neutrophile Granulozyten naiver weiblicher Mäuse eine eher aktivierende Wirkung auf das Immunsystem haben. Neutrophile Granulozyten naiver männlicher Mäuse hingegen haben eine eher immunsupprimierende Wirkung. Im Verlauf einer Infektion mit *E. histolytica* regulieren die neutrophilen Granulozyten männlicher Mäuse verstärkt immunaktivierende Gene hoch, während neutrophile Granulozyten *E. histolytica* -infizierter weiblicher Mäuse verstärkt Gene hochregulieren, welche eine Apoptose neutrophiler Granulozyten zur Folge haben und somit immunsupprimierend wirken.

2. Einleitung

Während meines Praxissemesters und meiner anschließenden Bachelorarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, wurden geschlechtsspezifische Unterschiede in der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut weiblicher und männlicher C57BL/6J Mäuse vor und nach intrahepatischer Infektion mit dem Protozoon *E. histolytica* mittels durchflusszytometrischer Methoden charakterisiert. Die RNA dieser Zellen wurde isoliert, quantitativ und qualitativ analysiert und nachfolgend sequenziert. Die gewonnenen Daten wurden im Rahmen einer Transkriptomstudie analysiert und werden in dieser Bachelorarbeit vorgestellt.

2.1 Das angeborene Immunsystem

2.1.1 Die Zellen des angeborenen Immunsystems im Blut

Das Immunsystem höherer Säugetiere besteht aus zwei Hauptkompartimenten. Das angeborene und das adaptive Immunsystem. Zum angeborenen Immunsystem gehören Makrophagen, dendritische Zellen sowie neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten.¹ Außerdem werden noch die Monozyten und die NK-Zellen hinzugezählt.¹ Obwohl diese Zellen verschiedene Funktionen haben und an verschiedenen Stellen des menschlichen Körpers wirken, entspringen sie alle einer gemeinsamen Vorläuferzelle im Knochenmark, der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle.¹ Die Differenzierung und Reifung der Zellen in die einzelnen Untergruppen des angeborenen Immunsystems erfolgt größtenteils im Knochenmark selbst, bevor sie in die Peripherie gelangen.¹

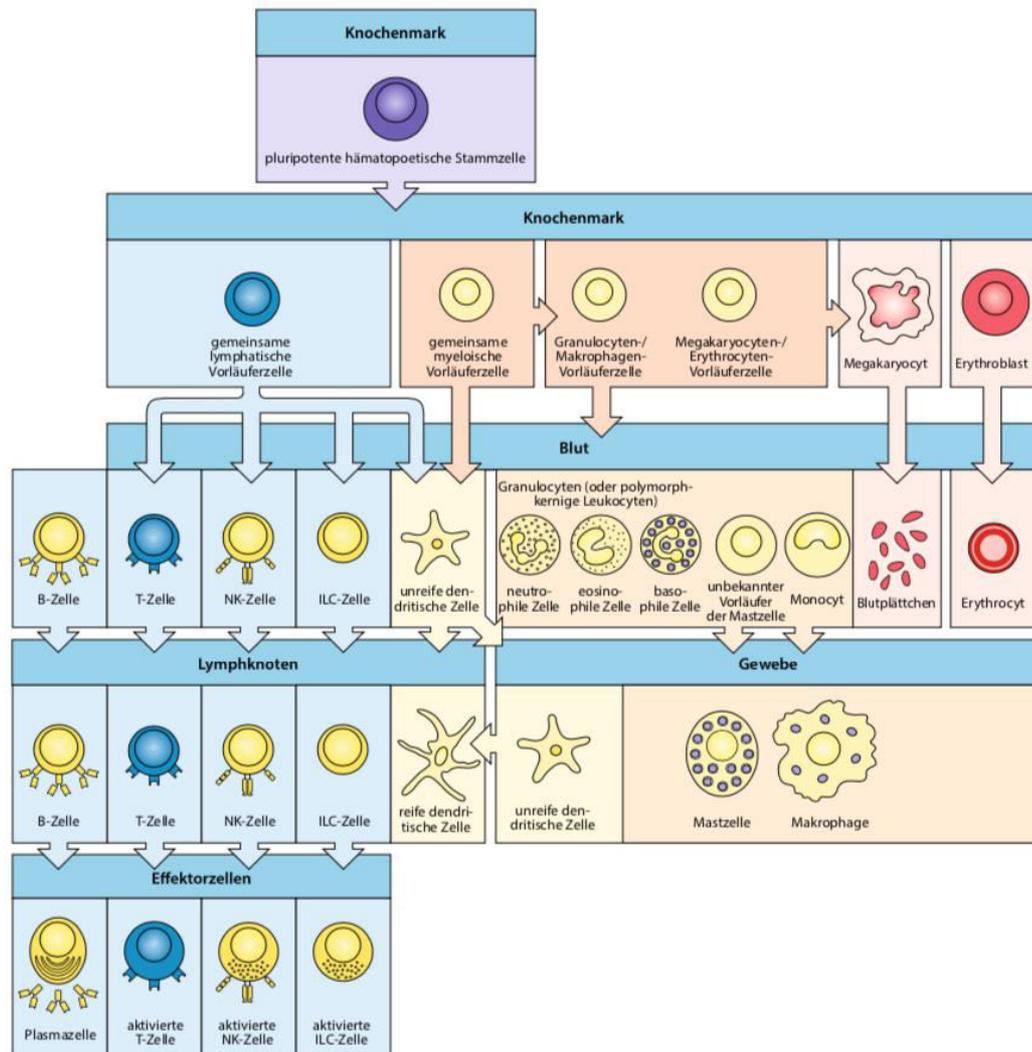


Abbildung 1: Darstellung aller Zellen die aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entstehen¹

Aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entstehen die gemeinsamen Vorläuferzellen der lymphatischen und myeloischen Zellen. Aus diesen bestehen alle zellulären Bestandteile des Blutes. Die ausdifferenzierten, myeloischen Zellen reifen im Gewebe und die lymphatischen Zellen im Thymus sowie den Lymphknoten.¹

2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind eine Untergruppe der weißen Blutkörperchen, den sogenannten Leukozyten und somit Teil des angeborenen Immunsystems. Das angeborene Immunsystem ist evolutionär der älteste Teil des Immunsystems und stellt die erste Verteidigungslinie gegenüber Pathogenen dar.^{2,6} Neutrophile Granulozyten machen mit etwa 40-70 % den Großteil der zirkulierenden Leukozyten im menschlichen peripheren Blut aus.³ In Mäusen beträgt der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten im Blut 10-25 %.⁹ Sie werden im Knochenmark gebildet und zum Infektionsherd rekrutiert sobald ein pathogener Organismus vom Immunsystem erkannt wird.² Am Infektionsherd werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert.^{2,6} Durch verschiedene regulatorische Mechanismen können die neutrophilen Granulozyten Einfluss auf die Immunantwort des adaptiven Immunsystems nehmen.⁴ Neutrophile Granulozyten sind aber auch in der Lage direkten Einfluss auf die Ausbreitung von Pathogenen zu nehmen. Sie verfügen, wie in Abbildung 2 dargestellt

über mehrere Möglichkeiten, um pathogene Mikroorganismen zu töten oder in ihrer Ausbreitung einzuschränken.⁹ Zum einen sind neutrophile Granulozyten in der Lage Mikroorganismen zu phagozytieren.⁹ Dazu werden die pathogenen Organismen in den neutrophilen Granulozyten aufgenommen und durch reaktive Sauerstoffspezies oder antimikrobiellen Proteinen getötet.⁹ Dabei handelt es sich primär um eine intrazelluläre Methode zum Töten von Mikroorganismen. Die antimikrobiellen Proteine können auch in die extrazelluläre Umgebung ausgestoßen werden und so auch extrazelluläre Mikroorganismen töten. Einer dieser Vorgänge ist die Degranulation.⁹ Dabei wird der Inhalt der intrazellulären Granulas der neutrophilen Granulozyten in den extrazellulären Raum ausgestoßen.⁹ In den Granulas befinden sich antimikrobielle Histone und Proteasen.⁹ Es gibt weitere Möglichkeiten mit denen neutrophile Granulozyten Pathogene auch direkt extrazellulär eliminieren können. Beispielsweise durch die Ausbildung von NETs.⁹ Als letztes Mittel zur Bekämpfung von Pathogenen können besonders stark aktivierte neutrophile Granulozyten NETs ausbilden und somit Mikroorganismen fixieren, sodass diese sich nicht weiterverbreiten können.⁹ Die NETs bestehen hauptsächlich aus DNA, an die antimikrobielle Enzyme, Histone und Proteine gebunden sind.⁹ Dadurch werden Pathogene nicht nur an der Ausbreitung gehindert, sondern direkt getötet.⁹ Der neutrophile Granulozyt stirbt während dieses Vorgangs.

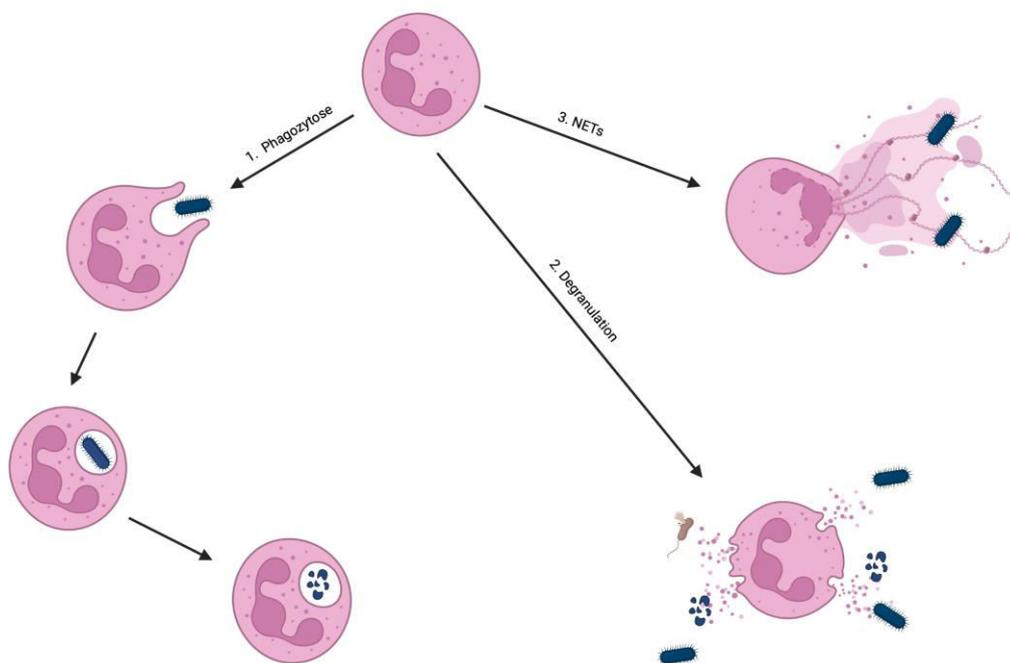


Abbildung 2: Verschiedene Mechanismen der Immunregulation durch neutrophile Granulozyten⁹ (Modifiziert nach Kolaczowska et al. 2013)

Auf dieser Abbildung sind die verschiedenen Mechanismen dargestellt, welche neutrophile Granulozyten zur Abwehr gegen Pathogene durchführen können. Sie sind in der Lage Mikroorganismen zu phagozytieren, indem sie die Mikroorganismen in sich aufnehmen und diese mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder antimikrobiellen Proteinen töten. Als Degranulation wird der Vorgang bezeichnet, bei welchem antimikrobielle Histone und Proteasen aus den intrazellulären Granulas des neutrophilen Granulozyten in den extrazellulären Raum ausgestoßen werden. Zudem sind besonders stark aktivierte neutrophile Granulozyten in der Lage NETs zu formen. Dabei stirbt der neutrophile Granulozyt und fixiert gleichzeitig Mikroorganismen, sodass sich diese nicht weiterverbreiten können.⁹

2.1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei Erkrankungen

Immer mehr Studien zeigen, dass es bei vielen Säugetieren, darunter auch Menschen, geschlechtsspezifische Unterschiede im angeborenen sowie adaptiven Immunsystem gibt.^{10,13,15} Beispielsweise wurde gezeigt, dass Frauen nicht so anfällig für bakterielle- sowie virale Infektionen sind wie Männer.¹³ Dazu wurden Infektionen mit verschiedenen Mikroorganismen untersucht, wie *M. tuberculosis*, Hepatitis B Virus, aber auch *E. histolytica*.¹³ Nicht nur sind Frauen weniger anfällig, sie haben auch eine höhere Überlebenschance und grundsätzlich mildere Verläufe bei Infektionen.^{13,15} Gleichzeitig wurde beobachtet, dass bei Frauen öfter Autoimmunerkrankungen und schwerwiegende Erkrankungen vorkommen im Vergleich zu Männern.¹⁵ Dazu gehören beispielsweise das Sjögren-Syndrom und der systemische Lupus erythematoses.¹⁵ In der USA sind etwa 80 % der gesamten Patienten mit Autoimmunerkrankungen weiblich.¹⁵ Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede könnten auch bei Kindern und Säuglingen beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass nicht nur die Geschlechtshormone, wie Testosteron und Östrogen, sondern auch chromosomale Faktoren für geschlechtsspezifische Unterschiede verantwortlich sind.¹³

Eine Gewichtung in der Bedeutung dieser Faktoren ist in der Regel schwer zu treffen. So sind z.B. neutrophile Granulozyten in weiblichen Mäusen langlebiger als in männlichen. Dies liegt an den weiblichen Sexualhormonen, welche eine lebensdauererlängernde Wirkung auf diese Zellen ausüben.¹⁵ Im Gegensatz hat Testosteron einen eher negativen Effekt auf das Überleben von Zellen, indem es die Apoptose fördert.³⁵ Östrogene wirken immunaktivierend.¹⁰ Das führt bei Frauen zwar zu einer besseren Infektionsabwehr und Vakzineantwort, aber auch zu einem höheren Risiko zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen.¹⁰

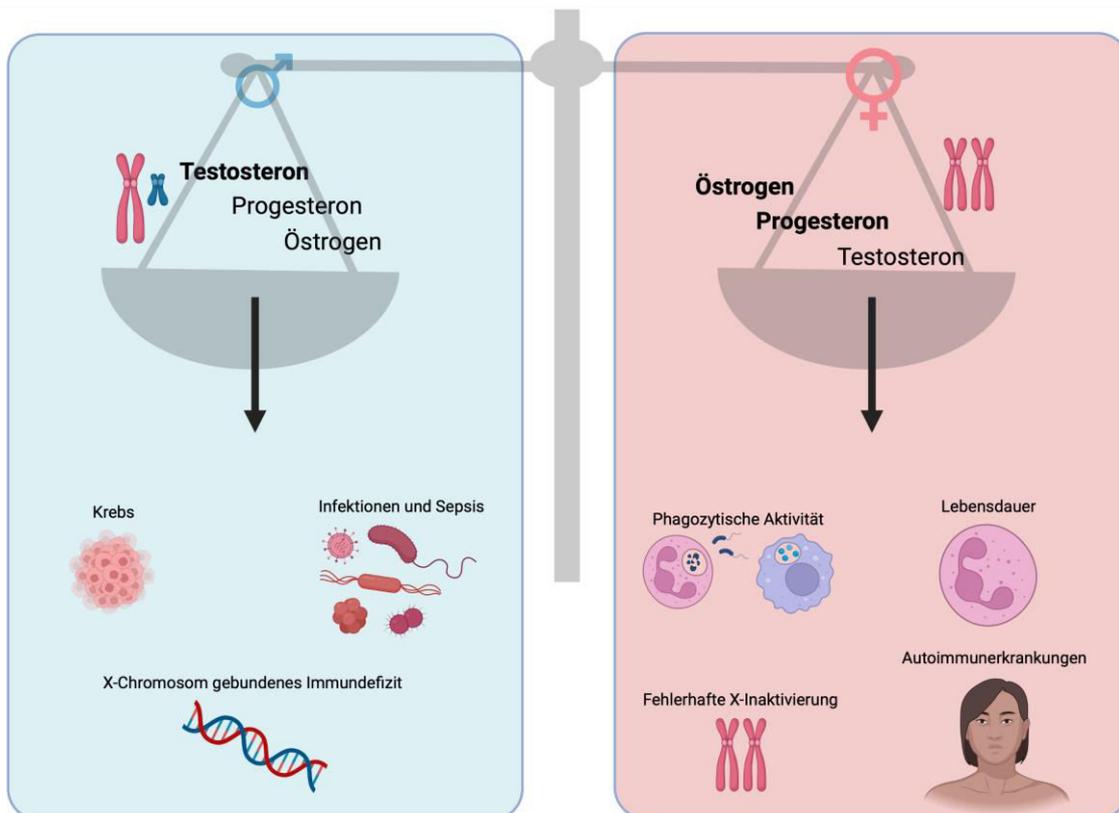


Abbildung 3: Geschlechtsdimorphismus des angeborenen Immunsystems bezogen auf die Immunreaktion und Anfälligkeit für Erkrankungen.^{10,15} (Modifiziert nach Jaillon et al. 2017)

Autoimmunerkrankungen treten bei Frauen im Vergleich zu Männern mit erhöhter Wahrscheinlichkeit auf, da die Immunreaktion weiblicher Säugetiere stärker ist verglichen mit männlichen Säugetieren.¹² Im Gegenzug sind Männer anfälliger für Infektionskrankheiten und Sepsis.¹² Es existieren weitere geschlechtsspezifische Unterschiede auf Immunologischer Ebene. Die phagozytische Aktivität von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ist in Frauen höher als in Männern.¹⁵ Auch sind Männer anfälliger für Krebserkrankungen.¹⁶ Durch fehlerhafte Inaktivierung des X-Chromosoms kann es bei Frauen zu einer Hochregulierung von immunsystemrelevanten Genen kommen, welche sich auf die Gesamtfunktion des Immunsystems auswirken können.¹³ Da Männer nur ein X-Chromosom besitzen sind sie von diesem Problem verschont. Allerdings kann es bei Männern zu einem Immundefizit kommen, falls ein Gen auf dem X-Chromosom geschädigt sein sollte.¹⁵

Bislang wird vermutet, dass diese biologischen Unterschiede des Immunsystems evolutionär bedingt sind.¹⁷ Das Immunsystem der Frauen muss anpassungsfähiger sein, beispielsweise um eine Schwangerschaft zu ermöglichen.¹⁷ Wäre das nicht der Fall, könnte der Fötus als pathogenes Lebewesen erkannt werden und eine ungewünschte Immunreaktion auslösen.¹⁷ Die Ausbildung und Reaktion des Immunsystems kann durch die Expression verschiedener Gene beeinflusst werden. Das menschliche X-Chromosom codiert für viele dieser Gene, wie die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 oder auch FoxP3.¹⁷ Die unterschiedliche Anzahl an X-Chromosomen bei Frauen und Männern sind unter anderem für die unterschiedlichen Reaktionen des Immunsystems verantwortlich.¹⁷

2.2 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica ist der Auslöser der Amöbiasis, einer endemischen Krankheit welche hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gebieten vorkommt.¹¹ Es handelt sich dabei um ein einzelliges Protozoon, das jährlich mindestens 10 Millionen Krankheitsfälle verursacht.¹¹ Da die Infektion in 90% der Fälle asymptomatisch verläuft dürfte die Dunkelziffer deutlich höher liegen. Die WHO schätzte in der Vergangenheit die Infektionszahlen weltweit auf etwa 50 Millionen Fälle und 100 000 Tote.¹⁹ Mittlerweile wird von wesentlich weniger Fällen weltweit ausgegangen. Die Übertragung des Parasiten erfolgt fäkal-oral.¹¹ *E. histolytica* ist ein human spezifischer Parasit und siedelt sich bei einer Infektion im menschlichen Dickdarm an und vermehrt sich.¹¹ Bei asymptomatischen Infektionen kann *E. histolytica* über mehrere Jahre im Dickdarm des Wirts verbleiben.¹¹ Sollte es dem Protozoon gelingen in die Darmschleimhaut einzudringen, kann dies zu einer schweren hämorrhagischen Durchfallerkrankung, der Amöbencolitis führen.¹¹ Bei durchdringen der Darmschleimhaut kann der Erreger über den Blutstrom in andere Organe, insbesondere in die Leber, aber auch in die Lunge oder das Gehirn gelangen und dort zur Ausbildung von Abszessen führen.¹¹ Allerdings wird sich in der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf den Amöbenleberabszess fokussiert.

2.2.1 Amöbenleberabszess

Ein Abszess der Leber wird als hepatischer Abszess bezeichnet. Darunter versteht man eine Ansammlung von entzündetem Gewebe.¹⁹ Der eitrige Teil des entzündeten Gewebes besteht aus in Apoptose gegangenen neutrophilen Granulozyten.¹⁹ (siehe 2.2.3)

Der Lebenszyklus von *E. histolytica* besteht aus zwei Stadien. Zum einen dem Zystenstadium und dem Trophozoitenstadium.¹⁹ Der Mensch ist der einzige relevante Wirt für *E. histolytica* und kann die Zysten beispielsweise durch verschmutztes Trinkwasser aufnehmen, wodurch diese zunächst in den Dünndarm gelangen.¹¹ Im Dünndarm entstehen aus einer vierkernigen Zyste Trophozoiten.¹⁹ In 90% der Fälle verursacht *E. histolytica* eine asymptomatische nicht invasive Erkrankung, indem es sich im Darmlumen ansiedelt.¹⁹ Bei den übrigen Fällen können die Trophozoiten die Darmschleimwand penetrieren und schließlich über den Blutstrom in die Leber gelangen.¹⁹ So wird ein Amöbenleberabszess verursacht.

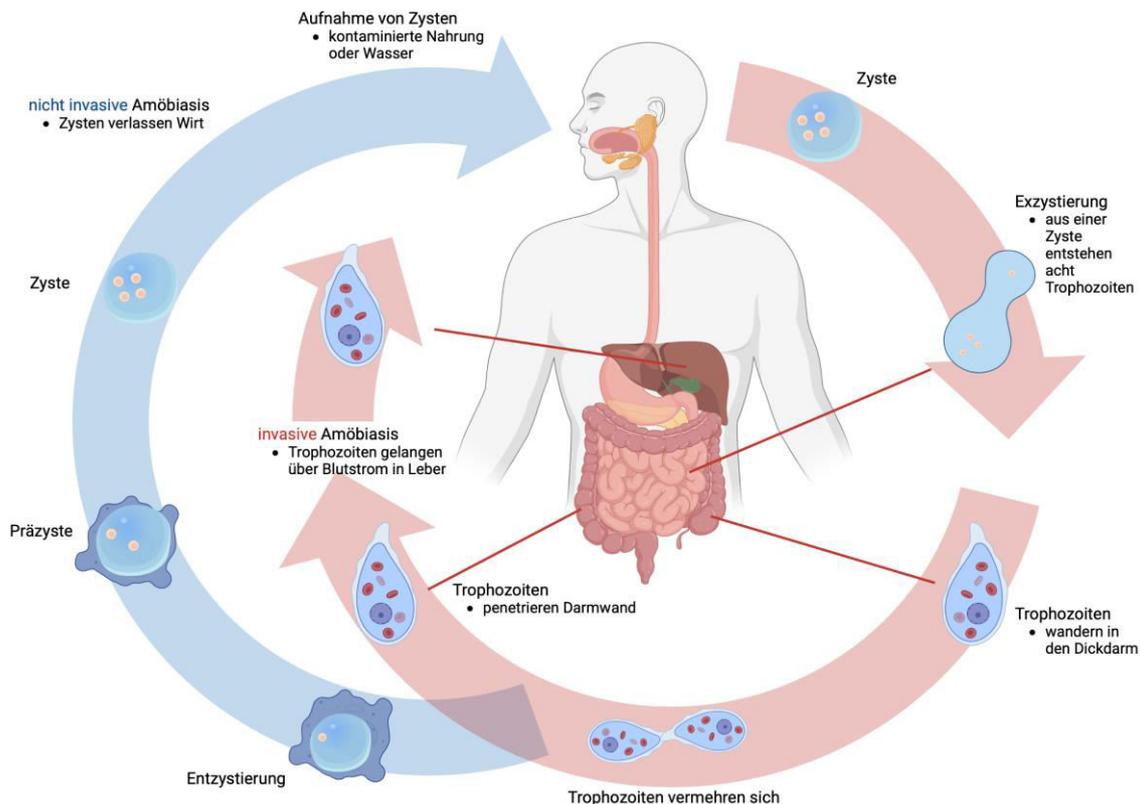


Abbildung 4: Lebenszyklus von *Entamoeba histolytica*¹⁹ (Modifiziert nach Roediger et al. 2020)

Über kontaminierte Nahrung oder Trinkwasser können Zysten von *E. histolytica* aufgenommen werden. Durch Exzystierung entstehen im Dünndarm aus einer Zyste acht Trophozoiten. Die Trophozoiten migrieren in den Dickdarm und vermehren sich dort durch Zellteilung. Sollten die Trophozoiten die Dickdarmwand penetrieren, kann eine invasive Amöbiasis entstehen. Die Trophozoiten gelangen so in die Blutbahn und können extraintestinale Organe, wie die Leber, befallen. In 90 % der Infektionen mit *E. histolytica* kommt es jedoch zu einer nicht invasiven Amöbiasis. Den Trophozoiten gelingt es nicht die Darmwand zu durchdringen. Nachdem sich die Trophozoiten im Dickdarm vermehrt haben, bilden sich erneut Zysten. Diese werden schließlich ausgeschieden.¹⁹

2.2.2 Geschlechtsdimorphismus im Amöbenleberabszess

In mehreren vorangegangenen Arbeiten wurde festgestellt, dass die Bildung eines Amöbenleberabszesses vom Geschlecht und Alter des Wirts abhängig ist.¹¹ Nur in etwa 5 % der symptomatischen Fälle sind Kinder von *E. histolytica* Infektion betroffen.¹¹ Selbst bei symptomatischen Infektionen beschränken sich die Symptome bei Kindern auf den Darmbereich.¹¹ Am häufigsten kommt der ALA bei Männern im Alter zwischen 18 und 50 Jahren vor, obwohl die Infektionszahlen bei Frauen und Kindern höher sind.¹⁹

