Universität Ulm
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

Modulation der Apoptose in Raw 264.7 und Thp-1 Makrophagen durch Infektion mit *Leishmania major*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Cordula Schropp
geb. in Schwabmünchen

2014

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	PD Dr. van Zandbergen
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Holger Barth
Tag der Promotion:	13.11.2014

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1 EINLEITUNG 1

1.1 Apoptose 1

1.1.1 Grundlagen 1

1.1.2 Schlüsselenzyme und Ablauf der Apoptose 2

1.1.3 Regulation und Modulation der Apoptose 6

1.1.4 Modulation von Apoptose durch Pathogene 8

1.2 Leishmanien 11

1.2.1 Medizinische Relevanz/ Leishmaniosen 11

1.2.2 Lebenszyklus 12

1.3 Zielsetzung der Arbeit 15

2 MATERIAL UND METHODEN 16

2.1 Material 16

2.1.1 Zelllinien und Leishmanien 16

2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen 16

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien 19

2.1.4 Antikörper 20

2.1.5 Geräte 20

2.2 Methoden 22

2.2.1 Zellkultur 22

2.2.2 Infektion von Makrophagen und Apoptoseinduktion 24

2.2.3 Kernfärbung 25

2.2.4 FACS-Analysen 26

2.2.5 Western-Blot 27

2.2.6 Statistik 29

3 ERGEBNISSE 30

3.1 Infektion von Raw-Makrophagen 30

3.1.1 Bestimmung der Apoptoserate 30

3.1.2 Freisetzung von Cytochrom *c* aus Mitochondrien 34

3.2 Infektion von Thp-1-Makrophagen 37

3.2.1 Bestimmung der Apoptoserate 37

3.2.2 Annexin-Messung bei Infektion mit fluoreszierenden Leishmanien 38

3.2.3 Apoptoseinduktion bei *L. major* Promastigoten 40

3.2.4 Caspasenaktivierung 43

3.2.5 Freisetzung von Cytochrom *c* 45

4 DISKUSSION 49

5 ZUSAMMENFASSUNG 62

6 LITERATURVERZEICHNIS 64

7 DANKSAGUNG 70

8 LEBENSLAUF 71

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Bak	“Bcl-2 homologous antagonist/killer” (ein Bcl-2 Protein)
Bax	“Bcl-2-associated-X protein” (ein Bcl-2 Protein)
Bcl-2	"B-cell lymphoma 2" (ein Bcl-2 Protein)
Bcl-w	Synonym für “Bcl-2-like protein 2” (eines der Bcl-2 Proteine)
Bcl-xl	“B-cell lymphoma-extra large” (ein Bcl-2 Protein)
BMDM	bone marrow-derived macrophages
Bok	“Bcl-2-related ovarian killer protein” (ein Bcl-2 Protein)
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl2	Calciumchlorid
Casp-3	Caspase-3
CD	"Cluster of Differentiation"
c-Flip	“cellular FLICE (FADD-like interleukin-1β converting enzyme) inhibitory protein”
CO2	Kohlendioxid
DD	“death domain”
DIABLO	“direct IAP binding protein with low isoelectric point”
DISC	“death-inducing signaling complex”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
Dtl.	Deutschland
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Endkonz.	Endkonzentration
FACS	“Fluorescence Activated Cell Sorting”
FADD	“FAS-associated via death domain”
FAS	entspricht CD 95 (Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie)
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm

gE	Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hcl	Salzsäure
IAP	"inhibitor of apoptosis protein"
ICE	Interleukin-1β-Converting-Enzym
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
L. major	Leishmania major
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
µ	Mikro
NaCl	Natriumchlorid
NfκB	Nukleärer Faktor kappa B
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
pH	pH-Wert
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smac	"second mitochondrial activator of caspases"
St	Staurosporin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Puffer Lösung
TEMED	N, N , N`, N`-Tetraethylethylendiamin
TNF	“Tumor Necrosis Factor”
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
V	Volt

1 EINLEITUNG

1.1 Apoptose

1.1.1 Grundlagen

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, mit dem einzelne Zellen kontrolliert und ohne Beschädigung von Nachbarzellen aus dem Organismus entfernt werden können. Der Vorgang wird genetisch kontrolliert, läuft geregelt ab und ist durch bestimmte biochemische und morphologische Merkmale charakterisiert.

Apoptose stellt in vielzelligen Organismen einen wichtigen Mechanismus zur Erhaltung der Gewebehomöostase und zur Kontrolle der Zellzahl und Größe von Geweben dar. Beim Menschen spielt Apoptose v.a. in der Regeneration von Geweben eine entscheidende Rolle: in der Darmschleimhaut bzw. der Haut werden ständig neue Epithelzellen aus Stammzellen gebildet, diese differenzieren sich und werden nach einer bestimmten Zeit schließlich apoptotisch, um wiederum neuen Zellen Platz zu machen (Hotchkiss et al. 2009). Zelluntergang durch Apoptose lässt sich auch im Endometrium (bei Menstruation) nachweisen (Ulukaya et al. 2011). Bereits während der Embrogenese ist die kontrollierte Elimination von Zellen essenziell: die Gliedmaßen entstehen aus Extremitätenknospen, wobei Finger und Zehen durch interdigitales Gewebe initial noch miteinander verbunden sind. Diese Interdigitalhäute gehen im Lauf der Entwicklung durch Apoptose zugrunde, so dass Hände und Füße ihre endgültige Form erhalten (Ulukaya et al. 2011).

Via Apoptose können zudem Zellen aus dem Organismus entfernt werden, die nicht mehr benötigt werden. Das spielt v.a. im Immunsystem eine Rolle: reife, antigen-aktivierte B- und T-Zellen, die nach Beendigung der Immunantwort überflüssig geworden sind, werden auf diese Weise eliminiert (Strasser 2005).

Auch bei Infektionen, besonders in der Abwehr intrazellulärer Pathogene (Bakterien, Viren, Parasiten) spielt Apoptose eine entscheidende Rolle. Infizierte Zellen können erkannt und durch Apoptose gezielt aus dem Organismus entfernt werden (Hotchkiss et al. 2009, Ulukaya et al. 2011).

Nicht zuletzt wird bei entarteten Zellen bzw. bei irreparablen DNA-Schäden Apoptose induziert, wodurch die Entstehung von Malignomen verhindert werden

soll (Strasser 2005, Hotchkiss et al. 2009, Ulukaya et al. 2011).

Für vielzellige Organismen ist Apoptose also ein überlebenswichtiger regulatorischer Prozess. Typisch ist, dass gezielt bestimmte Zellen aus dem Organismus entfernt werden können ohne gesunde Nachbarzellen zu schädigen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass apoptotische Zellen keine Entzündungsreaktion hervorrufen, da das gesamte Zellmaterial in Membranvesikel verpackt wird ("apoptotische Körperchen"); diese werden gleich phagozytiert, bevor es zur Aktivierung des Immunsystems mit Anlockung von Immunzellen kommt. Deshalb wird Apoptose auch „stiller Zelltod“ genannt (Strasser 2005, Hotchkiss et al. 2009, Ulukaya et al. 2011).

Es ist mittlerweile bekannt, dass Apoptose nicht nur in mehrzelligen Organismen vorkommt, sondern auch bei Einzellern, z.B. bei Protozoen der Genera Trypanosoma, Plasmodium und Leishmania (Kaczanowski et al. 2011). Vermutlich nutzen Pathogene diesen Weg zur Immunevasion. Bei Leishmanien spielt Apoptose in verschiedenen Phasen des Lebenszyklus und in der Interaktion mit dem Zwischenwirt eine entscheidende Rolle zur Etablierung einer Infektion (Shaha 2006, van Zandbergen et al. 2007).

Eine andere Art des Zelltodes ist die Nekrose. Zellen werden nekrotisch, wenn sie durch exogene Noxen so stark geschädigt werden, dass ein kontrolliertes Absterben nicht mehr möglich ist. Starke Hitzeeinwirkung, Strahlung, mechanische Schädigung oder Vergiftung sind mögliche Ursachen dafür. In der Regel geht die Nekrose mit einer Entzündungsreaktion einher, die durch freigesetzte Enzyme und Metaboliten verursacht wird. Nekrose läuft ohne genetische Kontrolle ab, ist also kein programmiertes Geschehen. Im Unterschied zur Apoptose wird das Zellmaterial nicht in Vesikel verpackt, sondern es kommt zur völligen Zelllyse. Morphologisch unterscheidet sich die Nekrose von der Apoptose durch Vergrößerung des Zellvolumens und Auflockerung des Chromatins (Bröker et al. 2005).

1.1.2 Schlüsselenzyme und Ablauf der Apoptose

Im Folgenden soll auf einige der Schlüsselenzyme der Apoptose, die Caspasen und die Bcl-2-Proteine, genauer eingegangen werden.

Der Begriff "Caspase" stammt von engl. cysteine-dependent-aspartate-specific protease und beschreibt eine Gruppe von intrazellulären Proteasen, die ihre

Substrate selektiv an Aspartatresten spalten. Dazu benutzen Caspasen Cystein-haltige Abschnitte. Sie gehören zur Familie der Interleukin-1β-Converting-Enzyme (ICE). In der Zelle liegen die Caspasen als Zymogene (inaktive Vorstufen), sog. Procaspasen, vor. Sie müssen also erst aktiviert werden, um enzymatische Fähigkeit zu erlangen (Lavrik et al. 2005, Zhaoyu et al. 2005, Pop et al. 2009).

Inaktive Initiatorcaspasen (z.B. Caspasen-8 und -9) liegen in lebenden Zellen als Monomere vor und enthalten in ihrer Prodomäne strukturelle Muster, die zur sog. Death Domain (DD) Superfamilie gehören. Mit diesen Todesdomänen können die Initiatorcaspasen mit anderen DD interagieren. Wenn die Prodomänen der Initiatorcaspasen von einem Adaptermolekül gebunden werden, können sich die Procaspasen zu Homodimeren zusammenfinden. Durch die Dimerisierung entstehen enzymatisch aktive Bereiche. Ein Beispiel: mit Hilfe des Adapterproteins FADD, welches auch eine DD enthält, kann der Todesrezeptor das apoptotische Signal auf Caspase-8 weiterleiten. Dabei interagieren die beteiligten Proteine über ihre jeweiligen DD. Der daraus resultierende Proteinkomplex aus Todesrezeptor, Adapterprotein und zwei Monomeren der Procaspase-8 wird DISC (= death-inducing signaling complex) genannt. Er führt zur Dimerisierung und somit zur Aktivierung von Procaspase-8 (Green 2003, Peter et al. 2003).

Effektor-Procaspasen werden durch Proteolyse aktiviert. Dies geschieht durch aktive Initiatorcaspasen. Effektorcaspasen (u.a. Caspase-3) sind in der Lage, zahlreiche Substrate zu spalten. Dazu zählen u.a. Proteinkinasen, Proteine des Zytoskeletts und DNasen. Die dadurch induzierten Veränderungen führen zum Verlust zellulärer Strukturen und Funktionen und in der Folge schließlich zum Zelltod. In dieser Phase werden biochemische und morphologische Charakteristika der Apoptose sichtbar (z.B. Zellschrumpfung, Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung, Abschnürung von apoptotischen Körperchen). Effektorcaspasen haben also die Aufgabe, den Abbau der Zelle voranzutreiben, zu dirigieren (vgl. Lavrik et al. 2005, Pop et al. 2009).

Manche Caspasen können durch IAP Proteine (= inhibitor of apoptosis proteins) direkt gehemmt werden, z.B. die Caspasen 3, 6 und 9. IAP Proteine wiederum können durch Smac/ DIABLO antagonisiert werden, die wie Cytochrom *c* aus dem Mitochondrium stammen. Hier wird deutlich, dass die Regulierung der Apoptose wichtig ist, denn in der Regel führt die Aktivierung von Caspasen sofort und effektiv zum Zelluntergang. Die Blockierung von Caspasen kann zum Verlust bzw.

zu verzögertem Auftreten apoptotischer Merkmale führen und die Zelle zumindest eine gewisse Zeit lang vor dem Tod bewahren (Riedl et al. 2004, Vucic et al. 2007).

Die Bcl-2 Proteine (B-cell lymphoma 2) stellen eine weitere wichtige Gruppe von Schlüsselennzyme der Apoptose dar. Sie kontrollieren den intrinsischen/ mitochondrialen Weg. Interessant ist, dass die Mitglieder dieser Proteinfamilie entweder pro- oder anti-apoptotische Funktion haben (Cory et al. 2002, Youle et al. 2008).

Alle Bcl-2 Proteine besitzen sog. BH-Regionen (Bcl-2-homology). Anhand der Anzahl dieser BH-Regionen werden sie in drei verschiedene Gruppen eingeteilt. BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1 und A1/BFL-1 besitzen jeweils vier BH-Regionen (BH 1-4) und haben antiapoptotische Wirkung. Zur Gruppe der proapoptotischen bcl-2 Proteine gehören z.B. Bax, Bak und Bok; sie besitzen drei BH-Regionen (BH

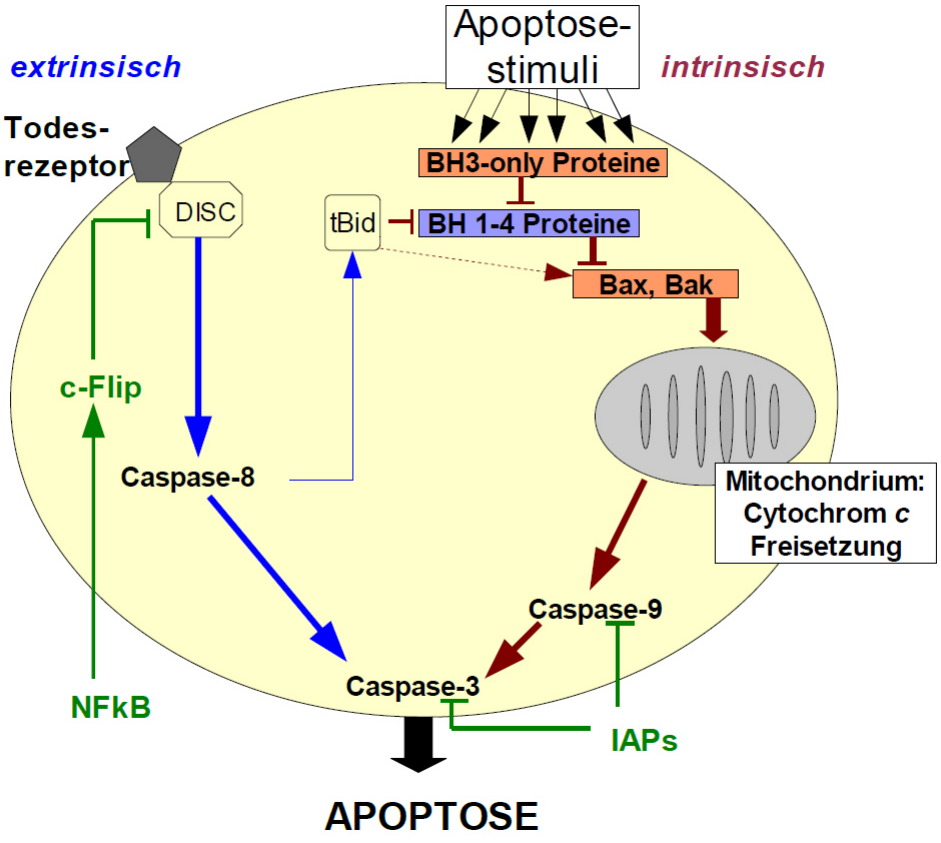


Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Apoptosekaskade einer Zelle
Apoptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Wird Apoptose durch Aktivierung des Todesrezeptors ausgelöst, spricht man vom extrinsichen Weg. Beim intrinsischen Weg (z.B. bei DNA-Schaden) spielt die Freisetzung von Cytochrom *c* aus Mitochondrien eine zentrale Rolle. Intrinsischer und extrinsischer Weg münden in eine gemeinsame Endstrecke, der Aktivierung von Effektorcaspasen, z.B. Caspase-3.
Hier grün dargestellt sind einige anti-apoptotische Signalwege.

1-3). Eine weitere proapoptotische Gruppe wird von den BH3-only Proteinen gebildet. Bei diesen Proteinen findet sich nur noch eine BH-Region, die BH 3-Region (Gélinas et al. 2005, Lomonosova et al. 2009).

Die verschiedenen Bcl-2 Proteine können miteinander interagieren. In einer lebenden Zelle herrscht ein "Gleichgewicht" zwischen pro- und antiapoptotischen bcl-2 Proteinen. Die antiapoptotischen BH 1-4 Proteine sind Gegenspieler der proapoptotischen bcl-2 Proteine BAX und BAK; die BH3-only Proteine liegen normalerweise im nicht aktivierten Zustand vor (Kuwana et al. 2005, Danial 2007, Youle et al. 2008) .

Ein intrinsischer Apoptosestimulus wie z.B. DNA-Schaden, führt zur Aktivierung von BH3-only Proteinen. Deren Aufgabe ist es dann, BAX und BAK zu aktivieren, um auf diese Weise das apoptotische Signal weiter zu leiten. BAX und BAK können daraufhin Oligomere bilden und an die äußere Mitochondrienmembran wandern und diese permeabilisieren. Es folgen weitere Schritte wie Freisetzung von Cytochrom *c* und Aktivierung von Caspasen; die Zelle wird apoptotisch. Letztendlich führt die Aktivierung von BH3-only Proteinen also zum Zusammenbruch des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren, wobei die proapoptotische Fraktion überwiegt. Apoptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden, die über unterschiedliche Signaltransduktionswege zum Untergang der Zelle führen (vgl. Danial 2007, Youle et al. 2008, Hotchkiss et al. 2009, Lomonosova et al. 2009).

Man unterscheidet prinzipiell zwei Wege, die zur Auslösung der Apoptose führen: den extrinsischen und den intrinsischen. Der extrinsische Signalweg wird über die Bindung eines Liganden an den entsprechenden Rezeptor, einen sog. "Todesrezeptor", vermittelt; diese Rezeptoren gehören zur TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNF= tumor necrosis factor) oder zum TRAIL-Rezeptorsystem und besitzen einen extrazellulären Bestandteil und eine intrazelluläre sog. Todesdomäne ("death domain"). Bekannte Vertreter sind der TNF-Rezeptor und der Fas-Rezeptor (syn. CD95, Apo-1). Sie können u.a. von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen gebunden und aktiviert werden. Der death-inducing signaling complex (DISC) entsteht nach Bindung des Todesrezeptors und führt zur Aktivierung von Caspase-8. Diese ist dann in der Lage, weitere Caspasen zu aktivieren (vgl. u.a. Zhaoyu et al. 2005, Youle et al. 2008).

Der intrinsische Weg heißt auch mitochondrialer Weg oder Bcl-2-kontrollierter

Weg, da durch die Bcl-2 Proteine die Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem Mitochondrium reguliert wird. Dieser Weg kann durch eine Vielzahl anderer Stimuli ausgelöst werden. Dazu zählen UV-Strahlung, DNA-Schäden, Wachstumsfaktor-Entzug, oxidativer Stress oder virale Infektion. Die Stimuli führen zur Aktivierung von sog. BH3-only Proteinen, die zur Familie der bcl-2 Proteine gehören. Diese interagieren wiederum mit anderen Mitgliedern der bcl-2 Proteinfamilie. Es kommt zum Übergewicht der proapoptotischen Proteine, die äußere Mitochondrienmembran wird permeabel und Substanzen des intermembranösen Raums wie Cytochrom *c* gelangen ins Zytosol. Dort wirken sie als starke Aktivatoren von Caspase 9 (Garrido et al. 2006, Green 2005, Karbowski et al. 2006, Kim et al. 2006, Chen et al. 2007, Danial 2007).

Der extrinsische und der intrinsische Weg münden in eine gemeinsame Endstrecke. Caspase-8 aus dem extrinsischen bzw. Caspase-9 aus dem intrinsischen Weg können Caspase-3 spalten, eine sog. Effektorcaspase. Diese ist in der Lage, zahlreiche Proteasen und DNasen zu aktivieren. Das führt letztendlich zur Zerlegung und zum Untergang der Zelle. Über die Spaltung des proapoptotischen Bcl-2 Proteins Bid durch Caspase-8 kann der intrinsische Weg auch nach Aktivierung des Todesrezeptors eingeschlagen werden.

1.1.3 Regulation und Modulation der Apoptose

Apoptose ist ein sehr komplexer Prozess, an dessen Ende der Untergang einer Zelle steht. Deshalb wird der Vorgang streng reguliert. Daran sind zahlreiche Proteine, Gene und Signalkaskaden beteiligt.

Neben den bereits erwähnten Bcl-2 Proteinen, die maßgeblich an der Regulation der Cytochrom *c*-Freisetzung aus Mitochondrien beteiligt sind gibt es eine weitere Gruppe regulatorischer Proteine, die IAPs (= inhibitor of apoptosis proteins), die selektiv bestimmte Caspasen hemmen und auf diese Weise den Zelltod verhindern können (Lavrik et al. 2005, Pop et al. 2009, Ulukaya et al. 2011).

Wichtige antiapoptotische Signalwege sind z.B. der NF-κB-Weg und der PI3K/Akt Weg. NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor, der im inaktiven Zustand im Zytosol an IκB gebunden vorliegt. Diese Bindung kann durch die von IKK (Iκ-Kinase) vermittelte Phosphorylierung von IκB aufgehoben werden. Daraufhin kann NF-κB in den Zellkern wandern und dort die Transkription von bestimmten, u.a. anti-apoptotischen, Genen induzieren. Dazu zählen z.B. Gene, die für c-Flip (hemmt

die Aktivierung von Caspase-8), Bfl-1/A1 (schützt vor Cytochrom *c* Freisetzung) oder die Caspase-Inhibitoren IAP-1 und 2 kodieren (Carmen et al. 2007, Perkins 2007). Ein anderer antiapoptotischer Signaltransduktionsweg ist der PI3K/Akt Weg. PI3K kann z.B. durch Bindung an Tyrosinkinaserezeptoren (z.B. durch Wachstumsfaktoren) aktiviert werden. Nach Aktivierung phosphoryliert es Akt, welches wiederum das proapoptotische bcl-2 Protein Bad und die "forkhead transcription factors" (wichtig für Transkription proapoptotischer Gene) inaktiviert. Außerdem aktiviert phosphoryliertes Akt die Iκ-Kinase (Ruhland et al. 2007).

Falls die Apoptosemaschinerie gestört ist, können daraus Krankheiten resultieren. Defekte im Apoptoseablauf können einerseits zu vermehrtem Untergang von Zellen führen - andererseits aber auch die Apoptoseinduktion erschweren und die Eliminierung geschädigter Zellen hemmen. Dabei gibt es zahlreiche Möglichkeiten, in die Apoptosekaskade einzugreifen. Es kann sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg moduliert werden. Außerdem ist es möglich, Regulationsmechanismen zu verändern. Im Folgenden sollen zur Veranschaulichung nur einige wenige Krankheiten genannt werden, bei denen Apoptosedefekte pathogenetisch von Bedeutung sind (Hotchkiss et al. 2009).

