Aus der Universitätsklinik Ulm

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Direktor Prof. Dr. S. Stenger

Detektion und Analyse molekularer Mechanismen der Apoptose in humanpathogenen Protozoen der Gattung *Leishmania*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Jochen Paul Steinacker

aus Schwäbisch Gmünd

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD G. van Zandbergen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

Tag der Promotion: 08.05.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1. Über Apoptose 1

1.2. *Leishmania major* als Vertreter der eukaryonten Einzeller 3

1.3. Der Lebenszyklus des Genus *Leishmania* 4

1.4. Leishmaniose – eine Zoonose beim Menschen 6

1.5. Apoptose bei Leishmanien 7

1.6. Zielsetzung der Arbeit 10

2. Material und Methoden 12

2.1. Materialliste 12

2.2. Methoden 28

3. Ergebnisteil 51

3.1. Wachstumsverhalten 51

3.2. Apoptoserate in der Zellkultur 52

3.3. Apoptoseinduktion bei Promastigoten und Amastigoten Leishmanien 53

3.4. Analyse der Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid Färbung 55

3.5. Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei Promastigoten und Amastigoten Leishmanien 58

3.6. Differenzierung des Auftretens unterschiedlicher ROS Spezies bei Promastigoten und Amastigoten Leishmanien 59

3.7. Untersuchung der Modulationsmöglichkeit der Apoptose Induktion durch den ROS Fänger N-Acetylcystein (NAC) 63

3.8. Analyse der Enzymregulation im Zusammenhang mit ROS – Untersuchung der *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase 66

3.9. Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung von LmAPX 70

3.10. Analyse der Enzymmenge im Zusammenhang mit der Degradierung von DNA während der Apoptose – Untersuchung von Endonuclease G 72

3.11. Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung von Endonuclease G 75

3.12. Inhibition der Endonuclease G mittels Aurintricarbonsäure 77

3.13. Suche nach unbekannten Mediatoren der Apoptose auf Proteinebene 79

3.14. Massenspektrometrische Analyse der Protozoen 80

3.15. Calpain-like Cystein Peptidase (F20.1280) 83

3.16. Acetyl-CoA Synthetase *Leishmania major* strain Friedlin 84

3.17. Dipeptidyl Peptidase III Metallo Peptidase Clan M Family M49 LM 85
4. Diskussion 88
4.1. Morphologische Charakteristika der Apoptose bei *Leishmania major* Promastigoten und deren Wachstumsverhalten 89
4.2. Analyse der Apoptoserate durch Stimulation bei Amastigoten und Promastigoten.....90
4.3. Messung des DNA Gehaltes in Promastigoten und Amastigoten mittels Propidiumiodid Färbung 91
4.4. Bedeutung und Vorkommen von verschiedenen Arten reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen der Apoptose.....92
4.5. Analyse der Enzymregulation unter Apoptose Stimulation im Fall der *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase 95
4.6. Untersuchung der Enzymmenge an Endonuclease G bei zur Apoptose stimulierten Leishmanien.....98
4.7. Suche nach weiteren Mediatoren der Apoptose; Hemmung der Proteinbiosynthese mittels Cyclohexamid 100
4.8. Massenspektrometrische Analyse der protozoischen Proteinregulation und Identifikation dreier möglicher Mediatoren im Rahmen apoptotischer Vorgänge bei *Leishmania major* 101
5. Zusammenfassung 106
6. Literaturverzeichnis 107
7. Danksagung 118
8. Lebenslauf.....119