Bei Männern die älter als 50 Jahre alt sind nimmt die Wahrscheinlichkeit eines ALA ab.¹¹ Die Infektionen bei Kindern und Frauen verlaufen in den meisten Fällen asymptomatisch und somit ohne Bildung eines Amöbenleberabszesses.¹⁹ Es wird vermutet, dass die Geschlechtshormone, insbesondere Testosteron, für den Geschlechtsdimorphismus verantwortlich sind.^{19,20} In vorangegangenen Versuchen wurde bestätigt, dass Testosteron die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines Amöbenleberabszesses erhöht, indem kastrierte männliche Mäuse und weibliche Mäuse mit Testosteronsubstitution untersucht wurden.²⁰ Daraus resultierte, dass eine Kastrierung der männlichen Mäuse eine Senkung der Wahrscheinlichkeit für einen ALA zur Folge hatte.²⁰ Außerdem erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit für einen Amöbenleberabszess bei Weibchen, welche eine Testosteronsubstitution bekommen hatten.²⁰ Der Amöbenleberabszess ist auch größer in der männlichen Versuchsgruppe.²⁰ Zudem heilt der Amöbenleberabszess in weiblichen Tieren schneller ab als bei männlichen Tieren.²⁰ Während der ALA bei Weibchen innerhalb von 3 Tagen abheilt, können aus männlichen Lebern auch nach 14 Tagen noch lebensfähige Amöben isoliert werden.²⁰

2.2.3 Neutrophile Granulozyten während eines Amöbenleberabszesses

Während eines Amöbenleberabszesses lagern sich vor allem neutrophile Granulozyten um den Abszess herum an.²⁸ In mehreren Studien konnte bereits dargestellt werden, dass neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Pathogenen übernehmen.²⁸ Mit den in Abschnitt 2.1.2 dargestellten Methoden können neutrophile Granulozyten Einfluss auf die Ausbreitung der Amöben nehmen. Die Mechanismen zur Bekämpfung von Pathogenen können durch eine Stimulation mit Zytokinen, welche durch andere Immunzellen produziert werden, verstärkt werden.²⁸ Beispiele hierfür sind IFN- γ und TNF- α , welche von Lymphozyten und Makrophagen gebildet werden.²⁸ Allerdings ist die starke Immunreaktion der neutrophilen Granulozyten nicht immer vorteilhaft für den Wirt, sondern können bei übermäßiger Aktivierung zur Gewebeschädigung beitragen. Die neutrophilen Granulozyten sind die ersten Zellen, die mit den Amöben in Kontakt geraten und sich in der Leber ansammeln.²⁸ Im Verlauf der Infektion führt die amöbizide Wirkung der neutrophilen Granulozyten zu einer Schädigung des Lebergewebes.²⁸ Dem entsprechend ist eine Ausbildung eines Amöbenleberabszesses immer begleitet von einer Ansammlung von lysierten neutrophilen Granulozyten um den Abszess herum.²⁸ Dies ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

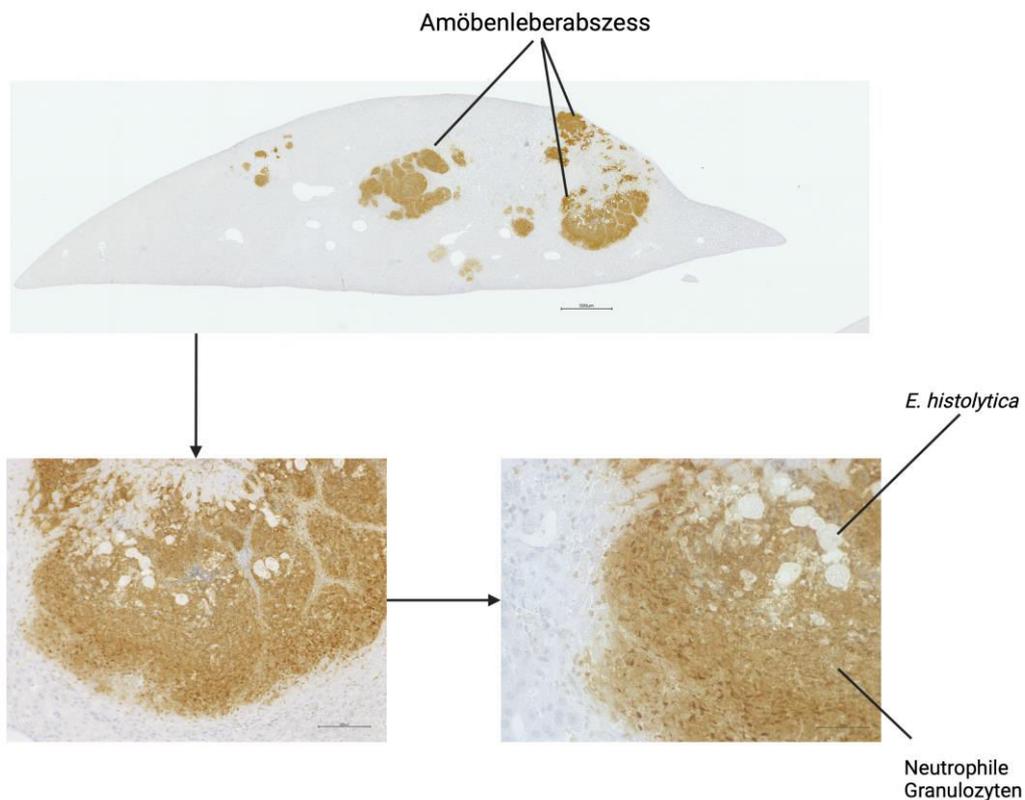


Abbildung 5: Histologische Färbung einer Leber drei Tage nach einer intrahepatischen Infektion mit *E. histolytica* Trophozoiten

Auf dieser Abbildung ist eine immunhistologische Färbung eines Leberquerschnitts drei Tage nach einer intrahepatischen Infektion mit *E. histolytica* abgebildet. Es handelt sich dabei um eine Färbung der neutrophilen Granulozyten mittels eines granulozyten-spezifischen Antikörpers. Zunächst ist der gesamte Leberquerschnitt zu sehen und darunter vergrößerte Aufnahmen eines Abszesses. Zu erkennen sind braune Bereiche im Lebergewebe. Dabei handelt es sich um zum Teil lysierte neutrophile Granulozyten, welche als Teil der angeborenen Immunreaktion nach einer Infektion an den Infektionsherd rekrutiert wurden. Umgeben von neutrophilen Granulozyten sind weiße Zellen. Dabei handelt es sich um die Amöben.

2.2.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede des angeborenen Immunsystems in Bezug auf neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten könne in der Maus anhand der Expression bestimmter Oberflächenmarker, CD11b und Ly6G, charakterisiert werden. In einer vorangegangenen Arbeit wurden die prozentualen Anteile an Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b⁺ Zellen im Blut, der Leber und im Knochenmark verglichen. Dazu wurden zum einen naive C57BL/6J Mäuse als auch C57BL/6J Mäuse verwendet, denen drei Tage zuvor intrahepatisch *E. histolytica* Trophozoiten injiziert wurden. Diese wurden anschließend gefärbt und mit einem Durchflusszytometer analysiert. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Die Ergebnisse des Versuches sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

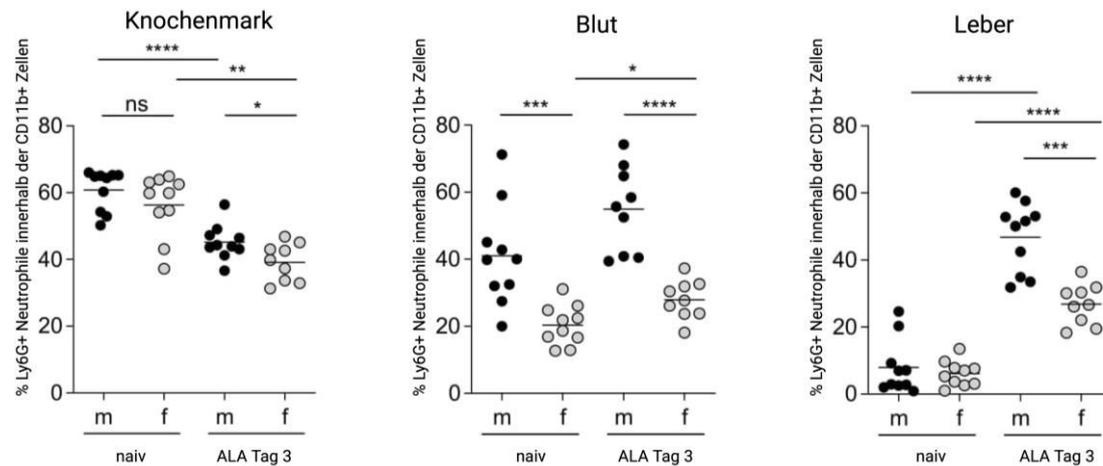


Abbildung 6: Prozentualer Anteil der Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b⁺ Zellen³

Aus den Versuchen resultierte, dass der prozentuale Anteil an Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b⁺ Zellen im Blut und der Leber während des Amöbenleberabszesses zunimmt. Nur im Knochenmark nimmt der prozentuale Anteil während der Infektion ab. Außerdem ist zu erkennen, dass der prozentuale Anteil bei männlichen Tieren stärker ansteigt.³

Anhand dieser Ergebnisse ist zu sehen, dass der prozentuale Anteil an Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten in männlichen Tieren stärker ansteigt als in weiblichen Tieren, nachdem der Amöbenleberabszess induziert wurde.³ Zudem weisen naive männliche Tiere im Blut einen signifikant höheren Anteil an Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten auf.³

Im Knochenmark ist das genaue Gegenteil zu beobachten. Nach der Induktion eines Amöbenleberabszesses, nimmt der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten im Knochenmark ab.³ Das liegt daran, dass sich im Knochenmark hauptsächlich unreife neutrophile Granulozyten befinden.²⁵ Während einer Infektion werden unreife neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark rekrutiert.²⁵ Sie gelangen in die Peripherie und somit zum Infektionsherd.²⁵ Während der Migration zum Infektionsherd werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert und werden zu reifen neutrophilen Granulozyten differenziert.²⁵ Dementsprechend steigen während einer Infektion die prozentualen Anteile an neutrophilen Granulozyten im Blut und der Leber.

2.3 Transkriptomanalyse

Eine effektive Methode zum Verständnis des Genexpressionsprofils in Zellen ist die RNA-Sequenzierung (*next generation sequencing*). Dabei werden aus mRNA-Sequenzen aller exprimierten Gene, welche unter den gewünschten Bedingungen gebildet werden, cDNA Bibliotheken hergestellt.²⁹ Diese können wiederum in informatische Daten umgewandelt werden.²⁹ So lässt sich die Genexpression sowie RNA-Expression der zu untersuchenden Zellen untersuchen.²⁹ Einige der bekanntesten Möglichkeiten der Darstellung der bioinformatischen Daten sind im Folgenden aufgeführt.

2.3.1 Hauptkomponentenanalyse

Als Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*) wird ein statistisches Verfahren bezeichnet, welches in diesem Fall dazu verwendet wurde, um darzustellen, wie nah die einzelnen Datensätze der biologischen Replikate beieinander liegen. Dadurch wird gewährleistet, dass die biologischen Replikate miteinander vergleichbar

sind und sich ähnlich verhalten. Eine beispielhafte Hauptkomponentenanalyse ist folgend abgebildet.

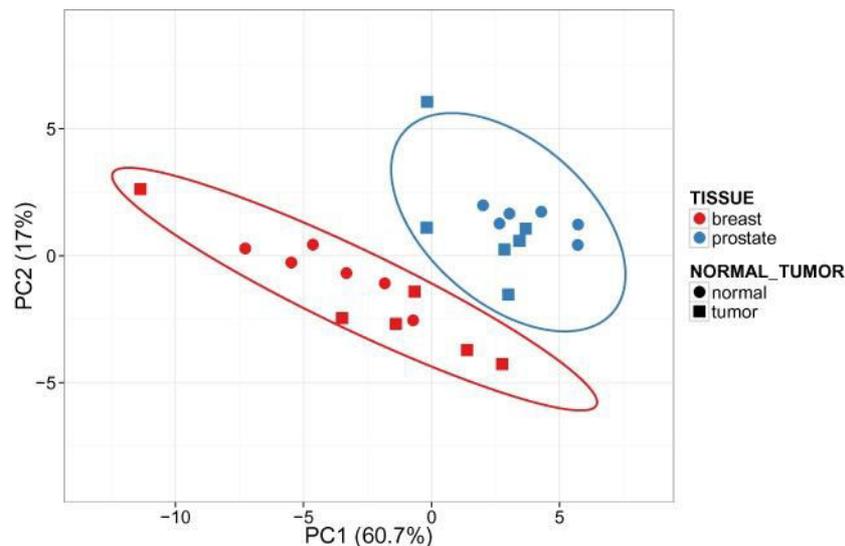


Abbildung 7: Beispielhafte Hauptkomponentenanalyse molekularer Merkmale in Stromazellen von Brust- und Prostatakrebsproben³³

Abgebildet ist eine Hauptkomponentenanalyse von Stromazellen, welche aus Brust- und Prostatakrebsproben isoliert wurden.³³ Punkte die nah beieinander sind, weisen ähnliche Merkmale auf und werden daher derselben Gruppe zugeordnet.

2.3.2 Heatmaps

Die einfachste Darstellungsmethode ist eine Heatmap. (Abbildung 7) Dabei wird die Expression bestimmter Gene in den einzelnen biologischen Proben miteinander verglichen.³⁰ Je höher die Expression eines Gens desto höher der sogenannte *Fold Change*.³⁰ Es ist üblich den $\log_2(\text{FC})$ anzugeben.²⁶ Da während der RNA-Sequenzierung mehrere zehntausend RNA-Sequenzen pro Probe untersucht werden, sind Fehler bei der Untersuchung unausweichlich.³⁰ Daher wurde die sogenannte *false discovery rate* eingeführt, welche in dieser Arbeit bei 0,05 liegt.³⁰ Bei der Berechnung der Signifikanzen der Ergebnisse wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied der Genexpression zwischen den Proben bei 95 % liegt.³⁰ Die restlichen 5 % sind falsch-positive Ergebnisse und werden mit eingerechnet.³⁰ Eine beispielhafte Heatmap ist im Folgenden dargestellt.

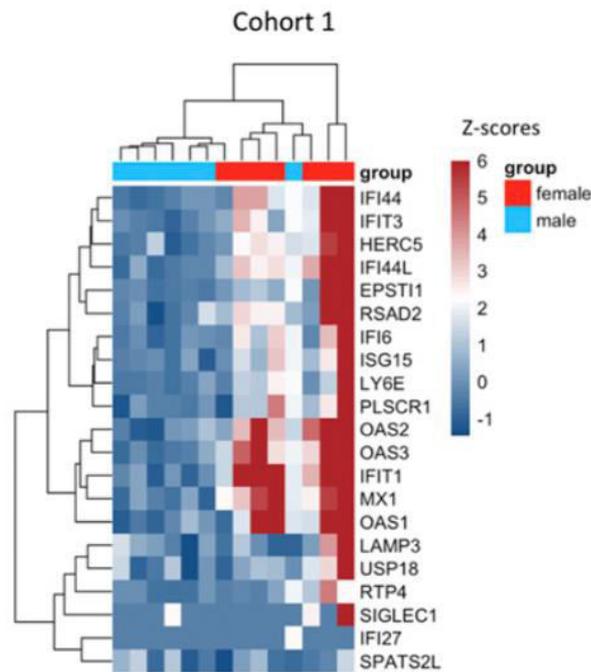


Abbildung 8: Beispielhafte Heatmap humaner männlicher und weiblicher neutrophiler Granulozyten¹²

In der Abbildung ist die Expression einiger Gene durch männliche und weibliche neutrophile Granulozyten dargestellt.¹² Die einzelnen Namen der Gene sind rechts neben jede Zeile geschrieben. Je dunkler die blaue Farbe der einzelnen Proben, desto geringer ist die Expression des Gens in der jeweiligen biologischen Probe.¹² Rote Felder bedeuten eine starke Expression des Gens in der biologischen Probe.¹²

2.3.3 Volcano-Plots

Eine weitere Darstellungsmethode ist der sogenannte *Volcano Plot*. Dabei werden zwei Gruppen miteinander verglichen.²⁶ In dem unten aufgeführten Beispiel für einen Volcano Plot wird die Genexpression weiblicher neutrophiler Granulozyten mit männlichen neutrophilen Granulozyten verglichen.¹² Auf der x-Achse ist der $\log_2(\text{FC})$ aufgetragen. Je höher dieser Wert, desto stärker wird das Gen von weiblichen neutrophilen Granulozyten exprimiert.¹² Je kleiner der Wert, desto stärker wird das Gen von männlichen neutrophilen Granulozyten exprimiert.¹² Auf der y-Achse ist die Signifikanz angegeben.²⁶ Je höher dieser Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Gen spezifisch von der betrachteten Gruppe exprimiert wird.¹²

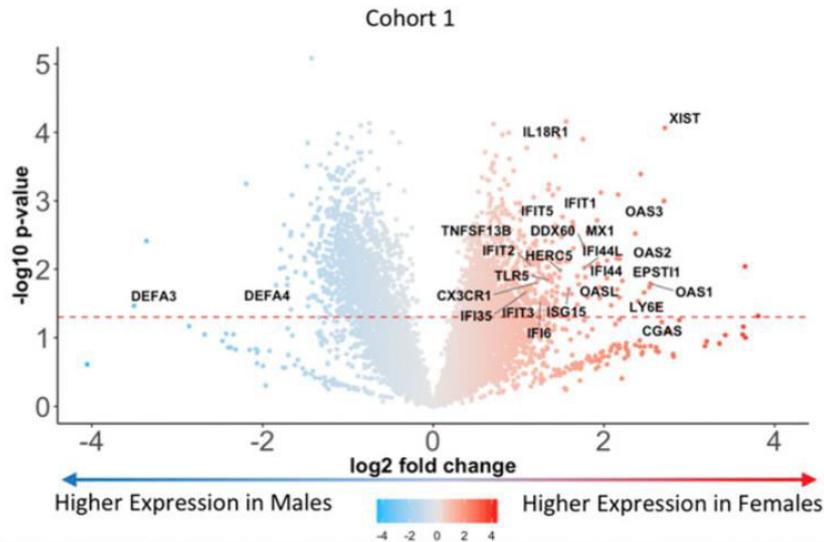


Abbildung 9: Beispielhafter Volcano Plot der Genexpression humaner männlicher und weiblicher neutrophiler Granulozyten¹²

Dargestellt ist das Verhältnis der Genexpression weiblicher neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu männlichen.¹²

2.3.4 Venn-Diagramm

Die letzte in dieser Arbeit verwendete Darstellungsform ist das Venn-Diagramm. Dabei handelt es sich um ein Mengendiagramm, welches in der Bioinformatik dazu genutzt wird, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Genexpression verschiedener Versuchsgruppen darzustellen.²⁷ Im Folgenden beispielhaften Venn Diagramm wurde die Hochregulation von *Brachypodium distachyon* Genen dargestellt.³¹ Die vier unterschiedliche Gruppen wurden zuvor verschiedenen Stresssituationen wie Hitze oder Kälte ausgesetzt.³¹ Die Anzahl an Genen, welche sich nicht mit anderen Gruppen überlappen, werden nur von der jeweiligen Gruppe exprimiert. Bezogen auf das Beispiel in Abbildung x werden 153 Gene nur von der Versuchsgruppe exprimiert, welche zuvor Kälte ausgesetzt wurde.³¹ Allerdings gibt es Überschneidungen in der Genexpression der Versuchsgruppe welche Kälte ausgesetzt wurde mit der Versuchsgruppe, welche Hitze ausgesetzt wurde.³¹ Einige der Gene werden von beiden Versuchsgruppen hochreguliert.³¹ In diesem Fall sind es sieben Gene.³¹

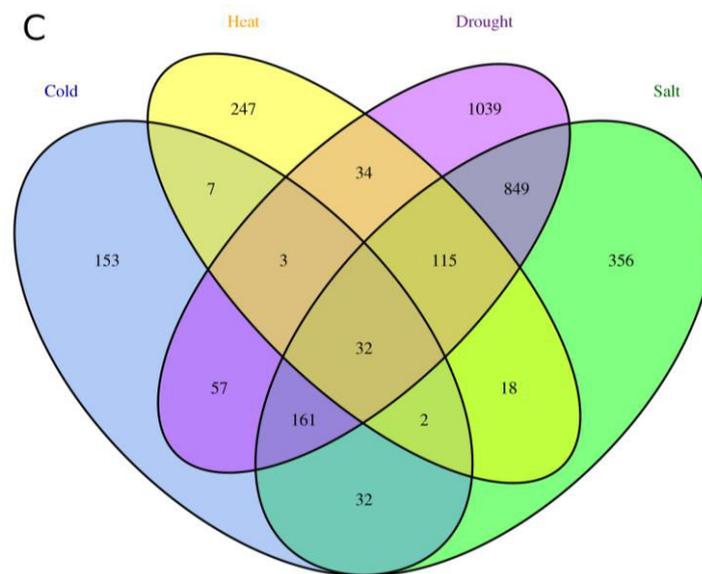


Abbildung 10: Beispielhaftes Venn Diagramm der Hochregulation von *Brachypodium distachyon* Genen nach Stressinduktion³¹

Abgebildet sind vier verschiedene Versuchsgruppen, welche unterschiedlichen Stresssituationen ausgesetzt wurden.³¹ Es sind Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Hochregulation von Genen nach Stressinduktion zu erkennen.³¹

2.4 Zielsetzung

Die Auswirkung der Zellen des angeborenen Immunsystems sind nicht immer vorteilhaft für den Organismus. Es konnte gezeigt werden, dass sich während einer hepatischen Infektion mit *E. histolytica* neutrophile Granulozyten und Monozyten um den Abszess herum anlagern und das Lebergewebe schädigen.²³ Die Schädigung des Gewebes führt zu einer deutlich stärkeren Ausprägungen des Amöbenleberabszesses.²³ Bei der Ausprägung des Amöbenleberabszesses konnte in vorangegangenen Arbeiten ein Geschlechtsdimorphismus beobachtet werden.²⁰ Es wurde gezeigt, dass männliche Mäuse größere Abszesse ausbilden und diese langsamer Verheilen im Vergleich zu weiblichen Mäusen.²⁰ Zudem können Zytokine, welche durch andere Zellen während eines Amöbenleberabszesses produziert werden, zum einen für die Bindung von neutrophilen Granulozyten an Orten der Entzündung und zum anderen Apoptose, Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung steuern. Um zu erforschen, welche Rolle neutrophile Granulozyten bei der Bildung und während eines Amöbenleberabszesses übernehmen ergibt sich folgende Zielsetzung für diese Bachelorarbeit.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Ausbildung des Amöbenleberabszesses im Mausmodell für die Erkrankung untersucht werden.

Dazu wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

- 1.) Die Isolierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blut männlicher und weiblicher C57BL/6J Mäuse vor und nach intrahepatischer Infektion mit *E. histolytica* HM1:IMSS, Klon B2*
- 2.) Die Isolierung von total RNA und anschließende Erstellung einer Transkriptomanalyse durch die BNI NGS Facility
- 3.) Auswertung der bioinformatischen Transkriptomanalyse

3. Material und biologische Proben

3.1 Mäuse

Für die Versuche wurden weibliche und männliche C57BL/6J Wildtyp Mäuse verwendet, die ausschließlich aus der Hauszucht des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin stammten. C57BL/6J Wildtyp Mäuse sind ein weitverbreiteter Inzuchtstamm von Labormäusen, die geno- und phänotypisch identisch sind. Das Alter der Mäuse betrug 8-12 Wochen. Die Tierversuche wurden in Zustimmung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Behörde Gesundheit und Verbraucher Schutz des Staats Hamburg hat die Experimente unter den Genehmigungsnummern N120/2020 bewilligt. Die Tötung der Mäuse erfolgte in der gewohnten Umgebung der Tiere durch das Einleiten von CO₂ unter Verwendung der Prallplatte nach Hackbarth mit anschließender Herzpunktion. Die Tötungen und Organentnahmen wurden von berechtigtem Personal durchgeführt.

3.2 Geräte

Die Geräte des alltäglichen Laborbedarfs sind nicht aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Biologische Sicherheitswerkbank	LaminAir® HB 2448	Heraeus Instruments
	MicroFlow M51426/5	Astec
Bioanalyser	2100 Bioanalyser	Agilent
Durchflusszytometer	FACSaria™ III	BD Biosciences
	BD™ LSRII	Becton Dickinson Biosciences
	BD Accuri™ C6 Plus Personal	BD Biosciences
Feinwaage	Kern410	Kern & Sohn GmbH
Magnetrührer (beheizt)	IKAMAG RET-GS	IKA-Labortechnik
Nanodrop	Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Pipetten (2 µL, 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Pipet-Lite XLS	Rainin
Pipettierhilfe	Cellmate II	Matrix
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Vortex-Schüttler	VF2	IKA-Labortechnik
Wasserbad	DC 10	Haake
Zentrifuge	Centrifuge 5424 R	Eppendorf
	Varifuge 3.0	Heraeus Sepatech
	Centrifuge 5810 R	Eppendorf

3.3 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien stammten von BioRad, Eppendorf, Merck KGaA, Thermo Fisher Scientific und Sarstedt, sofern es nachfolgend nicht anders beschrieben wurde.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
0,40 x 20 mm Einmal-Injektions-Kanüle	Braun
CellTrics™ 30 µL steril	Sysmex
CellTrics™ 70 µL steril	Sysmex
Einmalspritze (1 mL)	Braun
EDTA Probenröhrchen (1 mL)	KABE Labortechnik
Neubauer Zählkammer, <i>Neubauer-Improved</i>	Marienfeld Superior

3.4 Reagenzien

Sofern in Tabelle 3 nicht anders beschrieben wurden die verwendeten Reagenzien nach den in Tabelle 5 dargestellten Rezepten selbst hergestellt.