Bei den meisten Neoplasien findet man Defekte in der Apoptosekaskade. In den betroffenen Zellen ist die Apoptoseauslösung erschwert (z.B. durch defekte Bcl-2-Proteine) und das Entstehen von Tumoren wird erleichtert (Nemec et al. 2008). Ein gut erforschtes Beispiel: das Tumorsuppressor-Gen TP53. Es wird normalerweise durch DNA-Schäden aktiviert und hat die Aufgabe, die Transkription proapoptotischer Proteine wie PUMA, NOXA und BAX zu induzieren. Falls TP53 mutiert ist (z.B. beim Li-Fraumeni Syndrom), wird die Entstehung von Tumoren erleichtert. Ein anderes Beispiel: normalerweise werden autoreaktive B- und T-Zellen via Apoptose aus dem Organismus entfernt. Funktioniert dies nicht, kann die Entstehung von Autoimmunerkrankungen, z.B. Diabetes mellitus Typ 1, begünstigt werden (Hotchkiss et al. 2009).

Defekte in der Apoptosekaskade, die zu vermehrtem Zelltod führen, können bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden, z.B. bei M. Parkinson, M. Alzheimer und Multipler Sklerose. Bei Sepsis wurde ein verstärkter Abbau von Immuneffektorzellen durch Apoptose nachgewiesen, wodurch das Immunsystem stark beeinträchtigt wird (Green 2003, Nadiri et al. 2006).

Nicht immer ist eine defekte Apoptosemaschinerie die einzige Krankheitsursache,

aber eben einer der Mechanismen, die zur Entstehung einer Krankheit beitragen können.

1.1.4 Modulation von Apoptose durch Pathogene

Die Bedeutung des programmierten Zelltodes bei Infektionen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Apoptose spielt in der Abwehr von Krankheitserregern, besonders in der Abwehr intrazellulärer Pathogene, eine wichtige Rolle. Infizierte körpereigene Zellen werden vom immunkompetenten Organismus als solche erkannt und via Induktion von Apoptose aus dem Organismus entfernt (Hotchkiss et al. 2009, Ulukaya et al. 2011).

Einigen intrazellulären Erregern ist es bereits gelungen, in den Apoptoseablauf der Wirtszelle einzugreifen. Theoretisch kann die Apoptosekaskade auf jeder Stufe manipuliert werden: sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg, als auch die Signalkaskaden, die an der Regulation beteiligt sind. Die Modulation der Wirtszellapoptose stellt für das Pathogen einen von vielen anderen möglichen Wegen dar, die Infektion zu etablieren. Sie umfasst dabei ein breites Spektrum: von der Inhibierung der Apoptose bis hin zu deren Induktion. Wird die Wirtszelle als Ort für die Replikation genutzt, dann hat der Parasit ein Interesse daran, dass der Wirt möglichst lange am Leben bleibt, Apoptose wird inhibiert. Apoptoseinduktion findet dagegen im Allgemeinen eher bei Infektion von Zellen des adaptiven Immunsystems statt, um einer systemischen Immunantwort zu entfliehen (Schaumburg et al. 2006, Bruchhaus et al. 2007).

Im Folgenden soll die Modulation von Apoptose durch Protozoen als Mechanismus der Pathogenese anhand verschiedener Beispiele dargestellt werden (vgl. Leirião et al. 2004, Schaumburg et al. 2006, Bruchhaus et al. 2007, Carmen et al. 2007).

Trypanosoma brucei, der Erreger der afrikanischen Trypanosomiasis, ist in der Lage, Apoptose in Endothelzellen zu induzieren. Dieser Erreger kann eine Meningoenzephalitis verursachen. Dazu muss der extrazelluläre Parasit die Blut-Hirn-Schranke überwinden, um ins ZNS zu gelangen. Dies schafft er durch Bildung eines löslichen Faktors ("trypanosome apoptotic factor"), der Apoptose in den Endothelzellen auslöst. Somit kann diese biologische Barriere überwunden und neue Zellen können infiziert werden.

Das Protozoon *Cryptosporidium parvum* aktiviert in seiner Zielzelle den NF-κB-

Weg. Das schützt infizierte Zellen vor Apoptose. Jedoch wird in frühen Phasen (d.h. kurz nach Eindringen in die Wirtszelle) und in sehr späten Phasen (Austritt aus der infizierten Zelle, um weitere Zellen befallen zu können) der Infektion vermehrt Apoptose in den infizierten Zellen nachgewiesen. Cryptosporidien scheinen also einen Weg gefunden zu haben, die Apoptose ihrer Wirtszellen zu blockieren bis sie mit der Replikation fertig sind, um dann die Apoptosekaskade wieder frei zu geben. Allerdings ist das bisher nur eine Hypothese. Außerdem ist noch unklar, ob der NF-κB-Weg der einzige Weg ist, der angestoßen wird.

Ähnliche Abläufe wurden bei *Plasmodium falciparum* gefunden. Der Erreger der Malaria tropica befällt zunächst Hepatozyten, in denen die Differenzierung und Vermehrung der Plasmodien stattfindet. In diesem Stadium der Infektion wird die Apoptose der Leberzellen inhibiert. Artspezifisch nach 1-6 Wochen verlassen die Plasmodien die Leber und dringen in Erythrozyten ein. In dieser Phase der Infektion scheinen die Plasmodien den programmiertem Zelltod in Hepatozyten zu induzieren, um leichter ins Blut zu gelangen.

Ein weiterer Parasit, der Apoptose in seiner Wirtszelle moduliert, ist *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagas-Krankheit. Er ist in der Lage, die Apoptose von infizierten Neuronen zu hemmen. Dies geschieht mit Hilfe eines löslichen Faktors, der den Wachstumsfaktor *nerve growth factor* des Wirtes imitiert und damit indirekt den antiapoptotischen PI3K-Weg aktiviert. Außerdem ist die replikative amastigote Form des Parasiten fähig, den extrinsischen Apoptoseweg zu inhibieren: durch Induktion des antiapoptotischen Gens c-Flip wird die Spaltung von Procaspase-8 verhindert.

Auch Theilerien gehören zu den Protozoen, die in der Lage sind, antiapoptotische bzw. regulatorische Signalwege anzustoßen. Neben der Aktivierung des NF-κB-Wegs findet man in infizierten Zellen auch erhöhte Levels von c-Flip, c-IAP und x-IAP, allesamt Proteine, die an der Regulierung von Apoptose beteiligt sind und antiapoptotische Eigenschaften aufweisen.

Die Erreger der Toxoplasmose, *T. gondii*, können sowohl in den extrinsischen als auch in den intrinsischen Weg inhibierend eingreifen. In infizierten Zellen können die Caspasen 3, 8 und 9 nicht aktiviert werden. Die proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bax und Bad werden inaktiviert, antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Mcl-1 dagegen hochreguliert. Auf diese Weise wird das Gleichgewicht zw pro- und antiapoptotischen Faktoren zugunsten der antiapoptotischen verschoben, so wird

der Ablauf der Apoptose gestört und verzögert.

Ein weiteres gut erforschtes Beispiel für Modulation von Bcl-2 Proteinen sind Chlamydien, intrazelluläre Bakterien. Es ist bekannt, dass sowohl *C. trachomatis* als auch *C. pneumoniae* in der Lage sind, die pro-apoptotischen BH3-only Proteine Bim, Bad und PUMA zu hemmen (Fischer et al. 2004).

Neben der Sicherung des Überlebens des Parasiten in der Wirtszelle kann Modulation von Apoptose auch dazu genutzt werden, um überhaupt erst in den Wirt gelangen. Ein interessantes Beispiel dafür ist *L. major:* apoptotische infizierte PMN werden als "Trojanisches Pferd" benutzt, um schließlich unerkannt in Makrophagen, den definitiven Wirt, zu gelangen. Auf diese Weise, durch Phagozytose apoptotischer Partikel, werden Makrophagen nicht aktiviert und locken auch keine weiteren Immunzellen an. Die Auslösung einer Immunantwort wird umgangen (van Zandbergen et al. 2004 und 2007).

Man kann also sagen, dass es für intrazelluläre Parasiten von Nutzen sein kann, die Apoptosemaschinerie der Wirtszelle zu manipulieren. Dies kann auf jeder Ebene der Infektion von Vorteil sein, z.B. beim Eindringen in die Wirtszelle, zur Sicherstellung bzw. zur Verlängerung des Überlebens im Wirt, zum Austritt aus der infizierten Zelle um weitere Zellen befallen zu können oder zur Überwindung biologischer Hindernisse wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke. Wichtig ist, dass die Modulation der Wirtszellapoptose nur eine von vielen Möglichkeiten darstellt, wie die Pathogene ihr Ziel, die Etablierung der Infektion, erreichen können.

1.2 Leishmanien

1.2.1 Medizinische Relevanz/ Leishmaniosen

Zur Gattung der Leishmanien gehören über 20 für den Menschen pathogene Erreger, die unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen können, von unkomplizierten selbst heilenden Hautulzerationen über chronische mukokutane Infektionen bis hin zur lebensgefährlichen Beteiligung innerer Organe. Die verschiedenen von Leishmanien hervorgerufenen Krankheitsbilder werden unter dem Begriff "Leishmaniose" zusammengefasst. Weltweit sind Menschen in 88 Ländern von einer Leishmanien-Infektion bedroht. Vor allem tropische und subtropische Länder sind betroffen; die Erreger der Orientbeule kommen allerdings auch im Mittelmeerraum vor *(WHO: www.who.int/leishmaniasis/en)*. Die WHO schätzt die Zahl der Neuerkrankungen auf 2 Mio. pro Jahr.

Die kutane Form der Leishmaniose - auch bekannt als Orientbeule oder Aleppobeule - stellt sich als dermaler Knoten oder als Hautläsion dar. Sie heilt bei Immunkompetenten in der Regel spontan aber langsam ab, hinterlässt jedoch eine Narbe. In schweren Fällen können sich auch multiple (bis zu 200) Hautulzerationen bilden, deren narbiges Abheilen den Betroffenen entstellen kann. Erreger der Hautleishmaniose sind z.B. *L. major* und *L. tropicalis.*

Bei Befall der Schleimhäute in Nase, Mund und Rachen spricht man von mukokutaner Leishmaniose, die z.B. von *L. braziliensis* verursacht wird. Diese Form heilt nicht spontan; in den meisten Fällen wird der Infizierte stark entstellt.

Die viszerale Leishmaniose (syn. Kala Azar) ist eine systemische Erkrankung, die ohne Therapie tödlich verläuft. Typische Symptome sind Fieber mit hohen Spitzen, Hepatosplenomegalie, Gewichtsverlust und Anämie. *L. donovani*, *L. chagasi* und *L. infantum* sind die häufigsten Erreger. Es gibt etwa 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr, und jedes Jahr sterben ca. 50.000 der an viszeraler Leishmaniose Erkrankten. Eine Komplikation der viszeralen Leishmaniose ist die PKDL (post-kala-azar-dermal leishmaniasis), die nach medikamentöser Behandlung der viszeralen Leishmaniose auftreten kann. Sie ist gekennzeichnet durch ein flächenhaftes makulo-papulöses bis noduläres Exanthem und tritt gehäuft bei Immunsupprimierten und bei Infektion mit *L. infantum* auf. Die Betroffenen sind hoch kontagiös, da die nodulären Läsionen zahlreiche Parasiten enthalten.

Nicht alle in einem Endemiegebiet lebenden Personen erkranken tatsächlich an

Leishmaniose. Außerdem begünstigt die AIDS-Erkrankung die Infektion mit Leishmanien und korreliert mit einem schweren Verlauf der Leishmaniose. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass neben der Art des Erregers auch das Immunsystem des Infizierten über das Ausmaß der Erkrankung entscheidet (Chappuis et al. 2007, Tripathi et al. 2007).

1.2.2 Lebenszyklus

Leishmanien sind einzellige Parasiten, die zur Familie der Trypanosomatidae gehören. Sie kommen als begeißelte Form (Promastigoten) und ohne Flagellum (Amastigoten) vor. Es sind etwa 30 verschiedene Leishmanien-Arten bekannt, davon sind 21 humanpathogen. Charakteristisch für den Lebenszyklus von Leishmanien ist, dass sie einen Wirtswechsel zwischen Sandmücke und Säugetier vornehmen. Die Sandmücke ist zugleich Endwirt und Vektor, d.h. in der Sandmücke findet die geschlechtliche Vermehrung der Leishmanien statt und sie dient als Transportwirt, um den Parasiten vom einen Wirt auf den nächsten zu übertragen. Die Leishmanien leben dort extrazellulär in ihrer begeißelten Form (Promastigoten). Im Zwischenwirt Säugetier können sich die Leishmanien intrazellulär in Makrophagen durch Teilung vermehren. Dort findet man sie in ihrer unbegeißelten Form, den Amastigoten (vgl. Aga et al. 2002, van Zandbergen et al. 2004 u. 2006 u. 2007, Rogers et al. 2007).

In der weiblichen Sandmücke der Gattung Phlebotomus bzw. Lutzomyia leben die Leishmanien in ihrer begeißelten Form extrazellulär im Verdauungstrakt der Fliege. In diesem Stadium werden sie "prozyklische Promastigoten" genannt. Sie sind nicht infektiös und besitzen die Fähigkeit, sich zu teilen und zu vermehren. Nach dieser Phase findet eine Umwandlung der Leishmanien statt, die sog. Metazyklogenese: die prozyklischen reifen zu virulenten metazyklischen Promastigoten heran - von denen ein Teil apoptotisch ist (Shaha 2006) - und wandern in den Saugapparat der Mücke. Bei der nächsten Blutmahlzeit der Sandmücke werden diese dann unter die Haut des gestochenen Säugetiers injiziert. Leishmanien können in vielen Säugetieren wie z.B. in Nagetieren, Katzen, Hunden und Menschen überleben. Im Säugetier-Wirt werden die Promastigoten von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) phagozytiert, den ersten Abwehrzellen am Ort der Entzündung (Mückenstich). Die PMN locken mit Hilfe verschiedener Chemokine wie IL-8 und MIP-1β weitere Neutrophile und auch

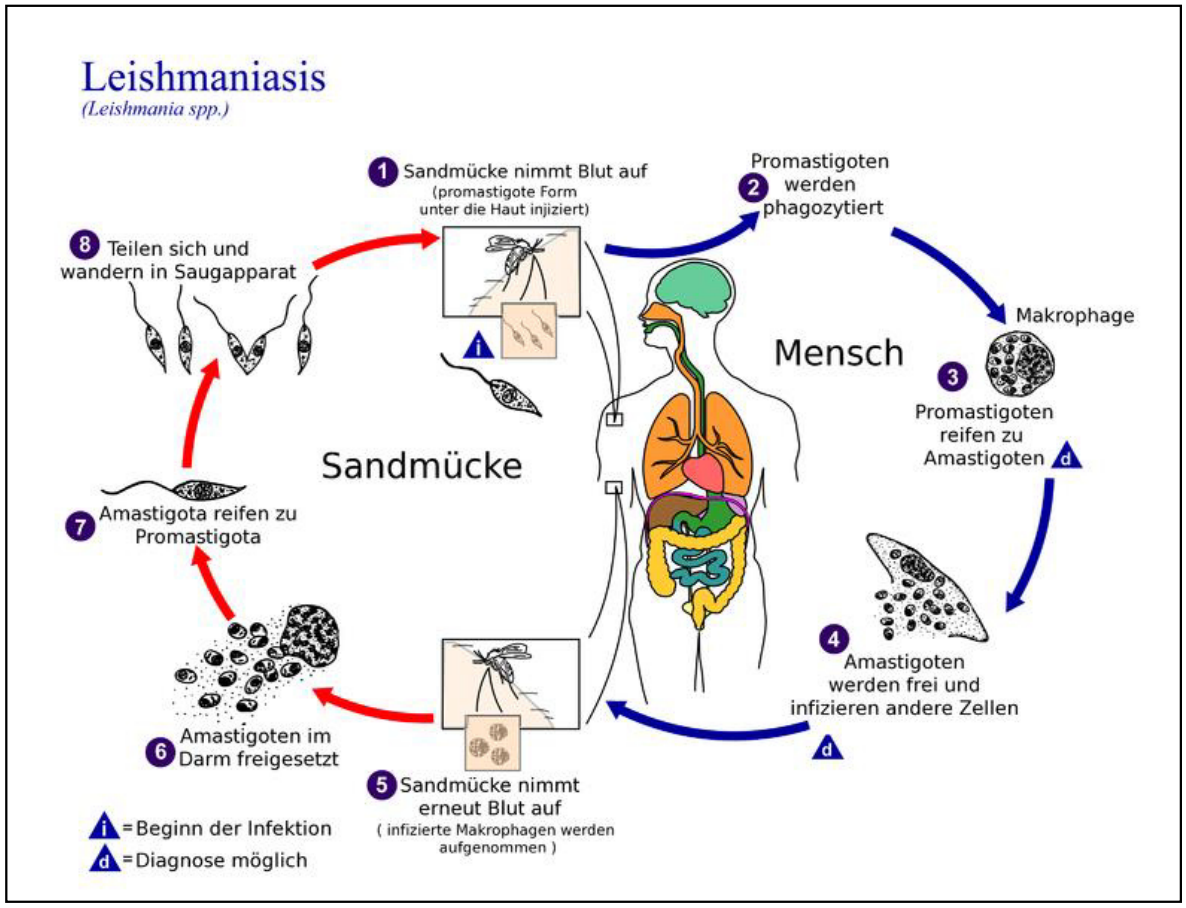


Abb. 2: Lebenszyklus der Leishmanien *(Quelle Bild: Centers for Disease Control and Prevention, USA)*

Charakteristisch für den Lebenszyklus der Leishmanien ist, dass sie einen Wirtswechsel vornehmen zwischen dem Endwirt Sandmücke und dem Zwischenwirt Säugetier. Die Sandmücke ist zugleich Vektor, d.h. Transportwirt, um den Parasiten vom einen Wirt auf den nächsten zu übertragen. In der Sandmücke findet die geschlechtliche Vermehrung der Leishmanien statt. Die Leishmanien leben dort extrazellulär in ihrer begeißelten Form (Promastigoten). Im Zwischenwirt Säugetier können sich die Leishmanien intrazellulär in Makrophagen durch Teilung vermehren. Dort findet man sie in ihrer unbegeißelten Form (Amastigoten).

Makrophagen an und werden anschließend selbst von den Makrophagen phagozytiert. Auf diese Weise gelangen die Leishmanien in ihren definitiven Endwirt, die Makrophagen. Intrazellulär wandeln sie sich dann in geißellose Amastigoten um und beginnen sich zu vermehren. Mit Amastigoten infizierte Makrophagen können bei der nächsten Blutmahlzeit von einer Sandfliege aufgenommen werden. Dort wandeln sie sich dann in Promastigoten um und vermehren sich, um als infektiöse Metazyklische beim nächsten Stich der Mücke wieder ein Säugetier zu infizieren. Interessanterweise scheinen Leishmanien zudem in der Lage zu sein, das Verhalten der Sandfliege zu beeinflussen, um eine höhere Transmissionsrate zu erreichen. Infizierte Sandfliegen stechen aggressiver

bzw. häufiger als nicht infizierte Tiere, besonders dann wenn das Stadium der virulenten metazyklischen Promastigoten erreicht ist (Rogers et al. 2007).

Es ist wichtig zu wissen, dass von der Sandmücke apoptotische und vitale Promastigoten in die Subkutis injiziert werden. Dabei exprimieren apoptotische Leishmanien Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite ihrer Zellmembran, welches für die PMN ein Signal zur Phagozytose darstellt. Gleichzeitig wird durch PS die Immmunantwort gedämpft, indem PMN vermehrt anti-inflammatorische Zytokine wie TGF-β, IL-8 und IL-10 sezernieren, während pro-inflammatorische Zytokine (z.B. TNF-α) herunterreguliert werden (van Zandbergen et al. 2007, Esmann et al. 2010). Der Grund dafür ist, dass apoptotische Partikel als nicht gefährlich eingestuft werden, weshalb keine Immunantwort ausgelöst wird. Durch die Anwesenheit von apoptotischen Promastigoten wird das Überleben von Leishmanien in den PMN erleichtert, denn das phagozytierte Material wird weniger aggressiv abgebaut. Die Promastigoten sind in der Lage, die spontane Apoptose der eigentlich sehr kurzlebigen PMN deutlich zu verzögern und sichern dadurch ihr Überleben für 2-3 Tage (Aga et al. 2002). Währenddessen bilden sie MIP-1β zur Anlockung von Makrophagen, die normalerweise erst 2-3 Tage nach den PMN in das Entzündungsgewebe einwanden. Apoptotische PMN werden - ganz physiologisch - von den angelockten Makrophagen phagozytiert. Die Leishmanien erreichen somit, dass sie - in apoptotischen PMN versteckt - von den Makrophagen phagozytiert werden ohne diese zu aktivieren ("silent phagocytosis"), denn die Aufnahme von apoptotischem Material dämpft die Makrophagenaktivität, verhindert eine Aktivierung des Immunsystems und ermöglicht so das intrazelluläre Überleben der Leishmanien (van Zandbergen et al. 2007). Zudem scheinen die Leishmanien nach der Phagozytose in der Lage zu sein, das Milieu im Endosom beeinflussen zu können, so dass dieses weniger sauer wird als normalerweise (Olivier et al. 2005). Ein weiterer Mechanismus, um das Überleben in den Makrophagen zu sichern, ist die Bildung eines „macrophage migration inhibiting factors“ (kurz MIF). Dieser Faktor aktiviert den MAP-Kinase-Weg, einen der anti-apoptotischen Regulationsmechanismen der Makrophagen (Kamir et al. 2008).

1.3 Zielsetzung

Leishmanien sind in der Lage, die spontane Apoptose von PMN zu verzögern (Aga et al. 2002). Dadurch sichern sie ihr Überleben in den PMN für wenige Tage bis die Makrophagen, ihre definitiven Wirtszellen, am Ort der Entzündung angekommen sind. Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Frage, ob Leishmanien in die Apoptosekaskade ihrer definitiven Wirtszellen, den Makrophagen, eingreifen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits nachweisen, dass mit Leishmanien infizierte Makrophagen nach Apoptoseinduktion im Vergleich zu nicht infizierten Makrophagen später apoptotisch werden bzw. eine geringere Apoptoserate aufweisen (Moore et al. 1994, Akarid et al. 2004, Lisi et al. 2005, Ruhland et al. 2007). Es konnte von einigen Autoren (Akarid et al. 2004, Ruhland et al. 2007) gezeigt werden, dass nach Apoptoseinduktion bei den infizierten Zellen sowohl die Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem Mitochondrium als auch die Aktivierung von Caspase-3 geringer waren als bei den nicht infizierten Makrophagen. Akarid und Mitarbeiter (2004) haben außerdem herausgefunden, dass der extrinsische Weg nicht an der Apoptosemodulation beteiligt ist. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass Leishmanien in ihren definitiven Wirtszellen, den Makrophagen, in die Apoptosekaskade hemmend eingreifen. Allerdings ist noch unklar, wie genau bzw. auf welcher Ebene die Modulation der Wirtszellapoptose stattfindet.