Abkürzungsverzeichnis

α	anti, englisch: gegen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
µmol	Mikromol
AAM	Alex Amastigoten Medium
ACoAS	Acetyl-CoenzymA Synthetase
A. dest.	aqua destillata, lateinisch: destilliertes Wasser
AIF	apoptosis inducing factor, englisch: Apoptose induzierender Faktor
AnxV	Annexin V
APS	Ammoniumpersulfat
ATA	Aurintricarbonsäure
BCA	Bicinchoninsäure
BHI	Brain Heart Infusion, englisch: Gehirn Herz Agar
bp	base pair, englisch: Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA, englisch: komplementäre DNA
CLCP	Calpain-like Cystein Peptidase
cm	Zentimeter
CX	Cyclohexamid
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
3,4-DCIC	3,4-Dichloroisocoumarin
DHE	Dihydroethidium
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, englisch: Desoxyribonukleinsäure
DPPD	Dipeptidyl Peptidase III
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

eGFP	enhanced green fluorescent protein, englisch: verbessertes grün fluoreszierendes Protein
EndoG	Endonuclease G
FACS	fluorescence activated cell sorting, englisch: Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	forward, englisch: vorwärts (bei Primern, Leserichtung)
g	Erdschwerebeschleunigung
G0/1/G2 Phase	gap, englisch: (Lücke); Phasen im Zellzyklus
HCl	Chlorwasserstoff
H_2DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlore Säure
HRP	horseradish peroxidase, englisch: Meerrettich Peroxidase
HTRA2	high temperature requirement protein A2, englisch: hohe Temperatur erforderndes Protein A2
Hz	Hertz
ICD10	international statistical classification of diseases and related health problems, englisch: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KL	Kutane Leishmaniose
l	Liter
LCF	Leishmanien chemotaktischer Faktor
LmAPX	*Leishmania major* Ascorbat Peroxidase
LMJ number	*Leishmania major* number, englisch: *Leishmania major* Nummer
log-Phase	logarithmische Phase im Wachstum von Promastigoten
M	Angabe der Molarität; 1M = mol/l
mA	Milliampere
MDL28170	Calpain Inhibitor mit der Nummer 28170 des MDL® directory of available chemicals
Med.	Mediumkontrolle

mg	Milligramm
MG	Molekulares Gewicht
Mil.	Miltefosin
min	Minute
MKL	Mukokutane Leishmaniose
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization, englisch: Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien Membran
M Phase	Mitose Phase, Phase im Zellzyklus
n	Anzahl
NAC	N-Acetylcystein
NaN_3	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNN	Novy-Nicolle-McNeal Agar
$\cdot O_2^-$	Superoxid-Anion
OD	Optische Dichte
OH·	Hydroxyl-Radikal
$ONOO^-$	Peroxynitrit-Anion
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, englisch: mit Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, englisch: Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PL	Phospholipid
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, englisch: quantitative Polymerasekettenreaktion

Rb	rabbit, englisch: Kaninchen
rev	reverse, englisch: rückwärts (bei Primern, Leserichtung)
RNA	ribonucleic acid, englisch: Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, englisch: Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rotations per minute, englisch: Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT PCR	reverse transcription polymerase chain reaction, englisch: Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	standard error of the mean, englisch: Standardfehler
S Phase	Synthese Phase, Phase im Zellzyklus
spp.	species pluralis; zusammenfassend, mehrere Spezies einer Gattung
St.	Staurosporin
subG1	Zellfraktion im Zellzyklus unter der Phase G1; Anteil der Zellen mit hypoploider Erbinformation
TBE	TRIS Borat EDTA Puffer
TBS(-T)	tris buffered saline (with tween), englisch: Salzlösung gepuffert mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (und Zusatz von Polysorbat 20)
TC	Triacsin C
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T_H-1	T-Helferzelle vom Typ 1
T_H-2	T-Helferzelle vom Typ 2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit, englisch: Einheit
UNC5B	Netrin Rezeptor UNC5B
V	Volt
v/v	Volumenkonzentration (Volumen je Volumen)
VL	Viszerale Leishmaniose
WHO	World Health Organization, englisch: Weltgesundheitsorganisation
wt	wildtype, englisch: Wildform