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien

Artikel	Hersteller
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Antisedan® (5 mg mL ⁻¹)	Orion Pharma
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG
Di-natrium-hydrogen-phosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG
DPBS	PAN-Biotech GmbH
Ethanol 100%	Merck KGaA
FCS	Capricorn Scientific
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Kalium-di-hydrogen-phosphat	Merck KGaA
<i>L-Glutamine</i> (200 mM)	Thermo Fisher Scientific
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Nuklease-freies Wasser	Qiagen
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific
RLT-Puffer	Qiagen
RDD-Puffer	Qiagen
RPE -Puffer	Qiagen
RPMI 1640 Medium, <i>no glutamine</i>	Thermo Fisher Scientific
Tris, <i>Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG
TRizol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Trypan Blue Solution 0,4 %	Thermo Fisher Scientific
Zombie UV™ dye	BioLegend

3.5 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Die zur Isolation der neutrophilen Granulozyten, während der durchflusszytometrischen Analyse verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4: Murine Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse

Murines Epitop	Klon	Wirtstier	Konjugiertes Fluorochrom	Hersteller
CD11b	M1/70	Ratte	AF488, <i>alexa fluor 488</i>	Thermo Fisher Scientific
Ly6C	HK1.4	Ratte	APC	BioLegend
	HK1.4	Ratte	PE	BioLegend
Ly6G	1A8	Ratte	APC	BioLegend
	1A8	Ratte	PE	BioLegend

3.6 Puffer und Medien

Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien und Puffer

Reagenz		Zusammensetzung	Hinweise
Antidot		0,9% NaCl-Lösung + 2,5 mg/kg KG Atipamezol	Aufhebung der Narkose während ALA-Operation
Antikörper Mastermix		FC-Block + 1:600 Ly6C PE + 1:300 Ly6G APC + 1:100 CD11b AF488	Für die Isolation von Neutrophilen aus murinem Blut
		FC-Block + 1:200 Ly6C APC + 1:400 Ly6G PE + 1:400 CD11b AF488	Für die Überprüfung der Anreicherung der Neutrophilen aus dem Knochenmark
DNase-Lösung		140 µL RDD-Puffer + 20 µL DNase	Reicht für 2 Proben
Erythrozyten-Lysepuffer	Teil A	0,16 M NH ₄ Cl	Am Versuchstag oder frühestens 3 Tage vor dem Versuchstag wurden die Teile A und B im Verhältnis 9:1 gemischt.
	Teil B	0,17 M Tris	
Komplettiertes RPMI		RPMI + 10 % FCS + 1% L-Glutamin +1 % Penicillin-Streptomycin	Haltbarkeit < 1 Monat
Narkose		0,9% NaCl-Lösung + 1 mg/kg KG Medetomidin + 75 mg/kg KG Ketamin	
PBS-Stammlösung (20x) (2 L Ansatz)		2 L ddH ₂ O + 8 g KCl + 8 g KH ₂ PO ₄ + 46 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O + 320 g NaCl	1 x PBS jeweils durch Verdünnen mit ddH ₂ O aus der 20 x PBS-Stammlösung hergestellt.

TY-Medium	4 L ddH ₂ O + 100 g Trypticase + 50 g Hefe + 50 g Glucose + 10 g NaCl + 3,8 g K ₂ HPO ₄ + 3,0 g KH ₂ PO ₄ + 5,0 g L-Cystein + 1,0 g Ascorbinsäure + 0,114 g Fe-Ammoniumcitrat	- Medium bei 4 °C lagern. - Haltbarkeit < 2 Wochen - pH-Wert auf 6,8 einstellen mit NaOH
TY-Medium (komplettiert)	430 mL TY-Medium + 50 mL Rinderserum + 15 mL Vitaminmix + 5 mL Penicillin-Streptomycin	

3.7 Verwendete Kits

Tabelle 6: Zusammensetzung und Name der verwendeten Kits

Hersteller	Name des Kits	Bestandteile
Qiagen	RNeasy® MinElute® Cleanup Kit	<ul style="list-style-type: none"> • RNeasy MinElute Säulen (1,5 mL; 2mL) • RLT-Puffer • RPE-Puffer • RNase-freies Wasser

4. Methoden

Anmerkung: Aufgrund fehlender fachlicher Qualifikation für einige der in diesem Kapitel beschriebenen Methoden, wurden die mit einem „“ markierten Methoden durch Arbeitskollegen durchgeführt, welche für die jeweiligen Methoden sowohl fachlich als auch tierschutzrechtlich qualifiziert sind.*

4.1 Organentnahme aus den C57BL/6J Mäusen*

4.1.1 Tötung und Blutentnahme aus den Mäusen*

Für die Analyse der neutrophilen Granulozyten wurden Immunzellen aus dem Blut von weiblichen und männlichen C57BL/6J Wildtyp Mäusen sowie C57BL/6J Mäusen welche drei Tage zuvor, nach der in Absatz 4.2 beschriebenen Methode, mit *E. histolytica* infiziert wurden, aufgereinigt. Das Alter der Mäuse betrug 8-14 Wochen. Durch das Einleiten eines CO₂/O₂ Gemisches unter Verwendung der Prallplatte nach Hackbarth mit anschließender Herzpunktion wurden die Mäuse getötet. Nach Fixierung der getöteten Mäuse wurde das Blut mittels Herzpunktion gewonnen, indem eine Kanüle direkt unter dem Sternum flach Richtung Herz geschoben und der Stempel der Spritze vorsichtig hochgezogen wurde. Das Blut wurde zügig in EDTA Röhrchen überführt und sofort durchmischt, sodass das gesamte EDTA am Rand des EDTA Röhrchens in Kontakt mit dem Blut kommen konnte. Sofern unter 300 µL Blut mittels der Herzpunktion gewonnen wurde, wurde die cervikale Dislokation zusätzlich zur sekundären Tötungsmethode durchgeführt.

4.1.2 Entnahme der Beine der Mäuse

Um neutrophile Granulozyten aus dem murinen Knochenmark aufzureinigen, wurden die Vorder- und Hinterbeine der Mäuse entnommen. Dazu wurden mit einer Schere Einschnitte in die Haut der Mäuse an den Beinen gemacht und die Haut in Richtung des Bauches gezogen, sodass diese nicht mit der Probe abgeschnitten wurde. Anschließend wurden die Beine mit einer Schere entfernt, indem der Knochen möglichst nah am Becken durchgeschnitten wurde und in kaltem PBS auf Eis gelagert.

4.2 Infektion der Mäuse mit *E. histolytica**

4.2.1 Kultivierung und Vorbereitung von *E. histolytica* für die Operation*

Für die Operation der Mäuse und die daraus folgende Infektion mit *E. histolytica* wurden jeweils einen Tag vor der Operation die Amöben vorbereitet. Dazu wurde eine gut bewachsene Amöbenkultur verwendet. Das TY-Medium, in dem die Amöben kultiviert werden, wurde größtenteils abgegossen, sodass nur ein geringes Restvolumen Medium in der Kulturflasche vorhanden war. Anschließend wurden die an der Gefäßwand festhängenden Amöben auf Eis durch Klopfen gelöst und im übrig gebliebenen TY-Medium resuspendiert. Die Amöbensuspension wurde in ein frisches 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm und 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Amöben im Rückfluss resuspendiert. Daraufhin wurden 10 µL der Suspension in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 990 µL TY-Medium vorgelegt wurde. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Konzentration der Amöbensuspension mit TY-Medium auf $1 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt und für die Operation verwendet.

4.2.2 Operation für die Infektion der C57BL/6J Mäuse mit *E. histolytica**

Bereits eine Stunde vor Beginn der Operation wurden die zu operierenden Mäuse in ihren Käfigen in den Operationsraum gestellt, sodass die Mäuse sich an die neue Umgebung gewöhnen konnten. Um die einzusetzende Menge an Narkose zu bestimmen, wurden die Mäuse einzeln gewogen. Die individuelle Menge Narkose wurde mit einer Spritze interperitoneal injiziert, während die Maus von einer weiteren Person fixiert wurde. Der Zeitpunkt wurde notiert und ein Zeitlimit von 45 Minuten für die restliche Operation festgelegt, um sicherzustellen, dass die Mäuse in Narkose bleiben. Sobald die Mäuse sich nicht mehr bewegten, wurden diese auf eine Wärmeplatte gelegt, welche auf 37 °C eingestellt war. Zusätzlich wurde auf die Augen der Mäuse eine Augencreme appliziert, sodass sie nicht austrocknen. Nach 5-10 Minuten wurden die Mäuse auf den Rücken gedreht und der Bauch mit einer Iod-Lösung eingerieben. Als abschließende Kontrolle der Wirkung der Narkose wurde der Zwischenzeh-Reflex der Mäuse überprüft. Sobald festgestellt wurde, dass die Narkose wirkt, wurde die Operation begonnen. Es wurde eine Laparotomie durchgeführt und das Loch vorsichtig mit einer atraumatischen Pinzette vergrößert. Die Leber wurde freigelegt, indem die Bauchdecke entlang der *Linea Alba* vorsichtig aufgeschnitten wurde, sodass es nicht blutete. Daraufhin wurden 20 µL der eingestellten Amöbensuspension direkt in die Leber der Maus gespritzt. In 20 µL der Amöbensuspension sind $2 \cdot 10^5$ Amöben enthalten. Abschließend wurde die Bauchdecke mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen und die äußere Haut mit einer Klammer verschlossen. Die Mäuse wurden, nachdem die 45 Minuten vorbei waren, mit Antisedan wachgespritzt und zurück in den Käfig gelegt.

4.2.3 Kontrolle der Abszesse nach der Operation

Drei Tage nach der Operation, welche zu einer Infektion der Mäuse mit *E. histolytica* führte, wurde die Organentnahme bzw. die Blutabnahme durchgeführt. Zur Kontrolle, ob die Infektion erfolgreich war, wurden nach der Blutabnahme die Amöbenleberabszesse auf den Lebern der Mäuse untersucht. Es wurde jeweils die Größe, Form und das Vorhandensein eines Abszesses beobachtet und notiert. Das Blut der Mäuse bei denen sich kein Abszess gebildet oder bei denen sich ein Infarkt gebildet hatte, wurde nicht für den weiteren Versuchsverlauf benutzt. Ein Infarkt wurde an der abweichenden Form des Abszesses erkannt. Der Infarkt bildet sich nur oberflächlich auf der Leber, während der Amöbenleberabszess tief in das Lebergewebe eindringt.

4.3 Isolation neutrophiler Granulozyten aus murinem Blut

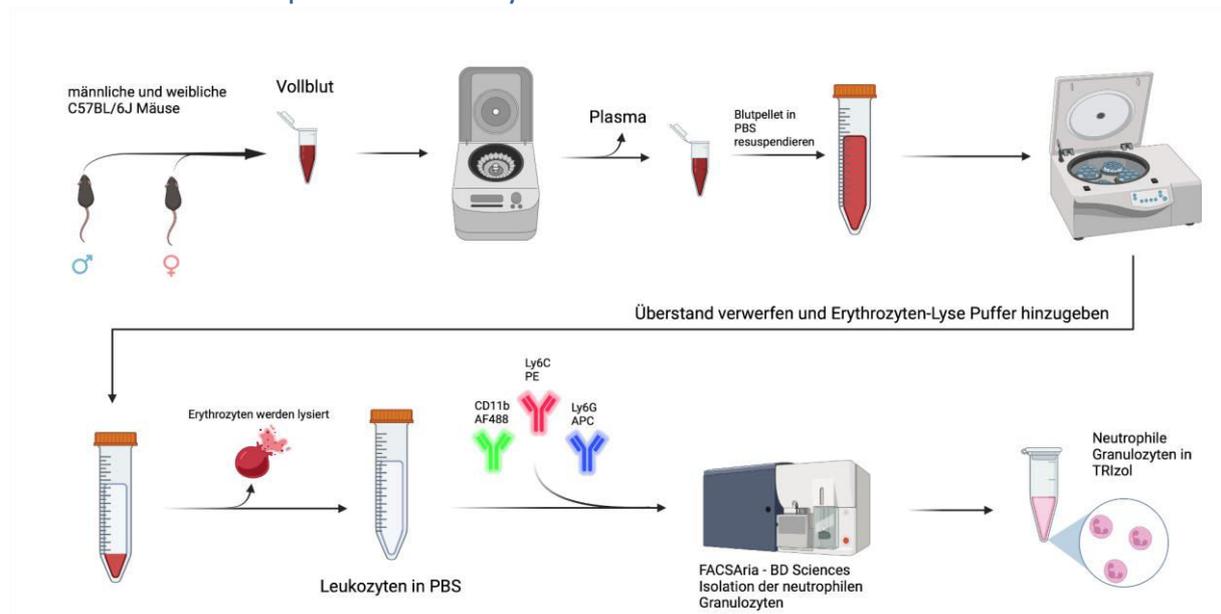


Abbildung 11: Versuchsablauf der Isolation von murinen neutrophilen Granulozyten. Naiven männlichen und weiblichen C57BL/6J Mäusen wurde Blut mittels einer Herzpunktion entnommen. Anschließend wurde das Blutplasma verworfen und das Pellet aufgereinigt u.a. durch eine Lyse der Erythrozyten. Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und mit dem Durchflusszytometer FACSARIA™ (Hergestellt von der Firma BD Sciences) sortiert. Die sortierten neutrophilen Granulozyten wurden in TRIzol aufgenommen und bis zur RNA-Isolation bei -80°C eingefroren. Erstellt mit einer lizenzierten Version von BioRender.

4.3.1 Aufreinigung der Leukozyten

Zur Isolation der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut wurden zunächst die Leukozyten aus der Blutprobe aufgereinigt. Dazu wurden die Blutproben in den EDTA Röhrchen bei 4°C und 3000 rpm für 5-10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand der Blutprobe, das Blutplasma, mittels einer 200 µL Pipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Blutpellet wurde mit einer 200 µL Pipette in 15 mL Falcon Röhrchen überführt, in dem bereits 10 mL kaltes PBS vorgelegt wurden. Die Falcons wurden geschüttelt und bei 4 °C und 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Blutpellet wurde mit 5 mL Erythrozyten-Lysepuffer versetzt, welches bis zur Verwendung im 37 °C Wasserbad gewärmt wurde. Anschließend wurde 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Durch

regelmäßiges Invertieren des Falcons während der Inkubation wurden die Proben durchmischt. Die Reaktion wurde nach exakt 5 Minuten durch die Zugabe von mindestens 7 mL PBS gestoppt. Dazu wurde das Falcon mit PBS aufgefüllt und geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

In vorangegangenen Versuchen wurde festgestellt, dass nicht genügend neutrophile Granulozyten für die folgenden Versuche im Blut einer Maus vorhanden sind. Daher wurden an dieser Stelle die Blutpellets von 4-5 gleichgeschlechtlichen Mäusen zu einer biologischen Probe zusammengeführt (gepoolt).

Nach dem poolen der Proben wurden Waschschrte mit PBS durchgeführt. Dazu wurde 10 mL PBS in die Falcon Röhrchen mit den gepoolten Blutpellets gegeben und durch Schütteln durchmischt. Die Proben wurden bei 4°C und 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschvorgang wurde so lange wiederholt, bis das Blutpellet leicht rosa-weiß war (ca. 2-3 Waschschrte).

4.3.2 Färbung für die durchflusszytometrische Analyse

Für das Sortieren der neutrophilen Granulozyten wurden die Leukozyten mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Dazu wurde nach Tabelle 5 ein Antikörper-Mastermix angesetzt. Die Blutproben wurden bei 4°C und 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde jeweils 200 µL Antikörper-Mastermix hinzu pipettiert. Die Proben wurden kurz gevortext und für 20 Minuten bei 4°C dunkel inkubiert. Die Inkubation wurde nach exakt 20 Minuten durch die Zugabe von 5 mL PBS unterbrochen. Die Proben wurden bei 4°C und 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 5 mL PBS resuspendiert und durch ein 30 µL Zellsieb in ein frisches 15 mL Falcon Röhrchen gegeben. Das Zellsieb wurde mit 5 mL frischem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die gefilterten Zellen bei 4°C und 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Großteil des Überstands wurde abgenommen und verworfen, sodass nur noch etwa 1 mL Überstand im Falcon Röhrchen übrig war. Das Pellet wurde im Überstand resuspendiert und anschließend mit dem FACSria™ III sortiert.

4.3.3 Durchflusszytometrische Analyse*

Zur Isolation der neutrophilen Granulozyten aus den aufgereinigten Leukozyten wurde das Durchflusszytometer FACSria™ III von BD Biosciences verwendet. Das FACSria™ III konnte mittels des Vorwärts- (FSC) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) die Größe und Granularität jeder einzelnen Zelle ermitteln. Das Durchflusszytometer verfügte zudem über vier verschiedene Laser, mit denen die eingesetzten Fluorochrome mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden konnten und somit die Detektion von Oberflächenmolekülen ermöglichten. Für das Sortieren der Zellen wurden die Zellen in den Blutpellet mit spezifischen Antikörpern gefärbt, an die spezifische Fluorochrome gebunden waren (Tabelle 4). Die Messküvette des FACSria™ III ermöglichte die Bestrahlung einzelner Zellen aus den Proben mit den verschiedenen Lasern. An die neutrophilen Granulozyten wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper Ly6C PE und Ly6G APC gebunden. Aufgrund der an die Antikörper gebundenen Fluorochrome, welche durch die Laser angeregt wurden, konnten die neutrophilen Granulozyten erkannt werden, da diese Licht mit einer spezifischen Wellenlänge emittierten. Die Sortierten neutrophilen Granulozyten wurden in ein neues 15 mL Falcon Röhrchen gefüllt. In das 15 mL Falcon wurde zuvor 1 mL cRPMI vorgelegt und das Röhrchen wurde über Nacht bei 4°C gerollt.

4.3.4 Aufnahme der neutrophilen Granulozyten in TRIzol

Nach dem Sortieren der Zellen im FACSaria™ III wurden die neutrophilen Granulozyten, welche sich in cRPMI befanden, auf Eis gelagert. Die Proben wurden bei 4°C und 1500 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µL warmen TRIzol resuspendiert, welches zuvor im 37°C Wasserbad erwärmt wurde. Die in TRIzol resuspendierten Zellen wurden in ein frisches RNase-freies 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

4.4 RNA Isolation mit RNEasy MinElute Kit

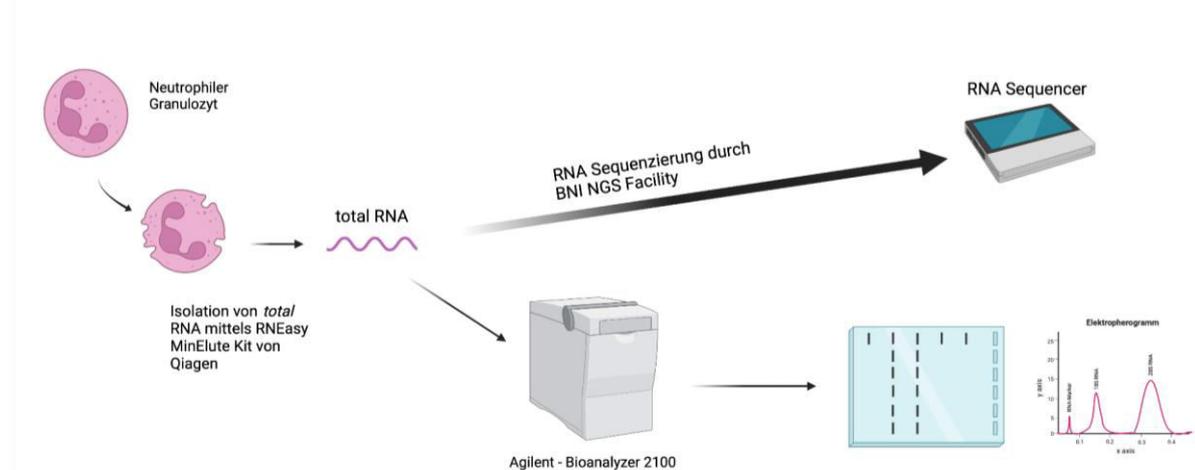


Abbildung 12: Isolation der total RNA aus murinen neutrophilen Granulozyten

Die total RNA der in TRIzol aufgenommenen neutrophilen Granulozyten wurde mit dem RNEasy MinElute Kit aufgereinigt. Anschließend wurde die Qualität und die Menge der RNA am Bioanalyzer 2100 überprüft. Sofern die Werte gut waren, wurden die RNA-Proben in die BNI NGS Facility gebracht. Abschließend wurden die Proben sequenziert und die Ergebnisse ausgewertet. Erstellt mit einer lizenzierten Version von BioRender.

Für die Isolation der RNA wurden eine 70%ige und 80%ige Ethanol-Lösung angesetzt. Diese wurden zusätzlich während des Ansatzes steril filtriert. Die gesamten folgenden Versuchsschritte in diesem Abschnitt wurden unter einer Sicherheitswerkbank mit angeschaltetem Abzug durchgeführt.

Die Zellen wurden aus der -80 °C Kühlzelle entnommen und auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden die Zellen 1:5 mit Chloroform versetzt (100 µL Chloroform bei 500 µL TRIzol) und gevortext. Anschließend wurden die Zellen 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 4°C und 12000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Nach diesem Schritt befanden sich zwei Phasen in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Die obere Phase, die Chloroform-Phase, wurde vorsichtig in ein frisches RNase freies 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Das Volumen der Chloroform-Phase wurde mittels einer 1000 µL Pipette bestimmt und 1:1 70%iges Ethanol hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext. Nun wurden das gesamte Probenvolumen auf eine MinElute Säule aus dem RNEasy MinElute Kit von Qiagen gegeben. Die Säulen wurden zuvor auf frische RNase freie 2 mL Eppendorf-

Reaktionsgefäße gestellt und wurden bei Raumtemperatur und 8000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und 350 µL RW1-Puffer auf die Säule gegeben und für weitere 15 Sekunden bei 8000 g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule auf ein frisches RNase freies 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. Der DNA-Verdau wurde nun durchgeführt, indem 80 µL einer DNase-Lösung mittig auf die Säule pipettiert wurde. Die Proben wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 350 µL RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und die Proben bei 8000 g und bei Raumtemperatur für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. Daraufhin wurden 500 µL RPE-Puffer auf die Säule gegeben und die Proben bei 8000 g und bei Raumtemperatur für 15 Sekunden zentrifugiert. Erneut wurde der Durchfluss verworfen und 500 µL 80%iges Ethanol auf die Säule pipettiert. Die Proben wurden für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säulen wurden auf neue RNase freie 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße gesetzt und für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur mit offenem Deckel zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule auf ein frisches RNase freies 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und 20 µL Nuklease-freies Wasser mittig auf die Säule gegeben. Die Proben wurden für eine Minute inkubiert und danach bei 21 130 g und bei Raumtemperatur für 2 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde das Filtrat (enthält RNA) mit einer Pipette aufgenommen und nochmal auf die Säule gegeben. Die Probe wurde bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur für 2 Minuten zentrifugiert.

Aus jeder Probe wurde ein 2-3 µL Aliquot für den Bioanalyser entnommen, in ein frisches RNase freies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und zusammen mit den Proben bei -80 °C eingefroren.

4.5 Analyse der Qualität und Menge der RNA

4.5.1 RNA Analyse am Nanodrop 2000

Der Nanodrop 2000 ist ein Spektralphotometer. Das Gerät ermöglicht eine Bestimmung der RNA-Konzentration in der Probe und berechnet zugleich die Extinktionsverhältnisse $OD_{260/280}$ und $OD_{260/230}$. Der Wert $OD_{260/280}$ dient zur Bestimmung der Reinheit der RNA. Die RNA absorbiert Licht der Wellenlänge 260 nm, während bei etwa 280 nm Substanzen wie Phenol, Proteine oder andere ungewünschte Substanzen Licht absorbieren. RNA gilt als rein, wenn das Extinktionsverhältnis 260 nm zu 280 nm bei etwa 2,0 liegt. Der Wert $OD_{260/230}$ vergleicht die Extinktion von RNA bei 260 nm zu Substanzen wie Ethanol, EDTA und Zucker, welche bei 230 nm Licht absorbieren. Der Wert dient auch zur Bestimmung der Reinheit der RNA und liegt im Idealfall zwischen 1,8-2,2. Für die Messung wurde 1 µL der Probe benötigt, sowie Nuklease-freies Wasser als Blindwert.

4.5.2 RNA Analyse am 2100 Bioanalyser

4.5.2.1 Vorbereitungen

Für die Analyse der Proben am Bioanalyser wurden die Proben aus der -80 °C Kühlzelle entnommen und auf Eis aufgetaut. Das Konzentrat zur Färbung der RNA wurde aus dem Kühlschranks entnommen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgewärmt.

Zunächst wurde das Gel angefertigt. Dazu wurde 550 µL der RNA Gel Matrix auf einen Filter in einem 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bei 1500 g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Es wurden Aliquots des Gels hergestellt,

indem jeweils 65 μL des filtrierte Gels in neue RNase freie 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert wurde. Sobald das Konzentrat zur Färbung der RNA Raumtemperatur erreicht hatte, wurde es für 10 Sekunden gevortext und kurz herunterzentrifugiert. Anschließend wurde 1 μL des Konzentrates in das Eppendorf-Reaktionsgefäß, welches das Gel-Aliquot enthält, pipettiert. Die Lösung wurde gevortext und für 10 Minuten bei 13000 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

4.5.2.2 Beladen des RNA Chips mit den vorbereiteten Lösungen

Zum Beladen des RNA Chips wurde ein frischer Chip auf die Belade-Station gelegt und 9 μL der Gel-Färbe-Lösung in das Well mit der weißen Aufschrift „G“ pipettiert. Anschließend wurde der Stempel der Spritze der Belade-Station soweit rausgezogen bis er genau auf 1 mL stand, die Belade-Station geschlossen und der Stempel soweit runtergepresst bis dieser in der Klemme eingerastet ist. Nach exakt 30 Sekunden wurde die Klemme gelöst, weitere 5 Sekunden gewartet und der Stempel wieder in die 1 mL Position gezogen. Die Belade-Station wurde geöffnet und jeweils 9 μL der Gel-Färbe-Lösung in die beiden Wells mit der schwarzen Aufschrift „G“ pipettiert. In das Well mit der Aufschrift „CS“ wurde 9 μL der Lösung zur Aufarbeitung der RNA pipettiert und 5 μL des RNA-Markers in alle 11 Wells für die Proben, sowie das Well „RNA-Ladder“ vorgelegt.