Als Grundhypothese der vorliegenden Arbeit wird postuliert, dass die Apoptosehemmung der Wirtszellen durch Leishmanien im intrinsischen Weg stattfindet.
Um diese Hypothese zu überprüfen wurde

- ein geeigneter Apoptoseinduktor gesucht,
- die Apoptoserate zu verschiedenen Zeitpunkten nach Apoptosestimulation bestimmt,
- die Caspasenaktivierung untersucht und
- die Freisetzung von Cytochrom *c* gemessen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Leishmanien

Thp-1 humane Zellinie, akute monozytäre Leukämie (ATCC TIB-202™)

Raw 264.7 murine Makrophagen Leukämie-Zelllinie (freundlicherweise bereitgestellt von PD Dr. S. Fischer, ehemals Universität Ulm, Dtl.)

L. major Stamm MHOM/IL/81/FEBNI (Freundlicherweise bereitgestellt von Dr. F. Ebert, Bernhard Nocht, Institut für Tropenmedizin, Hamburg, Dtl.)

LM dsRED transgener Leishmanien-Stamm (aus Stamm MHOM/IL/81/FEBNI), der rot fluoresziert (freundlicherweise bereitgestellt von A. Wenzel, ehemals Immunologie Uni Ulm, Dtl.)

LM eGFP transgener Leishmanien-Stamm (aus Stamm MHOM/IL/81/FEBNI), der grün fluoresziert (freundlicherweise bereitgestellt von A. Wenzel, ehemals Immunologie Uni Ulm, Dtl.)

2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.2.1 Zellkulturmedien

Raw 264.7:
RPMI 1640
10 Vol.% FCS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin

Thp-1 :
RPMI 1640
10 Vol.% FCS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin
10 mM Hepes
50 µM β-Mercaptoethanol

Promastigoten:
RPMI 1640
5 Vol.% FCS
100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin
10 mM Hepes
50 µM β-Mercaptoethanol

rote/ grüne Promastigoten: zusätzlich 30 µg/ml Hygromycin

2.1.2.2 Intrazelluläre FACS-Färbung

Fixierung:	PBS (9ml)
	4% PFA (1ml 37%ige PFA-Lösung)
Waschpuffer:	PBS
	1% FCS
	1% BSA
	1% humanes Plasma
Färbepuffer:	PBS
	1% FCS
	1% BSA
	1% humanes Plasma
	0,5% Saponin

2.1.2.3 Annexin-Messung

Annexin-Bindepuffer:	10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4
(für Zellen)	140 mM NaCl
	2,5 mM $CaCl_2$ (frisch)
Annexin-Puffer:	Ringer-Lösung
(für Leishmanien)	1% BSA

2.1.2.4 Western-Blot

LGB (4fach):	91 g Tris
	2 g SDS (unter dem Abzug)
	500 ml Aqua dest.
	► auf pH 8,8 einstellen
UGB (4fach):	30 g Tris
	2 g SDS

	500 ml Aqua dest.
	► auf pH 6,8 einstellen
Lysisbuffer	20 mM Tris/HCl
(Mitochondrienlysate)	135 mM NaCl
	1,5 mM $MgCl_2$
	10% Glycerol
	► auf pH 7,4 einstellen und bei 4°C aufbewahren
	1% Triton X-100 (frisch)
	Proteinaseinhibitoren (frisch)
Lysepuffer:	0,05 M Pipes-NaOH
(Zelllysate)	0,05 M Hepes
	2 mM $MgCl_2$
	1 mM EDTA
	1% TritonX-100
	► auf pH 7,0 einstellen und bei 4°C aufbewahren
	10 mM DTT (frisch)
	Proteaseinhibitoren (frisch)
Lämmlipuffer (6fach):	0,35 M TrisCl, pH 6,8
	0,35 M SDS
	30% Glycerol
	0,6 M DTT
	0,175 mM Bromphenol Blau
	► in 1 ml-Aliquots bei -70°C lagern
Trenngel (12,5 %):	3,3 ml Aqua dest.
	2,5 ml LGB (4fach)
	4,2 ml Acrylamid-Bis
	60 µl APS
	10 µl TEMED
Sammelgel:	4,6 ml Aqua dest.
	1,25 ml UGB (4fach)
	0,8 ml Acrylamid-Bis
	23,3 µl APS
	10µl TEMED
Laufpuffer (5fach):	30 g Tris

	144 g Glycine
	5 g SDS
	1 l Aqua dest.
Transferpuffer	200 ml Methanol
	80 ml Tris/Glycine (10x)
	720 ml Aqua dest.
TBS (10fach):	24,2 g Tris
	80 g NaCl
	1 L. Aqua dest.
	► auf pH 7,6 einstellen
TBS/T:	50 ml TBS (10fach)
	450 ml Aqua dest.
	250 µl Tween
Blotting-Lösung:	100 ml TBS/T
	5 g Magermilchpulver

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid-Bis	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
AF1	Citifluor, London
Annexin-V-FITC	Responsif AG, Erlangen
Annexin-V fluor 568	Roche Applied Science, Mannheim
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenol Blau	Serva, Heidelberg
Diff-QUIK®	Medion Diagnostics, Düdingen
Digitonin	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DTT	Sigma, Deisenhofen
ECL	Amersham, GE Healthcare
EDTA	Sigma, Deisenhofen
FCS	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Hepes	Biochrom, Berlin
Hoechst 33258	Sigma, Deisenhofen

Hygromycin B	Invivogen, San Diego
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Molecular weight markers	Amersham, GE Healthcare
PFA, Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PBS	PAA, Pasching
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, BerlinPipes
PMA	Sigma, Deisenhofen
Propidiumiodid	Laborbestand
Proteinaseinhibitoren	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium	Sigma, Deisenhofen
SDS	Sigma, Deisenhofen
Staurosporin	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg

2.1.4 Antikörper

aktive Caspase-3, monoklonal, Kanninchen	Cell Signaling Technology
Isotypkontrolle, monoklonal, Kanninchen	Cell Signaling Technology
Cytochrom *c*, monoklonal, Maus	BD Pharmingen
Caspase-9, polyklonal, Kanninchen	Cell Signaling Technology anti-
Leishmanien, Kanninchen	Laborbestand
Zweitantikörper	
anti-mouse+HRP, Schaf	Chemicon, Australien
anti-rabbit+HRP, Schaf	Chemicon, Australien
anti-Mouse RPE, ploy klonal, Ziege	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
anti-Rabbit IgG+DyLight 488, Ziege	Cell Signaling Technology

2.1.5 Geräte

Durchflusszytometer	
FACS-Calibur II	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikroskope	
Axioscope	Carl Zeiss, Jena

Axiovert 40CFL	Carl Zeiss, Jena
pH-Meter pH525	WTW, Wellheim
UV-Gerät: Stratalinker 2400	Stratagene, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Raw-Makrophagen

Bei der Zelllinie Raw 264.7 handelt es sich um Makrophagen, die durch Injektion eines Leukämie-Virus in eine Maus gewonnen worden sind.

Raw-Makrophagen wurden in Petrischalen in Raw-Medium kultiviert, in welchem sich in Suspension befanden. Es wurden 1 bis 2 Mio. Zellen in 10 ml Medium (1 - 2 x 10^5/ml) ausgesät. Alle zwei Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen geerntet und bei 400 g_E 8 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in frischem Raw-Medium resuspendiert (Endkonz. 1-2 x 10^5/ml) und zur weiteren Kultur wieder auf Petrischalen verteilt und bei 37°C inkubiert. Auch zum Infizieren wurden die Makrophagen geerntet, zentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert (½ Mio./ml) und je 2 ml/Loch in eine 6-Loch-Platte gegeben. Dort wurden die Zellen adhärent und konnten nach 18 bis 24 h infiziert werden. Für Versuche mussten die adhärenten Zellen mit Accutase gelöst werden: nach Abnahme des Mediums wurden die adhärenten Zellen mit ca. 0,5 ml Accutase pro Loch kurz inkubiert und konnten anschließend geerntet und für Versuche verwendet werden.

2.2.1.2 Thp-1 Makrophagen

Bei Thp-Zellen handelt es sich um eine humane Makrophagen/Monozyten-Zelllinie. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C in Suspension kultiviert. Sie wurden dreimal pro Woche umgesetzt. Dazu wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert (8 Minuten bei 400 g_E), das Pellet in frischem Thp-Kulturmedium resuspendiert und in einer Konzentration von 3 x 10^5 Zellen/ml auf Zellkultur-flaschen verteilt und bei 37°C inkubiert. Zum Infizieren wurden Thp-1 Zellen geerntet und das Pellet in Thp-Medium resuspendiert, das zusätzlich PMA (Endkonz. 10 ng/ml) enthielt. Danach wurde die Suspension auf 6-Loch-Platten verteilt, so dass sich in jedem Loch 1 Mio. Zellen befanden. Damit die Thp-1 Zellen adhärent werden und sich zu Makrophagen differenzieren können, benötigen sie PMA (Schwende et al. 1996). Nach 18 bis 24 Stunden waren sie adhärent und konnten infiziert werden. Adhärente Zellen konnten ohne Zusatz von Accutase gelöst und geerntet werden.

2.2.1.3 Kultivierung von *L. major* Promastigoten

L. major Promastigoten wurden bei 27°C und 5% CO_2 in Novy-Nicolle-McNeal Blutagarplatten (96 wells) mit Leishmanien-Medium kultiviert. Sie wurden einmal pro Woche passagiert. Nach sieben Tagen befanden sich die Leishmanien in ihrer stationären Phase, d.h. etwa die Hälfte der Leishmanien war vital, die andere Hälfte apoptotisch Zur Passage wurden die Promastigoten geerntet, zentrifugiert (8 Minuten bei 2400g$_E$), das Pellet in frischem Leishmanien-Kulturmedium resuspendiert und pro Loch 100.000 lebende Promastigoten in 100 µl Medium ausgesät (insgesamt ca. 200.000 Leishmanien pro Loch). Promastigoten in der stationären Phase wurden auch zur Infektion der Makrophagen verwendet. Apoptotische Leishmanien sind wichtig für die Virulenz und erleichtern es lebenden Parasiten, in den Makrophagen zu überleben: durch Phagozytose apoptotischer Partikel werden Makrophagen nicht aktiviert, sondern vielmehr in ihren Funktionen gedämpft, d.h. einerseits werden keine weiteren Immunzellen angelockt und andererseits werden auch die phagozytierten "ungefährlichen" apoptotischen Partikel weniger aggressiv abgebaut (vgl. van Zandbergen et al. 2004 und 2007). Zur Infektion von Makrophagen siehe Kap. 2.2.2

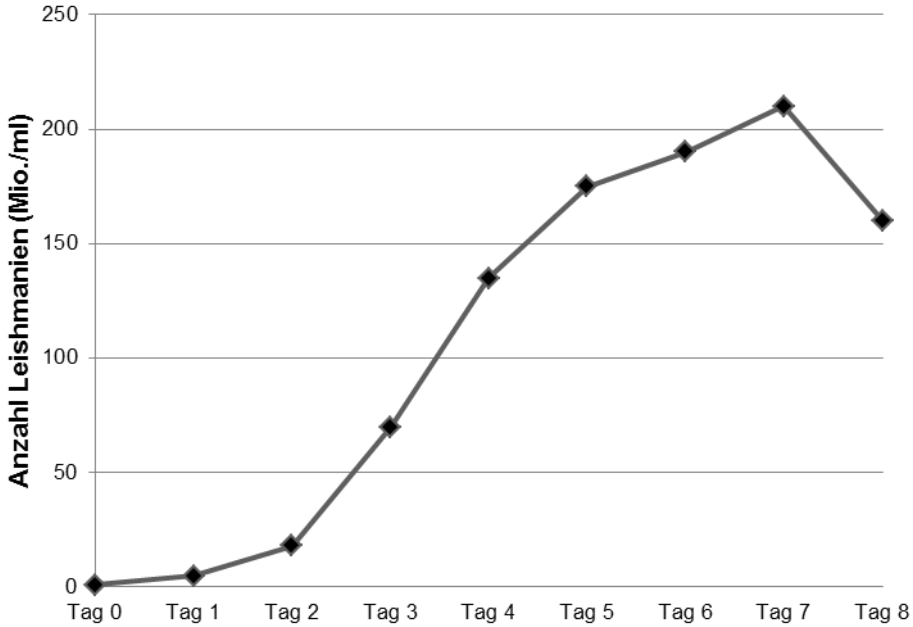


Abb. 3: Wachstumskurve von *L. major* Promastigoten, n=1
Die Anzahl der Promastigoten in Mio./ml wurde bis Tag 8 nach Passage ermittelt. Leishmanien haben ein charakteristisches Wachstumsverhalten: bis etwa Tag 4 nach Passage ist das Wachstum logarithmisch. Danach verlangsamt sich das Wachstum u.a. durch Nährstoffmangel; in der stationären Phase bleibt die Konzentration der Leishmanien etwa gleich (ab Tag 5). Außerdem wird der Anteil apoptotischer Zellen mit Alter der Kultur größer. An Tag 7 sind etwa 50-60% der Leishmanien apoptotisch.

Vor Versuchen und vor Infektion von Makrophagen mit Leishmanien wurde eine Annexin-Färbung der Promastigoten-Kultur durchgeführt, um den Anteil lebender und toter Promastigoten zu bestimmen. Zum Infizieren wurden nur Kulturen verwendet, bei denen die Apoptoserate zwischen 45% und 60% lag.

2.2.1.4 Auftauen und Einfrieren

Eingefrorene Zellen bzw. Leishmanien wurden im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und sofort mit dem jeweiligen Zellkulturmedium gewaschen, um das toxische DMSO so schnell wie möglich zu verdünnen und zu entfernen. Das Pellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen (MΦ) bzw. auf Blutagarplatten (Leishmanien) verteilt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen geerntet, gewaschen und das Pellet in eiskaltem Medium aufgenommen, das 20% FCS enthielt. Danach wurde die Zellzahl bestimmt und auf einen bestimmten Wert eingestellt: 20 Mio/ml (Zellen) bzw. 150 Mio./ml (Leishmanien). In jedes Kryoröhrchen wurden je 500 µl Einfriermedium (Medium + 20% FCS + 20% DMSO) vorgelegt und dann noch je 500 µl der kalten Zell- bzw. Leishmanien-Lösung dazugegeben. Alle Schritte wurden zügig und bei 4°C durchgeführt. Die Röhrchen mussten anschließend schonend eingefroren werden. Sie wurden über Nacht im -80°C-Schrank gelagert und erst danach in den Stickstoff-Tank umgesetzt.

2.2.2 Infektion von Makrophagen und Apoptoseinduktion

Für die Infektion der Makrophagen wurden sieben Tage alte Leishmanien (stationäre Phase) verwendet. Die Leishmanien wurden geerntet, gezählt und bei 2400 g_E 8 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in Infektionsmedium (Raw- bzw. Thp-Kulturmedium mit 20% FCS) resuspendiert.

Zuvor waren die Makrophagen in 6-Loch-Platten (je 1 Mio. pro Loch) ausgesät worden, damit sie adhärent wurden. Das alte Medium wurde abgenommen und je 2 ml Infektionsmedium (mit den darin enthaltenen Promastigoten) in jedes Loch gegeben und für 12-18 Stunden bei 37°C inkubiert. Raw-Makrophagen wurden mit 10 Promastigoten pro Makrophage, Thp-1 Zellen mit 50 Promastigoten pro Zelle inkubiert. Danach wurden die extrazellulären, nicht phagozytierten, Leishmanien dreimal mit PBS von den MΦ gewaschen. Dieser Schritt wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend wurde wieder normales

Zellkulturmedium dazugegeben und ein Teil der Zellen wurde mit Staurosporin oder Camptothecin coinkubiert, um Apoptose zu induzieren (Hsiang et al. 1985, Bertrand et al. 1994). Bei Raw-MΦ wurde Staurosporin in einer Endkonzentration von 500 ng/ml verwendet, bei Thp-MΦ in einer Endkonzentration von 1 µg/ml. Camptothecin wurde in einer Endkonzentration von 2 µM bzw. 4 µM benutzt, um Apoptose zu induzieren. Bis zu den weiteren Schritten im Versuchsablauf wurden alle Zellen bei 37°C bebrütet.

2.2.2.1 Diff QUIK®- Färbung

Zur Kontrolle der Infektionsrate (immer direkt vor Durchführung eines Versuches) wurden infizierte MΦ auf Objektträger zentrifugiert, an der Luft getrocknet und mit Diff QUIK gefärbt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Schnellfärbung, bei der eosinophile Zellstrukturen rot und basophile blau angefärbt werden. Zuerst wurden die Makrophagen geerntet, gezählt und mit PBS gewaschen. Es wurden immer 150.000 MΦ in 100 µl PBS resuspendiert und mit einer Zytozentrifuge bei 54 x g_E 5 Minuten lang auf Objektträger zentrifugiert. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und anschließend mit den Diff QUIK Färbelösungen gefärbt. Dabei wurden die Zellen erst 1 Minute lang fixiert, dann je 1 Minute lang mit den zwei verschiedenen Färbelösungen gefärbt. Es wurden mindestens 200 Zellen auf dem Objektträger gezählt.

2.2.3 Kernfärbung

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde eine Kernfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 durchgeführt. Dies ist ein membranpermeabler, fluoreszierender DNA-Farbstoff, mit dem DNA, Chromosomen und Nukleoli angefärbt werden können, da der Farbstoff mit A-T-Regionen auf RNA und DNA interkaliert.

Die Färbung wurde in 6-Loch-Platten durchgeführt. Die Zellen wurden ca. 20 Minuten lang mit Hoechst B 33258 (Endkonz. 100 µg/ml) bei 37°C im Dunkeln inkubiert, dann geerntet, gezählt und mit PBS gewaschen. Pro Probe wurden max. 150.000 MΦ in 100µl PBS mit einer Zytozentrifuge bei 54 x g_E 5 Minuten lang auf einen Objektträger zentrifugiert und gleich mit AF1 eingedeckelt. Am Fluoreszenzmikroskop konnte anschließend die Apoptoserate ermittelt werden. Es wurden pro Probe mindestens 200 Zellen ausgezählt. Es wurden nur diejenigen Zellen als apoptotisch gewertet, deren Zellkern schon eindeutig zu apoptotischen

Körperchen degradiert war.

2.2.4 FACS-Analysen

2.2.4.1 Annexin-Färbung für Promastigoten

Um den Anteil apoptotischer Leishmanien in einer Promastigotenkultur zu messen, wurde eine Annexin-Färbung durchgeführt. Für die Infektion von Makrophagen wurden nur Kulturen verwendet, bei denen die Apoptoserate zwischen 45% und 60% lag. Die Färbung wurde bei 4°C durchgeführt. Je 5 x 10^6 Promastigoten wurden zweimal bei 2400 g_E 8 Minuten lang mit FACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde anschließend mit 0,75 µl Annexin A5 FITC in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Leishmanien noch zweimal bei 2400 g_E mit FACS-Puffer gewaschen und dann zum Messen in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.4.2 Annexin-Propidiumiodid-Färbung für Makrophagen

Pro Probe wurden 5 x 10^5 Zellen in 96-Loch-Platten mit spitzem Boden gefärbt. Die Zellen wurden geerntet und bei 400 g_E einmal mit PBS und einmal mit Annexin-Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet mit 0,75 µl FITC-markiertem Annexin A5 und mit 1 µl Propidiumiodid 20 Minuten lang auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurde jede Probe mit 400µl Annexin-Bindepuffer aufgefüllt und am Durchflusszytometer eingelesen.

Diese Doppelfärbung dient der Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen. Während (früh)apoptotische Zellen nur Annexin-positiv sind, sind spätapoptotische bzw. apoptotisch-nekrotische Zellen doppelt positiv für Annexin und den DNA-Farbstoff Propidiumiodid. Nekrotische Zellen lassen sich nur mit Propidiumiodid anfärben.

2.2.4.3 Intrazelluläre FACS-Färbung

Intrazelluläre Färbungen wurden für aktive Caspase-3 und für Cytochrom *c* durchgeführt. Bei der intrazellulären Färbung von aktiver Caspase-3 wurden auch immer Leishmanien mit einem anderen Farbstoff angefärbt. Als Erstantikörper dieser Doppelfärbung wurden anti-aktive-Caspase-3 und anti-Leishmanien-Serum benutzt. Als Zweitantikörper dienten anti-Rabbit IgG+DyLight 488 zur Markierung der aktiven Caspase-3 und anti-Mouse RPE zur Detektierung des Leishmanien-

Markers. Bei der intrazellulären Färbung von Cytochrom *c* wurden die Leishmanien nicht mit angefärbt, da sowohl der Antikörper gegen Cytochrom *c* als auch der gegen das Leishmanien-Antigen aus der Maus stammten. Ein Zweitantikörper würde nicht spezifisch den einen oder den anderen der beiden Erstantikörper binden können. Die verwendeten Antikörper waren: anti-Cytochrom *c* und als Zweitantikörper anti-mouse FITC.

Die Färbung wurde bei 4°C in 96-Loch-Platten mit spitzem Boden durchgeführt. Die Zellen wurden geerntet und gezählt. Pro Probe wurden je 5 x 10^5 Zellen in ein Loch der Platte überführt und bei 300 g_E einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten lang im Dunkeln mit einer 4%igen Formaldehydlösung fixiert. Danach wurden sie bei 300 g_E einmal mit Waschpuffer gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Es folgte ein Waschschritt mit Saponin-haltigem Färbepuffer, um die Zellmembranen zu permeabilisieren und um intrazelluläre Strukturen anfärben zu können.

Dann wurden die Proben mit dem Erstantikörper inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die MΦ wieder mit Färbepuffer gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, damit keine falsch positiven Signale gemessen werden. Es folgte die 30minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper. Anschließend wurden die Zellen noch einmal mit Färbepuffer und einmal mit Waschpuffer gewaschen und zum Messen in 400µl Waschpuffer aufgenommen. Danach wurden die Proben im FACS eingelesen.

2.2.5 Western-Blot

Diese Methode wurde angewandt, um die Caspasenaktivierung und die Freisetzung von Cytochrom *c* zu untersuchen.