1. Einleitung

1.1.Über Apoptose

Der Begriff der Apoptose, welcher für eine streng regulierte und gleichzeitig hoch konservierte Form des programmierten Zelltodes verwandt wird, bezieht sich im Allgemeinen auf mehrzellige Organismen und spielt eine bedeutende Rolle für deren Homöostase respektive deren Zellumsatz, besonders in Hinblick auf die Wachstums- sowie Entwicklungsphasen der mehrzelligen Organismen (Kerr et al. 1972; Vaux et al. 1999). Diese Form des programmierten Zelltodes wurde bereits in der zweiten Hälfte des 19ten Jahrhunderts beobachtet, erlangte jedoch erst rund 100 Jahre später größere Bedeutung, als sich die Vorstellung eines aktiven Prozesses mitsamt intrazellularen Signalwegen Bahn zu brechen begann (Ameisen 2002). Im Zuge der Abgrenzung der Apoptose von anderen Formen des programmierten Zelltodes etablierten sich distinkte morphologische Kennzeichen, welche zur Identifikation der Apoptose herangezogen werden können. Im Gegensatz zum pathologischen Zelltod, welcher durch Zellschwellung und den Verlust der Membranintegrität gekennzeichnet ist, kommt es im Ablauf der Apoptose zunächst zur Kondensation von Chromatin und zum Schrumpfen der Zelle, wobei die Integrität der Plasmamembran und die der Zellorganellen erhalten bleibt (Jacobson et al. 1997; Kerr et al. 1972). Als ein frühapoptotischer Vorgang wurde in diesem Zusammenhang lange Zeit die Externalisation von Phosphatidylserin, einem Phospholipid, welches bei vitalen Zellen im Bereich der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist (Martin et al. 1995), beschrieben. Mittlerweile wurde jedoch publiziert, dass Promastigote *Leishmania donovani* kein Phosphatidylserin besitzen, jedoch im Rahmen der Apoptose andere Phospholipide externalisieren (Weingärtner et al. 2012). Dieser Umstand kann unter anderem dazu verwandt werden, apoptotische Zellen mittels an Annexine gekoppelte Farbstoffen anzufärben, wobei deren Calcium abhängige Affinität zu Phospholipiden genutzt wird (Homburg et al. 1995). Die molekulare Maschinerie, welche bei mehrzelligen Organismen den aktiven Prozess der Apoptose reguliert, ist verhältnismäßig gut beschrieben, wobei im ersten Pfad, dem extrinsischen, die Aspartat abhängigen Cysteinproteasen aus der Familie der Caspasen von zentraler Bedeutung sind und in einem zweiten, dem intrinsischen Pfad, die Freisetzung von mitochondrialen Effektormolekülen im Rahmen der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran von entscheidender Bedeutung ist, in diesem Kontext sei die Kontrolle des Prozesses durch Proteine der Blc-2/Bax Familie und die Freisetzung von Cytochrom C genannt (Arnoult et al. 2002; Green 2000; Hengartner 2000). Eine

weitere Stoffklasse, welcher im Hinblick auf ihren Hauptentstehungsort, dem Mitochondrium, sowie während der Apoptoseinduktion und deren Verlauf eine bedeutsame Rolle zukommt, sind reaktive Sauerstoffspezies (englisch: reactive oxygen species, ROS) (Higuchi et al. 1998). Das intrazelluläre Gleichgewicht an ROS Entstehung und ROS Abbau wird von einer Reihe Molekülen strikt reguliert, da unterschiedliche reaktive Sauerstoffspezies wie etwa Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Peroxinitrit ($ONOO^-$) sowohl bei der Vermittlung von Zellproliferation als auch bei Apoptose von Bedeutung sind (Cadenas 2004; Lander et al. 1996).