4.5.2.3 Beladen des RNA Chips mit den Proben

Die Proben wurden im Thermomixer bei 70 °C für 2 Minuten denaturiert. Mit derselben Methode wurde die RNA-Ladder denaturiert, dabei handelt es sich um einen Größenmarker mit unterschiedlich großen RNA Fragmenten. In das Well „RNA-Ladder“ wurde 1 μL der denaturierten RNA-Ladder pipettiert und in die 11 anderen Wells für die Proben wurde jeweils 1 μL der Probe pipettiert. Der gesamte Chip wurde abschließend für 1 Minute bei 2400 rpm geschüttelt und daraufhin in den Bioanalyser gestellt und vermessen.

4.6 RNA-Sequenzierung*

Die RNA-Sequenzierung wurde in der Abteilung Arbovirologie und Entomologie des Bernhard-Nocht-Instituts durch Dr. Dániel Cadar durchgeführt.

4.7 Bioinformatische Analyse

Die bioinformatische Analyse wurde im Zentrum für molekulare Neurobiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) durch Dr. Malte Borggrewe und Dr. Sonja Hänzelmann durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten in murinem Blut

Um die RNA aus murinen neutrophilen Granulozyten zu erhalten, wurden zunächst die neutrophilen Granulozyten aus C57BL/6J Mäusen isoliert. Dazu wurden vier Versuchsgruppen eingesetzt. Zum einen die naiven männlichen und weiblichen Tiere und zum anderen männliche und weibliche Tiere, welche drei Tage zuvor intrahepatisch

mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert wurden. Jede Versuchsgruppe bestand aus vier biologischen Proben.

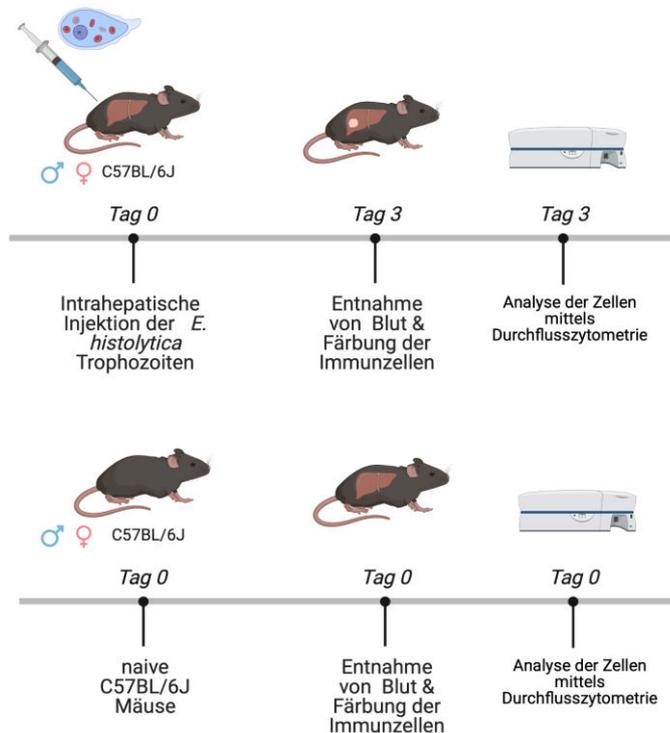


Abbildung 13: Vier Versuchsgruppen, die für die folgenden Versuche verwendet wurden

Für die nachfolgenden Versuche wurden vier Versuchsgruppen eingesetzt. Als Kontrollgruppen wurden naive männliche und weibliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Die beiden anderen Gruppen bestanden aus weiblichen und männlichen C57BL/6J Mäusen, welche drei Tage zuvor mit *E. histolytica* infiziert wurden. Erstellt mit einer lizenzierten Version von BioRender.

Um die neutrophilen Granulozyten von den restlichen Blutzellen zu trennen, wurde die folgende Gating-Strategie angewandt. Zunächst wurden die Zellen nach ihren Oberflächeneigenschaften sortiert. Dazu wurde das Seitwärtsstreulicht SSC-A gegen das Vorwärtsstreulicht FSC-A aufgetragen und alle Zellen bis auf die Lymphozyten ausgeschlossen. Je höher der Wert des SSC-A, desto höher die Granularität der Zelle. Je höher der Wert des FSC-A, desto größer ist die Fläche der Zelle. Daraufhin wurde das FSC-H, also die Höhe der Zellen, gegen das FSC-A aufgetragen. Hier wurden die einzeln vorliegenden Zellen, sogenannte *single cells*, ausgewählt. Im dritten Schritt wurden erstmals die fluorochrom-gekoppelten Antikörper zum Sortieren verwendet. Es wurden alle CD11b⁺ Zellen ausgewählt. Dazu zählen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Um die neutrophilen Granulozyten von den restlichen Zellen zu trennen, wurde Ly6C gegen Ly6G aufgetragen. Abschließend wurden die Ly6C⁺ und Ly6G⁺ Zellen, also die neutrophilen Granulozyten, ausgewählt.

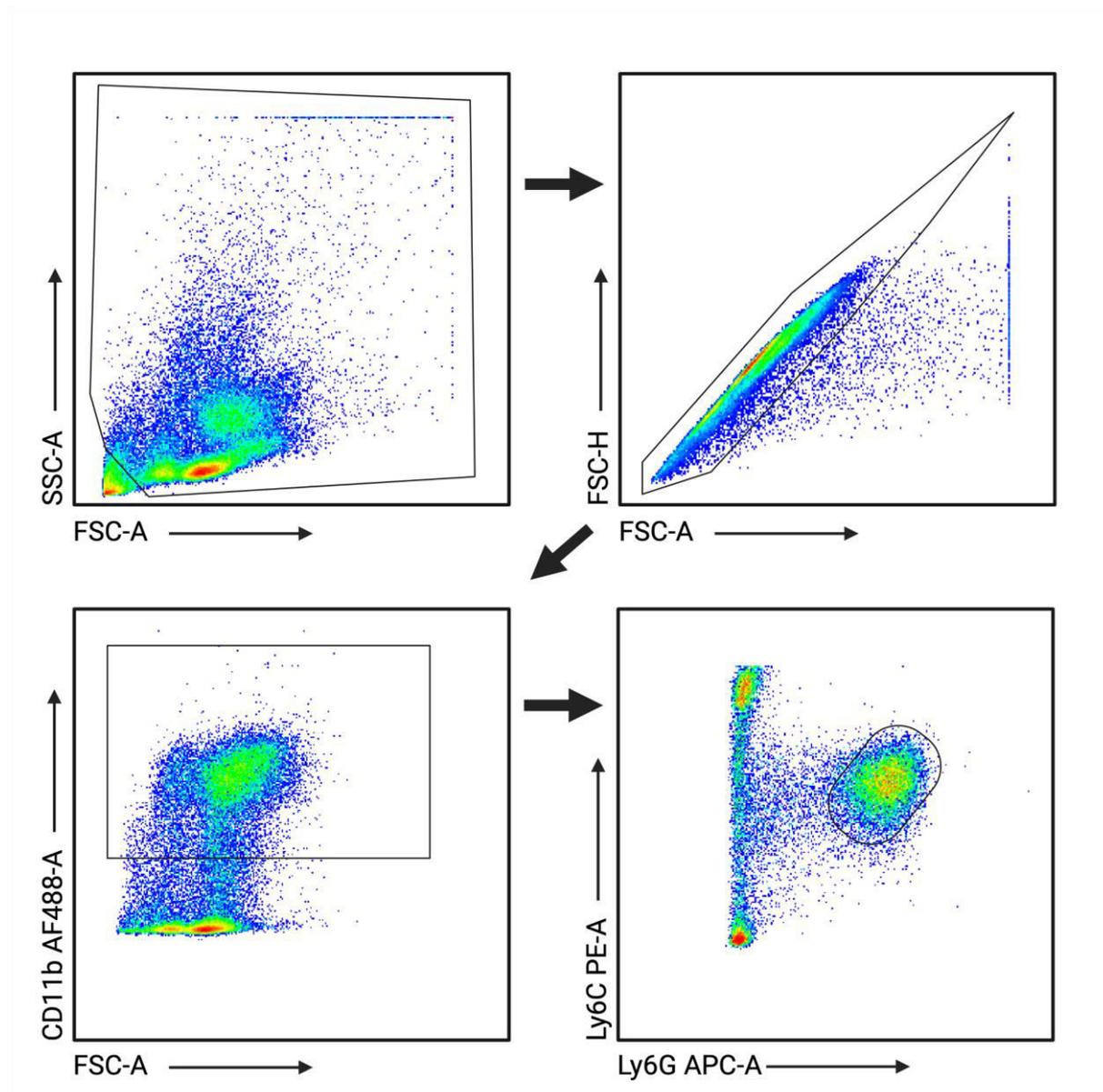


Abbildung 14: Gating Strategie zum Abtrennen von neutrophilen Granulozyten von den restlichen Zellen

Erst wurden die Oberflächeneigenschaften der Zellen zum Sortieren verwendet. Indem das SSC-A (Granularität) gegen das FSC-A (Fläche) aufgetragen wurde, konnten die Lymphozyten isoliert werden. Anschließend wurde das FSC-H (Höhe) gegen das FSC-A (Fläche) aufgetragen und die Einzelzellen ausgewählt. Um die Monozyten, Granulozyten und Makrophagen von den restlichen Zellen zu trennen, wurden alle CD11b⁺ Zellen ausgewählt. Abschließend wurden die neutrophilen Granulozyten (Ly6C⁺, Ly6G⁺) ausgewählt.

Bereits während der Isolationsversuche wurde beobachtet, dass die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in männlichen Tieren höher war als in Weibchen. Anhand der Daten, die durch das FACSAria während des Sortierens gesammelt wurden, wurde die durchschnittliche Anzahl an neutrophilen Granulozyten pro Tier berechnet werden.

Tabelle 7: Durchschnittliche Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Tier im Blut

Probenname	Anzahl Tiere pro Probe	Gesamtanzahl neutrophiler Granulozyten	Durchschnittliche Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Tier
ALA m BP1	4	834 515	208 629
ALA m BP2	3	576 547	192 182
ALA m BP3	3	616 973	205 658
ALA m BP4	4	818 417	204 604
ALA w BP1	9	832 588	92 510
ALA w BP2	18	577 372	32 076
ALA w BP3	9	602 781	66 976
ALA w BP4	19	425 385	22 389
WT m BP1	5	670 979	134 196
WT m BP2	6	526 284	87 714
WT m BP3	7	446 878	63 840
WT m BP4	12	666 391	55 533
WT w BP1	24	1 013 963	42 248
WT w BP2	24	771 427	32 143
WT w BP3	20	678 302	33 915
WT w BP4	12	615 629	51 302

In den folgenden Darstellungen wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b⁺ Zellen dargestellt. Zunächst der Vergleich zwischen naiven männlichen und weiblichen Mäusen und darauffolgend bei männlichen und weiblichen Mäusen mit Amöbenleberabszess.

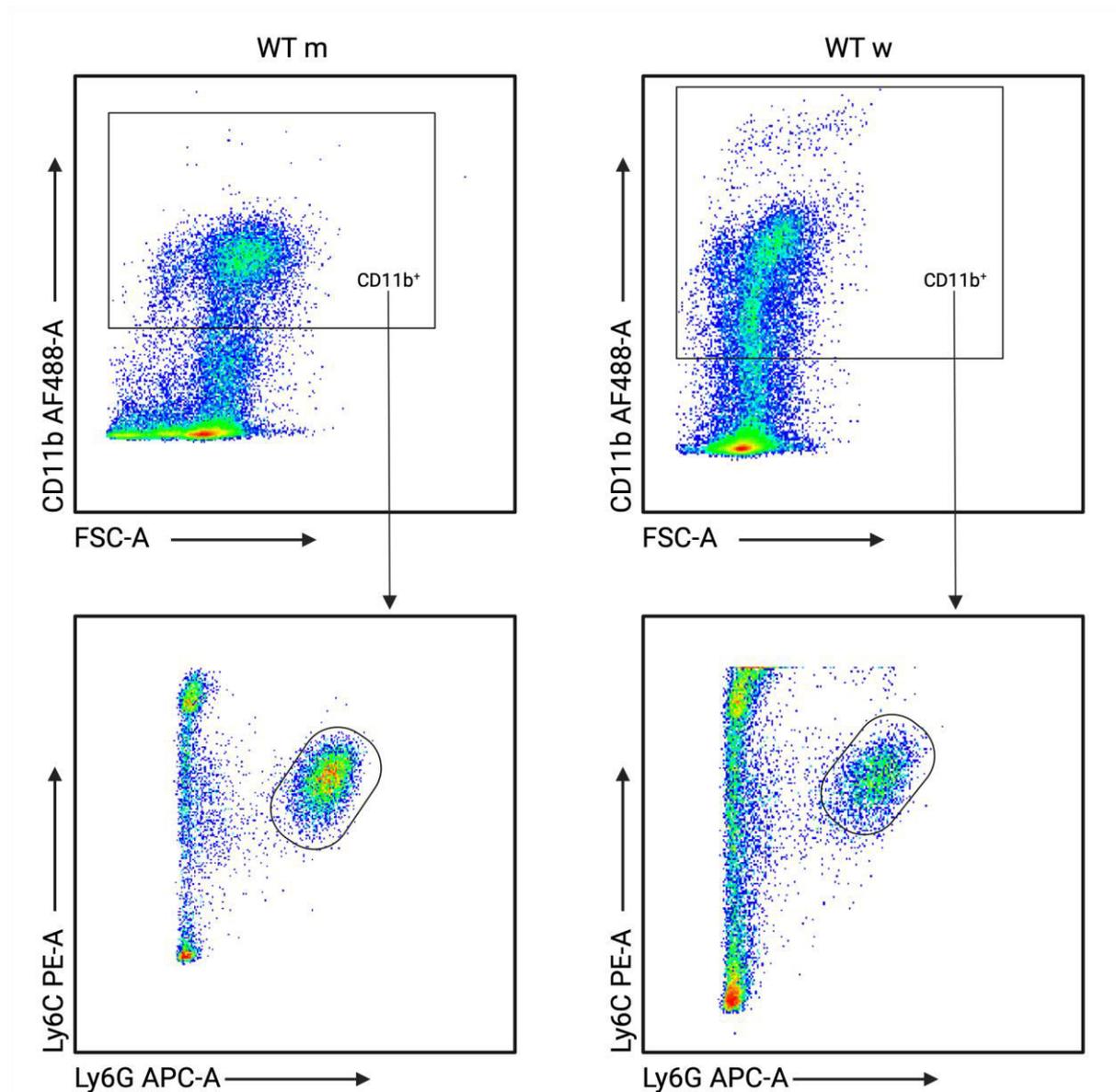


Abbildung 15: Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten aus allen CD11b⁺ Zellen bei naiven Tieren im Blut

In dieser Darstellung ist die Anzahl an neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b⁺ Zellen (Makrophagen, Granulozyten und Monozyten) dargestellt. Auf der linken Hälfte befindet sich eine naive männliche Probe und auf der rechten Hälfte eine naive weibliche Probe. In beiden Fällen wurde die in Abbildung 13 dargestellte Gating-Strategie angewendet.

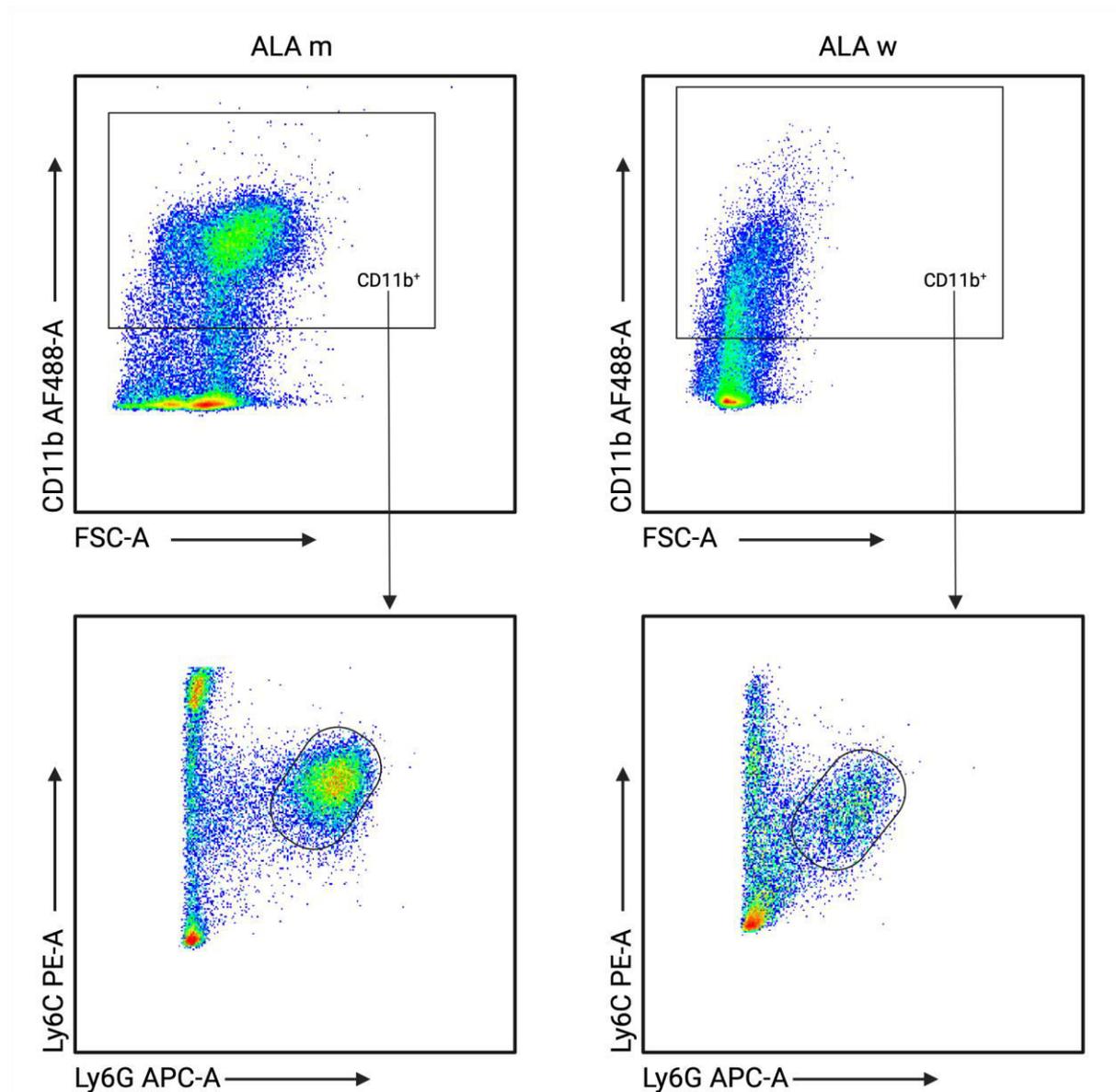


Abbildung 16: Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten aus allen CD11b⁺ Zellen während einer Infektion mit *E. histolytica* im Blut

In der Abbildung sind jeweils die letzten zwei Gates der in Abbildung 13 entwickelten Gating-Strategie dargestellt. Links befindet sich eine männliche Probe und rechts eine weibliche Probe. Die Proben wurden aus C57BL/6J Mäusen generiert, welche drei Tage zuvor mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert wurden.

Sowohl bei den naiven Tieren als auch bei den Tieren mit Amöbenleberabszess, ist die Zelldichte der Neutrophilen-Population höher in den männlichen Tieren.

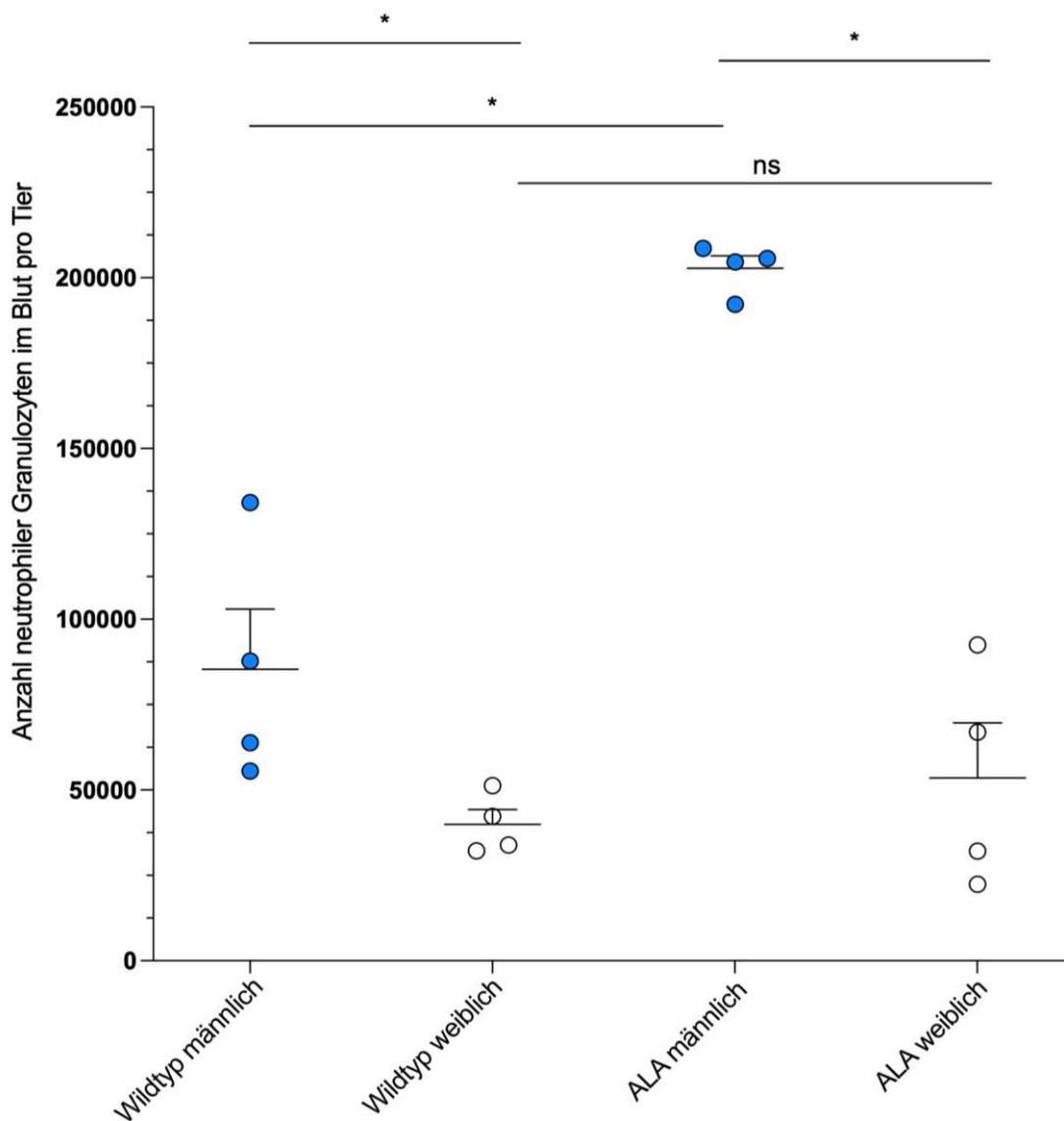


Abbildung 17: Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten aus allen CD11b⁺ Zellen bei allen biologischen Proben im Blut

Dargestellt ist die durchschnittliche Gesamtanzahl an neutrophilen Granulozyten pro Tier in allen 16 biologischen Proben. Zu erkennen ist, dass die Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blut in naiven Tieren geringer ist im Vergleich zu Tieren mit Amöbenleberabszess. Außerdem liegt die durchschnittliche Anzahl an neutrophilen Granulozyten in männlichen Tieren über der Gesamtanzahl in Weibchen. Der Anstieg der Menge an neutrophilen Granulozyten im Blut während einer Infektion mit *E. histolytica* ist deutlich stärker in Männchen. Die Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U Tests ermittelt. (ns=no significance; * $p < 0,05$)

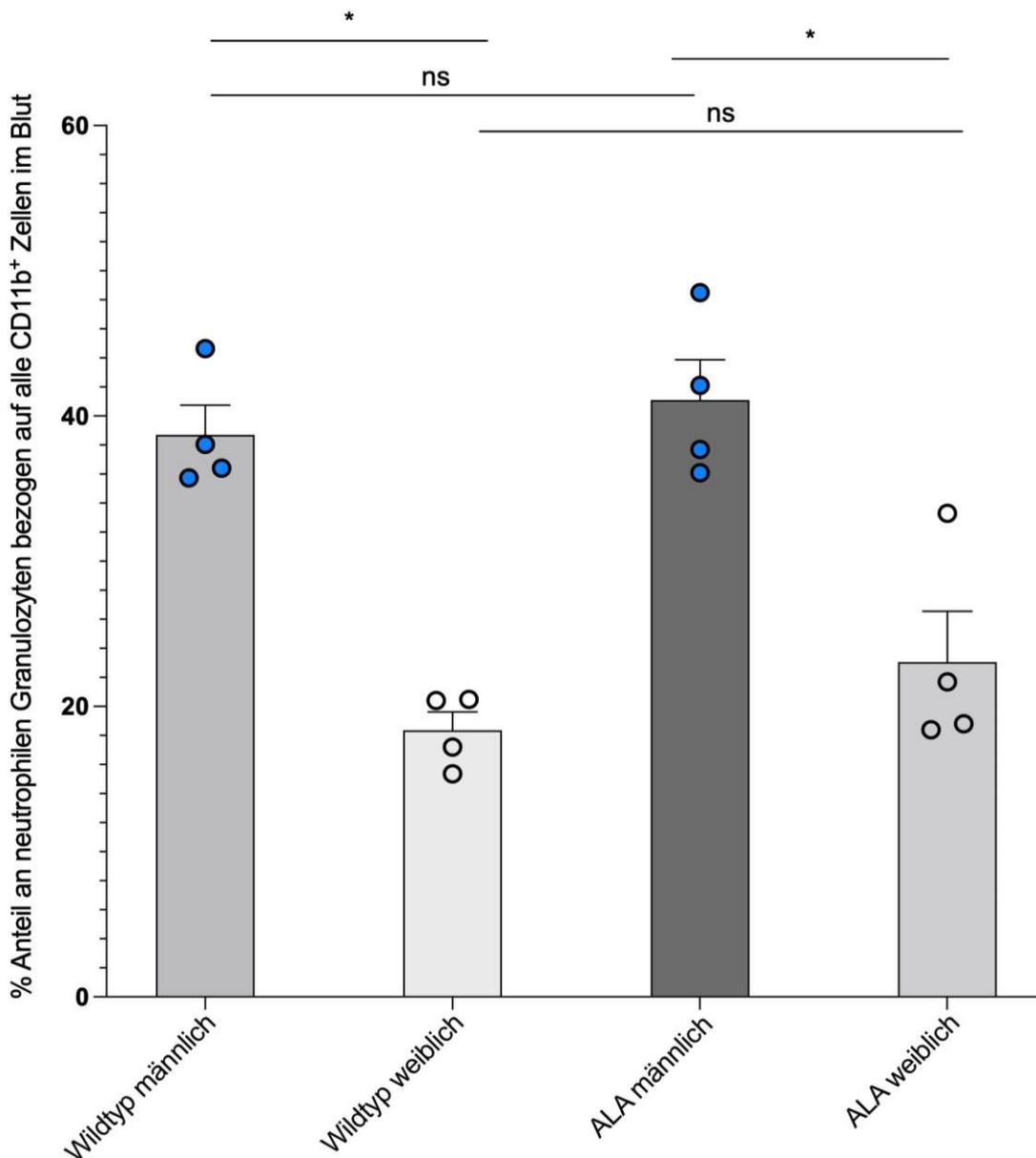


Abbildung 18: Geschlechtsdimorphismus im prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten aus allen CD11b⁺-Zellen bei allen biologischen Proben im Blut

In dieser Abbildung ist der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b⁺-Zellen dargestellt. Der prozentuale Anteil im Blut steigt während einer Infektion mit *E. histolytica* sowohl bei männlichen als auch weiblichen Tieren. Allerdings ist der prozentuale Anteil sowohl bei naiven als auch infizierten Tieren in männlichen Tieren höher. Die Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U Tests ermittelt. (ns=no significance; *p<0,05)

Die Gesamtanzahl an neutrophilen Granulozyten ist in männlichen C57BL/6J Mäusen höher als in weiblichen Tieren. Der Effekt verstärkt sich während einer Infektion mit *E. histolytica*. Identische Ergebnisse wurden beim prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b⁺-Zellen beobachtet.