Ein Western-Blot besteht aus folgenden Schritten: Herstellung eines Protein-gemisches, dessen Auftrennung mittels Gelelektrophorese, Transfer der Proteine vom empfindlichen Gel auf eine Membran und Nachweis des gesuchten Proteins. Wir haben Western-Blots aus Zell- und aus Mitochondrienlysaten gemacht.

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde je 1 Mio. Zellen gewaschen und mit je 50 µl Lysepuffer (enthält Triton X-100) zur Permeabilisierung der Zellmembran resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 2000 g_E 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und mit 10 µl Lämmlipuffer (6fach) vermischt. Nach 5minütigem

Aufkochen bei 95°C wurden die Lysate bei -20°C eingefroren.

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von Cytochrom *c* nach Apoptoseinduktion wurden mitochondriale und zytosolische Lysate aus Raw 264.7 und THP-1 Zellen hergestellt. Pro Ansatz wurden 8 x 10^6 Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und das Pellet anschließend in 125 µl PBS resuspendiert. Pro Probe wurden 125 µl 500 mM Saccharose mit darin gelöstem Digitonin (Endkonz. 150 µg/ml) zur Permeabilisierung der Zellmembran hinzugefügt. Die Proben wurden nach 30sekündiger Inkubation auf Eis sofort bei 13000 g_E für 60 s bei 4°C zentrifugiert. Dadurch wurde die mitochondriale von der zytosolischen Fraktion getrennt. Der Überstand, d.h. die zytosolische Fraktion, wurde mit 6fach Lämmlipuffer vermischt, kurz bei 95°C aufgekocht und eingefroren.

Das mit Mitochondrien angereicherte Pellet wurde 90 min lang auf Eis mit dem "Lysisbuffer" lysiert und danach 10 Minuten bei 4°C und 900 g_E zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Lämmlipuffer (6fach) bei 95°C aufgekocht, kurz abzentrifugiert und bei -20°C bis zur elektrophoretischen Auftrennung aufbewahrt. Diese Methode ist nicht besonders rein, d.h. die Mitochondrien werden lediglich angereichert, aber nicht komplett von anderen Zellorganellen getrennt. Trotzdem ist eine Unterscheidung zwischen zytosolischem und mitochondrialem Cytochrom *c*-Gehalt möglich.

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelekrophorese). Bei dieser Methode passieren die Proteine zunächst ein Sammelgel, in welchem sie zu einer scharfen Bande fokussiert werden. Erst dann wandern die Proteine nahezu gleichzeitig in das Trenngel ein, in dem die eigentliche Auftrennung des Proteingemisches anhand der Molekularmasse erfolgt. Im Gegensatz zur kontinuierlichen PAGE erhält man schärfere Banden. Damit die negativ geladenen Proteine sich in Bewegung setzen können, muss erst eine Spannung angelegt werden: 15 Minuten bei 130 Volt zur Durchwanderung des Sammelgels und danach etwa 45 min bei 180 Volt zur Auftrennung der Proteine im Trenngel.

Die aufgetrennten Proteine werden im nächsten Schritt vom Gel auf eine Membran transferiert (=Blotting). Es wurden Wet-Blots gemacht, die zunächst nach dem Sandwichverfahren aufgebaut werden mussten: zwischen zwei Kunststoffgitter wurden von außen nach innen je ein Schwamm, mehrere Filterpapiere und das Gel bzw. die Membran gelegt. Die Kunststoffgitter wurden

dann in das Blotgerät eingespannt und eine Spannung von 100 Volt (bei 400 mA) angelegt. Bei 4°C dauerte der Proteintransfer zwei Stunden.

Nach dem Blotten wurde eine gleichmäßige Verteilung der Proteinbanden mit rotem Ponceau-S-Farbstoff kontrolliert. Der Farbstoff wurde sogleich mit Aqua dest. vorsichtig abgespült und die Membran bei 4°C über Nacht in TBS/T mit 5 % Trockenmilchpulver eingelegt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken (sog. "Blocking").

Im nächsten Schritt folgte die Detektierung des Proteins mit Hilfe der indirekten Antikörper-Markierung. D.h. das gesuchte Protein (z.B. Cytochrom *c*) wird mit einem unmarkierten Primärantikörper (z.B. anti-Cytochrom *c*) selektiv erkannt. Ein an HPR (Meerrettichperoxidase) gekoppelter Sekundärantikörper bindet an diesen und weist so das gesuchte Protein indirekt nach. Die Antikörper wurden mit der Blocking-Lösung verdünnt und je ein Milliliter dieser Lösung auf die Membran gegeben und eingeschweißt. Nach drei Waschschritten wurde die Membran kurz mit ECL inkubiert. Dieses Nachweisreagenz besteht aus zwei verschiedenen Lösungen, die u.a. das Substrat Luminol enthalten. Dieses wird durch HRP gespaltet, wodurch Licht emittiert wird. Deshalb wird die Membran sofort nach der Inkubation mit ECL zusammen mit dem Film, der das emitterte Licht detektiert, in eine Filmkassette (zum Schutz vor Licht) gepackt und innerhalb von 10-20 Minuten entwickelt.

2.2.6 Statistik

Mit Ausnahme weniger Versuche wurden alle Experimente mindestens dreimal durchgeführt. Die Mittelwerte und der Standardfehler (SEM = standard error of the mean) wurden graphisch dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem student´s t-Test (zweiseitig, gepaart) geprüft. Es wurden jeweils nicht infizierte und infizierte Makrophagen miteinander verglichen. Als statistisch signifikant wurde ein $p \leq 0,05$ betrachtet (*steht für $p \leq 0,05$; ** steht für $p \leq 0,01$).

3 ERGEBNISSE

3.1 Infektion von Raw 264.7-Makrophagen

3.1.1 Bestimmung der Apoptoserate

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde zunächst eine Kernfärbung mit Hoechst angefertigt (siehe Kap. 2.2.3). Als apoptotisch wurden alle Zellen gezählt, bei denen der Zellkern eindeutig zu "apoptotischen Körperchen" kondensiert war. Als Kontrolle dienten infizierte und nicht infizierte Zellen, bei denen keine Apoptose induziert worden war.

Es zeigte sich, dass bei infizierten Raw-MΦ die Apoptoserate sowohl nach 6stündiger und als auch nach 20stündiger Inkubation mit Staurosporin signifikant nierdriger war als bei nicht infizierten Zellen (Abb.5). Ohne Apoptoseinduktion war der Anteil apoptotischer Zellen bei beiden Ansätzen in etwa gleich. Nekrotische Zellen (u.a. erkennbar an Vergrößerung des Zellvolumens und Auflockerung des Chromatins) wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt.

Um dieses Ergebnis zu erhärten, wurde mit der FACS-Messung von Annexin und Propidiumiodid (siehe auch Kap.2.2.4) eine objektivere Methode zur Bestimmung der Apoptoserate gewählt. Der Vorteil bei dieser Methode besteht darin, dass zwischen früher und später Apoptose unterschieden werden kann und dass

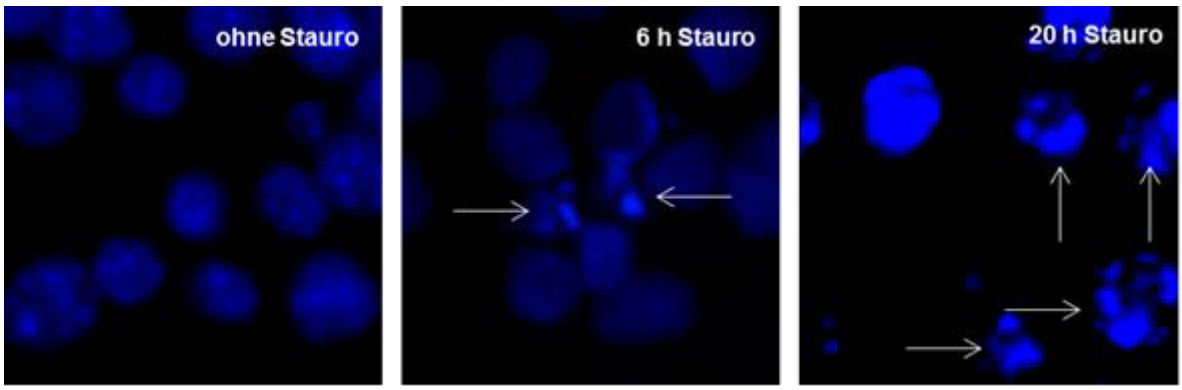


Abb.4: Bestimmung der Apoptoserate mit dem DNA-Farbstoff Hoechst
Zur Veranschaulichung sind hier 3 Bilder (mit nicht infizierten Raw-Makrophagen) dargestellt. Die Zellkerne wurden nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin (6 h und 20 h; Endkonz. 500 ng/ml; links eine Probe ohne Apoptoseinduktion) mit dem DNA-Farbstoff Hoechst angefärbt. Pro Probe wurden je 150.000 Zellen mit einer Zytozentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde anschließend die Apoptoserate ausgezählt. DNA wird auf den Bildern blau dargestellt. Die weißen Pfeile markieren apoptotische Zellen.

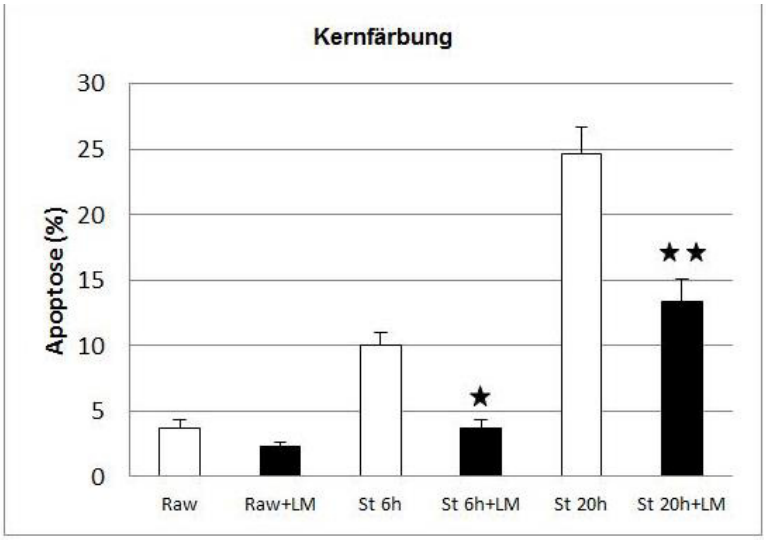


Abb. 5: Bestimmung der Apoptoserate mit Hoechst-Färbung
Infizierte und nicht infizierte Raw-Makrophagen wurden nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin (6 h und 20 h; Endkoz. 500 ng/ml) mit Hoechst-Farbstoff inkubiert und am Fluoreszenzmikroskop die Apoptoserate ausgezählt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptoseinduktion (die beiden ersten Balken von links).
Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Versuchen (n=3).
Bestimmung der Signifikanz mit dem student´s t-test: $p \leq 0,05$ (*) bzw. $p \leq 0,01$ (**) = signifikant unterschiedlich zur Vergleichspopulation.
Raw = Raw-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; Raw+LM = mit *L. major* infizierte Raw Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; St 6h/20h = Raw-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin (6h bzw. 20h); St 6h/20h+LM = infizierte Raw-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin

nekrotische Zellen erkannt werden. (Früh)apoptotische Zellen sind Annexin-positiv, nekrotische Zellen Propidiumiodid-positiv. Zellen, die sich sowohl mit Annexin als auch mit Propidiumiodid anfärben ließen, wurden als spät-apoptotisch gewertet. Der Versuch war ähnlich wie der vorherige aufgebaut: nicht infizierte und infizierte Raw-Makrophagen wurden nach Apoptoseinduktion von 6h bzw. 15h gefärbt und analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptosestimulation. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. In Abbildung 6 ist eine der Messungen dargestellt. In Abb. 7 folgt die Auswertung der 3 Versuche. Man erkennt, dass mit dieser Methode keine Apoptoseinhibierung bei infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Im Gegenteil: bei den meisten Proben war die Apoptoserate bei infizierten Makrophagen war sogar größer als bei den nicht infizierten.

Bei den Populationen ohne Apoptoseinduktion war der Anteil Annexin-positiver (= frühapoptotischer) Zellen bei Leishmanien-Infektion signifikant höher als bei der nicht infizierten Vergleichspopulation (siehe Abb. 7.a und 7.c). Auch der Anteil spätapoptotischer Zellen war bei Proben ohne Apoptosestimulation nach Leishmanien-Infektion deutlich größer (siehe Abb. 7.b und 7.d). Ein ähnliches Bild

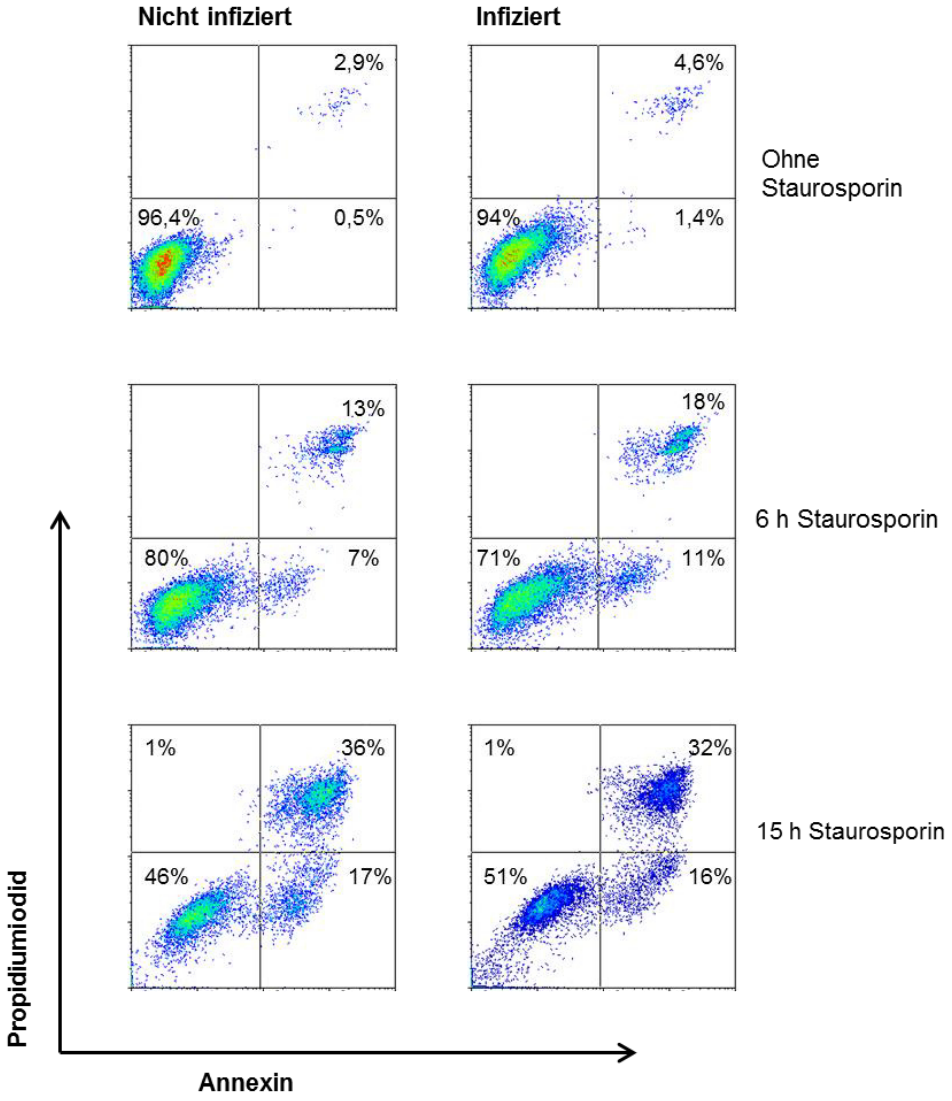


Abb. 6: Durchflusszytometrische Bestimmung von Annexin und Propidiumiodid
Infizierte (rechte Spalte) und nicht infizierte Zellen (linke Spalte) wurden nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin (6h und 15h lang; Endkonz. 500 ng/ml) geerntet, gezählt und mit Annexin und Propidiumiodid gefärbt. Die Proben wurden im FACS eingelesen. Hier ist zur Veranschaulichung eine Messung dargestellt. Vitale Zellen befinden sich im linken unteren Quadranten, früh-apoptotische Zellen (nur Annexin-positiv) im rechten unteren Quadranten, spät-apoptotische Zellen im rechten oberen Quadranten (doppelt positiv für Annexin und Propidiumiodid). Nekrotische Zellen (im linken oberen Quadranten) sind praktisch nicht nachweisbar. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptoseinduktion (in der oberen Reihe).

sieht man nach 6stündiger Apoptoseinduktion: auch dann findet man bei infizierten Zellen eine signifikant höhere Apoptoserate (betrifft sowohl die frühe als auch die späte Apoptose; siehe Abb. 7.a und 7.b). Nach 15stündiger Inkubation mit Staurosporin ist in der infizierten Population die Apoptoserate geringer; jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant.

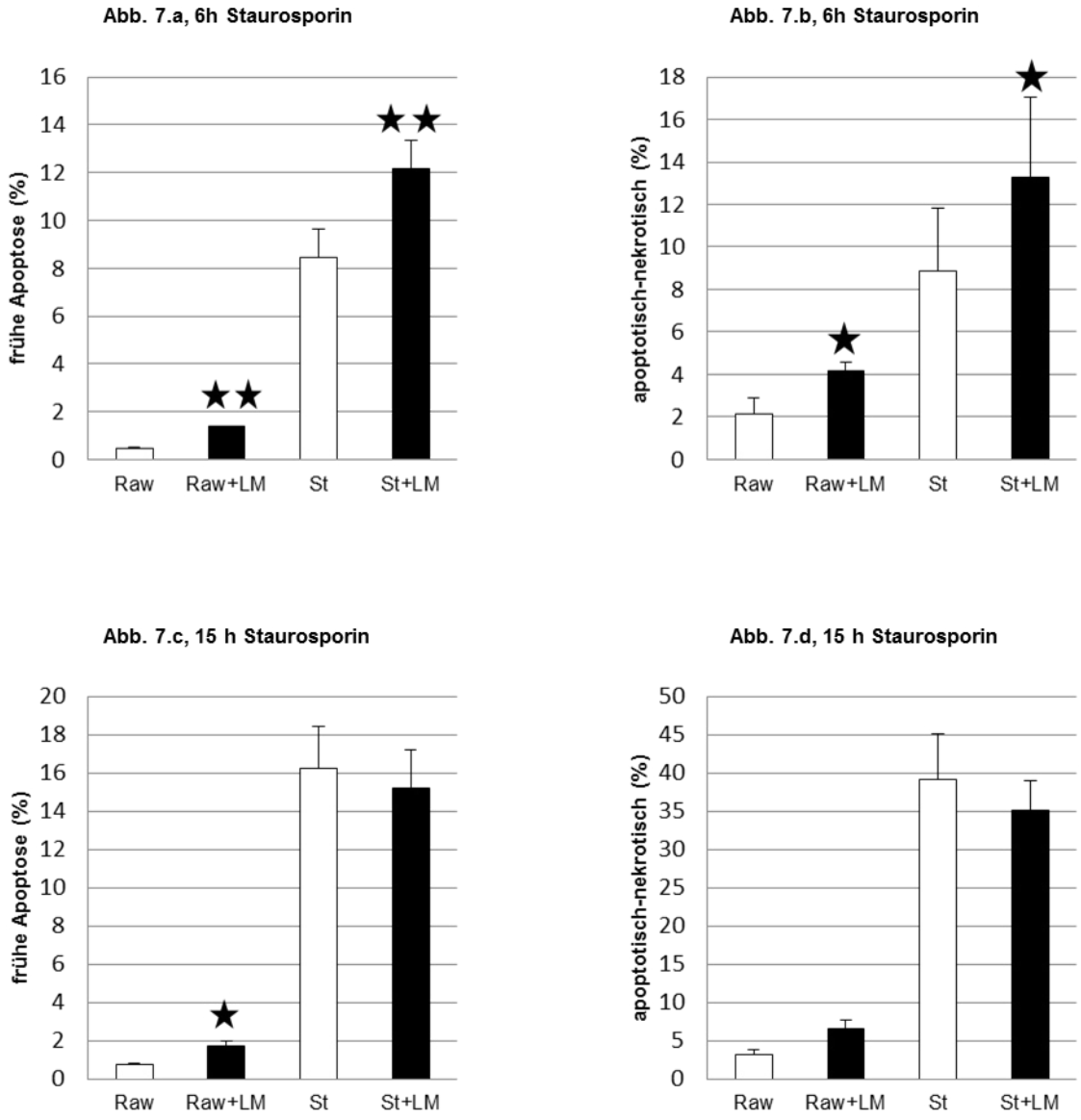


Abb. 7: Annexin-Propidiumiodid-Messung am FACS

Nicht infizierte und infizierte Raw-Makrophagen wurden mit Staurosporin (6h bzw. 15h; Endkonz. 500 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde die Annexin-Färbung durchgeführt, die Proben im FACS eingelesen und somit der Anteil Annexin-positiver bzw. Annexin-PI-positiver Zellen (apoptotisch-nekrotisch) bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptoseinduktion.
Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Versuchen (n=3).
$p \leq 0,05$ (*) bzw. $p \leq 0,01$ (**) = signifikant unterschiedlich zur Vergleichspopulation.
Raw = Raw-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; Raw+LM = mit *L. major* infizierte Raw-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; St = Raw-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin; St+LM = infizierte Raw-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin

Die Ergebnisse der beiden Methoden zur Bestimmung der Apoptoserate decken sich also nicht. Es wurde deshalb beschlossen, für weitere Versuche die Apoptosestimulation bei Raw-Makrophagen bei 15 Stunden zu belassen. Womöglich war die 6stündige Apoptosestimulation zu kurz gewählt, um überhaupt einen Effekt durch Leishmanien-Infektion erkennen zu können.

3.1.2 Freisetzung von Cytochrom *c* aus Mitochondrien

Um herauszufinden, ob der intrinsische Apoptoseweg der Makrophagen durch Leishmanien-Infektion moduliert wird, wurde die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: Western-Blot aus Mitochondrien-Lysaten und intrazelluläre FACS-Färbung von Cytochrom *c.*

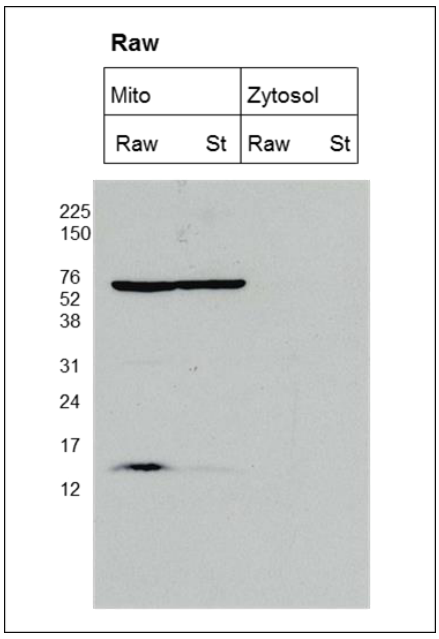


Abb. 8: Westernblot aus Mitochondrienlysaten, n = 1

Nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin (10h, Endkonz. 500 ng/ml) wurden zytosolische und mitochondriale Lsyate aus Raw-Makrophagen hergestellt. Die Trennung der beiden Fraktionen erfolgte nach Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin (Endkonz. 150 µg/ml). Zur Lyse des mit Mitochondrien angereicherten Pellets wurde Triton verwendet. Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE.