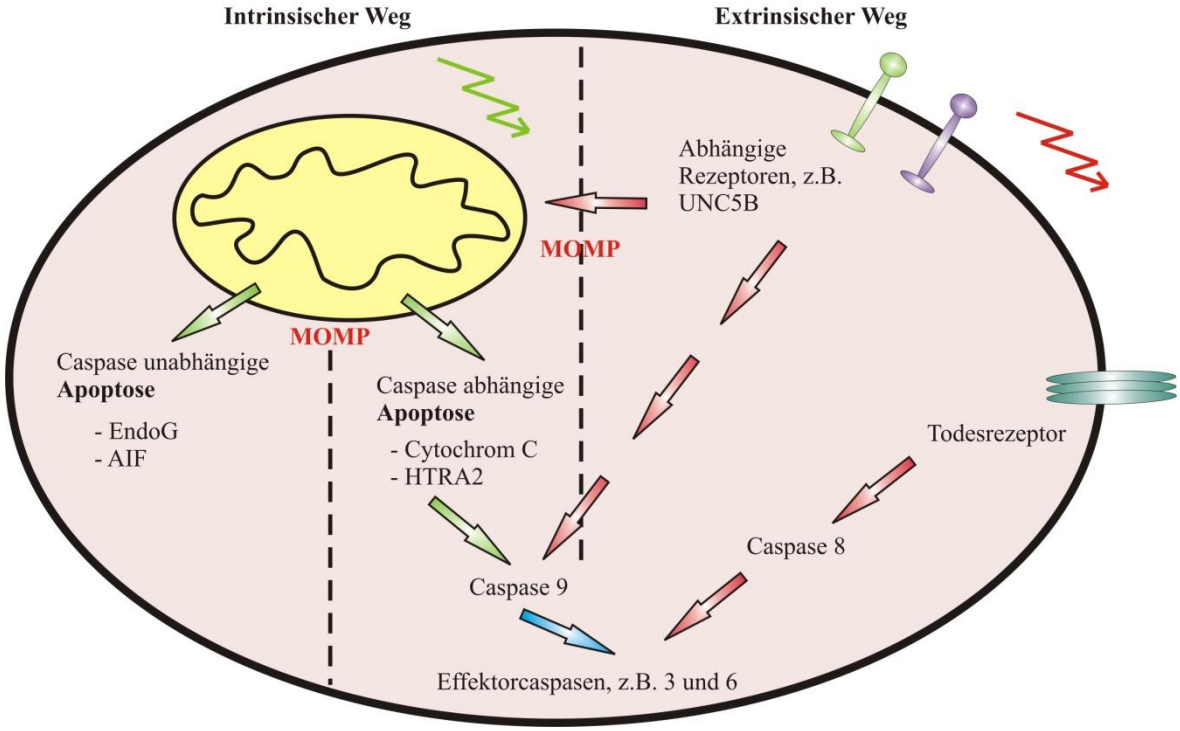

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung einer Zelle samt der bei mehrzelligen Eukaryonten bekannten Signalwege, welche zur Apoptose führen. Auf der linken Seite dargestellt ist der intrinsische Pfad, der grüne Blitz symbolisiert eine Form von intrazellulärem Stress, grüne Pfeile stellen Teile des intrinsischen Weges dar, ockerfarben ist das Mitochondrium mit äußerer und innerer Membran abgebildet. Die rechte Seite zeigt den extrinsischen Pfad, der rote Blitz symbolisiert extrazelluläre Auslöser der Apoptose, rote Pfeile stellen Wirkungen vermittelt durch Teile des extrinsischen Signalweges dar. Der blaue Pfeil weist auf die gemeinsame Endstrecke der beiden Pfade mit Effektorcaspasen hin. Gestrichelte Linien (- - -) symbolisieren getrennte Signalwege. Abkürzungen: AIF für apoptosis inducing factor; EndoG für Endonuclease G; HTRA2 für high temperature requirement protein A2; MOMP für mitochondrial outer membrane permeabilization; UNC5B für Netrin Rezeptor UNC5B. Abbildung modifizierte Darstellung nach Galluzzi et al. 2012.