5.2 Qualität und Menge der isolierten RNA

Aus den neutrophilen Granulozyten wurde die komplette RNA isoliert, um eine RNA-Sequenzierung und somit eine Transkriptomanalyse durchzuführen. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde mittels NanoDrop 2000 und Bioanalyzer analysiert. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen dargestellt.

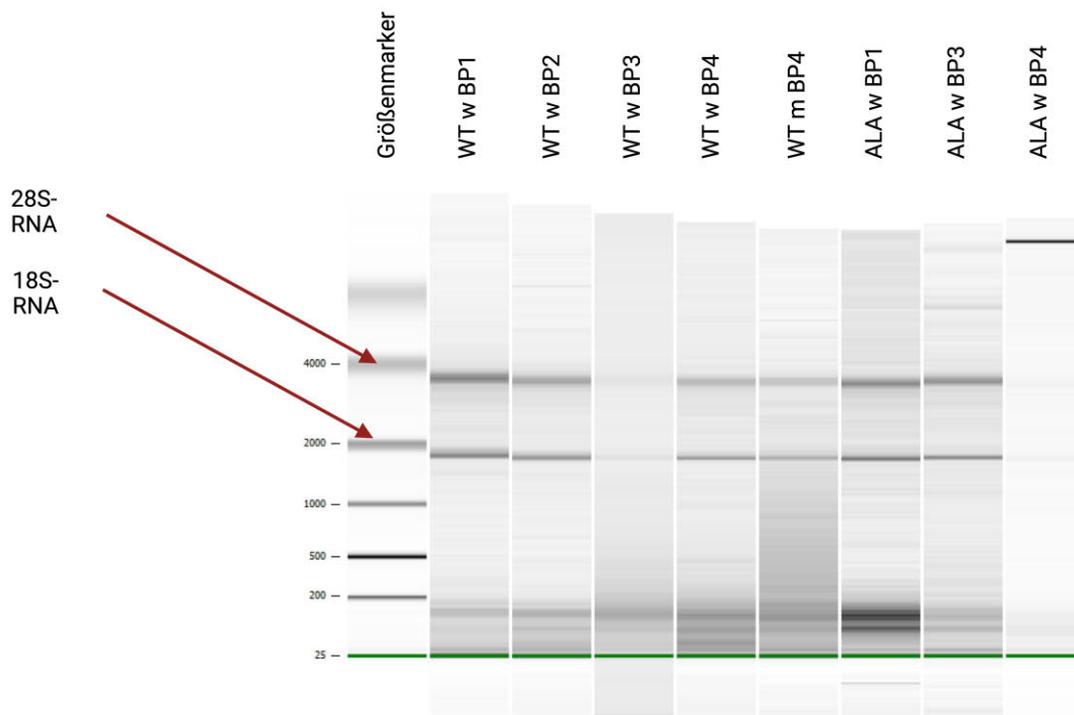
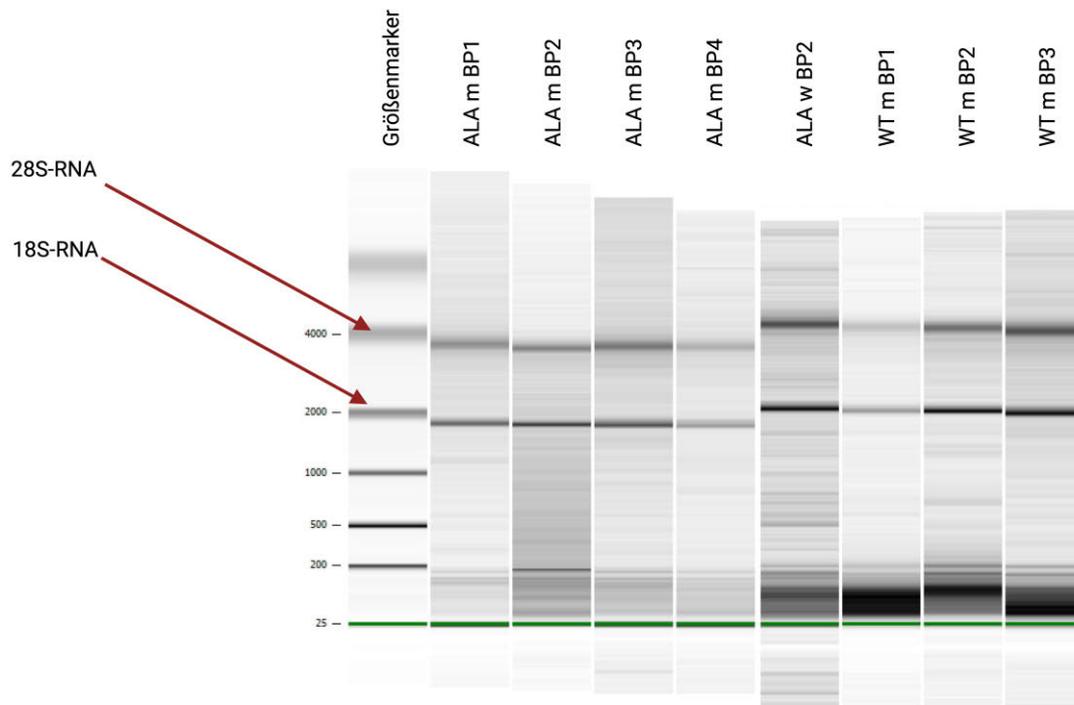


Abbildung 19: Gel-Elektrophorese zur Bestimmung der Größe und Qualität der aus neutrophilen Granulozyten isolierten RNA

In der Abbildung ist ein Trenngel der RNA Qualitätskontrolle zu sehen. Die RNA-Fragment Leiter ist auf der linken Bahn zu sehen und die entsprechenden Proben befinden sich auf den restlichen Bahnen.

Bei der weiblichen Probe ALA w BP4 ist zudem eine starke Bande weit nach 4000 nt zu erkennen. Die Probe WT w BP3 hat zeigt eine ähnliche Bande vor 0 nt. Dabei handelt es sich um Messfehler.

Die RNA-Ladder enthält RNA-Fragmente bestimmter Größe und wurde als Marker für die jeweiligen Molekülgrößen verwendet. Bei allen Proben sind die charakteristischen Banden bei etwa 2000 und 4000 Nucleotiden (nt) zu erkennen. Dabei handelt es sich zum einen um die 18S-RNA (≈ 2000 nt) und zum anderen um die 28S-RNA (≈ 4000 nt). Bei den Proben 7, 8 und 9 sind zudem breite Banden zwischen 25 und 300 nt zu erkennen. Dabei handelt es sich um 5S-RNA bzw. kleine RNA-Fragmente, welche durch die Degradierung der RNA entstehen. Diese sind in der Regel unerwünscht und verschlechtern den RIN-Wert bzw. die Reinheit der RNA.

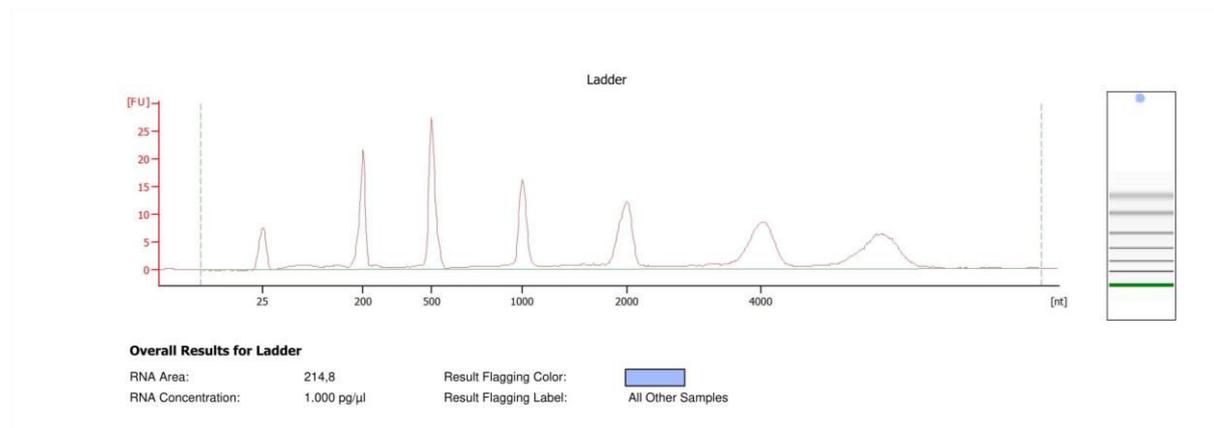


Abbildung 20: Elektropherogramm der RNA-Ladder

Diese Probe wird als Größenmarker verwendet. Sie enthält RNA-Fragmente mit verschiedenen, aber bestimmten Größen, welche zur Charakterisierung der Größe der Proben verwendet werden.

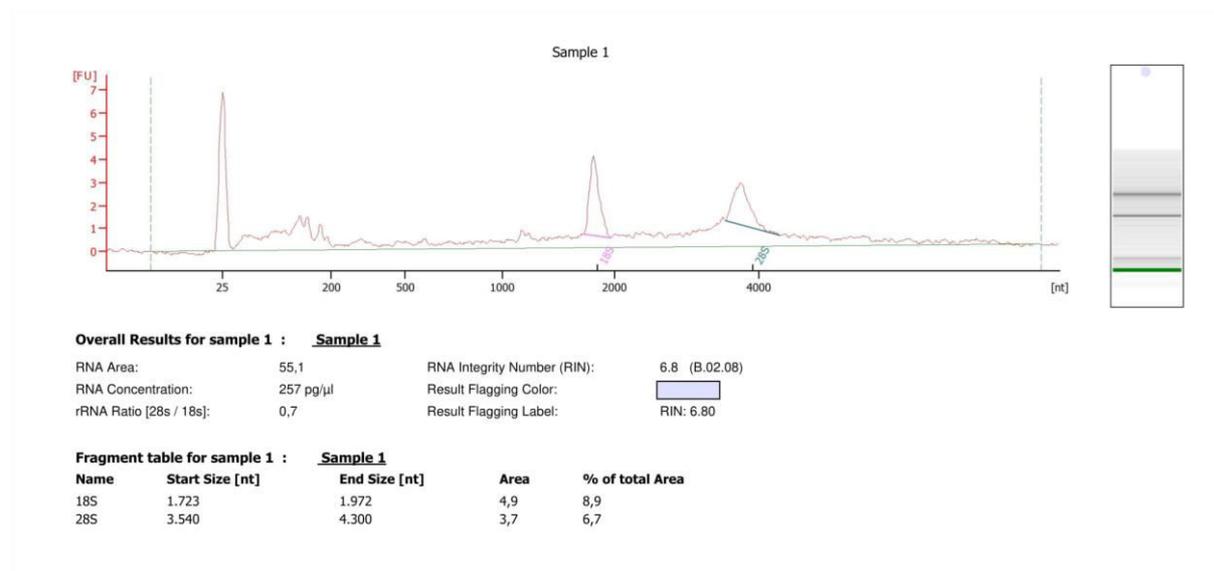


Abbildung 21: Beispielhaftes Elektropherogramm einer Probe

Dargestellt ist das Elektropherogramm der RNA aus männlichen neutrophilen Granulozyten.

Bei etwa 25 nt ist der RNA-Marker zu erkennen. Anschließend folgen jeweils bei etwa 2000 nt und 4000 nt zwei deutliche Peaks. Der Peak bei 2000 nt wurde der 18S rRNA und der Peak bei 4000 nt der 28S rRNA zugeordnet. Zwischen 25 und 200 nt sind auch

einige kleine Peaks zu erkennen. Diese stammen von 5S RNA bzw. kurzen RNA-Fragmenten. Diese sind in diesem Fall unerwünscht und haben einen negativen Einfluss auf den RIN-Wert. Die vom Bioanalyzer bestimmte RNA-Konzentration betrug 165 pg/ μ L. Der RIN-Wert konnte nicht ermittelt werden, da die RNA-Konzentration zu gering war

Tabelle 8: Ergebnisse der RNA Isolation aus neutrophilen Granulozyten mit dem Nanodrop

Name der Probe	$c_{RNA, Nanodrop}$ [ng/ μ l]	$OD_{260/280}$	$OD_{260/230}$
m BP1 ALA	16,3	1,43	0,49
m BP2 ALA	7,8	1,49	0,07
m BP3 ALA	7,7	1,36	0,35
m BP4 ALA	5,9	1,44	0,21
w BP1 ALA	6,8	1,48	0,23
w BP2 ALA	5,0	1,49	0,08
w BP3 ALA	n.a.	n.a.	n.a.
w BP4 ALA	n.a.	n.a.	n.a.
m BP1 wt	12,9	1,53	0,53
m BP2 wt	7,2	1,54	0,25
m BP3 wt	10,7	1,56	0,58
m BP4 wt	n.a.	n.a.	n.a.
w BP1 wt	n.a.	n.a.	n.a.
w BP2 wt	n.a.	n.a.	n.a.
w BP3 wt	n.a.	n.a.	n.a.
w BP4 wt	n.a.	n.a.	n.a.

Die Werte wurden nach der Isolation mit dem Nanodrop 2000 bestimmt. Da die Werte des Nanodrop 2000 sehr ungenau waren, wurde bei den späteren Versuchen auf eine Konzentrationsmessung mit dem Nanodrop verzichtet und die Bestimmung mittels Bioanalyzer durchgeführt.

Tabelle 9: Ergebnisse der RNA Isolation aus neutrophilen Granulozyten mit dem Bioanalyser

Name der Probe	$c_{RNA, Bioanalyser}$ [ng/ μ l]	V_{Probe} [μ l]	m_{RNA} [ng]	RIN-Wert
m BP1 ALA	0,257	18	4,626	6,8
m BP2 ALA	0,683	18	12,294	4,9
m BP3 ALA	0,165	18	2,97	n.a.
m BP4 ALA	0,232	18	4,176	6,6
w BP1 ALA	0,262	17	4,454	n.a.
w BP2 ALA	0,231	18	4,158	n.a.
w BP3 ALA	0,160	17	2,720	n.a.
w BP4 ALA	0,107	14	1,819	2,8
m BP1 wt	1,077	13	14,001	n.a.
m BP2 wt	0,886	13	11,518	n.a.
m BP3 wt	0,776	13	10,088	n.a.
m BP4 wt	0,354	17	6,018	3,7
w BP1 wt	0,250	17	4,250	7
w BP2 wt	0,229	17	3,893	n.a.
w BP3 wt	0,282	17	4,794	3
w BP4 wt	0,255	17	4,335	n.a.

Die RNA-Konzentration wurde zusätzlich am Bioanalyser bestimmt. Anschließend wurde aus dem Volumen der Probe sowie der RNA-Konzentration manuell die RNA-Masse berechnet. Die RIN-Werte wurden, soweit möglich, automatisch vom Bioanalyser bestimmt.

Die total RNA-Konzentration betrug bei allen Proben zwischen 0,1 und 1 ng μ L⁻¹. Daraus resultierte, dass aus den Proben jeweils 3 bis 14 ng total RNA isoliert wurde. Der vom Nanodrop automatisch berechnete Wert $OD_{260/280}$ dient zur Bestimmung der Reinheit der RNA. Die RNA absorbiert Licht der Wellenlänge 260 nm, während bei etwa 280 nm Substanzen wie Phenol, Proteine oder andere ungewünschte Substanzen Licht absorbieren. RNA gilt als rein, wenn das Extinktionsverhältnis 260 nm zu 280 nm bei

etwa 2,0 liegt. Der Wert $OD_{260/230}$ vergleicht die Extinktion von RNA bei 260 nm zu Substanzen wie Ethanol, EDTA und Zucker, welche das Licht bei 230 nm absorbieren. Der Wert dient auch zur Bestimmung der Reinheit der RNA und liegt im Idealfall zwischen 1,8-2,2. Da der Nanodrop 2000 bei sehr niedrigen RNA-Konzentrationen keine zuverlässigen Ergebnisse liefert, wurden die nachfolgenden RNA-Proben mit einem Bioanalytiker gemessen.

5.3 Ergebnisse der Transkriptomanalyse

Mit der RNA, welche aus den neutrophilen Granulozyten isoliert wurde, wurde eine Gen-Sequenzierung durchgeführt. Für die Versuche wurden vier Versuchsgruppen mit jeweils vier biologischen Replikaten verwendet. Um zu untersuchen, ob die biologischen Replikate einer Versuchsgruppe untereinander vergleichbar sind, wurde eine sogenannte Hauptkomponentenanalyse durchgeführt.

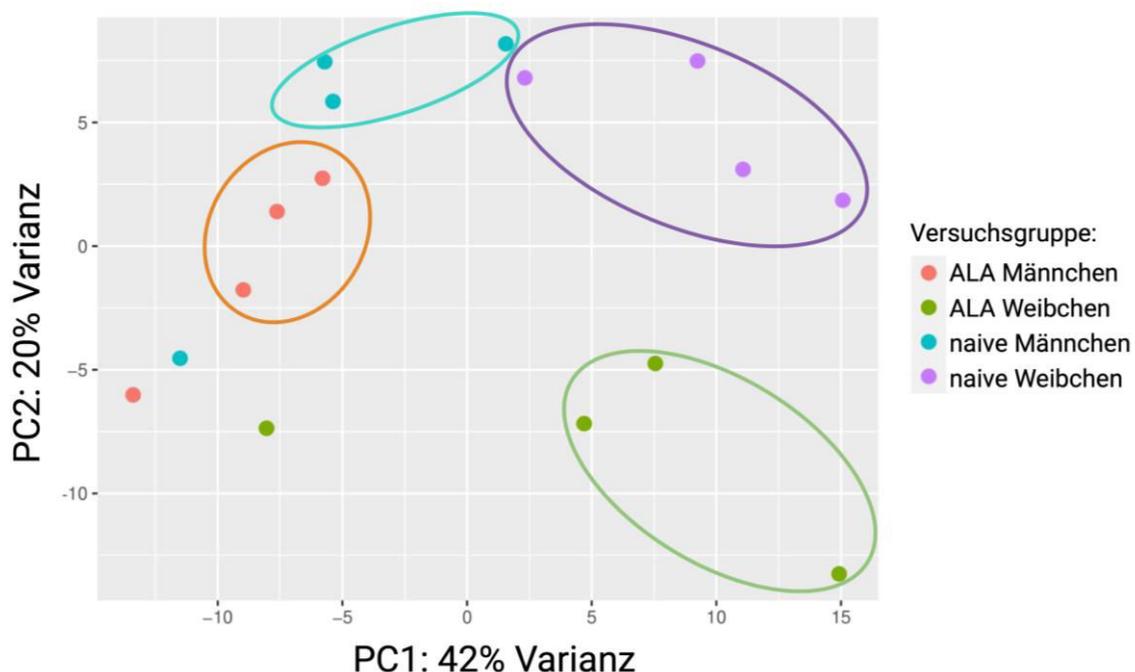


Abbildung 22: Hauptkomponentenanalyse der vier Versuchsgruppen

Die einzelnen Punkte stellen jeweils die biologischen Replikate der vier Versuchsgruppen dar. Die vier verschiedenen Versuchsgruppen sind zusätzlich farblich markiert. Die roten Punkte sind die männlichen ALA Mäuse und die grünen Punkte jeweils die weiblichen ALA Mäuse. Die naiven männlichen Mäuse sind in blau Abgebildet und die naiven Weibchen in lila.

Wie auf der Abbildung 23 zu erkennen ist, sind die biologischen Replikate der einzelnen Versuchsgruppen miteinander vergleichbar. Je näher die biologischen Replikate einer biologischen Probe beieinander liegen, desto besser sind die biologischen Replikate miteinander vergleichbar. Auf die Abbildung bezogen bedeutet das, dass je näher die einzelnen Punkte mit derselben Farbe beieinander liegen, desto besser. Es wurden lediglich zwei Ausreißer gefunden. Zum einen ein biologisches Replikat der weiblichen Tiere welche mit *E. histolytica* infiziert wurden. Zum anderen ein biologisches Replikat der naiven männlichen Mäuse. Dennoch liegen die Punkte in der Abbildung insgesamt nah genug beieinander, um eine aussagekräftige Transkriptomanalyse durchzuführen.

5.3.1 Naive Männchen verglichen mit naiven Weibchen

Um einen Einblick in einen möglichen Geschlechtsdimorphismus im naiven Zustand zu erhalten, wurde zunächst das Genexpressionsprofil der neutrophilen Granulozyten im Blut aus den naiven Weibchen mit dem Genexpressionsprofil der naiven Männchen verglichen. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

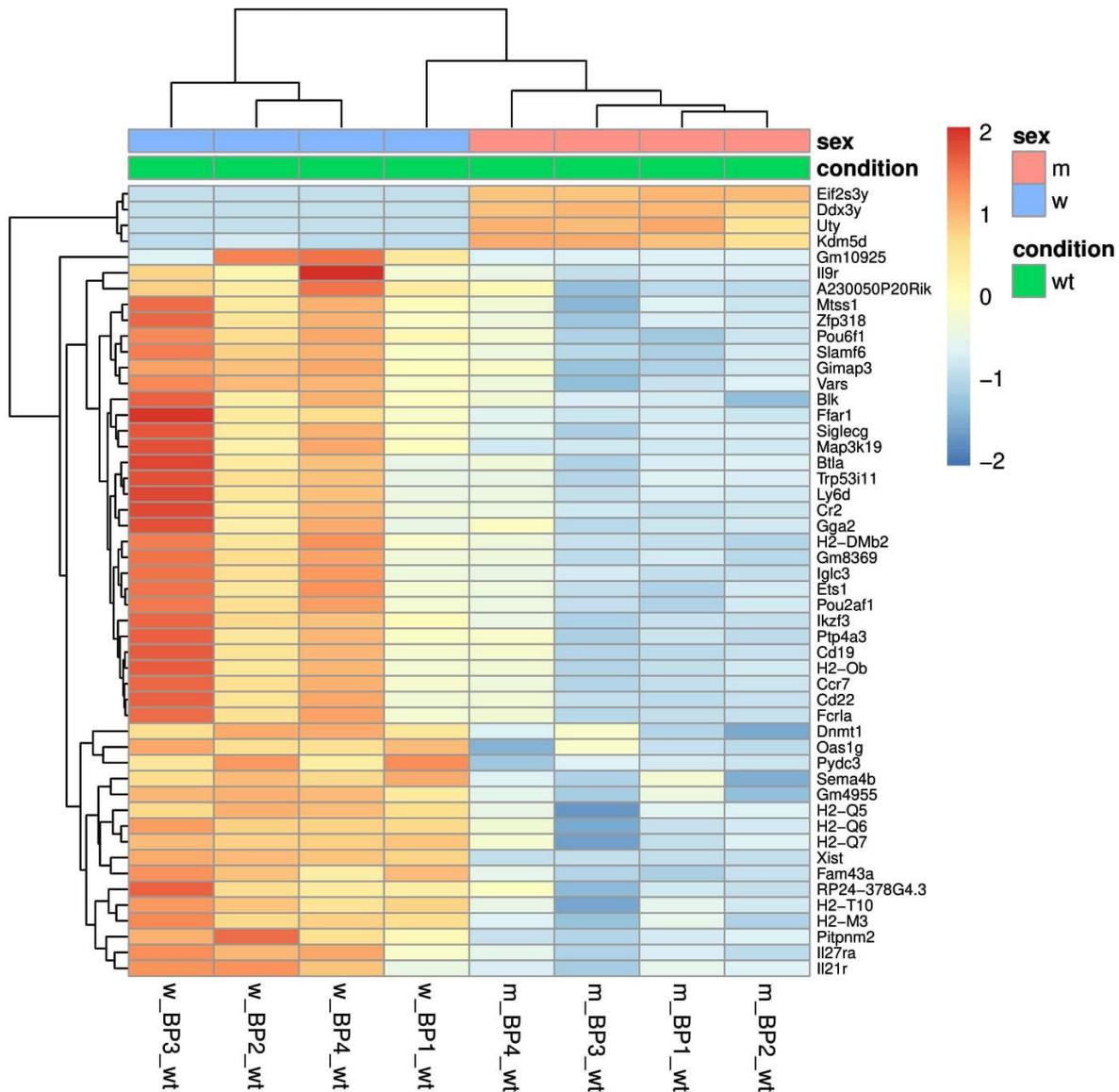


Abbildung 23: Heatmap regulierter Gene neutrophiler Granulozyten isoliert aus dem Blut naiver weiblicher C57BL/6J Mäuse oder naiver männlicher C57BL/6J Mäuse

Dargestellt sind die 50 am stärksten regulierten Gene, welche von neutrophilen Granulozyten aus naiven männlichen (m wt) und weiblichen (w wt) C57BL/6J Mäusen exprimiert werden. Der maximale Foldchange ($\text{Log}_2(\text{FC})$) bei dieser Auswertung beträgt 2. Je dunkler die blaue Farbe der Gene in den einzelnen Gruppen, desto stärker wird das Gen herunterreguliert im Vergleich zu den anderen Gruppen. Dem entsprechend werden Gene von den einzelnen Gruppen stärker hochreguliert, je dunkler der Rotton ist.