Mito = Mitochondrien-Lysat; Zytosol = zytosolisches Lysat; St = Inkubation der Raw-Zellen mit Staurosporin; Raw = Raw-Zellen ohne Staurosporin

Bei lebenden Zellen ist das gesamte Cytochrom *c* in den Mitochondrien, der zytosolische Cytochrom *c*-Gehalt ist sehr gering. Bei Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges dagegen wird Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. Für den Western-Blot wurden deshalb mitochondriale und zytosolische Lysate aus Raw-Makrophagen (mit und ohne Apoptoseinduktion) hergestellt und aufgetragen. Bei dieser Methode werden Mitochondrien im Lysat lediglich angereichtert; daneben befinden sich noch weitere Zellorganellen im gewonnenen Lysat. Trotzdem kann mit dieser Methode die subzelluläre Verteilung von Cytochrom *c* gut beurteilt werden.

Im hier gezeigten Western-Blot erkennt man Banden bei ca. 80 kDa (unspezifisch)

und bei 15 kDa (Cytochrom *c*). Die unspezifischen Banden bei 80 kDa können als Ladungskontrolle interpretiert werden. Man sieht, dass bei allen Mitochondrienlysaten in etwa die gleiche Menge geladen wurde. Die zytosolischen Lysate waren weder bei 80 kDa noch bei 15 kDa detektierbar. Bei den Proben ohne Apoptoseinduktion sind die Banden bei 15 kDa sehr stark, nach Apoptose-induktion deutlich schwächer, d.h. Cytochrom *c* wurde dort freigesetzt. Mit infizierten Raw-Makrophagen ist es nicht gelungen, zufriedenstellende Western-Blots herzustellen. Festzuhalten ist, dass die Methode an sich funktioniert.

Die Cytochrom *c*-Freisetzung wurde mit einer weiteren Methode untersucht: einer intrazellulären Färbung von Cytochrom *c* (nach 15stündiger Stimulation mit Staurosporin), die mit dem Durchflusszytometer analysiert wurde.

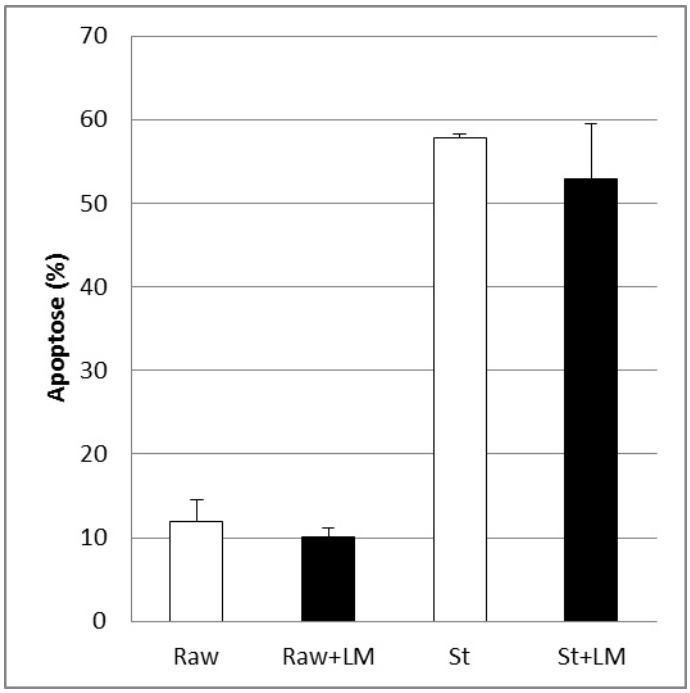


Abb. 9: Freisetzung von Cytochrom *c*
Nicht infizierte und infizierte Raw-Makrophagen wurden 15 Stunden lang mit Staurosporin (Endkonz. 500 ng/ml) stimuliert. Nach Färbung wurden die Proben im FACS eingelesen und der Gehalt von Cytochrom *c* in den Mitochondrien gemessen. Zur Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptoseinduktion. Dargestellt ist jeweils der Anteil apoptotischer Zellen, nicht die Höhe des Cytochrom *c*-Gehaltes.
Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Versuchen (n=3).
$p \leq 0{,}05$ (*) bzw. $p \leq 0{,}01$ (**) = signifikant unterschiedlich zur Vergleichspopulation.
Raw = Raw-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; Raw+LM = mit *L. major* infizierte Raw-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; St = Raw-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin; St+LM = infizierte Raw-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin

Die Messung spiegelt v.a. den mitochondrialen Cytochrom *c*-Gehalt wider. Ins Zytosol freigesetztes Cytochrom *c* wird zum Einen rasch an dADP und Apaf-1 gebunden, um anschließend Caspase 9 zu aktivieren (siehe Abb. 1). Außerdem geht ein Teil der zytosolischen Fraktion während der Färbung verloren, v.a. durch wiederholtes Waschen der Proben. In apoptotischen Zellen ist somit weniger Cytochrom *c* nachweisbar. Daraus ergibt sich, dass vitale Populationen stark anfärbbar sind, während apoptotische Zellen sich nur schwach anfärben lassen.
Die Auswertung (siehe Abb. 9) ergab, dass nach Apoptoseinduktion sowohl bei infizierten als auch bei nicht infizierten Zellen als Zeichen der Aktivierung der Apoptosekaskade weniger Cytochrom *c* nachgewiesen werden konnte. Bei infizierten Zellen war der Cytochrom *c*- Gehalt zwar höher als bei nicht infizierten, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Man erkennt lediglich den Trend, dass Leishmanien-Infektion zu einer verringerten Cytochrom *c*-Freisetzung nach Apoptoseinduktion führen kann.

3.2 Infektion von Thp-1-Makrophagen

3.2.1 Bestimmung der Apoptoserate

Bei dieser Zelllinie wurde analog zu den Raw-Makrophagen verfahren, d.h. die Apoptosekaskade wurde auf verschiedenen Ebenen betrachtet. Es wurden nach Apoptosestimulation immer infizierte Thp-Makrophagen und nicht infizierte miteinander verglichen. Als Kontrolle dienten infizierte und nicht infizierte Zellen ohne Apoptoseinduktion. Zunächst wurde nach Unterschieden in der Apoptoserate geschaut, dann nach Unterschieden in der Caspasenaktivierung und schließlich nach Unterschieden in der Freisetzung von Cytochrom *c*.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

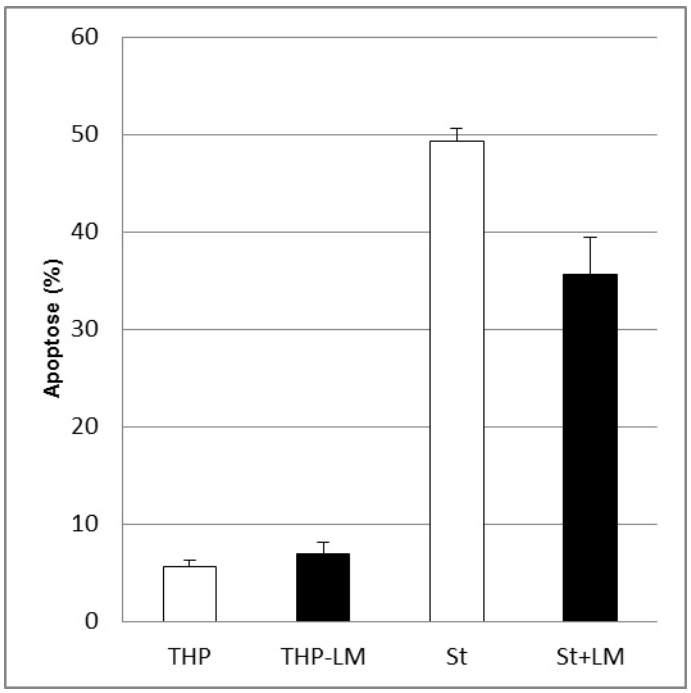


Abb. 10: Bestimmung der Apoptoserate nach Färbung mit Hoechst

Bei infizierten (Infektionsrate 43-50%) und nicht infizierten Thp-Makrophagen wurde 6h lang mit Staurosporin (Endkonz. 500 ng/ml) Apoptose induziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst gefärbt und die Apopotserate ausgezählt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptoseinduktion.
Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Versuchen (n=3).
THP = Thp-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; THP+LM = mit *L. major* infizierte Thp Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; St = Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin; St+LM = infizierte Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin

Man sieht, dass Leishmanien-Infektion zu einer deutlich niedrigeren Apoptoserate nach sechsstündiger Apoptoseinduktion führt, allerdings ist der Unterschied nicht statistisch signifikant.

3.2.2 Annexin-Messung bei Infektion mit fluoreszierenden Leishmanien

Für die Annexin-Messung am FACS wurden die Thp-1-MΦ mit fluoreszierenden Leishmanien infiziert, um leichter zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen unterscheiden zu können.

Es wurden zwei verschiedene fluoreszierende Leishmanien-Stämme benutzt: rot (dsRED) und grün (eGFP) fluoreszierende Promastigoten. Der Vorteil einer FACS-Färbung mit fluoreszierenden Leishmanien besteht darin, dass die infizierten Zellen von nicht infizierten Zellen unterschieden werden können – ohne die Leishmanien extra anfärben zu müssen.

In einem Vorversuch wurde zunächst geschaut, welche Dauer der Apoptosestimulation am besten geeignet ist (siehe Abb. 11). Die Zellen wurden unterschiedlich lange mit Staurosporin (Endkonz. 1 µg/ml) inkubiert: 3, 6 und 18 Stunden. Dabei konnte man erkennen, dass mit zunehmender Dauer der Apoptosestimulation die apoptotische Population größer wurde. Gleichzeitig wurde aber bei langer Inkubation mit Staurosporin auch die infizierte Population beschädigt, das heißt die Fluoreszenz ging verloren. Dazu muss man wissen, dass nur die lebenden Promastigoten fluoreszieren, tote bzw. apoptotische nicht mehr. Deshalb spiegelt die am FACS sichtbare infizierte Population nicht die tatsächliche Infektionsrate wider; diese wäre höher, da auch apoptotische Leishmanien phagozytiert werden.

Nach dreistündiger Apoptosestimulation ist die apoptotische Population schon gut von den nicht apoptotischen Zellen abzugrenzen und außerdem fluoreszieren die meisten Leishmanien noch. Nach sechsstündiger Apoptosestimulation verschmelzen apoptotische und nicht apoptotische Population zunehmend. Zudem nimmt auch der Anteil der fluoreszierenden Leishmanien weiter ab; nach 18 h haben fast alle Promastigoten ihre Fluoreszenz verloren, leben also nicht mehr. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen, die Dauer der Apoptosestimulation auf drei Stunden zu begrenzen, um sowohl apoptotische von nicht apoptotischen Zellen als auch infizierte von nicht infizierten Populationen deutlich abgrenzen zu können.

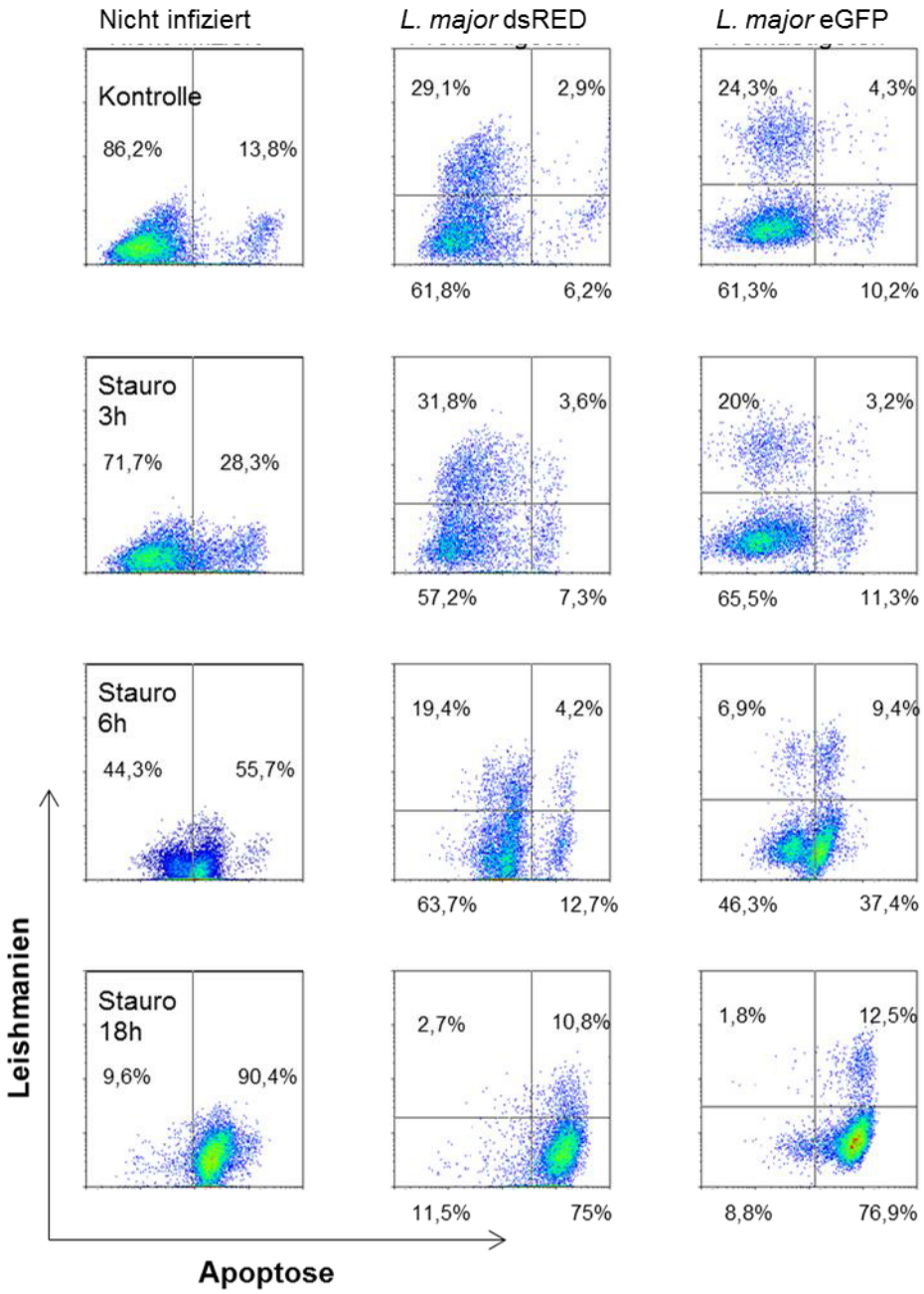


Abb. 11: Zeitreihe zur Apoptosestimulation mit Staurosporin

Thp-Makrophagen wurden mit rot (mittlere Spalte, dsRED) bzw. grün (rechte Spalte, eGFP) fluoreszierenden *L. major* infiziert. Zum Vergleich dienten nicht infizierte Thp-Makrophagen (linke Spalte). Mit Staurosporin (Endkonz. 1µg/ml) wurde unterschiedlich lang Apoptose stimuliert (3, 6 bzw. 18 Stunden lang) und anschließend eine Annexin-Färbung am FACS analysiert. Zur Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptoseinduktion (oberste Reihe). Der Versuch wurde einmal durchgeführt (n=1), um die richtige Dauer der Apoptosestimulation herauszufinden. Dargestellt sind die Dotplots.

Außerdem erkennt man keinen Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zelle in der Annexin-Positivität. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf die Durchführung weiterer Annexin-Messungen verzichtet und stattdessen nach einem besseren Apoptoseinduktor gesucht, der die Leishmanien nicht bzw. nicht

so stark beeinträchtigt.

3.2.3 Apoptoseinduktion bei *L. major* Promastigoten

Die bisherigen Beobachtungen warfen die Frage auf, ob Staurosporin überhaupt ein geeigneter Apoptosestimulus ist. Optimal wäre ein Apoptoseinduktor, der selektiv nur die Makrophagen zur Apoptose anregt und keine Wirkung auf die Leishmanien hat. Um diese Frage zu klären, wurde bei *L. major* Promastigoten mit verschiedenen Stimuli Apoptose induziert.

Dazu wurden die Leishmanien ausgezählt und in eine 24-Loch-Platte verteilt, so dass sich in jedem Loch ca. 5 Mio. Leishmanien in je 1 ml Thp-Medium befanden. Danach wurde der Apoptoseinduktor (Camptothecin 2µM bzw. 4µM, Staurosporin 1µg/ml) dazugegeben bzw. manche Proben mit 1000 Joule UV bestrahlt. Anschließend wurden die Leishmanien bei 37°C inkubiert. Bei dieser Temperatur fand auch sonst immer die Transfektion statt.

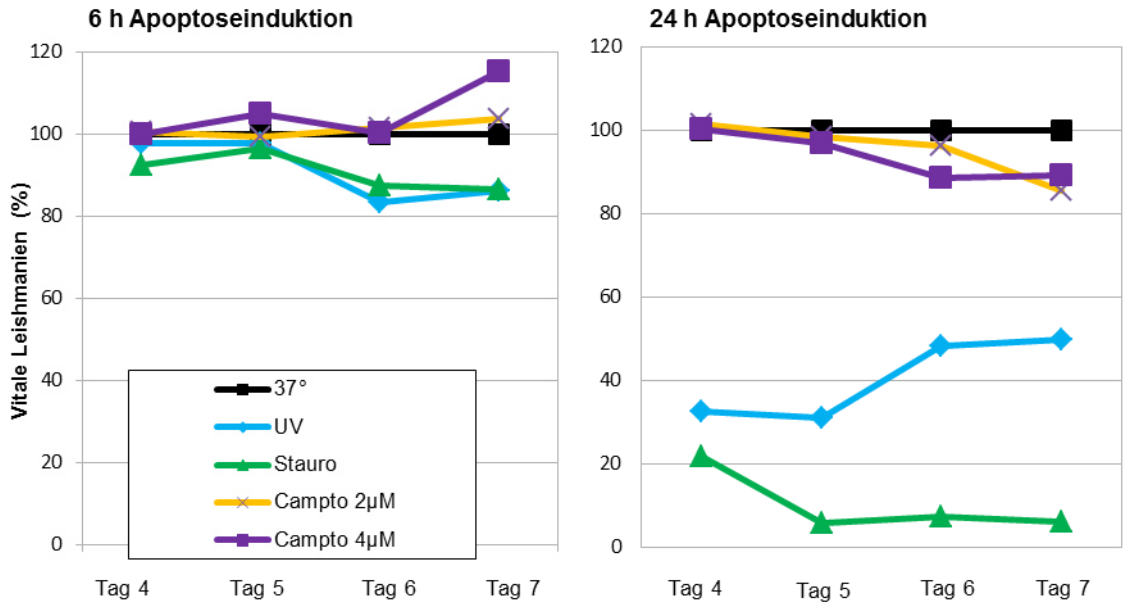


Abb. 12: Apoptoseinduktion bei *L. major* Promastigoten
Grafische Darstellung der Vitalität der *L. major* Promastigoten nach Apoptoseinduktion mit verschiedenen Stimuli bei 37°C statt der gängigen Kulturtemperatur von 27°C. **Der 37°C Wert (keine Apoptoseinduktion) wurde gleich 100% lebende Zellen gesetzt**. Die Mittelwerte der anderen Konditionen wurden damit verglichen. (n=2)
y-Achse: lebende Zellen (%)
Tag 4, 5, 6, 7: Alter der Promastigoten-Kultur in Tagen
37°C = Inkubation der LM bei 37°C (6 bzw. 24 Stunden) ohne Apoptoseinduktion; UV = UV-Bestrahlung (1000 Joule); Stauro = Staurosporin (Endkonz. 1 µg/ml); Campto= Camptothecin (Endkonz. 2µM bzw. 4µM)

Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (6h, 24h) wurde dann eine Annexin-Messung durchgeführt. Für die Apoptosestimulation wurden unterschiedlich alte Promastigoten verwendet: Tag 4 bis Tag 7 nach Passage.

Bei 4 Tage alten Promastigoten sind kaum apoptotische Leishmanien in der Kultur vorhanden, der Anteil apoptotischer Promastigoten wird dann von Tag zu Tag höher, bis er ca. 50-60% an Tag 7 beträgt. Der Vorteil von Promastigotenkulturen mit geringem Apoptoseanteil liegt darin, dass die Auswirkung der einzelnen Apoptoseinduktoren besser sichtbar ist. Da aber für die Transfektion immer sieben Tage alte Promastigoten genommen werden, wurde bei diesen auch die Empfänglichkeit für Apoptosestimuli untersucht.

Es zeigte sich, dass allein schon die Temperaturerhöhung auf 37°C (statt für Leiahmanienkultur übliche 27°C) dazu führt, dass ein Teil der Promastigoten apoptotisch wird. Dieser Effekt wurde bei der Auswertung weggerechnet, indem der 37°C-Wert gleich 100% lebende Promastigoten gesetzt wurde. Das heißt auch, dass der Anteil apoptotischer Leishmanien in der Kultur bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurde, sondern letztendlich wurde nur der Anteil apoptotischer Leishmanien miteinander verglichen, der durch Inkubation mit den Apoptoseinduktoren entstanden war.

Es fällt auf, dass Staurosporin der stärkste Apoptoseinduktor ist, gefolgt von UV-Strahlung. Camptothecin dagegen hat kaum Auswirkungen auf die Apoptoserate, selbst nach 24 Stunden Inkubationszeit ist der Anteil lebender Leishmanien nur ein bisschen niedriger als bei den nicht behandelten Promastigoten (37°C-Wert). Eine entscheidende Rolle spielt auch die Dauer der Apoptosestimulation: nach 24h sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Apoptoseinduktoren viel ausgeprägter als nach 6h: nach 24stündiger Staurosporinbehandlung sind über 95% der Leishmanien avital. Das Ergebnis war auch bei der mikroskopischen Auszählung und Morphologiekontrolle eindeutig. Nach 24stündiger Behandlung mit Staurosporin oder UV waren fast alle Leishmanien rund bis oval und immobil. Das sind eindeutige Zeichen dafür, dass die Leishmanien nicht mehr vital sind, sondern präapototisch bis apoptotisch. Schon nach 6stündiger Inkubation waren die Promastigoten deutlich kürzer und weniger mobil als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Camptothecin zeigte dagegen kaum Auswirkungen auf die Morphologie der Leishmanien: es fanden sich immer fast so viele bewegliche, zappelige und stäbchenförmige (= lebende) Promastigoten wie in der 37°C-

Kontrollpopulation. Apoptotische Leishmanien waren dort deutlich abgrenzbar. Außerdem war die Dichte der Leishmanien in der Kontrollgruppe und nach 24stündiger Inkubation mit Camptothecin deutlich höher (3-4x) als nach gleicher Inkubationsdauer von Staurosporin bzw. UV. Das heißt, die Promastigoten haben sich trotz Inkubation mit Camptothecin noch vermehrt - im Gegensatz zur Apoptosestimulation mit UV oder Staurosporin. Dieser Effekt war nach 6stündiger Apoptoseinduktion noch nicht sichtbar (Daten nicht gezeigt).