Die bislang angesprochenen Effektormoleküle und Caspase –abhängigen Signalwege sind für mehrzellige Organismen beschrieben worden; jedoch kam es in den letzten beiden Dekaden zu einem Paradigmenwechsel und der Beobachtung, dass auch einzellige Lebewesen einen programmierten Zelltod durchlaufen können und dabei dieselben

morphologischen Landmarken aufweisen, wie sie in Mehrzellern beobachtet wurden (Ameisen 1998; Ameisen 2002; Kroemer et al. 2005). Diese Erkenntnis wurde zunächst an vier eukaryonten Protozoen offenbar, darunter Kinetoplastea wie *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania major* (Arnoult et al. 2002). Letztere zur Familie der Trypanosomatidae gehörende Art steht im Fokus dieser Arbeit und wird im nächsten Absatz näher vorgestellt.

1.2. *Leishmania major* als Vertreter der eukaryonten Einzeller

Leishmanien sind einzellige Lebewesen und gehören zur Domäne der Eukaryonten; sie sind mit Ausnahme Australiens und der Antarktis auf allen Kontinenten der Welt verbreitet (Baṇuls et al. 1999). Diese Einzeller entstammen der Familie der Trypanosomatidae und werden gemäß ihrer unterschiedlichen Entwicklung im Gastrointestinaltrakt von Sandmücken in zwei Subgenus unterteilt (Abbildung 2), den *Leishmania*, deren Wachstum auf präpylorische Abschnitte des Verdauungstraktes der Mücken restringiert ist und den *Viannia*, welche sich sowohl prä- als auch postpylorisch vermehren können (Committee on the control of Leishmaniases 2010).

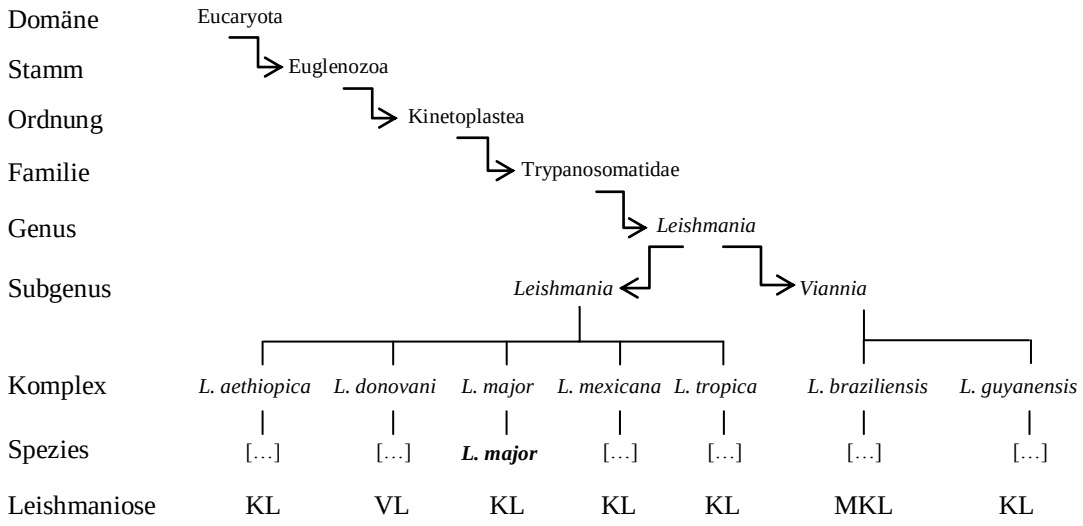

Abbildung 2: Schematische Darstellung der taxonomischen Klassifikation der Spezies *Leishmania major* (Ashford 2000). Pfeile (→) stellen den Übergang eines taxonomischen Ranges in den nächsten darunter liegenden dar. *L.* steht für *Leishmania*. Es erfolgte die Abbildung aller humanpathogenen Komplexe (Ashford 2000; Couppié et al. 2004), die folgenden Spezies wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen und durch […] angedeutet. Die unterhalb der Spezies aufgeführten Abkürzungen stellen die Zuordnung der beim Menschen gemäß ICD 10 hervorgerufenen Form der Leishmaniose dar; KL steht für kutane Leishmaniose, MKL steht für mukokutane Leishmaniose und VL bedeutet viszerale Leishmaniose.