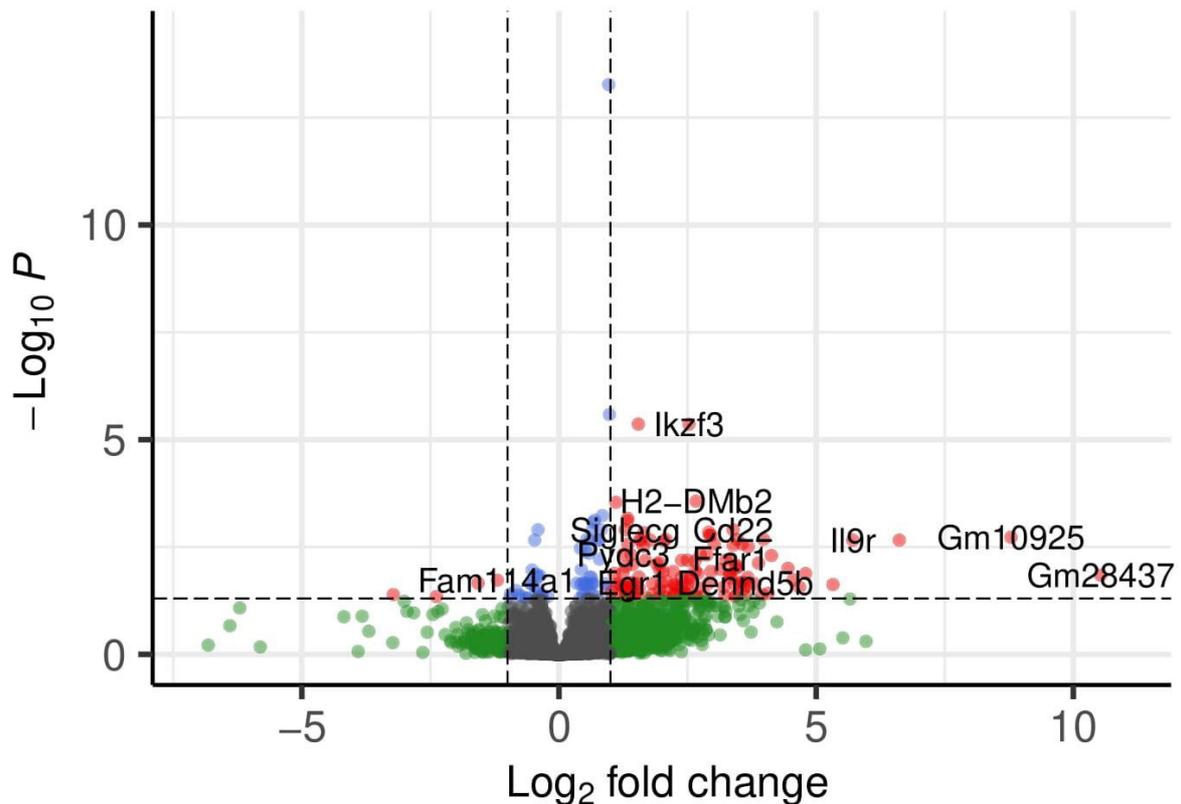


Abbildung 24: Volcano-Plot regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver Weibchen verglichen mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver Männchen

Dargestellt ist das Genexpressionsprofil neutrophiler Granulozyten aus naiven weiblichen Mäusen im Blut. Gene die einen positiven $\text{Log}_2(\text{FC})$ -Wert haben werden von weiblichen neutrophilen Granulozyten stärker exprimiert als von männlichen neutrophilen Granulozyten. Somit sind die Gene welche einen negativen $\text{Log}_2(\text{FC})$ -Wert haben in naiven Weibchen herunterreguliert. Gleichzeitig werden diese Gene in neutrophilen Granulozyten aus naiven männlichen Tieren hochreguliert.

Während durch die neutrophilen Granulozyten naiver männlicher Mäuse vor allem Gene hochreguliert werden, welche für eine positive Regulation der Genexpression im ganzen Sorgen, wie beispielsweise *Eif2s3y*, werden in neutrophilen Granulozyten naiver weiblicher Mäuse Gene hochreguliert, welche einen Einfluss auf das Immunsystem haben. Beispiele hierfür sind Gene wie *IL9R*, *SLAMF6*, *GIMAP3*, *BLK* und *LY6D* welche alle eine Rolle bei der Aktivierung von Leukozyten spielen. Zudem haben die Gene *SLAMF6*, *GIMAP3* und *BLK* Auswirkungen auf eine Hochregulation der Immunantwort. Dem Volcano-Plot ist zu entnehmen, dass das Gen *IL9R* signifikant stärker in neutrophilen Granulozyten naiver weiblicher Mäuse hochreguliert wird. Auffällig ist, dass neutrophile Granulozyten aus dem Blut naiver männlicher Mäuse deutlich weniger Gene hoch- bzw. herunterregulieren als die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver weiblicher Mäuse. Dies ist sowohl auf der Heatmap als auch im Volcano-Plot zu erkennen.

5.3.2 Naive Männchen verglichen mit ALA Männchen

Als nächstes wurde das Genexpressionsprofil neutrophiler Granulozyten im Blut aus den naiven Männchen mit dem Genexpressionsprofil der männlichen ALA Mäuse verglichen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

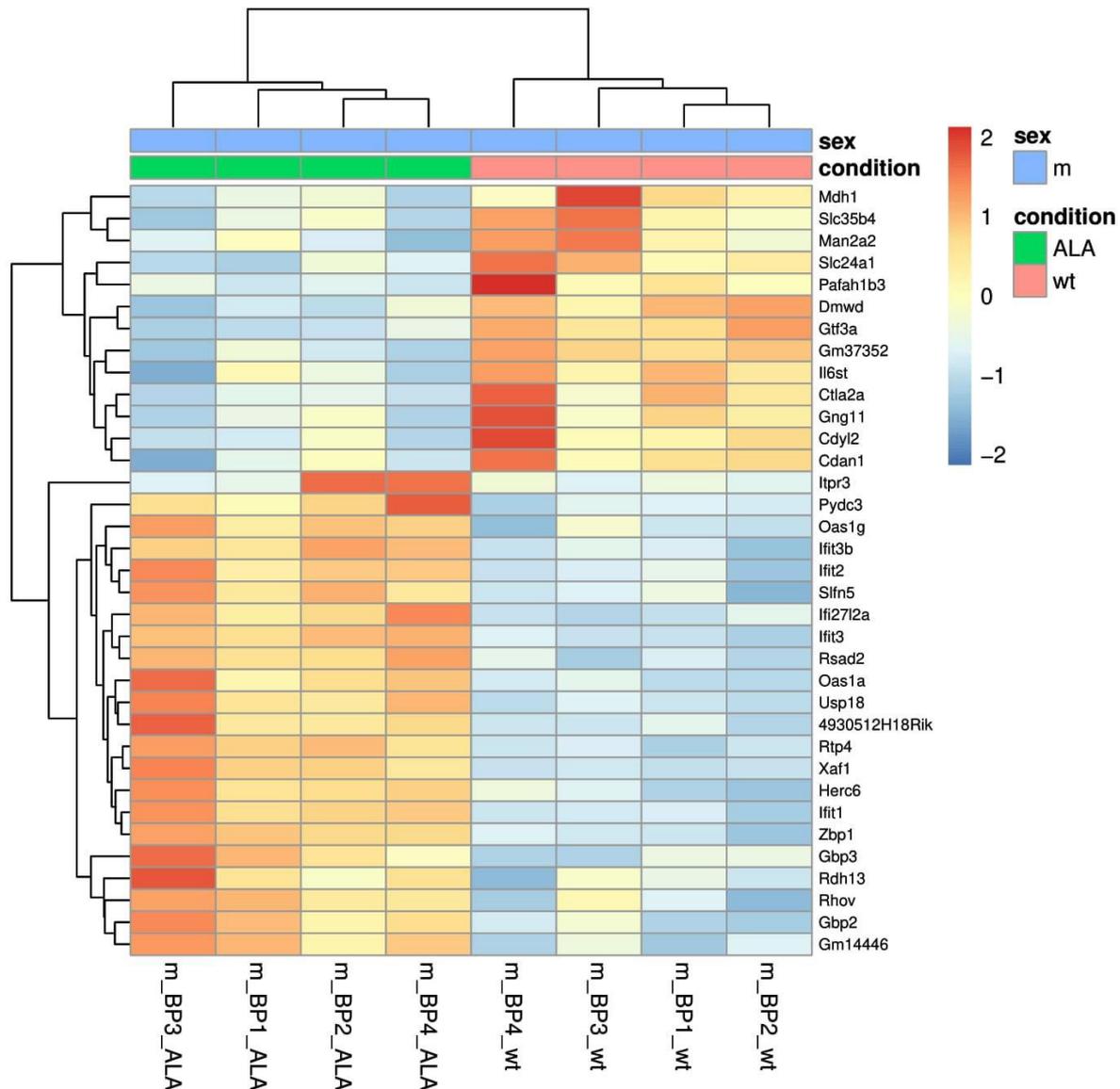


Abbildung 25: Heatmap regulierter Gene neutrophiler Granulozyten isoliert aus dem Blut naiver oder *E. histolytica*-infizierter männlicher C57BL/6J Mäuse

Dargestellt sind die 50 am stärksten regulierten Gene, welche von neutrophilen Granulozyten aus männlichen ALA Mäusen (m ALA) und naiven männlichen Mäusen (m wt) exprimiert werden. Der maximale Foldchange ($\text{Log}_2(\text{FC})$) bei dieser Auswertung beträgt 2. Je dunkler die blaue Farbe der Gene in den einzelnen Gruppen, desto stärker wird das Gen herunterreguliert im Vergleich zu den anderen Gruppen. Dem entsprechend werden Gene von den einzelnen Gruppen stärker hochreguliert, je dunkler der Rotton ist.

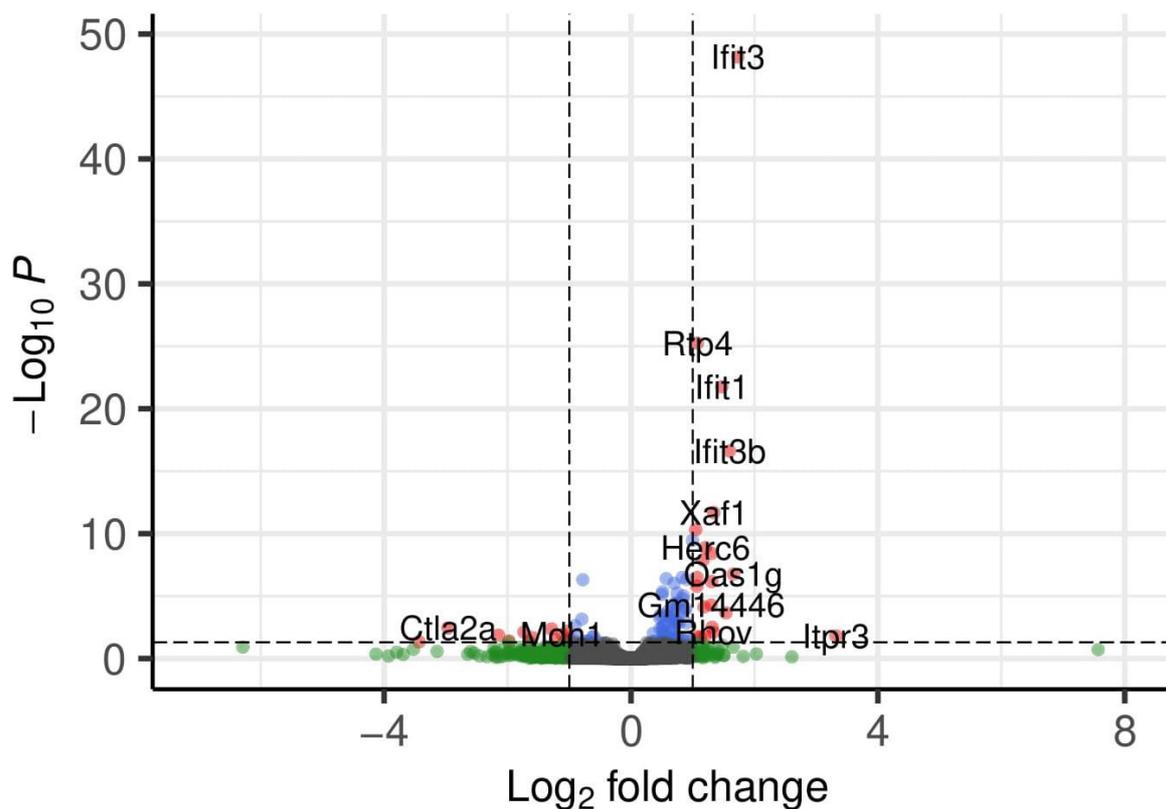


Abbildung 26: Volcano-Plot regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut männlicher ALA Mäuse verglichen mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver männlicher Mäuse

Dargestellt ist das Genexpressionsprofil neutrophiler Granulozyten aus männlichen ALA Mäusen im Blut. Gene die einen positiven $\text{Log}_2(\text{FC})$ -Wert haben werden von neutrophilen Granulozyten aus männlichen ALA Mäusen stärker exprimiert als von männlichen neutrophilen Granulozyten aus naiven Tieren. Somit sind die Gene welche einen negativen $\text{Log}_2(\text{FC})$ -Wert haben in neutrophilen Granulozyten in männlichen ALA Mäusen herunterreguliert. Gleichzeitig werden diese Gene in neutrophilen Granulozyten aus naiven männlichen Tieren hochreguliert.

Die Heatmap zeigt bei neutrophilen Granulozyten aus naiven männlichen Tieren eine Hochregulation von Genen, welche eine negative Auswirkung auf die DNA-Replikation und DNA-gesteuerten Transkription haben. Dazu gehören Gene wie CDYL2 und CDAN1. Zudem wird CTLA2A in naiven Tieren hochreguliert. Es wird vermutet, dass dieses Gen zu einer negativen Regulierung einer Entzündungsreaktion führt. Außerdem zeigt der Volcano-Plot, dass CTLA2A mit erhöhter Wahrscheinlichkeit in neutrophilen Granulozyten naiver männlicher Tiere exprimiert wird, da es einen signifikanten Unterschied in den beiden Versuchsgruppen gibt.

Im Vergleich dazu werden in den neutrophilen Granulozyten männlicher ALA Tiere vor allem Gene exprimiert, welche einen Einfluss auf das Immunsystem haben. Es werden Gene als Reaktion auf das Auftreten eines pathogenen Organismus hochreguliert. Als Beispiele hierfür dienen OAS1G, IFIT3B, IFIT3, RSAD2, OAS1A und IFIT1. Im Volcano-Plot ist zu erkennen, dass mehrere dieser Gene spezifisch durch die neutrophilen Granulozyten aus den männlichen ALA Mäusen exprimiert werden. Besonders hervorzuheben sind hierbei IFIT3, IFIT1 und IFIT3b. Diese Gene werden als Reaktion auf das Vorhandensein von $\text{INF-}\alpha$ und $\text{INF-}\beta$ exprimiert.

5.3.3 Naive Weibchen verglichen mit ALA Weibchen

Der dritte Vergleich befasst sich mit dem Genexpressionsprofil von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut weiblicher ALA-Mäuse im Vergleich zu dem Genexpressionsprofil derjenigen von naiven weiblichen Mäusen. Die Ergebnisse sind unten dargestellt.

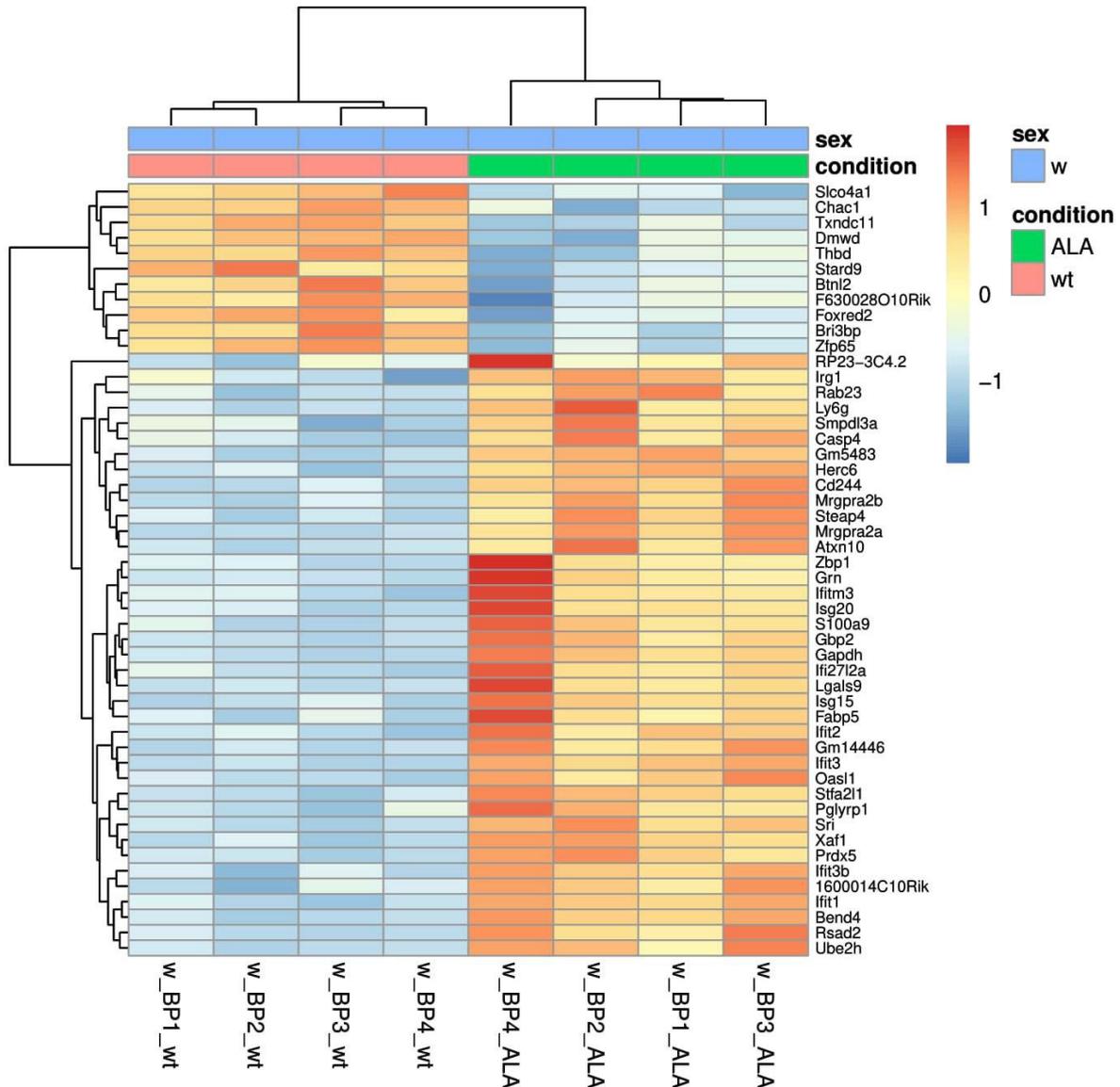


Abbildung 27: Heatmap regulierter Gene neutrophiler Granulozyten isoliert aus dem Blut naiver oder *E. histolytica* -infizierten weiblicher C57BL/6J Mäuse

Abgebildet sind die 50 am stärksten regulierten Gene, welche von neutrophilen Granulozyten aus naiven weiblichen Mäusen (w wt) und weiblichen ALA Mäusen (w ALA) exprimiert werden. Der maximale Foldchange ($\text{Log}_2(\text{FC})$) bei dieser Auswertung beträgt 2. Je dunkler die blaue Farbe der Gene in den einzelnen Gruppen, desto stärker wird das Gen herunterreguliert im Vergleich zu den anderen Gruppen. Dem entsprechend werden Gene von den einzelnen Gruppen stärker hochreguliert, je dunkler der Rotton ist.

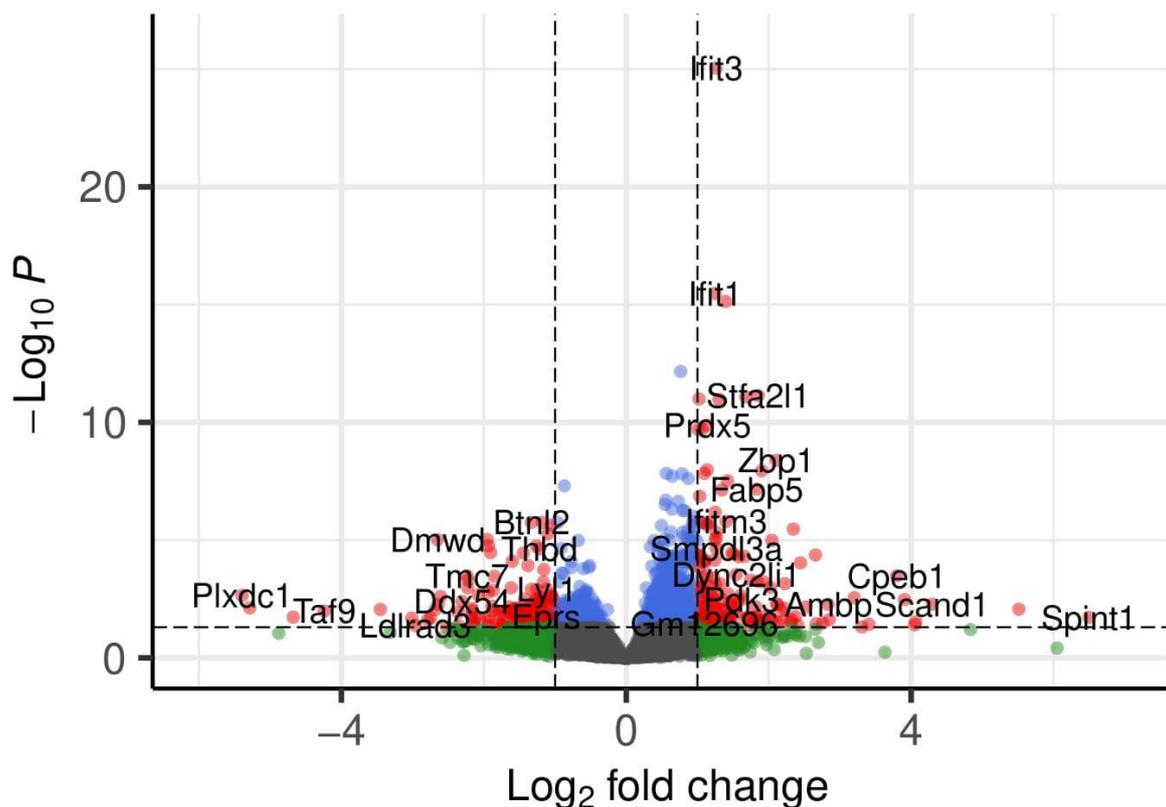


Abbildung 28: Volcano-Plot regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut weiblicher ALA Mäuse verglichen mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver weiblicher Mäuse

Dargestellt ist das Genexpressionsprofil neutrophiler Granulozyten aus weiblichen ALA Mäusen im Blut. Gene die einen positiven $\text{Log}_2(\text{FC})$ -Wert haben werden von neutrophilen Granulozyten weiblicher ALA Mäuse stärker exprimiert als von neutrophilen Granulozyten naiver Weibchen. Somit sind die Gene welche einen negativen $\text{Log}_2(\text{FC})$ -Wert haben in naiven Weibchen hochreguliert. Gleichzeitig werden diese Gene in neutrophilen Granulozyten weiblicher ALA Tiere herunterreguliert.

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass sich die neutrophilen Granulozyten der weiblichen ALA Tiere ähnlich verhalten wie die neutrophilen Granulozyten aus männlichen ALA Tieren. Es werden vor allem Gene exprimiert, welche einen Einfluss auf das Immunsystem haben. Gene wie CASP4, HERC6, ZBP1, GRN, IFITM3 sind allesamt Gene, welche als Reaktion auf das Auftreten eines fremden Organismus exprimiert werden. Diese werden während des Amöbenleberabszesses stark hochreguliert. Die neutrophilen Granulozyten naiver weiblicher Tiere regulieren diese Gene herunter. Der Volcano-Plot bestätigt zudem, dass diese Gene signifikant stärker von neutrophilen Granulozyten weiblicher ALA Tiere hochreguliert werden. Außerdem ist auffällig, dass die neutrophilen Granulozyten der weiblichen ALA Tiere Gene hochregulieren, die Auswirkungen auf das apoptotische Verhalten der neutrophilen Granulozyten haben. Beispiele hierfür sind ZBP1, GRN, S100A9 und IFI27L2A. Auch diese Gene werden in den neutrophilen Granulozyten in naiven weiblichen Tieren herunterreguliert.

5.3.4 ALA Männchen verglichen mit ALA Weibchen

Abschließend wurde das Genexpressionsprofil der neutrophilen Granulozyten im Blut beider Geschlechter während einer Infektion mit *E. histolytica* miteinander verglichen. Folgend sind die Heatmap und der Volcano-Plot dargestellt.