Camptothecin scheint die Leishmanien also kaum zu beeinträchtigen. Aber wie verhält sich diese Substanz bei Makrophagen? Dort soll schließlich Apoptose induziert werden. Für die bisherigen Versuche wurde immer mit Staurosporin Apoptose stimuliert. Camptothecin wurde von uns bei Makrophagen noch nicht zur Apoptoseinduktion genommen. Deshalb wurden nun nicht infizierte und infizierte Thp-1-Makrophagen 6 Stunden lang mit Camptothecin (Endkonz. 2µM) und zum Vergleich mit Staurosporin (Endkonz. 1 µg/ml) inkubiert und die Apoptoserate nach Hoechst-Färbung ausgezählt.

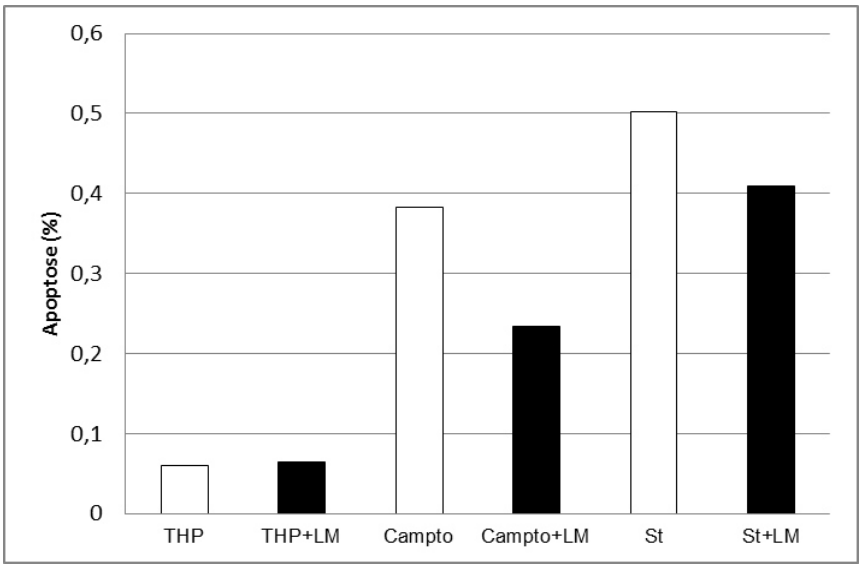


Abb. 13: Hoechst-Färbung nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin und Camptothecin
Apoptoserate nach 6stündiger Apoptoseinduktion mit Staurosporin (Endkonz. 1µg/ml) bzw. Camptothecin (Endkonz. 2µM). n=1; Infektionsrate: 48%
THP = Thp-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion
THP+LM = mit *L. major* infizierte Thp-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion
Campto = Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation durch Camptothecin
Campto+LM = infizierte Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Camptothecin
St = Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin
St+LM = infizierte Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin

Als Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptose-induktion (siehe Abb. 13). Man

erkennt, dass durch Camptothecin (Endkonz. 2µM) weniger Apoptose induziert wird als durch Staurosporin. Jedoch ist nach Inkubation mit Camptothecin der Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen deutlicher, d.h. infizierte Zellen sind deutlich weniger apoptotisch (ca. 23%) als die Vergleichspopulation nach Apoptoseinduktion (ca. 38%). Für weitere Versuche sollte deshalb auch Camptothecin (Endkonz. 2µM bzw. 4µM) zur Apoptoseinduktion genommen werden.

3.2.4 Caspasenaktivierung

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich nach Apoptoseinduktion die Aktivierung von Caspasen bei infizierten und nicht infizierten Zellen unterscheidet. Dazu wurde eine intrazelluläre Doppelfärbung von aktiver Caspase-3 und von Leishmanien durchgeführt (siehe Abb. 14 und 15). Dadurch können infizierte und nicht infizierte Zellen gut voneinander abgegrenzt werden und gezielt nach Unterschieden in der Aktivierung von Caspase-3 geschaut werden

Der Vorteil gegenüber der Transfektion mit fluoreszierenden Promastigoten (siehe Kap. 3.2.2) besteht darin, dass die Färbung von Leishmanien-Antigen vitale und avitale Leishmanien sichtbar macht. So kann man besser auf die Infektionsrate schließen, denn man findet immer auch eine apoptotische Subpopulation von Leishmanien in den Phagozyten, die essenziell für die Virulenz und das Überleben der vitalen Protozoen sind (van Zandbergen et al. 2006).

Man sieht, dass bei infizierten Zellen nach Apoptosestimulation mit Camptothecin signifikant weniger Caspase-3 aktiviert wird als bei der nicht infizierten Vergleichspopulation: nach Leishmanien-Infektion wird ca. 50% weniger Aktivierung von Caspase-3 beobachtet. Nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin ist das Ergebnis ähnlich: bei infizierten Zellen kann weniger aktive Caspase-3 nachgewiesen werden. Allerdings ist der Unterschied nur bei Verwendung von Camptothecin als Apoptoseinduktor statistisch signifikant; nach Inkubation mit Staurosporin ist die Verringerung der Aktivierung von Caspase-3 in infizierten Makrophagen nicht signifikant (siehe Abb. 14). Auch in den Proben ohne Apoptoseinduktion wird in infizierten Zellen signifikant weniger Caspase-3 aktiviert.

Da Caspase-3 sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Apoptoseweg aktiviert werden kann, sollte im nächsten Schritt die Aktivierung von Caspase-9 als Marker für den intrinsischen Apoptoseweg untersucht werden. Die

Level von Pro- und aktiver Caspase-9 sollten mittels Western-Blot-Analyse bestimmt werden. Es ist nicht gelungen, die Methode zu etablieren.

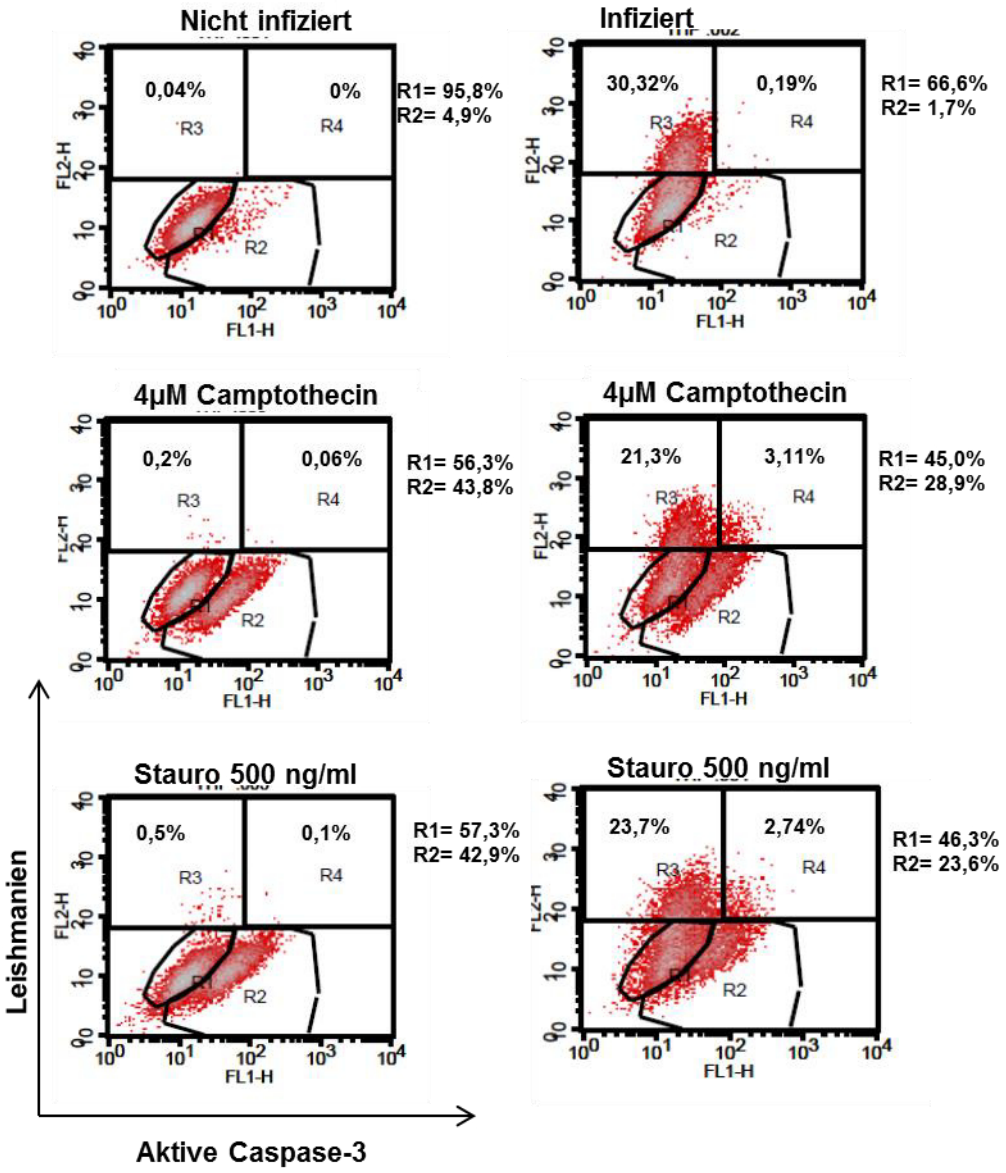
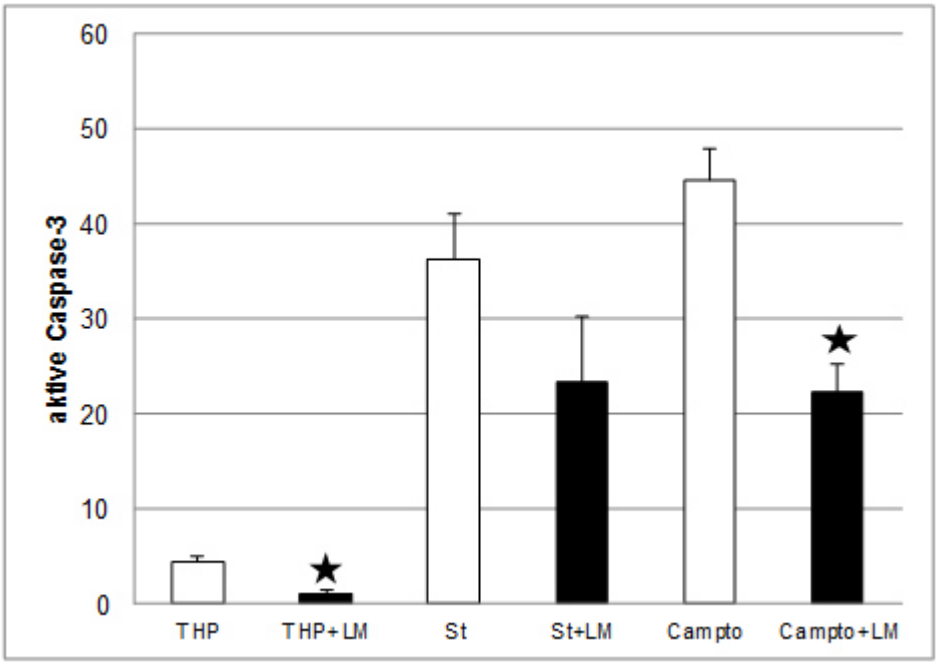


Abb. 14: Doppelfärbung von aktiver Caspase-3 und Leishmanien-Antigen

Nicht infizierte und infizierte Thp-1-Makrophagen wurden mit Staurosporin (Endkonz. 500 ng/ml) bzw. Camptothecin (4µM) zur Apoptose angeregt. Nach 6stündiger Stimulation wurden die Zellen geerntet und gefärbt. Es handelt sich hier um eine Doppelfärbung von aktiver Caspase-3 (und FITC als Zweitantikörper) und Leishmanien-Antigen (und RPE als Zweitantikörper. Zur Veranschaulichung sind die Dotplots eines Versuches dargestellt.
R1: vitale, nicht infizierte Thp-Zellen
R2: apoptotische, nicht infizierte Thp-Zellen
R3: vitale infizierte Thp-Zellen
R4 apoptotische infizierte Thp-Zellen



:

Abb. 15: Messung von aktiver Caspase-3

Bei infizierten (Infektionsrate 54-60%) und nicht infizierten Thp-Makrophagen wurde nach 6stündiger Apoptoseinduktion mit Staurosporin (Endkonz. 500 ng/ml) bzw. Camptothecin (Endkonz. 4µM) aktive Caspase-3 angefärbt und im FACS analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Apoptoseinduktion. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Versuchen (n=3).
$p \leq 0{,}05$ (*) = signifikant unterschiedlich zur Vergleichspopulation
THP = Thp-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; THP+LM = mit *L. major* infizierte Thp-Makrophagen ohne Apoptoseinduktion; Campto = Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation durch Camptothecin; Campto+LM = infizierte Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Camptothecin; St = Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin; St+LM = infizierte Thp-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Staurosporin

3.2.5 Freisetzung von Cytochrom *c*

Daraufhin wurde beschlossen, im nächsten Schritt die Freisetzung von Cytochrom *c* aus Mitochondrien zu untersuchen. Diese Methode war bereits bei Raw-Makrophagen angewandt worden. Vorgenommene Änderung im Versuchsaufbau mit den Thp-Makrophagen beinhalteten Verwendung von Camptothecin als Apoptoseinduktor und Verkürzung der Dauer der Apoptosestimulation auf 6 Stunden.

Es wurde zunächst ein Western-Blot aus Mitochondrien-Lysaten angefertigt (vgl. Kap. 2.2.5 und 3.1.2). Im Westernblot (siehe Abb. 16) erkennt man Banden bei ca. 80 kDa (unspezifisch) und bei 15 kDa (Cytochrom *c*). Die unspezifischen Banden bei 80 kDa können als Ladungskontrolle interpretiert werden. Man sieht, dass bei

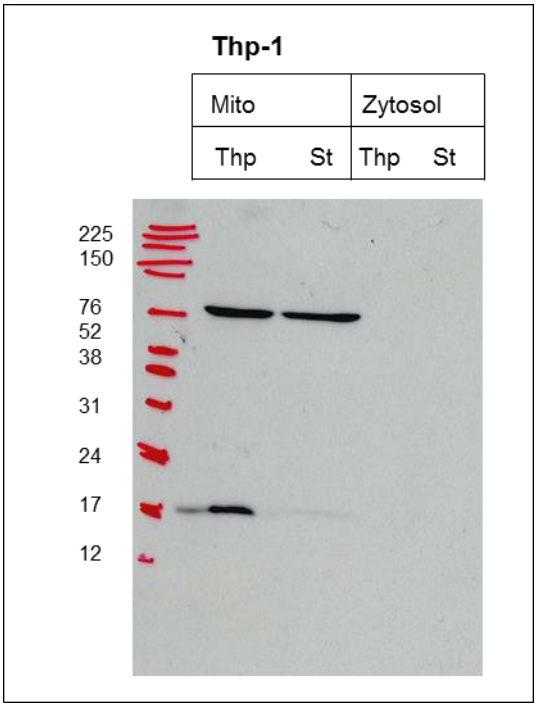


Abb. 16: Westernblot aus Mitochondrienlysat

Nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin (10h, Endkonz. 500 ng/ml) wurden zytosolische und mitochondriale Lysate aus Thp-Makrophagen hergestellt. Die Trennung der beiden Fraktionen erfolgte nach Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin (Endkonz. 150 µg/ml). Nach Lyse des mit Mitochondrien angereicherten Pellets erfolgte die Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE; n=1

Mito = Mitochondrienlysat; Zytosol = zytosolisches Lysat; Thp = Thp-MΦ ohne Apoptoseinduktion; St = Thp-MΦ nach Inkubation mit Staurosporin

beiden Mitochondrienlysaten in etwa die gleiche Menge geladen wurde. Die zytosolischen Lysate waren weder bei 80 kDa noch bei 15 kDa detektierbar. Die Bande bei 15 kDa ist bei der Probe nach Apoptoseinduktion deutlich schwächer, d.h. dort ist Cytochrom *c* freigesetzt worden. Es ist nicht gelungen, mit infizierten Zellen einen schönen Western-Blot herzustellen.

Die intrazelluläre Färbung von Cytochrom *c* mit anschließender FACS-Analyse diente als zweite Methode zur Untersuchung der Cytochrom *c*-Freisetzung. Allerdings wurden die Leishmanien - anders als bei der Färbung von Caspase-3 - nicht mit angefärbt, da sowohl der Antikörper gegen Cytochrom *c* als auch der gegen das Leishmanien-Antigen aus der Maus stammten. Ein Zweitantikörper würde nicht spezifisch den einen oder den anderen der beiden Erstantikörper binden können. Die Durchführung der Färbung wurde in Kap. 2.2.4 genau beschrieben. Die Messung spiegelt v.a. den mitochondrialen Cytochrom *c*-Gehalt

wider. Ins Zytosol freigesetztes Cytochrom *c* wird rasch u.a. an Apaf-1 (z.B. Lavrik et al. 2005, Zhaoyu et al. 2005, Youle et al. 2008) gebunden und dient der Aktivierung von Caspase-9. Zudem geht im Rahmen der intrazellulären Färbung, v.a. durch diverse Wasch-Schritte, ein Teil der zytosolischen Fraktion (und somit auch ein Teil des Cytochrom *c* im Zytosol) verloren.

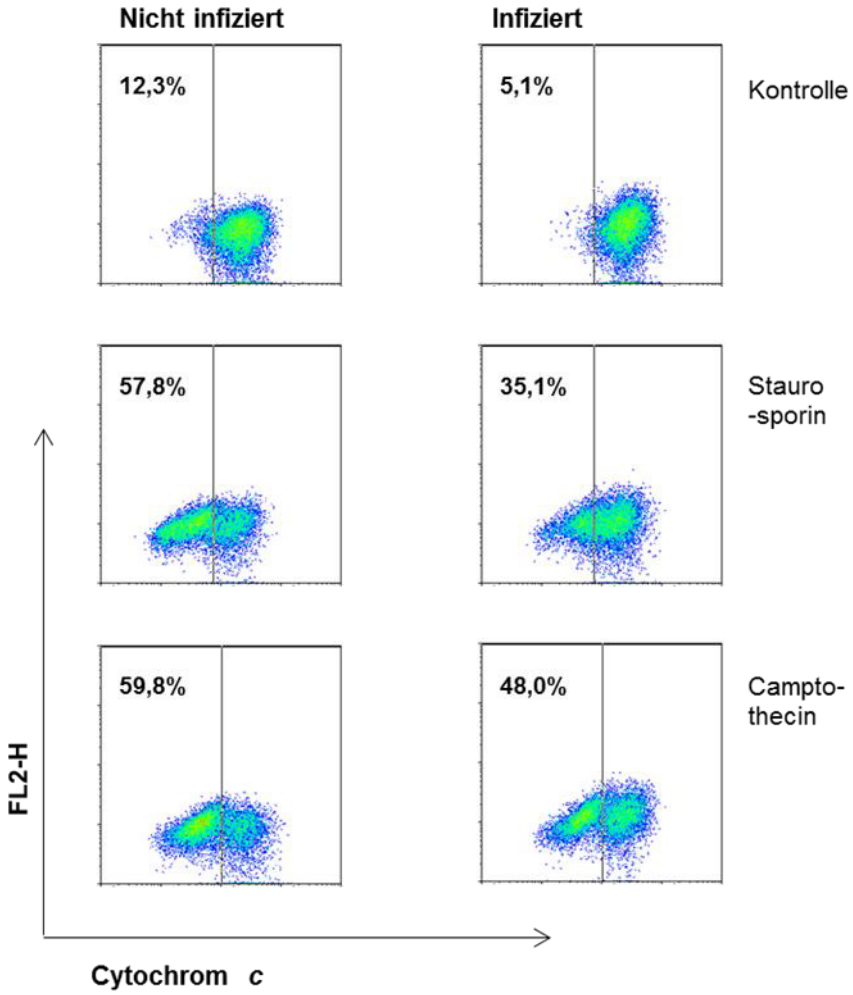


Abb. 17: Cytochrom *c*-Freisetzung nach Apoptoseinduktion
Bei infizierten (Infektionsrate 54%) und nicht infizierten Thp-1 Makrophagen wurde nach 6stündiger Apoptoseinduktion mit Camptothecin (4µM) und Staurosporin (500 ng/ml) eine intrazelluläre Färbung von Cytochrom *c* angefertigt und im FACS eingelesen. n=1
Dargestellt sind die Dotplots dieses Versuches. In der rechten Spalte befinden sich jeweils die vitalen Zellen, links die apopotischen. Es ist jeweils die Apoptoserate in Prozent angegeben.

Im Dotplot (siehe Abb. 17) sieht man, dass es nach Apoptoseinduktion zwei Populationen gibt: eine stark Cytochrom *c*-positive (lebende) und eine schwach Cytochrom *c*-positive (apoptotische), d.h. in apoptotischen Zellen ist weniger

Cytochrom c nachweisbar. Die Populationen sind nach Inkubation mit Camptothecin schöner abzugrenzen als nach Staurosporin-Behandlung. Bei den infizierten Zellen gibt es nach Apoptose-Induktion mehr Cytochrom *c*- positive Zellen als bei den nicht infizierten Zellen, das heißt die Freisetzung von Cytochrom *c* nach Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs ist bei Leishmanien-Infektion geringer.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde in vitro die Apoptosemodulation durch Leishmanien in Makrophagen, ihren definitiven Wirtszellen, untersucht. Unter der Annahme, dass Leishmanien in den intrinsischen Weg der Wirtszell-Apoptosekaskade eingreifen, wurde das Augenmerk auf diesen Weg gelegt.
Es wurde mit zwei verschiedenen Zelllinien gearbeitet: Raw 264.7 und Thp-1 Makrophagen. Apoptose wurde medikamentös mit Camptothecin bzw. Staurosporin induziert. Auf verschiedenen Stufen der Apoptosekaskade wurden infizierte und nicht infizierte Makrophagen nach Apoptoseinduktion miteinander verglichen.
Dabei konnte nachgewiesen werden, dass mit Leishmanien infizierte Makrophagen nach medikamentöser Apoptoseinduktion eine geringere Apoptoserate aufweisen als nicht infizierte Makrophagen. Zudem konnte bei infizierten Makrophagen nach Apoptosestimulation eine geringere Aktivität von Caspase-3 gemessen werden. Außerdem fanden sich Unterschiede in der Freisetzung von Cytochrom-*c*. Während bei vitalen Zellen freies Cytochrom *c* im Zytosol praktisch nicht nachweisbar ist, steigt dessen Konzentration bei Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges stark an. Hier konnte gezeigt werden, dass nach Apopotsestimulation sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen mitochondriales Cytochrom-*c* freigesetzt wurde. Jedoch konnte bei Leishmanien-Infektion signifikant weniger Cytochrom *c* gemessen werden. Somit konnte nachgewiesen werden, dass Leishmanien in der Lage sind, in Makrophagen hemmend in den intrinischen Weg der Apoptosekaskade einzugreifen. Daneben wurde eine neue intrazelluläre Färbung für Caspase-3 und Cytochrom *c* etabliert.