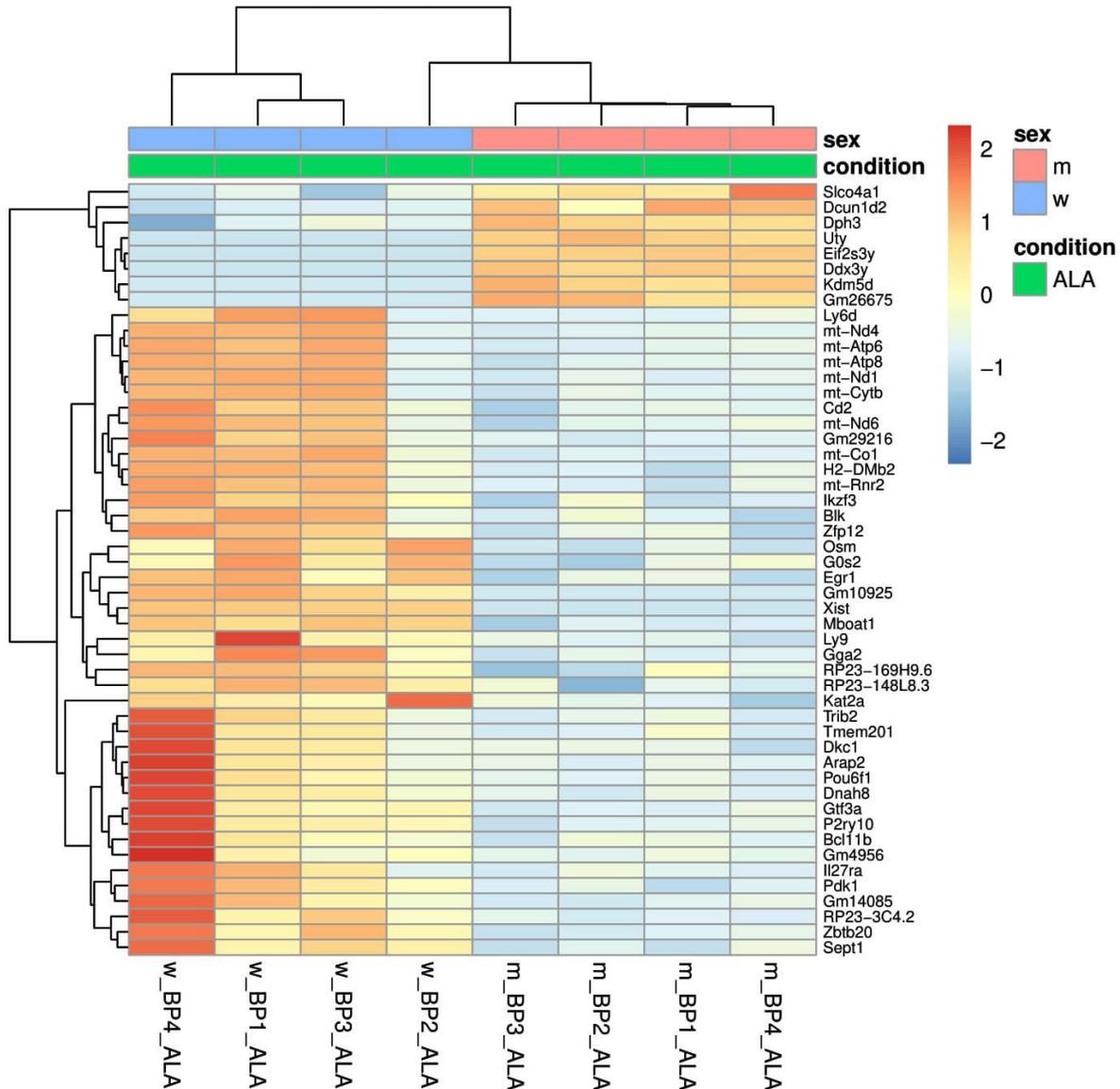


Abbildung 29: Heatmap regulierter Gene neutrophiler Granulozyten isoliert aus dem Blut *E. histolytica* -infizierter weiblicher und männlicher C57BL/6J Mäuse

Dargestellt sind die 50 am stärksten regulierten Gene, welche von neutrophilen Granulozyten aus männlichen (m ALA) und weiblichen (w ALA) ALA Mäusen exprimiert werden. Der maximale Foldchange ($\text{Log}_2(\text{FC})$) bei dieser Auswertung beträgt 2. Je dunkler die blaue Farbe der Gene in den einzelnen Gruppen, desto stärker wird das Gen herunterreguliert im Vergleich zu den anderen Gruppen. Dem entsprechend werden Gene von den einzelnen Gruppen stärker hochreguliert, je dunkler der Rotton ist.

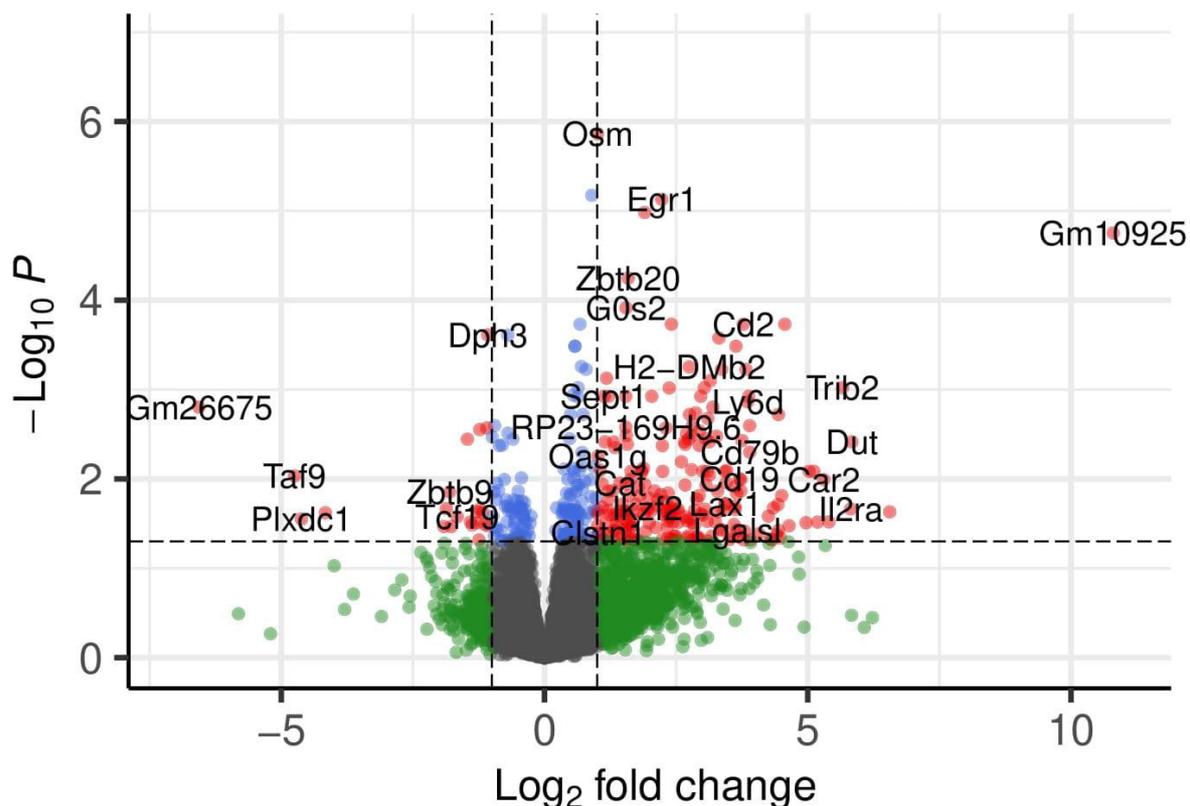


Abbildung 30: Volcano-Plot regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut weiblicher ALA Mäuse verglichen mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut männlicher ALA Mäuse

Dargestellt ist das Genexpressionsprofil neutrophiler Granulozyten aus weiblichen ALA Mäusen im Blut. Gene die einen positiven $\text{Log}_2(\text{FC})$ -Wert haben werden von weiblichen neutrophilen Granulozyten stärker exprimiert als von männlichen neutrophilen Granulozyten. Somit sind die Gene welche einen negativen $\text{Log}_2(\text{FC})$ -Wert haben in weiblichen ALA Mäusen herunterreguliert. Gleichzeitig werden diese Gene in neutrophilen Granulozyten aus männlichen ALA Mäusen hochreguliert.

Aus der Heatmap ist abzulesen, dass neutrophile Granulozyten in weiblichen ALA Tieren Gene stärker hochregulieren, welche eine Aktivierung und Differenzierung von Leukozyten zur Folge haben. Dazu gehören Gene wie BCL11B, IL27RA, KAT2A und EGR1. Zudem werden Gene hochreguliert, wie beispielsweise CD2, OSM sowie EGR1, die für eine positive Regulation der Zytokin-Produktion zuständig sind. Im Volcano-Plot ist auch zu erkennen, dass diese Gene hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten weiblicher ALA Tiere exprimiert werden. Auffällig ist, dass beide Gruppen viele Gene hoch- bzw. herunterregulieren.

5.3.5 Vergleich der hoch- und herunterregulierten Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut

Als letzter Schritt wurden aus den hoch- bzw. herunterregulierten Genen Venn-Diagramme erstellt. Diese stellen dar, ob sich hoch- bzw. herunterregulierte Gene in den einzelnen Vergleichen überschneiden oder nicht.

Zunächst der Vergleich der hochregulierten Gene in weiblichen Tieren zu männlichen Tieren.

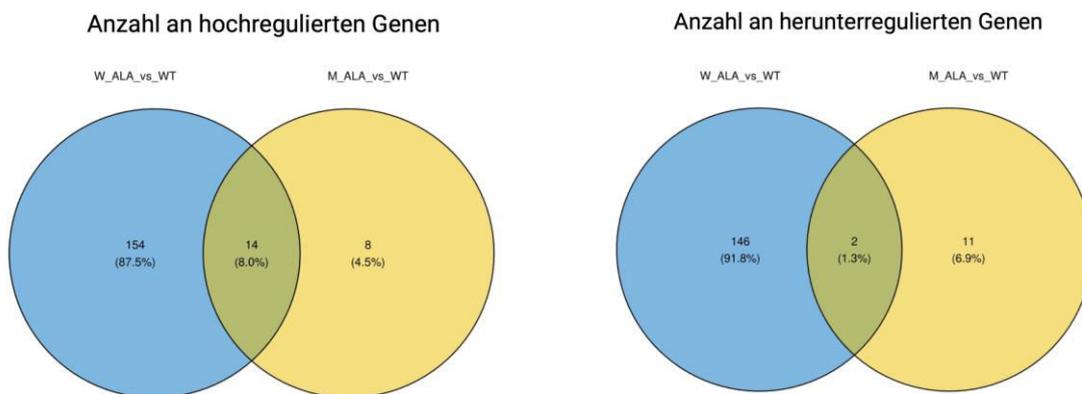


Abbildung 31: Venn-Diagramm der regulierten Gene in neutrophilen Granulozyten aus weiblichen ALA Mäusen und Wildtyp Mäusen verglichen mit den regulierten Genen aus männlichen ALA Mäusen und Wildtyp Mäusen

Dargestellt ist der Vergleich der regulierten Gene in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut. Dazu wurden zum einen die hochregulierten Gene in weiblichen ALA Tieren sowie naiven Tieren im Vergleich zu den hochregulierten Genen in männlichen ALA Tieren und naiven Tieren abgebildet. Es sind Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Hoch bzw. Herunterregulation von Genen zu erkennen.

Das Venn-Diagramm zeigt, dass die weiblichen Tiere deutlich mehr Gene hochregulieren im Vergleich zu dem männlichen Tieren. Insgesamt regulieren die Weibchen 168 Gene hoch während die Männchen 22 Gene hochregulieren. Von diesen 168 Genen werden in den weiblichen Tieren 14 Gene hochreguliert, welche auch in den männlichen Tieren hochreguliert werden.

Auf der rechten Seite der Abbildung wurden die herunterregulierten Gene in weiblichen Tieren im Vergleich zu den herunterregulierten Genen in Männchen dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass weibliche Tiere insgesamt 148 Gene herunterregulieren, während die männlichen Tiere 13 Gene herunterregulieren. Von den 13 herunterregulierten Genen in männlichen ALA Tieren sowie naiven männlichen Tieren gleichen sich zwei Gene mit den herunterregulierten Genen der weiblichen ALA Tiere und naiven weiblichen Tieren.

Nun wurden die zwei verschiedenen Konditionen miteinander verglichen. Es wurden die regulierten Gene beider Geschlechter unter ALA Bedingungen mit den regulierten Genen beider Geschlechter unter naiven Bedingungen verglichen.

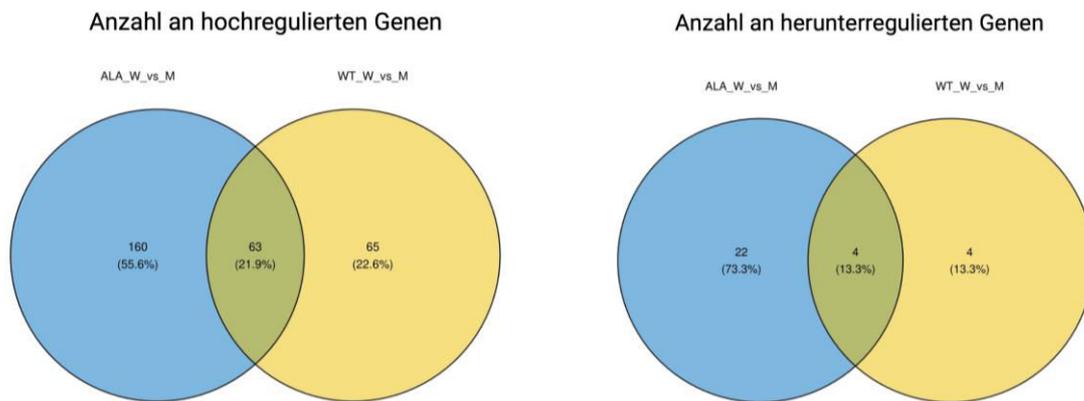


Abbildung 32: Venn-Diagramm der regulierten Gene in neutrophilen Granulozyten aus weiblichen und männlichen ALA Mäusen verglichen mit regulierten Genen aus männlichen und weiblichen Wildtyp Mäusen

Die Graphik stellt die hochregulierten Gene in neutrophilen Granulozyten im Blut aus ALA Tieren im Vergleich zu naiven Tieren dar. Es sind Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede in der Anzahl an hoch- und herunterregulierten Genen zu erkennen.

Insgesamt regulieren die Tiere, welche zuvor mit *E. histolytica* infiziert wurden, 223 Gene hoch. Im Gegensatz dazu wurden bei naiven Tieren 128 Gene gefunden, welche hochreguliert werden. Zudem wurde gezeigt, dass 63 der Gene, welche in beiden Gruppen hochreguliert wurden, miteinander identisch sind und somit sowohl im naiven Zustand als auch während des Amöbenleberabszesses hochreguliert werden.

Auf der rechten Seite der Abbildung wurden die herunterregulierten Gene in neutrophilen Granulozyten miteinander verglichen, welche aus dem Blut von ALA Mäusen sowie naiven Mäusen isoliert wurden. Das Ergebnis ist im folgenden Venn-Diagramm dargestellt.

Auf der Abbildung ist zu erkennen, dass C57BL/6J Mäuse während einer Infektion mit *E. histolytica* 26 Gene herunterregulieren. Naive Mäuse regulieren insgesamt 8 Gene herunter, von denen 4 Gene identisch mit den herunterregulierten Genen in ALA Mäusen sind.

6. Diskussion

Seit einiger Zeit wird beobachtet, dass bei vielen Krankheiten ein Geschlechtsdimorphismus vorliegt. Sowohl im Verlauf der Erkrankung als auch in der Behandlung von Krankheiten. Beispielsweise ist ein Amöbenleberabszess nach einer Infektion mit *E. histolytica* bei weiblichen Mäusen nach drei Tagen nicht mehr nachweisbar.¹¹ Bei männlichen Mäusen konnte der Parasit nach 14 Tagen noch nachgewiesen werden.¹¹ Dies ist insbesondere wichtig, da deswegen Therapiemethoden angepasst werden müssen, um bei allen Geschlechtern eine optimale Behandlung zu ermöglichen.

Obwohl es sich bei *E. histolytica* um einen human spezifischen Parasiten handelt, ist es möglich in C57BL/6J Mäusen einen Amöbenleberabszess zu verursachen, indem die Mäuse mit einem maus-adaptiertem *E. histolytica* Stamm infiziert werden.¹¹ Zudem wurde nachgewiesen, dass analog zu den humanen Modellen ein

Geschlechtsdimorphismus im Mausmodell zu erkennen ist.¹¹ Daher wurde in dieser Arbeit zunächst mit dem Mausmodell gearbeitet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Geschlechtsdimorphismus in murinen neutrophilen Granulozyten während einer Infektion mit *E. histolytica* untersucht. Zudem wurde die Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Ausbildung des Amöbenleberabszesses im Mausmodell für die Erkrankung untersucht. Dazu wurde das Genexpressionsprofil weiblicher und männlicher C57BL/6J Mäuse vor und während einer Infektion mit *E. histolytica* betrachtet. Die Diskussion konzentriert sich auf den Geschlechtsdimorphismus der neutrophilen Granulozyten, der RNA Isolation aus neutrophilen Granulozyten und der Analyse der Transkriptom-Daten.

6.1 Geschlechtsdimorphismus in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten

Bereits die Untersuchung der Abszesse nach der Blutentnahme zeigte einen Geschlechtsdimorphismus in der Größe der Abszesse. Während bei den männlichen Mäusen nach drei Tagen große Abszesse zu erkennen waren, zeigten sich auf den weiblichen Lebern nur kleine Abszesse. Außerdem wurde beobachtet, dass deutlich mehr weibliche Mäuse benötigt wurden, um den eigens festgelegten Schwellenwert von mindestens 500 000 neutrophilen Granulozyten zu erreichen. Der Schwellenwert diente dazu, um sicherzugehen, dass aus den neutrophilen Granulozyten genug RNA für eine RNA-Sequenzierung isoliert werden konnte. Weitere Versuche zeigten, dass sowohl naive männliche Mäuse mehr neutrophile Granulozyten im Blut besitzen als auch männliche Mäuse, welche drei Tage zuvor intrahepatisch mit *E. histolytica* Trophozoiten infiziert wurden. Die erkrankten männlichen Mäuse hatten nicht nur mehr neutrophile Granulozyten im Blut als erkrankte weibliche Mäuse, sondern auch als naive männliche Mäuse. Zudem wurde beobachtet, dass die Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blut bei beiden Geschlechtern drei Tage nach einer Infektion mit *E. histolytica* ansteigt.

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass bei naiven Mäusen der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten bezogen auf alle CD11b⁺ Zellen im Knochenmark am höchsten ist.³ Im Blut sowie der Leber sind die prozentualen Anteile im naiven Zustand deutlich geringer.³ Nach einer Infektion mit *E. histolytica* nimmt der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten im Knochenmark ab und steigt im Blut als auch der Leber an.³ Dieselben Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich die Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blut bei männlichen und weiblichen Tieren grundsätzlich unterscheidet. Die Tatsache, dass der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten während einer Infektion im Blut und der Leber zunimmt und im Knochenmark abnimmt ist plausibel, da im Knochenmark überwiegend unreife neutrophile Granulozyten, mit einer vergleichsweise kurzen Lebensdauer, vorhanden sind.²⁵ Im Falle einer Infektion werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert und migrieren in die Peripherie.²⁵ Über das Blut können sie an den Infektionsherd gelangen und dort eine Immunreaktion auslösen.²⁵ Durch inflammatorische Zytokine, welche von anderen Immunzellen produziert werden und bakteriellen Produkten wird die Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten um ein vielfaches gesteigert.⁹ Die neutrophilen Granulozyten sind die ersten Immunzellen, welche zum Infektionsherd rekrutiert werden.^{2,9} Die verlängerte Lebensdauer ist notwendig dafür, dass neutrophile Granulozyten ihre Aufgabe am Infektionsherd erfüllen können. Durch verschiedene regulatorische Mechanismen, wie beispielsweise die Degranulation von Proteasen im extrazellulären Raum oder das Ausschütten von entzündungshemmenden bzw. entzündungsfördernden Botenstoffen, können die neutrophilen Granulozyten Einfluss auf die Immunantwort des adaptiven

Immunsystems nehmen.³² Allerdings führt eine zu lange Lebensdauer und somit ein zu langes Verharren der neutrophilen Granulozyten im Gewebe zu einer Schädigung des Gewebes.⁹ Dies ist gut am Beispiel einer Infektion mit *E. histolytica* erkennbar. Im Verlauf der Infektion führt die amöbicide Wirkung der neutrophilen Granulozyten zu einer Schädigung des Lebergewebes.²⁸ Dem entsprechend ist eine Ausbildung eines Amöbenleberabszesses immer begleitet von einer Ansammlung von lysierten neutrophilen Granulozyten um den Abszess herum, wie auf Abbildung 5 zu erkennen.²⁸ Die gewebeschädigende Wirkung von Immunzellen und somit viel stärkere Ausprägung des Amöbenleberabszesses konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten beobachtet werden.²³ In einem Versuch wurden sowohl C57BL/6J Mäuse als auch CCR2^{-/-} Mäuse verwendet.²³ CCR2 bzw. der entsprechende Ligand CCL2 ist für die Migration von Ly6C^{hi} Monozyten (klassische Monozyten) aus dem Knochenmark in das Blut verantwortlich.²³ Die CCR2^{-/-} Mäuse dienten als Kontrolle und zeigten deutlich kleinere Abszesse.²³ Außerdem wurde auch ein Unterschied zwischen den Geschlechtern beobachtet. Sowohl in männlichen Mäusen als auch in Männern wurden erhöhte prozentuale Anteile an klassischen Monozyten während eines Amöbenleberabszesses gefunden.²³ Dadurch wurden auch erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF α , CCL2 und CXCL1 gemessen.²² Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die erhöhten Konzentrationen auf das Vorhandensein von Testosteron zurückzuführen ist.²³ In einer humanen Studie mit transgenen Frauen, welche über 200 Tage intramuskulär Testosteron verabreicht bekommen haben, wurden erhöhte Konzentrationen an TNF α und CXCL1 gemessen.²² Diese Zytokine sind zum einen für die Bindung von neutrophilen Granulozyten an Orten der Entzündung und zum anderen Apoptose, Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung zuständig.²³ Somit ist für eine effektive Bekämpfung des pathogenen Organismus eine klare Regulation der Lebensdauer sowie pro- bzw. antiinflammatorischen Wirkung der neutrophilen Granulozyten unumgänglich.

6.2 Qualität und Menge der RNA

Für die anschließende RNA-Sequenzierung wurde die total RNA aus murinen neutrophilen Granulozyten aus dem Blut isoliert. Für die RNA-Sequenzierung musste die RNA in einer ausreichenden Menge und Reinheit vorliegen. Dazu wurden mehrere Messungen durchgeführt. Zunächst am Nanodrop und anschließend am Bioanalyzer.

Da die Werte des Nanodrop bei so geringen RNA-Konzentrationen nicht hinreichend genau waren, wurde bei einigen Proben auf die Messung am Nanodrop verzichtet.

Alle RNA-Proben wurden zusätzlich am Bioanalyzer ausgewertet, indem die RNA-Konzentration und der RIN-Wert durch den Bioanalyzer bestimmt wurden. Mithilfe der am Bioanalyzer bestimmten RNA-Konzentrationen wurden die totalen RNA-Massen in den Proben bestimmt. Die RNA-Massen aller biologischen Proben lagen zwischen 1,8 ng und 14 ng pro Probe.

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass neutrophile Granulozyten Schwierigkeiten bei der RNA-Isolation verursachen aufgrund der geringen RNA-Menge, welche aus ihnen isoliert werden kann.³⁴ Die neutrophilen Granulozyten wurden in dieser Arbeit aus dem Blut isoliert. Möglicherweise ist die isolierbare RNA-Menge in neutrophilen Granulozyten aus der Leber höher. Allerdings wurde in Vorversuchen festgestellt, dass die Anzahl an isolierbaren neutrophilen Granulozyten aus der Leber deutlich geringer ist als aus dem Blut. Zudem wäre es möglich, dass mit einem anderen RNA-Isolationsprotokoll bzw. einem anderen RNA-Isolations-Kit größere Mengen RNA isoliert werden könnten.

Für die RNA-Sequenzierung wurden pro biologischer Probe mindestens 1 ng RNA mit einem möglichst hohen RIN-Wert benötigt. Diese Bedingungen waren bei allen Proben gegeben, sodass diese zur RNA-Sequenzierung gegeben wurden.

6.3 Geschlechtsdimorphismus im Genexpressionsprofil neutrophiler Granulozyten während eines Amöbenleberabszesses

Die Transkriptomanalyse ergab deutliche Unterschiede in der Genexpression neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von Geschlecht und Infektionsstatus. Da mehrere biologische Replikate pro Versuchsgruppe verwendet wurden, wurde als erstes eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, um zu prüfen ob die biologischen Replikate miteinander vergleichbar sind.

Die einzelnen biologischen Replikate lagen, bis auf zwei Ausreißer, nah beieinander und sind somit vergleichbar. Mögliche Gründe für die Ausreißer sind schlechte RNA-Qualität oder ein Fehler während der Gen-Sequenzierung.

6.3.1 Naive Männchen verglichen mit naiven Weibchen

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zeigen, dass neutrophile Granulozyten aus dem Blut naiver weiblicher Mäuse verstärkt Gene hochregulieren, welche eine Aktivierende Wirkung auf das Immunsystem haben. Im Gegensatz dazu exprimieren die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver männlicher Mäuse verstärkt Gene, die für eine positive Regulation der Genexpression sorgen. Im Volcano-Plot (Abbildung 24) ist zudem zu erkennen, dass die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut der Weibchen im naiven Zustand weitaus mehr Gene hoch- bzw. herunterregulieren als die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver Männchen. Diese Aussage wird durch das Venn-Diagramm in Abbildung 31 bestätigt. Aus dem Diagramm lässt sich ableiten, dass die Genexpression der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut im naiven Zustand geringer ist im Vergleich zu den ALA Mäusen. Zusätzlich lässt sich ablesen, dass die neutrophilen Granulozyten männlicher Tiere deutlich weniger Gene hoch- als auch herunterregulieren. Die in neutrophilen Granulozyten hochregulierten Gene, welche dem Blut naiver Männchen entstammen, sind hauptsächlich Y-Chromosom-spezifische Gene und für die Fragestellung dieser Arbeit nebensächlich. In den neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver weiblicher Mäuse werden immunregulatorische Gene wie beispielsweise SLAMF6, GIMAP3 und BLK hochreguliert. Die Gene SLAMF6 und BLK spielen eine Schlüsselrolle in der Entstehung und dem Verlauf einiger Autoimmunerkrankungen.^{37,38,39}

Die hohe Expression dieser und ähnlicher Gene in naiven weiblichen Mäusen könnte mit der immunaktivierenden Funktion des Östrogens zusammenhängen. Die weiblichen Mäuse produzieren deutlich mehr Östrogen im Vergleich zu den männlichen Mäusen. Die immunaktivierende Wirkung führt bei den Weibchen zu einer besseren Infektionsabwehr, aber es erhöht das Risiko zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen.¹⁵ Die verstärkte Aktivierung des Immunsystems der weiblichen Mäuse könnte zu einer schnelleren Immunantwort im Falle einer Infektion führen. Das wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass *E. histolytica* in weiblichen Mäusen bereits nach drei Tagen nicht mehr nachweisbar ist und die weiblichen Mäuse kleinere Abszesse ausbilden.

6.3.2 Naive Männchen verglichen mit ALA Männchen

Aus dem Vergleich des Genexpressionsprofils der neutrophilen Granulozyten, welche aus dem Blut naiver Männchen sowie ALA Männchen isoliert wurden, ergibt sich, dass während einer Infektion mit *E. histolytica* besonders viele Gene hochreguliert werden, welche einen Einfluss auf das Immunsystem haben. Im Vergleich dazu ergaben die Untersuchungen des Genexpressionsprofils naiver Männchen, dass vor allem Gene hochreguliert werden, deren genaue Funktion noch nicht bekannt ist. Die Gene, deren Funktion größtenteils bekannt ist und die in neutrophilen Granulozyten naiver Männchen hochreguliert werden, sind CDYL2, CDAN1 und CTLA2A. Es wird vermutet, dass die ersten beiden Gene eine negative Auswirkung auf die DNA-Replikation haben könnten.³⁶ Die Funktion des Gens CTLA2A wird aktuell erforscht, aber es wird vermutet, dass dieses Gen zu einer negativen Regulierung einer Entzündungsreaktion führt und somit eine antiinflammatorische Wirkung hat.³⁶

Gene, die einen Einfluss auf das Immunsystem haben und durch die neutrophilen Granulozyten der männlichen ALA Mäuse hochreguliert werden, sind vor allem OAS1A, OAS1G, IFIT1, IFIT3B, IFIT3 und RSAD2. Diese Gene werden signifikant stärker hochreguliert in den neutrophilen Granulozyten männlicher ALA Mäuse, wie im zugehörigen Volcano-Plot zu erkennen ist. Das ist plausibel, da einige dieser Gene spezifisch als Reaktion auf das Auftreten eines fremden Organismus exprimiert werden. Dem entsprechend werden diese Gene in den neutrophilen Granulozyten naiver männlicher Mäuse runterreguliert. Zudem zeigt der Volcano-Plot, dass eine größere Anzahl an Genen durch die neutrophilen Granulozyten während eines Amöbenleberabszesses exprimiert werden. Aus dem Venn-Diagramm in Abbildung 31 resultiert, dass sowohl in naiven Männchen als auch in ALA Männchen nur wenige Gene hoch- sowie runterreguliert werden.

Besonders auffällig ist die Hochregulation der Gene IFIT1, IFIT3 und IFIT3b in den neutrophilen Granulozyten männlicher ALA Mäuse. Diese Gene werden als Reaktion auf das Vorhandensein von INF- α und INF- β , welche von Monozyten bzw. Makrophagen produziert werden, exprimiert. Zudem ist auf dem Volcano-Plot zu sehen, dass die neutrophilen Granulozyten männlicher ALA Mäuse das Gen RTP4 hochregulieren. Die Expression der Gene IFIT1, IFIT3 und RTP4 führt zu der Produktion verschiedener Proteine mit antiviralen und antiproliferativen Auswirkungen.^{36,40,41}

Die Hochregulation immunaktivierender Gene in den neutrophilen Granulozyten männlicher ALA Mäuse lässt darauf deuten, dass diese Gene als Reaktion auf eine Infektion mit *E. histolytica* hochreguliert werden und dadurch zu einer proinflammatorischen Immunantwort führen. Gleichzeitig werden diese immunaktivierenden Gene in neutrophilen Granulozyten naiver männlicher Mäuse herunterreguliert. Dies könnte mit dem männlichen Geschlechtshormon Testosteron zusammenhängen, da Testosteron immunsupprimierend wirkt.¹⁵ Die unterdrückende Wirkung des Testosterons auf das Immunsystem naiver männlicher Mäuse, könnte zu einer schlechteren Infektionsabwehr führen. Dies könnte ein Grund für die größeren Amöbenleberabszesse bei männlichen Mäusen und die längere Nachweisbarkeit des Protozoons im Lebergewebe während einer Infektion mit *E. histolytica* sein.

6.3.3 Naive Weibchen verglichen mit ALA Weibchen

Aus der Heatmap der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut naiver weiblicher Mäuse als auch weiblicher ALA Mäuse ist abzulesen, dass sich die neutrophilen Granulozyten der weiblichen ALA Mäuse ähnlich verhalten wie die neutrophilen Granulozyten männlicher ALA Mäuse. Auch bei dieser Gruppe werden verstärkt Gene hochreguliert,

welche einen Einfluss auf das Immunsystem haben. Analog zu den neutrophilen Granulozyten der männlichen ALA Tiere, werden Gene hochreguliert welche als Reaktion auf das Auftreten eines fremden Organismus exprimiert werden. Beispiele hierfür sind die Gene CASP4, HERC6, ZBP1, GRN und IFITM3.³⁶ Der zugehörige Volcano-Plot bestätigt, dass diese Gene signifikant stärker durch die neutrophilen Granulozyten der weiblichen ALA Mäuse hochreguliert werden. Zudem werden in den neutrophilen Granulozyten der weiblichen ALA Mäuse Gene wie IFI27L2A, S100A9, GRN und ZBP1 hochreguliert und in naiven weiblichen neutrophilen Granulozyten herunterreguliert. Es wird vermutet, dass diese Gene Auswirkungen auf das apoptotische Verhalten der neutrophilen Granulozyten haben.³⁶ Das könnte daran liegen, dass bei weiblichen Mäusen der Parasit bereits drei Tage nach der Infektion bezwungen ist. Zudem würde es erklären, warum im Blut weiblicher ALA Mäuse weniger neutrophile Granulozyten detektierbar sind als im Blut männlicher ALA Mäuse. Die Hochregulation von Genen, welche zu einer Apoptose von neutrophilen Granulozyten zu Folge haben, könnte dazu führen, dass sich die neutrophilen Granulozyten im Blut nicht um einen möglichen Leberabszess akkumulieren. Dies führt zu einer Reduktion des ALA Volumens. Wäre das nicht der Fall könnten neutrophile Granulozyten durch ihre amöbicide Wirkung das Lebergewebe weiter schädigen.²⁸ Die Herunterregelung dieser Gene bei naiven weiblichen Mäusen, könnte damit zusammenhängen, dass im Blut naiver weiblicher Mäuse keine erhöhten Konzentrationen an neutrophilen Granulozyten vorhanden sind. In dem Venn-Diagramm in Abbildung 31 ist zu erkennen, dass weibliche Mäuse deutlich mehr Gene regulieren und die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut weiblicher Mäuse eine viel stärkere Genexpressionsaktivität zeigen. Dies könnte möglicherweise einer der Gründe sein, warum bei weiblichen Mäusen sowie Frauen ein kleinerer Amöbenleberabszess entsteht, vor allem wenn es Gene sind, die Immunsystemrelevant sind. Des Weiteren könnte die stärkere Genexpressionsaktivität naiver Weibchen ein Grund dafür sein, dass der Parasit schneller bezwungen wird und somit nicht mehr nachweisbar ist.

6.3.4 ALA Männchen verglichen mit ALA Weibchen

Im finalen Vergleich wurde die Genexpression neutrophiler Granulozyten aus dem Blut männlicher und weiblicher ALA Mäuse miteinander verglichen. In der Heatmap ist zu sehen, dass neutrophile Granulozyten männlicher ALA Mäuse nicht so viele Gene hochregulieren wie weibliche ALA Mäuse. Diese Feststellung wird durch den zugehörigen Volcano-Plot bestätigt. Zudem ist die Funktion vieler dieser Gene bislang nicht ausreichend erforscht. Die neutrophilen Granulozyten, welche aus dem Blut weiblicher ALA Mäuse isoliert wurden, regulieren weitaus mehr Gene hoch. Dazu zählen Gene wie BCL11B, IL27RA, KAT2A und EGR1. Diese Gene sind für die Aktivierung und Differenzierung von Leukozyten zuständig.³⁶ Außerdem werden verstärkt Gene hochreguliert, welche einen positiven Einfluss auf die Zytokin-Produktion der Zellen haben.³⁶ Beispiele hierfür sind Gene wie CD2, OSM und EGR1. Außerdem hat das Gen EGR1 Auswirkungen auf die Apoptose von Zellen, in denen es exprimiert wird.⁴² Somit zeigen die neutrophilen Granulozyten weiblicher ALA Mäuse im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten männlicher ALA Mäuse eher eine immunsupprimierende Wirkung. Durch den Volcano-Plot wird bestätigt, dass diese Gene viel stärker in den neutrophilen Granulozyten weiblicher ALA Mäuse hochreguliert werden. Im Vergleich zu den naiven Mäusen ist auffällig, dass die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut sowohl männlicher als auch weiblicher ALA Mäuse deutlich mehr Gene hoch- bzw. herunterregulieren. Dies wird nicht nur durch die Volcano-Plots bestätigt, sondern auch

durch die Venn-Diagramme. Aus dem Venn-Diagramm kann entnommen werden, dass neutrophile Granulozyten *E. histolytica* -infizierter C57BL/6J Mäuse insgesamt 223 Gene hochregulieren und 26 Gene herunterregulieren. Im Vergleich dazu regulieren neutrophile Granulozyten naiver C57BL/6J Mäuse 128 Gene hoch und 8 Gene herunter. Von den 223 hochregulierten Genen der neutrophilen Granulozyten der *E. histolytica* -infizierten C57BL/6J Mäuse, sind 63 Gene identisch mit den hochregulierten Genen in den neutrophilen Granulozyten naiver Mäuse. Ebenfalls sind 4 der 8 herunterregulierten Gene der neutrophilen Granulozyten naiver Mäuse identisch mit den herunterregulierten Genen in neutrophilen Granulozyten *E. histolytica* -infizierter C57BL/6J Mäuse.

Die Hochregulation immunsupprimierender Gene in weiblichen ALA Mäusen deutet eher darauf hin, dass die neutrophilen Granulozyten im Blut dieser Mäuse eher in die Apoptose gehen. Gleichzeitig zeigt die zugehörige Heatmap, dass das Gen *EGR1* in neutrophilen Granulozyten männlicher ALA Mäuse herunterreguliert wird. Das könnte erklären, warum sich in den Lebern männlicher ALA Mäuse im Vergleich zu weiblichen ALA Mäusen große Abszesse bilden.

6.3.5 Interpretation

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass neutrophile Granulozyten naiver weiblicher Mäuse im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten naiver männlicher Mäuse eine eher aktivierende Wirkung auf das Immunsystem haben. Neutrophile Granulozyten männlicher Mäuse hingegen haben eine eher immunsupprimierende Wirkung. Im Verlauf einer Infektion mit *E. histolytica* regulieren die neutrophilen Granulozyten männlicher Mäuse verstärkt immunaktivierende Gene hoch, während neutrophile Granulozyten *E. histolytica* -infizierter weiblicher Mäuse verstärkt Gene hochregulieren, welche eine Apoptose neutrophiler Granulozyten zur Folge haben und somit immunsupprimierend wirken. Um zu erforschen, ob diese geschlechtsspezifischen Unterschiede chromosomal bedingt sind oder ob die Geschlechtshormone einen Einfluss auf die Expression der hier gezeigten Gene haben, können in Zukunft noch weitere Versuche durchgeführt werden.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Murphy, Kenneth M., Casey Weaver, und Charles Janeway. *Janeway Immunologie*. Übersetzt von Lothar Seidler. 9. Auflage. Lehrbuch. Berlin [Heidelberg]: Springer Spektrum, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
2. Swamydas, Muthulekha, u. a. „ISOLATION OF MOUSE NEUTROPHILS“. *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan ... [et al.], Bd. 110, August 2015, S. 3.20.1-3.20.15. PubMed Central, <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0320s110>.
3. Rohte, Moritz. *Charakterisierung pro- und antiinflammatorischer Expressionsmuster von murinen neutrophilen Granulozyten in der Entamoeba histolytica Infektion als auch unter in vitro Stimulation*. Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg, 2021.
4. Amulic, Borko, u. a. „Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease“. *Annual Review of Immunology*, Bd. 30, Nr. 1, April 2012, S. 459–89. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>.
5. Lotter, Hanna, und Marcus Altfeld. „Sex Differences in Immunity“. *Seminars in Immunopathology*, Bd. 41, Nr. 2, März 2019, S. 133–35. Springer Link, <https://doi.org/10.1007/s00281-018-00728-x>.
6. Liew, Pei Xiong, und Paul Kubes. „The Neutrophil’s Role During Health and Disease“. *Physiological Reviews*, Bd. 99, Nr. 2, April 2019, S. 1223–48. PubMed, <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>.
7. Ruggieri, Anna, u. a. „The Influence of Sex and Gender on Immunity, Infection and Vaccination“. *Annali Dell’Istituto Superiore Di Sanita*, Bd. 52, Nr. 2, Juni 2016, S. 198–204. PubMed, https://doi.org/10.4415/ANN_16_02_11.
8. Silvestre-Roig, Carlos, u. a. „Neutrophil Diversity in Health and Disease“. *Trends in Immunology*, Bd. 40, Nr. 7, Juli 2019, S. 565–83. PubMed, <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.012>.
9. Kolaczowska, Elzbieta, und Paul Kubes. „Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation“. *Nature Reviews Immunology* 13, Nr. 3 (März 2013): 159–75. <https://doi.org/10.1038/nri3399>.
10. Jaillon, Sébastien, Kevin Berthenet, und Cecilia Garlanda. „Sexual Dimorphism in Innate Immunity“. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 56, Nr. 3 (Juni 2019): 308–21. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8648-x>.
11. Lotter, Hannelore, Thomas Jacobs, Iris Gaworski, und Egbert Tannich. „Sexual Dimorphism in the Control of Amebic Liver Abscess in a Mouse Model of Disease“. *Infection and Immunity* 74, Nr. 1 (Januar 2006): 118–24. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.118-124.2006>.
12. Gupta, Sarthak, Shuichiro Nakabo, Luz P. Blanco, Liam J. O’Neil, Gustaf Wigerblad, Rishi R. Goel, Pragnesh Mistry, u. a. „Sex Differences in Neutrophil Biology Modulate Response to Type I Interferons and Immunometabolism“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, Nr. 28 (14. Juli 2020): 16481–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003603117>.
13. Libert, Claude, Lien Dejager, und Iris Pinheiro. „The X Chromosome in Immune Functions: When a Chromosome Makes the Difference“. *Nature Reviews Immunology* 10, Nr. 8 (August 2010): 594–604. <https://doi.org/10.1038/nri2815>.
14. Mol, Sanne, Florianne M. J. Hafkamp, Laura Varela, Neena Simkhada, Esther W. Taanman-Kueter, Sander W. Tas, Marca H. M. Wauben, Tom Groot Kormelink, und Esther C. de Jong. „Efficient Neutrophil Activation Requires Two Simultaneous Activating Stimuli“. *International Journal of Molecular Sciences* 22, Nr. 18 (18. September 2021): 10106. <https://doi.org/10.3390/ijms221810106>.
15. Klein, Sabra L., und Katie L. Flanagan. „Sex Differences in Immune Responses“. *Nature Reviews Immunology* 16, Nr. 10 (Oktober 2016): 626–38. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>.
16. Rubin, Joshua B., Joseph S. Lagas, Lauren Broestl, Jasmin Sponagel, Nathan Rockwell, Gina Rhee, Sarah F. Rosen, u. a. „Sex Differences in Cancer Mechanisms“. *Biology of Sex Differences* 11, Nr. 1 (Dezember 2020): 17. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00291-x>.
17. Lunzen, J. van, und M. Altfeld. „Sex Differences in Infectious Diseases-Common but Neglected“. *Journal of Infectious Diseases* 209, Nr. suppl 3 (15. Juli 2014): S79–80. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu159>.
18. Zuk, Marlene. „The Sicker Sex“. Herausgegeben von Glenn F. Rall. *PLoS Pathogens* 5, Nr. 1 (30. Januar 2009): e1000267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000267>.
19. Roediger, Rebecca, und Mauricio Lisker-Melman. „Pyogenic and Amebic Infections of the Liver“. *Gastroenterology Clinics of North America* 49, Nr. 2 (Juni 2020): 361–77. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.013>.
20. Lotter, Hannelore, Elena Helk, Hannah Bernin, Thomas Jacobs, Cornelia Prehn, Jerzy Adamski, Nestor González-Roldán, Otto Holst, und Egbert Tannich. „Testosterone Increases Susceptibility to Amebic Liver Abscess in Mice and Mediates Inhibition of IFN γ Secretion in Natural Killer T Cells“. Herausgegeben von Gordon Langsley. *PLoS ONE* 8, Nr. 2 (12. Februar 2013): e55694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055694>.

21. Meyer, Martin, Helena Fehling, Jenny Matthiesen, Stephan Lorenzen, Kathrin Schuldt, Hannah Bernin, Mareen Zaruba, u. a. „Overexpression of Differentially Expressed Genes Identified in Non-Pathogenic and Pathogenic *Entamoeba Histolytica* Clones Allow Identification of New Pathogenicity Factors Involved in Amoebic Liver Abscess Formation“. Herausgegeben von Patricia J. Johnson. *PLOS Pathogens* 12, Nr. 8 (30. August 2016): e1005853. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005853>.
22. Sellau, Julie, Marie Groneberg, Helena Fehling, Thorsten Thye, Stefan Hoenow, Claudia Marggraff, Marie Weskamm, u. a. „Androgens Predispose Males to Monocyte-Mediated Immunopathology by Inducing the Expression of Leukocyte Recruitment Factor CXCL1“. *Nature Communications* 11, Nr. 1 (Dezember 2020): 3459. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17260-y>.
23. Helk, Elena, Hannah Bernin, Thomas Ernst, Harald Ittrich, Thomas Jacobs, Joerg Heeren, Frank Tacke, Egbert Tannich, und Hannelore Lotter. „TNF α -Mediated Liver Destruction by Kupffer Cells and Ly6Chi Monocytes during *Entamoeba Histolytica* Infection“. Herausgegeben von Sharon Reed. *PLoS Pathogens* 9, Nr. 1 (3. Januar 2013): e1003096. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003096>.
24. Nieves, Yesica Romina, Ayelen Lizarraga, Nehuen Salas, Verónica Mabel Cóceres, und Natalia Miguel. „Extracellular Vesicles Released by Anaerobic Protozoan Parasites: Current Situation“. *Cellular Microbiology* 22, Nr. 11 (November 2020). <https://doi.org/10.1111/cmi.13257>.
25. Jaillon, Sebastien, Andrea Ponzetta, Diletta Di Mitri, Angela Santoni, Raffaella Bonecchi, und Alberto Mantovani. „Neutrophil Diversity and Plasticity in Tumour Progression and Therapy“. *Nature Reviews Cancer* 20, Nr. 9 (September 2020): 485–503. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0281-y>.
26. Li, Wentian. „VOLCANO PLOTS IN ANALYZING DIFFERENTIAL EXPRESSIONS WITH MRNA MICROARRAYS“. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 10, Nr. 06 (Dezember 2012): 1231003. <https://doi.org/10.1142/S0219720012310038>.
27. Jia, Anqiang, Ling Xu, und Yi Wang. „Venn Diagrams in Bioinformatics“. *Briefings in Bioinformatics* 22, Nr. 5 (2. September 2021): bbab108. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab108>.
28. Campos-Rodríguez, Rafael, Manuel Gutiérrez-Meza, Rosa Adriana Jarillo-Luna, María Elisa Drago-Serrano, Edgar Abarca-Rojano, Javier Ventura-Juárez, Luz María Cárdenas-Jaramillo, und Judith Pacheco-Yepe. „A review of the proposed role of neutrophils in rodent amoebic liver abscess models“. *Parasite* 23 (2016): 6. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016006>.
29. Hrdlickova, Radmila, Masoud Toloue, und Bin Tian. „RNA -Seq Methods for Transcriptome Analysis“. *WIREs RNA* 8, Nr. 1 (Januar 2017). <https://doi.org/10.1002/wrna.1364>.
30. Li, Xiao, Yang Gao, Zicheng Xu, Zheng Zhang, Yuxiao Zheng, und Feng Qi. „Identification of Prognostic Genes in Adrenocortical Carcinoma Microenvironment Based on Bioinformatic Methods“. *Cancer Medicine* 9, Nr. 3 (Februar 2020): 1161–72. <https://doi.org/10.1002/cam4.2774>.
31. Priest, Henry D., Samuel E. Fox, Erik R. Rowley, Jessica R. Murray, Todd P. Michael, und Todd C. Mockler. „Analysis of Global Gene Expression in *Brachypodium distachyon* Reveals Extensive Network Plasticity in Response to Abiotic Stress“. Herausgegeben von Keqiang Wu. *PLoS ONE* 9, Nr. 1 (29. Januar 2014): e87499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087499>.
32. Amulic, Borko, Christel Cazalet, Garret L. Hayes, Kathleen D. Metzler, und Arturo Zychlinsky. „Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease“. *Annual Review of Immunology* 30, Nr. 1 (23. April 2012): 459–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>.
33. Metsalu, Tauno, und Jaak Vilo. „ClustVis: A Web Tool for Visualizing Clustering of Multivariate Data Using Principal Component Analysis and Heatmap“. *Nucleic Acids Research* 43, Nr. W1 (1. Juli 2015): W566–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>.
34. Stejskal, S., I. Koutná, und Z. Ručka. „Isolation of Granulocytes: Which Transcriptome Do We Analyse - Neutrophils or Eosinophils?“ *Folia Biologica* 56, Nr. 6 (2010): 252–55.
35. Estrada M, Varshney A, Ehrlich BE. Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2006 Sep 1;281(35):25492-501. doi: 10.1074/jbc.M603193200. Epub 2006 Jun 27. PMID: 16803879.
36. Uku Raudvere, Liis Kolberg, Ivan Kuzmin, Tambet Arak, Priit Adler, Hedi Peterson, Jaak Vilo: g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update) *Nucleic Acids Research* 2019; doi:10.1093/nar/gkz369 [PDF].
37. Yin, Bo-Wen, Bin Li, Arshad Mehmood, Congcong Yuan, Shuang Song, Ruo-Yi Guo, Lu Zhang, Tianzhao Ma, und Li Guo. „BLK Polymorphisms and Expression Level in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder“. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 27, Nr. 12 (Dezember 2021): 1549–60. <https://doi.org/10.1111/cns.13738>.
38. Yigit, Burcu, Ninghai Wang, Roland W. Herzog, und Cox Terhorst. „SLAMF6 in Health and Disease: Implications for Therapeutic Targeting“. *Clinical Immunology* 204 (Juli 2019): 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.10.013>.

39. Jokinen, Riikka, Heidi Junnila, und Brendan J. Battersby. „Gimap3: A Foot-in-the-Door to Tissue-Specific Regulation of Mitochondrial DNA Genetics“. *Small GTPases* 2, Nr. 1 (Januar 2011): 31–35. <https://doi.org/10.4161/sgtp.2.1.14937>.
40. Diamond, Michael S. „IFIT1: A Dual Sensor and Effector Molecule That Detects Non-2'-O Methylated Viral RNA and Inhibits Its Translation“. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25, Nr. 5 (Oktober 2014): 543–50. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.05.002>.
41. Boys, Ian N., Elaine Xu, Katrina B. Mar, Pamela C. De La Cruz-Rivera, Jennifer L. Eitson, Benjamin Moon, und John W. Schoggins. „RTP4 Is a Potent IFN-Inducible Anti-Flavivirus Effector Engaged in a Host-Virus Arms Race in Bats and Other Mammals“. *Cell Host & Microbe* 28, Nr. 5 (November 2020): 712–723.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.014>.
42. Wang, Bin, Hanfei Guo, Hongquan Yu, Yong Chen, Haiyang Xu, und Gang Zhao. „The Role of the Transcription Factor EGR1 in Cancer“. *Frontiers in Oncology* 11 (24. März 2021): 642547. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.642547>.

8. Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. vet. Hanna Lotter für die Möglichkeit bedanken in ihrer wunderbaren Arbeitsgruppe Molekulare Infektionsimmunologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin mein Praxissemester sowie meine Bachelorarbeit durchzuführen. Zusätzlich möchte ich mich dafür bedanken, dass ich immer auf sie zurückkommen konnte, falls Fragen zu meiner Arbeit entstanden sind.

Als nächstes möchte ich mich bei Dr. Marco Er-Lukowiak für die Betreuung meiner Bachelorarbeit bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei Dr. Julie Sellau dafür, dass sie sich zu Beginn meines Praxissemesters die Zeit genommen hat mich in das Thema einzuarbeiten und zu betreuen.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Andrä für die Betreuung meines Praxissemesters sowie der anschließenden Bachelorarbeit bedanken.

Ich möchte Birgit Hüsing und Ulricke Richardt für das teilweise stundenlange FACSen meiner Zellen danken. Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des Tierhauses des BNITM.

Ganz besonderer Dank gilt der wunderbaren AG Lotter, die mich herzlich bei sich aufgenommen hat und immer für mich da war. Ich hatte unendlich viel Spaß mit euch!

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für die guten Ratschläge an schlechten Tagen sowie die finanzielle Unterstützung während meines Jahres am BNI bedanken.

Hab euch lieb.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit ausschließlich von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Ich habe keine anderen Hilfsmittel benutzt und keine Quellen verwendet, die nicht im Literaturverzeichnis angegeben sind. Die eingereichte schriftliche Version entspricht der Version die auf dem elektronischen Speichermedium. Ich bin mir dessen bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben kann.

Hamburg, der 31.08.22

David Teodor Moamenpour