4.1 Leishmanien-Infektion verringert die Apoptoserate in Raw- und Thp-Makrophagen nach chemischer Apoptoseinduktion

Die Rolle der Apoptose im Rahmen von Infektionen hat in den letzten Jahren das Interesse der Forschung geweckt. Insbesondere die Modulation von Apoptose durch Pathogene ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Ein Eingreifen in die Wirtszell-Apoptose kann für den Krankheitserreger als Immunevasionsstrategie eine wichtige Rolle spielen. Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte bereits

nachweisen werden, dass auch Leishmanien in die Wirtszell-Apoptose eingreifen.
Es ist bekannt, dass *L. major* Promastigoten in der Lage sind, die spontane Apoptose von PMN (ihrer „Zwischen-Wirtszelle“) um ca. 24 Stunden zu verzögern (Aga et al. 2002). Die apoptotischen PMN werden mitsamt der sich darin befindenden Promastigoten von den Makrophagen phagozytiert; die Promastigoten nutzen die apoptotischen PMN also als „Trojanisches Pferd“, um in ihre definitiven Wirtszellen, die Makrophagen, zu gelangen (van Zandbergen et al. 2004).
Beschrieben ist eine Apoptose-Hemmung durch *L. major* Promastigoten desweiteren in murinen BMDM: Nach Wachstumsfaktor-Entzug weisen infizierte Makrophagen eine geringere Apoptoserate auf als nicht infizierte Zellen. Zudem konnte 24 Stunden nach Infektion und nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin eine geringere Caspase-3-Aktivität gemessen werden (Akarid et al. 2004).
Auch in Raw 264.7-Makrophagen konnte nach chemischer Apoptosestimulation eine Apoptosehemmung in frühen Phasen der Infektion (12 und 24 Stunden nach Infektion) nachgewiesen werden. Bei Makrophagen, die mit Promastigoten von *L. major, L. mexicana pifanoi* und *L. amazonensis* infiziert waren, war die mittels TUNEL-Messung ermittelte Apoptoserate nach Behandlung mit Camptothecin deutlich geringer (Ruhland et al. 2007).
Ein weiteres Beispiel für Apoptosehemmung in Raw-Makrophagen durch Leishmanien wurde von Donovan und Mitarbeitern publiziert. Die Arbeitsgruppe induzierte Apoptose mit Cycloheximid (Induktor des intrinsischen Weges) und untersuchte den Zeitpunkt 16 Stunden nach Infektion. Es wurden 5 verschiedene *L. major*-Stämme und 3 *L. donovani*-Stämme zur Infektion der Makrophagen verwendet. Die Apoptoserate wurde mit einem Apoptose-Kit zur Detektion von DNA-Strangbrüchen bestimmt. Die Leishmanien-Infektion führte stets zu einer Abnahme der Apoptoserate, wobei sich deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Apoptosehemmung zwischen den einzelnen Stämmen zeigten (Donovan et al. 2009).
Neben diesen Veröffentlichungen, die in frühen Phasen der Infektion eine Hemmung der Wirtszell-Apoptose durch Leishmanien nachweisen konnten, gibt es auch Hinweise dafür, dass sich Leishmanien in späten Zeitpunkten der Infektion anders verhalten. Publiziert wurde, dass Makrophagen (der Zelllinien Thp-1 und U937 sowie primäre humane Makrophagen) 48 und 72 Stunden nach Infektion mit

Promastigoten von *L. major, L. aethiopica* bzw. *L. tropica* eine bis zu 200% höhere Apoptoserate aufweisen, nachdem Apoptose mit Camptothecin induziert worden war (Getti et al. 2008). Die Apoptoserate wurde mit verschiedenen Apoptosekits bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die frühe Phase der Infektion, die Zeitpunkte 6 und 20 Stunden nach Infektion, untersucht. Bei der Bestimmung der Apoptoserate anhand der Morphologie/ nach Kernfärbung konnten wir bestätigen, dass mit Leishmanien infizierte Makrophagen der Zelllinien Raw 264.7 und THP-1 nach chemischer Apoptosestimulation eine geringere Apoptoserate aufweisen als nicht infzierte Makrophagen. Dabei konnte nach Apoptosestimulation mit Staurosporin an beiden Zeitpunkten bei Verwendung von Raw-Makrophagen eine statistisch signifikante Reduktion der Apoptoserate ermittelt werden. Auch bei infizierten Thp-Makrophagen war die Apoptoserate nach Apoptosestimulation mit Staurosporin bzw. Camptothecin geringer im Vergleich zu den nicht infizierten Makrophagen, jedoch war der Unterschied zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant.

Somit konnten wir die in der Literatur beschriebene Hemmung der Wirtszell-Apoptose durch Leishmanien in frühen Phasen der Infektion mit den von uns verwendeten Zelllinien Thp-1 und Raw 264.7 bestätigen.

4.2 Infektionsrate unterschiedlich in Thp-1 und Raw-Makrophagen

Makrophagen sind die Wirtszellen der Leishmanien im Säugetier-Wirt, z.B. beim Menschen. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und stellen ein Hindernis für Pathogene dar. Den Leishmanien ist es gelungen, diese Barriere zu überwinden, indem sie in apoptotischen PMN versteckt von Makrophagen phagozytiert werden, ohne diese zu aktivieren (van Zandbergen et al. 2004).

Die verschiedenen *Leishmania*-Spezies verursachen unterschiedliche Krankheitsbilder. Dies liegt einerseits daran, dass die verschiedenen Spezies unterschiedliche Virulenzfaktoren tragen (McMahon-Pratt et al. 2004). Andererseits entscheidet auch die Immunantwort des Wirtes über das Ausmaß der Erkrankung. Man geht davon aus, dass eine T-Helfer-1-Antwort bei Infektion mit *L. major* zu einer selbst heilenden Läsion führt, während die T-Helfer-2 Antwort mit einem chronischen und schwererem Verlauf korreliert. Es werden dabei unterschiedliche Zytokine aktiviert: bei der Typ-I-Antwort sind hohe Spiegel an IL-12, IFN-γ und TNF-α nachweisbar, bei der Typ-II- Antwort vorwiegend IL-4

(McMahon-Pratt et al. 2004, Giudice et al. 2012).

Ob und wie schwer ein Organismus an Leishmaniose erkrankt, hängt also von der *Leishmania*-Spezies und der Immunantwort des Wirtes ab. Es ist aber auch bekannt, dass derselbe *Leishmania*-Stamm in unterschiedlichen Wirtszellen/ Zelllinien unterschiedliche Krankheitsbilder auslöst. Dies wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen am Maus-Modell erforscht. Es gibt für *L. major* resistente (B10.D2, C57Bl/6, CBA, C3H) und empfängliche (BALB/c, P/J, SWR/J) Maus-Linien (Lipoldova et al. 2006). Resistenz bedeutet in diesem Zusammenhang selbst heilende Läsion bzw. milder Krankheitsverlauf. Ursächlich dafür scheinen Genpolymorphismen zu sein, die die Immunantwort des Wirtes beeinflussen. Bisher sind einige Genloci detektiert worden, die z.B. die Zytokinausschüttung oder die Parasitenlast in Organen regulieren (Lipoldova et al. 2006, Kurey et al. 2009). Auch das Ausmaß der Eliminierung bzw. Ausbreitung des Parasiten wird genetisch reguliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass unterschiedliche Genloci die Parasitenlast in verschiedenen Organen wie Milz oder Lymphkonten regulieren. Dies scheint auch essenziell für den Krankheitsverlauf und die klinische Manifestation zu sein. Resistente Zellen können die Parasitenlast in Milz und Lymphknoten klein halten, was mit einem milderen Krankheitsverlauf korreliert (Kurey et al. 2009). Diese Veröffentlichungen verdeutlichen, dass jede Makrophagen-Zelllinie einen anderen genetischen Hintergrund und somit andere Eigenschaften wie z.B. unterschiedliche Oberflächenrezeptoren hat und sich somit in der Immunantwort auf Leishmanien anders verhält.

Die Fragestellung, ob die Infektionsrate in Makrophagen eine Rolle für den Krankheitsverlauf spielt, wurde von Giudice et al. untersucht: es wurden Makrophagen von Patienten, die an kutaner bzw. mukokutaner Leishmaniose erkrankt waren und Makrophagen von asymptomatischen Patienten mit positivem Montenegro-Test isoliert und mit *L. braziliensis* inkubiert. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass die Parasitenlast in Makrophagen entscheidend für den Krankheitsverlauf ist: bei asymptomatischen Patienten ist die Leishmanien-Last in Makrophagen geringer als bei Patienten, die Symptome zeigen. Interessanterweise war die Infektionsrate der Makrophagen 2 h nach Transfektion noch gleich hoch, signifikante Unterschiede zeigten sich erst an späteren Zeitpunkten (z.B. 48 und 96 Stunden) nach Infektion. Es konnte also eine Korrelation zwischen der Parasitenlast in Makrophagen und dem

Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Da nur isoliert Makrophagen untersucht worden sind, war der Effekt unabhängig von der T-Helfer-Antwort (Giudice et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der humanen Monozyten-Zelllinie Thp-1 und der murinen Makrophagen-Zelllinie Raw 264.7 gearbeitet. Vor der jeweiligen Versuchsdurchführung wurde die Infektionsrate der Makrophagen bestimmt. Die Zelllinie Thp-1 zeigte eine stabile Infektionsrate mit 45-55%, während die Infektionsrate bei Raw-Zellen niedriger war und stärker schwankte (25-50%). Verglichen mit in der Literatur aufgeführten Angaben zu Infektionraten bei Raw-Makrophagen, war die Infektionsrate bei uns niedriger: nach Transfektion mit Promastigoten von *L. major* und *L. donovani* wird eine 80%ige Infektionsrate der Raw-Makrophagen beschrieben (Donovan et al. 2009). Diese Diskrepanz kann einerseits durch eine nicht optimale Raw 264.7-Kultur bedingt sein, d.h. z.B. durch zu alte Zellen. Andererseits kann auch eine nicht optimale Promastigoten-Kultur Grund für eine schlechte Infektionsrate sein: die besten Infektionsraten werden erzielt, wenn sich die Leishmanien in der stationären Phase befinden; dann sind etwa die Hälfte der Promastigoten apoptotisch. Der Anteil apoptotischer Promastigoten erhöht die Virulenz (van Zandbergen et al. 2006). Deshalb ist es wichtig, die Apoptoserate der Promastigoten-Kultur vor jeder Transfektion zu bestimmen.

Außerdem ist bei den von uns durchgeführten Versuchen aufgefallen, dass eine höhere Infektionsrate mit einer deutlicheren Apoptoseinhibition korreliert: die Apoptoseinhibition bei infizierten Thp-Zellen war deutlicher als bei infizierten Raw-Makrophagen. Der antiapototische Effekt kann jedoch rein rechnerisch bedingt sein: in der vorliegenden Arbeit wurde immer die Gesamtpopulation nach Transfektion und Apoptosestimulation betrachtet. Da die Infektionsraten der Versuchszellen unterschiedlich hoch waren, und davon ausgegangen wird, dass nur die mit Leishmanien infizierten Zellen die Apoptose inhibieren können, ist davon auch das Ausmaß der Apoptoseinhibition (z.B. gemessen an Caspasen-Aktivierung) abhängig. Je mehr Zellen infiziert sind, desto deutlicher ist der anti-apoptotische Effekt nach Apotosestimulation. Je geringer die Anzahl der infizierten Zellen einer Gesamtpopulation ist, desto geringer fällt der antiapoptotische Effekt aus und umso höher ist der Anteil apoptotischer Zellen nach Apotosestimulation gemessen an der Gesamtzahl der Versuchszellen einer Population.

Andere Forschungsgruppen konnten keinen Zusammenhang zwischen Infektionsrate der Makrophagen und Ausmaß der Apoptoseinhibition feststellen (Akarid et al. 2004). Es besteht weiterer Forschungsbedarf, um diese Fragestellung zu klären.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Infektionsrate der Makrophagen durch Verwendung von Promastigoten, die sich in der stationären Phase befinden, optimiert werden kann. Dazu muss vor jeder Transfektion die Apoptoserate der Promastigoten-Kultur bestimmt werden; diese sollte bei etwa 50-60 % liegen. Außerdem muss die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Infektionsrate von Makrophagen und dem Ausmaß der Apoptosehemmung gibt weiter erforscht werden. Da sich Makrophagen-Zelllinien in ihren Eigenschaften stark von primären Makrophagen unterscheiden sind Rückschlüsse auf das Verhalten von Makrophagen in vivo nur bedingt möglich.

Schlussfolgernd wäre es sinnvoll, für weitere Versuche primäre Makrophagen zu verwenden.

4.3 Höhere Annexin-Positivität in infizierten Raw-Makrophagen nach Inkubation mit Staurosporin

Um das Ergebnis der Kernfärung – eine Abnahme der Apoptoserate bei Leishmanien-Infektion – zu erhärten, wurde die Apoptoserate mit einer weiteren Methode bestimmt. Weit verbreitete Methoden zur Bestimmung der Apoptoserate (neben Kernfärbung/ Morphologiekontrolle) sind z. B. TUNEL-Technik und Annexin-Messung, die weniger subjektiv als die Kernfärbung sind. Mit der Annexin-Messung wurde auf eine laborintern gut etablierte sowie in der Apoptose- und Leishmanien-Forschung weit verbreitete Methode zurückgegriffen (z.B. Aga et al. 2002, Getti et al. 2008). Apoptotische Zellen (auch apoptotische Leishmanien) exprimieren auf ihrer Oberfläche Phosphatidylserin, das in der früh-apoptotischen Phase von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite transloziert. Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin und kann durch Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen im Durchflusszytometer analysiert werden (Zhang et al. 1997).

In kurzlebigen PMN konnte mittels Annexin-V-Messung und weiteren Methoden eine Hemmung der Apoptose der PMN durch Infektion mit *L.major* Promastigoten nachgewiesen werden (Aga et al. 2002). Im Unterschied zu unserem

Versuchsaufbau wurde die spontane Apoptose untersucht – Apoptose musste also nicht chemisch induziert werden. Auch in dendritischen Zellen konnte mittels Annexin-Messung eine Apoptosehemmung durch Leishmanien-Infektion nachgewiesen werden: nach Apoptoseinduktion mit Camptothecin waren infizierte Zellen weniger Annexin-positiv, d.h. weniger apoptotisch als die nicht infizierte Vergleichspopulation (Valdes-Reyes et al. 2009).

Es gibt auch Publikationen, die eine Apotposeinduktion durch Leishmanien-Infektion anhand Annexin V Analyse nachweisen konnten. Dies ist für Thp-1 und U937- Makrophagen nach Infektion mit Promastigoten von *L. major, L. aethiopica bzw. L. tropica* in späten Phasen der Infektion beschrieben worden (Getti et al. 2008): untersucht wurden die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion der Makrophagen, ohne chemische Apoptoseinduktion. Es wurde lediglich an o.g. Zeitpunkten die Apoptoserate/ Annexin-Positivität bei infizierten und nicht infizierten Makrophagen verglichen. Es konnte eine zeitabhängige Zunahme der Annexin-Positivität festgestellt werden. Daneben waren eine höhere Caspase-3 Aktivierung sowie eine Permeabilisierung der Mitochondien nachweisbar (Getti et al. 2008). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Raw 264.7 Makrophagen publiziert (Deschacht et al. 2012).

Allen genannten Publikationen ist gemeinsam, dass die mittels Annexin-Messung ermittelte Apoptoserate stets mit anderen Methoden erhärtet werden konnte, d.h. es konnte mit mehreren verschiedenen Methoden entweder eine Induktion (*Getti et al. 2008, Deschacht et al. 2012)* oder eine Hemmung *(Aga et al. 2002, Valdes-Reyes et al. 2009)* der Wirtszellapoptose gezeigt werden. Im Gegensatz dazu stimmen in der hier vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der Kernfärbung und der Annexin-Messung nicht überein: nach sechsstündiger Apoptosestimulation mit Staurosporin konnten wir bei den infizierten Raw-Makrophagen signifikant mehr Annexin messen, d.h. der Anteil apoptotischer Zellen war bei infizierten Zellen höher (etwa 12%) als bei nicht infizierten (etwa 8%). Nach 15stündiger Apoptoseinduktion war kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Populationen erkennbar. Somit besteht eine Divergenz zwischen der mittels Kernfärbung ermittelten Apoptoserate und dem Ergebnis der Annexin-Messung. Da wir mit anderen Methoden (Messung der Caspase-3-Aktivität und Cytochrom *c*- Freisetzung) nach sechsstündiger Apoptoseinduktion eine Apoptoseinhibition durch Leishmanien-Infektion nachweisen konnten, schien der Fehler an der

Methode bzw. an deren Durchführung zu liegen. Vorstellbar wäre, dass Leishmanien, die nach dem Waschen der Zellen mit angefärbt wurden, das Ergebnis verfälscht haben könnten (falsch hohe Annexin-Positivität).
Ein weiterer Aspekt ist zu beachten: in den oben aufgeführten Veröffentlichungen wurde fast ausschließlich die spontane Apoptose untersucht – in der hier vorliegenden Arbeit wurde Apotpose chemisch mit Staurosporin induziert. Folglich scheint es auch denkbar, dass die hohe Annexin-Positivität durch den Apoptoseinduktor Staurosporin bedingt sein könnte. Deshalb folgten weitere Versuche, die sich mit den Effekten von Staurosporin auf Leishmanien befassten.

4.4 Staurosporin hat eine zeitabhängige zytotoxische Wirkung auf *L. major* Promastigoten – Champtothecin nicht

Bei der Wahl des Apoptoseinduktors haben wir uns an der Literatur orientiert. Staurosporin, ein Proteinkinase-Inhibitor mit breitem Wirkspektrum (Bertrand et al. 1994), wurde z.B. von Akarid und Mitarbeitern verwendet (Akarid et al. 2004) und ist in der Apoptoseforschung weit verbreitet. Auch Camptothecin, ein Zytostatikum mit breitem Wirkspektrum (u.a. Hemmung der Topoisomerase I, Hemmung der DNA/ RNA-Synthese; Hsiang et al. 1985), ist in der Apoptoseforschung gängig (z.B. Ruhland et al. 2007, Valdes-Reyes et al. 2009), hat allerdings bekanntermaßen einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt auf *L. donovani* Promastigoten (Proulx et al. 2001, Sen et al. 2004, Marquis et al. 2005).
Zur Überprüfung der These, dass Leishmanien durch Staurosporin beeinträchtigt werden, wurden Thp-Makrophagen mit rot bzw. grün fluoreszierenden *L. major* Promastigoten (*L. major* dsRED bzw. eGFP) infiziert. Vorteil von fluoreszierender Leishmanien ist, dass diese nicht extra angefärbt werden müssen, um infizierte Zellen zu identifizieren. Wichtig zu wissen ist, dass nur vitale Promastigoten floureszieren. In der durchflusszytometrischen Analyse konnte ein zeitabhängiger Verlust der Fluoreszenz und damit der Vitalität der Leishmanien gemessen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Staurosporin eine zeitabhängige zytotoxische Wirkung auf Leishmanien hat. Ein für die von uns untersuchte Fragestellung (Modulation der Wirtszellapoptose) optimaler Apoptoseinduktor sollte jedoch gezielt in den Makrophagen Apoptose anstoßen, und Leishmanien nicht beeinflussen.
Um die Wirkung der von uns verwendeten Apoptoseinduktoren auf die

Leishmanien genauer zu untersuchen, wurden *L. major* Promastigoten mit Staurosporin in einer Konzentration von 1µg/ml (entspricht etwa 2,15 µM) und Camptothecin (2µM und 4 µM) inkubiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass durch Inkubation mit Staurosporin die Morphologie, die Vitalität und das Wachstum der Promastigoten beeinflusst werden. Mittels Annexin-Messung konnte gezeigt werden, dass nach 24stündiger Inkubation mit Staurosporin über 95% der Promastigoten apoptotisch waren. Nach 6stündiger Apoptosestimulation mit Staurosporin waren ca. 13 % der Promastigoten Annexin-positiv. Daneben waren deutliche morphologische Veränderungen sichtbar (Daten nicht gezeigt). Während sich die mit Camptothecin behandelten Leishmanien morphologisch kaum von der unbehandelten Vergleichspopulation unterschied, zeigten die mit Staurosporin behandelten Leishmanien bereits nach 6stündiger Inkubation morphologische Veränderungen, d.h. sie waren abgerundet bis oval und deutlich weniger mobil als die Vergleichspopulation. Das sind eindeutige Zeichen für eine – im Falle von Staurosporin irreversible – Zellschädigung (Becker et al. 1997). Zudem war 24 Stunden nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin eine deutliche Abnahme des Wachstums sichtbar (Daten hier nicht dargestellt).

Da Staurosporin bekanntermaßen in hohen Konzentrazionen zelltoxisch ist, verwundern diese Beobachtungen auf den ersten Blick nicht. Jedoch scheint es erstaunlich, dass in „gängigen“ Konzentrationen solche Effekte sichtbar sind. Es wurde gezielt nach Literatur gesucht, die sich mit den zytotoxischen Effekten der von uns verwendeten Apoptoseinduktoren auf Leishmanien befasst. Becker et al (1997) haben die Auswirkungen von Staurosporin auf Morphologie, Wachstum und Infektiosität von Leishmanien untersucht und festgestellt, dass Staurosporin eine konzentrations- und zeitabhängige zytotoxische Wirkung auf *Leishmania* Promastigoten hat. Eine Verringerung bzw. Stagnation des Wachstums war bereits bei niedrigen Konzentrationen nachweisbar, z.B. konnte bei einer Konzentration von 0,25 µM nach einer Stunde etwa 13 % weniger Wachstum als bei nicht behandelten Promastigoten nachgewiesen werden, was in der logarithmischen Wachstumsphase einen immense Abnahme des Wachstums bedeuten kann. Bei höheren Konzentrationen waren die Effekte noch deutlicher: nach 15minütiger Inkubation mit 10µM Staurosporin waren 59% der Promastigoten avital. Eine relevante Abnahme der Infektiosität wurde von Becker et al. erst bei Konzentrationen deutlich über 1µM nachgewiesen. Bei einer Staurosporin-

Konzentration von 10 µM nahm die Infektionsrate um fast 50% ab im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe.

Während es laut Becker et al. keine nennenswerte Beeinträchtigung der Amastigoten durch Staurosporin gibt, beschreiben Shimony et al. (2008) eine konzentrationsabhängige Schädigung der Amastigoten. Eine Abnahme der Vitalität um 20% konnte bereits bei Konzentrationen unter 2,5µM nachgewiesen werden. Bei höheren Konzentrationen fanden sich deutlichere Unterschiede. Jedoch war für Amastigoten eine 45fach höhere Konzentration des Apoptoseinhibitors nötig als für Promastigoten, um die gleichen Vitalitätsunterschiede zu erreichen. Anhand dieser Daten kann man davon ausgehen, dass Staurosporin in der von uns verwendeten Konzentration durchaus zu Beeinträchtigung der Promastigoten führen kann, dass aber die Leishmanien, die sich zu Amastigoten differenzieren konnten, kaum beeinflusst werden.

Camptothecin wurde von den in dieser Arbeit verwendeten *L. major* Promastigoten sehr gut toleriert. Es gibt große Unterschiede in der Sensibilität auf Camptothecin innerhalb der *Leishmania*-Spezies. Der *L. donovani*- Komplex scheint (mit Ausnahme weniger resistenter Stämme) sehr sensibel zu sein (Marquis et al. 2005, Sriram et al. 2005). Morphologische Veränderungen bei *L. donovani* Promastigoten werden in der Literatur erst ab Konzentrationen von 5-10µM beschrieben (Sen et al. 2004). Meines Wissens nach existieren keine Publikationen, die sich mit einer antiinfektiven Wirkung auf andere *Leishmania*-Spezies als *L. donovani* oder auf Amastigoten befassen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Camptothecin der für die Untersuchung unserer Fragestellung geeignetere Apotposeinduktor ist. In den hier verwendeten Konzentrationen (2 bzw. 4 µM) wurde in den Zelllinien Thp-1 und Raw 264.7 zuverlässig Apoptose induziert, während bei Leishmanien kein zytotoxischer Effekt und keine morphologischen Veränderungen sichtbar waren.

4.5 In infizierten Makrophagen wird der intrinsische Apoptoseweg gehemmt

Es ist bis heute nicht vollständig geklärt, über welchen Mechanismus Leishmanien in die Wirtszell-Apoptose eingreifen. Es sind bereits verschiedene Signalwege untersucht worden. Eine Modulation des extrinsischen Weges scheint eher unwahrscheinlich, zumindest gab es in murinen Makrophagen keinen Hinweis darauf (Akarid et al. 2004). Auch eine Modulation von (anti-apoptotischen)

Signalwegen scheint denkbar. Diesbezüglich konnte bei Leishmanien-Infektion eine Aktivierung der Signalwege p38 MAPK, NFkB und PI3K/Akt nachgewiesen werden, wobei nur die Blockierung des PI3K/Akt-Weges zur Aufhebung des anti-apoptotischen Effektes führte; untersucht wurden murine BMDM, die mit Promastigoten von *L. major* und *L. pifanoi* infiziert worden waren (Ruhland et al. 2007). Daneben konnte bereits mehrfach bestätigt werden, dass die Inhibition der Wirtszell-Apoptose durch Leishmanien mit einer Reduktion der Caspase-3-Aktivität einher geht: bei Infektion von U-937-Zellen mit *L. infantum* nach Apoptoseinduktion mit Actinomycin D (Lisi et al. 2005), bei mit *L. major* infizierten BMDM nach Wachstumsfaktorentzug und nach Apotposeinduktion durch Staurosporin (Akarid et al. 2004), bei murinen BMDM, B10 R und Raw 264.7-Makrophagen nach Apoptosestimulation mit Camptothecin bzw. Actinomycin D (Ruhland et al. 2007). Bei diesen Veröffentlichungen wurde die frühe Apoptose (max. 24 h nach Infektion) untersucht. Nicht zuletzt konnte auch in dendritischen Zellen nach Infektion mit *L. mexicana* eine Hemmung der Caspase-3 Aktivierung nach chemischer Apoptosestimulation mit Camptothecin nachgewiesen werden (Valdes-Reyes et al. 2009). Der deutlichste Effekt – eine Reduktion der Caspase-3 Aktivität um 80% – war 12 Stunden nach Inkubation mit Leishmanien und Apoptosestimulation nachweisbar (Valdes-Reyes et al. 2009).

Auch wir konnten nachweisen, dass *L. major*-Infektion zu einer signifikanten Reduktion der Caspase-3-Aktivität in Thp-1 Makrophagen nach Apoptoseinduktion führt. Nach 6tündiger Inkubation mit Camptothecin waren in 22,5% der infizierten Zellen aktive Capase-3 nachweisbar; in der nicht infizierten Vergleichspopulation waren es mit 44,7% etwa doppelt so viele Zellen. Nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin war der Unterschied nicht signifikant, aber auch hier war die Aktivität von Caspase-3 in infizierten Zellen nach Apoptoseinduktion geringer.

Es handelt sich bei Caspase-3 um eine sog. Effektorcaspase, die den Endpunkt der Apoptosekaskade darstellt und sowohl über intrinsischen als auch extrinsischen Apoptoseweg aktiviert werden kann. Daraus kann also kein Rückschluss auf den zugrunde liegenden Mechanismus der Apoptosemodulation gezogen werden. Um zu klären, ob Leishmanien zur Etablierung der Infektion den intrinsischen Apoptoseweg in ihren definitiven Wirtszellen modulieren, wurde die Cytochrom *c*-Freisetzung aus Mitrochondien untersucht.

Dazu wurde nach Infektion und Apoptoseinduktion eine intrazelluläre Cytochrom

c-Färbung angefertigt, die im FACS analysiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytosol bei Leishmanien-Infektion geringer ist. Ein ähnliches Resultat wurde 2004 von *Akarid et al*. publiziert, ebenfalls mittels intrazellulärer Färbung von Cytochrom *c* mit anschließender Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop (Akarid et al. 2004).
Zudem wurde mit der intrazellulären FACS-Färbung von Caspase-3 und Cytochrom c eine neue Methode etabliert.
Die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien wird durch Bcl-2 Proteine streng reguliert (vgl. Abb. 1). Dabei spielen anti-apoptotische BH 1-4 Proteine (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1/Bfl-1) und die pro-apoptotischen Proteine Bad und Bax eine entscheidende Rolle (Monian et al. 2012, Tait et al. 2010). Aufgabe der BH1-4 Proteine ist es, die Aktivierung der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bad und Bax zu hemmen und zu, dass aktives Bad bzw. Bax Oligodimere bilden und somit die Mitochondrienmembran permeabilisieren können, was zur Freisetzung von Cytochrom *c* führen würde.
In mit *L. major* bzw. *L. donovani* infizierten Makrophagen der Zelllinie Raw 264.7 konnte nach Apoptosestimulation mit Cycloheximid vermehrt Bcl-xl nachgewiesen werden (Donovan et al. 2009). Ebenso konnte in infizierten Raw- Makrophagen nach Apoptoseinduktion eine Physphorylierung und damit Inaktivierung von Bad beobachtet werden (Ruhland et al. 2007). Auch in Neutrophilen konnte nach *L. major*-Infektion eine vermehrte Expression der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bfl-1 und Bcl-2 beobachtet werden (Sarkar et al. 2013). Dies deutet darauf hin, dass der entscheidende Schritt der Apoptosemodulation auf Ebene der Bcl-2 Proteine stattfindet.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der intrinsische Weg der Apoptosekaskade bis zur mitochondrialen Ebene untersucht. Dabei konnte eine Hemmung der Wirtszellapoptose durch Leishmanien-Infektion nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass der intrinsische Weg durch Leishmanien-Infektion inhibiert wird, konnte durch unsere Ergebnisse erhärtet werden, da nach Apoptosestimulation die Cytochrom *c*-Freisetzung bei infizierten Makrophagen geringer war als bei nicht infizierten. Welcher Mechanismus dahinter steckt, kann jedoch anhand der Ergebnisse nicht geklärt werden. Dazu bedarf es weiterer Versuche. Sinnvoll

wäre, auf Ebene der Bcl-2 Proteine Bax oder Bak, die maßgeblich an der Regulierung der Cytochrom *c*-Freisetzung beteiligt sind, nach Unterschieden zwischen infizierten und nicht infizierten Makrophagen zu suchen.

Außerdem bleibt zu prüfen, ob die Ergebnisse auch mit primären Makrophagen reproduzierbar sind.

Interessant wäre es, einen längeren Infektionszeitraum zu beobachten, um herauszufinden, ob der anti-apoptotische Effekt nur zu Beginn der Infektion nachweisbar ist. Möglich wäre, dass nach Replikation der Amastigoten die Wirtszellapoptose angestoßen wird, um die Zelle leichter verlassen und neue infizieren zu können (vgl. Getti et al. 2008).

Nicht zuletzt scheinen Infektionsversuche mit Amastigoten viel versprechend, um die Interaktionen der Leishmanien mit der Wirtszelle weiter zu erforschen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Apoptose spielt in der Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern eine wichtige Rolle. Infizierte körpereigene Zellen können vom immunkompetenten Organismus als solche erkannt und via Induktion von Apoptose aus dem Organismus entfernt werden. Die Modulation von Apoptose durch intrazelluläre Pathogene ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Leishmanien sind obligat intrazelluläre Parasiten, deren Lebenszyklus durch einen Wirtswechsel – zwischen bestimmten Sandmückenarten und Säugetieren – gekennzeichnet ist. Im Säugetier-Wirt werden die Leishmanien von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) phagozytiert, den ersten Abwehrzellen am Ort der Entzündung. Leishmanien sind in der Lage, die spontane Apoptose der PMN zu verzögern. Dadurch sichern sie ihr Überleben in den PMN für wenige Tage bis die Makrophagen, ihre definitiven Wirtszellen, am Ort der Entzündung angekommen sind, um die PMN zu phagozytieren.

Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Frage, ob Leishmanien in die Apoptosekaskade ihrer definitiven Wirtszellen, den Makrophagen, eingreifen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits nachweisen, dass mit Leishmanien infizierte Makrophagen nach Apoptoseinduktion im Vergleich zu nicht infizierten Makrophagen später apoptotisch werden bzw. eine geringere Apoptoserate aufweisen. Allerdings ist noch unklar, auf welche Weise die Wirtszellapoptose moduliert wird.

Unter der Annahme, dass Leishmanien in den intrinsischen Weg der Wirtszell-Apoptosekaskade eingreifen, wurde das Augenmerk auf diesen Weg gelegt. Untersucht wurde die frühe Phase der Infektion, der Zeitraum der ersten 20 Stunden. Es wurde mit zwei verschiedenen Zelllinien gearbeitet: Raw 264.7 und Thp-1 Makrophagen. Apoptose wurde medikamentös mit Camptothecin bzw. Staurosporin induziert. Auf verschiedenen Stufen der Apoptosekaskade wurden infizierte und nicht infizierte Makrophagen nach Apoptoseinduktion miteinander verglichen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass mit Leishmanien infizierte Makrophagen nach medikamentöser Apoptoseinduktion eine geringere Apoptoserate aufweisen als nicht infizierte Makrophagen. Zudem konnte bei infizierten Makrophagen nach Apoptosestimulation eine geringere Aktivität von Caspase-3 gemessen werden. Außerdem fanden sich Unterschiede in der

Freisetzung von Cytochrom-*c*. Es konnte bei Leishmanien-Infektion signifikant weniger Cytochrom *c* nach Apoptosestimulation gemessen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Leishmanien in der Lage sind, in Makrophagen hemmend in den intrinischen Weg der Apoptosekaskade einzugreifen.

Welcher Mechanismus zugrunde liegt, kann jedoch anhand der Ergebnisse nicht geklärt werden. Dazu bedarf es weiterer Versuche. Sinnvoll wäre, auf Ebene der Bcl-2 Proteine Bax oder Bak, die maßgeblich an der Regulierung der Cytochrom *c*-Freisetzung beteiligt sind, nach Unterschieden zwischen infizierten und nicht infizierten Makrophagen zu suchen. Zudem muss geprüft werden, ob die Ergebnisse mit primären Makrophagen reproduzierbar sind. Nicht zuletzt könnten Infektionsversuche mit Amastigoten die Erforschung der Interaktionen zwischen Leishmanien und Makrophagen im intrazellulären Milieu weiter vorantreiben.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T: Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite Leishmania major.
Journal of Immunology, 169, 898-905 (2002)

2. Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC: Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c.
Journal of Leucocyte Biology, 76, 95-103 (2004)

3. Becker S, Jaffe CL: Effect of protein kinase inhibitors on the growth, morphology, and infectivity of Leishmania promastigotes.
Parasitology Research, 83(3), 273-80 (1997)

4. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y: Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine.
Experimental Cell Research, 211 (2), 314-321 (1994)

5. Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G: Cell death independent of caspases: a review.
Clinical Cancer Research, 11, 3155-3162 (2005)

6. Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT: Protozoan parasites: programmed cell deth as a mechanism for parasitism.
Trends in Parasitology, 23, 376-383 (2007)

7. Carmen JC, Sinai AP: Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites.
Molecular Microbiology, 64, 904-916 (2007)

8. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M: Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?
Nature Reviews. Microbiology, 5, 873-882 (2007)

9. Chen M, Guerrero AD, Huang L, Shabier Z, Pan M, Tan TH, Wang J: Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic BCL-2 family members.
The Journal of Biological Chemistry, 282, 33888-33895 (2007)

10. Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.
Nature Reviews. Cancer, 2, 647-656 (2002)

11. Danial NN: BCL-2 Family Proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death.
Clinical Cancer Research, 13, 7254-7263 (2007)

12. Deschacht M, Van Assche T, Hendrickx S, Bult H, Maes L, Cos P: Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon Leishmania infection.
Parasitology, 139(11), 1429-37 (2012)

13. Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA: Leishmania infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner.
Experimental Parasitology, 123, 58-64 (2009)

14. Esmann L, Idel C, Sarkar A, Hellberg L, Behnen M, Möller S, van Zandbergen G, Klinger M, Köhl J, Bussmeyer U, Solbach W, Laskay T: Phagocytosis of apoptotic cells by Neutrophil Granulocytes: diminished proinflammatory Neutrophil functions in the presence of apoptotic cells.
Journal of Immunology, 184, 391-400 (2010)

15. Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, Klos A, Hess S, Ying S, Häcker G: Chlamydia Inhibit Host Cell Apoptosis by Degradation of Proapoptotic BH3-only Proteins.
The Journal of Experimental Medicine, 200, 7, 905-916 (2004)

16. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G: Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria.
Cell Death and Differentiation, 13, 1423-1433 (2006)

17. Gélinas C, White E: BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL 1 and BAK-mediated apoptosis.
Genes & Development, 19 (11), 1263-1268 (2005)

18. Getti GT, Cheke RA, Humber DP: Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for Leishmania parasites?
Parasitology, 135, 1391-1399 (2008)

19. Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho RP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O: Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection.
Infectious Diseases, 12, 75 (2012)

20. Green DR: Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system.
Immunological Reviews, 193, 5-9 (2003)

21. Green DR: Apoptotic pathways: ten minutes to dead.
Cell, 121, 671-674 (2005)

22. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE: Cell Death.
New England Journal of Medicine, 361, 1570-1583 (2009)

23. Hsiang Y, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF: Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA Topoisomerase I.
Journal of Biological Chemistry, 260, 14873-14878 (1985)

24. Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE: Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites.
Parasites & Vectors, 4: 44 (2011)

25. Kamir D, Zierow S, Leng L, Cho Y, Diaz Y, Griffith J, McDonald C, Merk M, Mitchell RA, Trent J, Chen Y, Kwong A, Xiong H, Vermeire J, Cappello M, McMahon-Pratt D, Walker J, Bernhagen J, Lolis E, Bucala R: A Leishmania Ortholog of Macrophage Migration Inhibitory Factor Modulates Host Macrophage Responses.
Journal of Immunology, 180, 8250-8261 (2008)

26. Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ: Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis.
Nature, 443, 658-662 (2006)

27. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH: Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies.
Nature Cell Biology, 8, 1348-1358 (2006)

28. Kurey I, Kobets T, Havelková H, Slapničková M, Quan L, Trtková A, Grecov I, Svobodová M, Stassen AP, Hutson A, Demant P, Lipoldová M: Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after Leishmania major infection
Immunogenetics, 61, 619–633 (2009)

29. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD: BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly.
Molecular Cell, 17, 525-535 (2005)

30. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH: Caspases: pharmacological manipulation of cell death.
The Journal of Clinical Investigation, 115, 2665-2672 (2005)

31. Leirião P, Rodrigues CD, Albuquerque SS, Mota MM: Survival of protozoan intracellular parasites in host cells.
EMBO Reports, 5 (12), 1142-1147 (2004)

32. Lipoldová M, Demant P: Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis.
Nature reviews. Genetics, 7, 294-305 (2006)

33. Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, Brandonisio O, Panaro M: Infection with Leishmania infantum inhibits actinomycin D- induced apoptosis of human monocytic cell line U-937.
Journal of Eukaryotic Microbiology, 52, 211-217 (2005)

34. Lomonosova E, Chinnadurai G: BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview.

Oncogene, 27, 2-19 (2009)

35. Marquis J-F, Hardy I, Olivier M: Topoisomerase I Amino Acid Substitutions, Gly185Arg and Asp325Glu, Confer Camptothecin Resistance in Leishmania donovani.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49 (4), 1441–1446 (2005)

36. McMahon-Pratt D, Alexander J: Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for the New World coutaneous leishmaniases or the visceral disease?
Immunological reviews, 201, 206-224 (2004)

37. Monian P, Jiang X: Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis: regulation post cytochrome *c* release.
Experimental Oncology, 34, 185-191 (2012)

38. Moore KJ, Matlashewski G: Intracellular Infection by Leishmania donovani Inhibits Macrophage Apoptosis.
Journal of Immunology, 152, 2930-2937 (1994)

39. Nadiri A, Wolinski MK, Saleh M: The Inflammatory Caspases: Key Players in the Host Response to Pathogenic Invasion and Sepsis.
Journal of Immunology, 177, 4239–4245 (2006)

40. Nemec KN, Khaled AR: Therapeutic Modulation of Apoptosis: Targeting the BCL-2 Family at the Interface of the Mitochondrial Membrane.
Yonsei Medical Journal, 49, 689-697 (2008)

41. Olivier M, Gregory DJ, Forget G: Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view.
Clinical Microbiology Reviews,18, 293-305 (2005)

42. Perkins ND: Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function.
Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 8, 49-62 (2007)

43. Peter ME, Krammer PH: The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond.
Cell Death and Differentiation, 10, 26-35 (2003)

44. Pop C, Salvesen GS: Human caspases: activation, specifity, and regulation.
Journal of Biological Chemistry, 284, 21777-21781 (2009)

45. Proulx M, Désormeaux A, Marquis J, Olivier M, Bergeron M: Treatment of Visceral Leishmaniasis with Sterically Stabilized Liposomes Containing Camptothecin.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy,45 (9), 2623-2627 (2001)

46. Riedl SJ, Shi Y: Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.
Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 5, 897-907 (2004)

47. Rogers ME, Bates PA: *Leishmania* Manipulation of Sand Fly Feeding Behavior Results in Enhanced Transmission.
PloS Pathogens, 3 (6), e91 (2007)

48. Ruhland A, Leal N, Kima PE: *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis.
Cellular Microbiology 9, 84-96 (2007)

49. Sarkar A, Aga E, Bussmeyer U, Bhattacharyya A, Möller S, Hellberg L, Behnen M, Solbach W, Laskay T: Infection of neutrophil granulocytes with Leishmania major activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis.
Medical Microbiolology and Immunolology, 202 (1), 25-35 (2013) - Epub 2012

50. Schaumburg F, Hippe D, Vutova P, Luder CG: Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites.
Parasitology, 132, 69-85 (2006)

51. Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P: Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester an 1,25-dihydroxyvitamin D3.
Journal of Leukocyte Biology, 59, 555-561 (1996)

52. Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S, Rakshit S, Sen T, Majumder HK: Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate Leishmania donovani.
Cell Death and Differentiation 11, 924–936 (2004)

53. Shaha C: Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis.
Indian Journal of Medical Research, 123, 233-244 (2006)

54. Shimony O, Jaffe CL: Rapid fluorescent assay for screening drugs on Leishmania amastigotes.
Journal of Microbiological Methods, 75(2), 196-200 (2008)

55. Sriram D, Yogeeswari P, Thirumurugan R, Bal TR: Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential.
Natural Product Research, 19(4), 393-412 (2005)

56. Strasser A: The role of BH3-only proteins in the immune system.
Nature, 189-200 (2005)

57. Tait SWG, Green DR: Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond.
Nature reviews. Molecular Cell Biology, 11, 621-632 (2010)

58. Tripathi P, Singh V, Naik S: Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm.

FEMS Immunology and Medical Microbiology, 51, 229-242 (2007)

59. Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y: Apoptosis: why and how does it occur in biology?
Cell Biochemistry and Function, 29, 468-480 (2011)

60. Valdés-Reyes L, Argueta J, Morán J, Salaiza N, Hernández J, Berzunza M, Aguirre-García M, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L: Leishmania mexicana: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells.
Experimental Parasitology, 121, 199-207 (2009)

61. van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Muller A, Holscher C, Herrmann M, Sacks D, Solbach W, Laskay T: Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (37), 13837-13842 (2006)

62. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T: Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages.
Journal of Immunology, 173 (11), 6521-6525 (2004)

63. van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T: Apoptosis driven infection.
Autoimmunity, 40, 349-352 (2007)

64. Vucic D, Fairbrother WJ: The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Cancer.
Clinical Cancer Research, 13, 5995-6000 (2007)

65. Youle RJ, Strasser A: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death.
Molecular Cell Biology, 9, 47-59 (2008)

66. Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G: Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V.
Biotechniques, 23, 525-31 (1997)

67. Zhaoyu J, Wafik SE: Overview of cell death signaling pathways.
Cancer Biology & Therapy, 4, 139-163 (2005)

7 DANKSAGUNG

Die Dissertation entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Ulm unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Ger van Zandbergen.

Für die Vergabe des Themas bedanke ich mich bei PD Dr. med. Silke Fischer.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ger van Zandbergen für die allzeit konstruktiven und wertvollen Anregungen und für die Anweisung zu wissenschaftlichem Arbeiten und Denken.

8 LEBENSLAUF

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.