Die Zugehörigkeit der *Leishmania* zu den *Kinetoplastea* liegt in einem morphologischen Charakteristikum begründet, genauer in der spezifischen Konfiguration der

mitochondrialen DNA, dem so genannten Kinetoplasten (Minocha et al. 2011). Der Kinetoplast zeigt bei elektronenmikroskopischer Analyse eine komplexe Ringstruktur, welche sich dem Aussehen nach mit einem Kettenpanzer vergleichen lässt, wobei nach Größe zwischen Maxicircles und Minicircles unterschieden wird (Laurent u. Steinert 1970; Liu et al. 2005; Minocha et al. 2011). Die Maxicircles enthalten hierbei die Erbinformation für Proteine, welche in der mitochondrialen Energiekette benötigt werden und damit für den ROS Haushalt der Einzeller von zentraler Bedeutung sind (Shapiro u. Englund 1995).

1.3. Der Lebenszyklus des Genus *Leishmania*

Ein weiteres Charakteristikum der Leishmanien besteht in ihrem Lebenszyklus und dem Auftreten zweier morphologisch distinkt voneinander abzugrenzenden Erscheinungsformen, den unbegeißelten Amastigoten sowie den ein Flagellum tragenden Promastigoten, welche jeweils charakteristisch für ein Stadium im Verlauf des Lebenszyklus mitsamt dem dabei stattfindenden Wirtswechsel sind.

Die durch ihre Begeißelung motilen Promastigoten (Abbildung 3 A) existieren im Verdauungstrakt von Sandmücken, genauer gesagt in verschiedenen Sandmückenarten (Phlebotominae), welche eine Unterfamilie der Schmetterlingsmücken (Psychodidea) darstellen. Regional kommen hierbei unterschiedliche Arten besonders häufig als Vektoren der Leishmanien vor, insbesondere Arten der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia* (Kassiri u. Javadian 2011; Vilela et al. 2011).

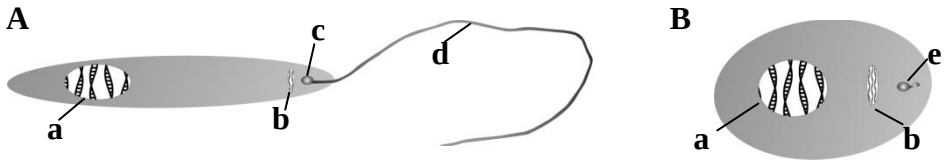

Abbildung 3: Schematische Darstellung der beiden morphologisch verschiedenen Lebensformen des Genus *Leishmania*. A zeigt einen Promastigoten, **B** zeigt einen Amastigoten; a Nucleus, b Kinetoplast, c Basalkorn, d freie Geißel, e Geißelrest.

Die prozyklischen Promastigoten, welche das teilungsfähige Stadium im Wirtsorganismus der Sandmücke darstellen, wandeln sich im Zuge des Zellzyklus in metazyklische Promastigoten um und wandern in den vorderen Verdauungstrakt der Phlebotominae, zu den Speicheldrüsen der Wirtsorganismen. Die Umwandlung von niedrig virulenten prozyklischen Promastigoten in hoch virulente metazyklische Promastigoten ist

gekennzeichnet durch spezifische molekulare Änderungen der Zelloberfläche, besondere Bedeutung wurde in diesem Zusammenhang der unterschiedlichen Struktur eines Polysaccharids, dem Lipophosphoglykan, bei prozyklischen und metazyklischen Promastigoten beigemessen (Späth et al. 2000; van Zandbergen et al. 2006).

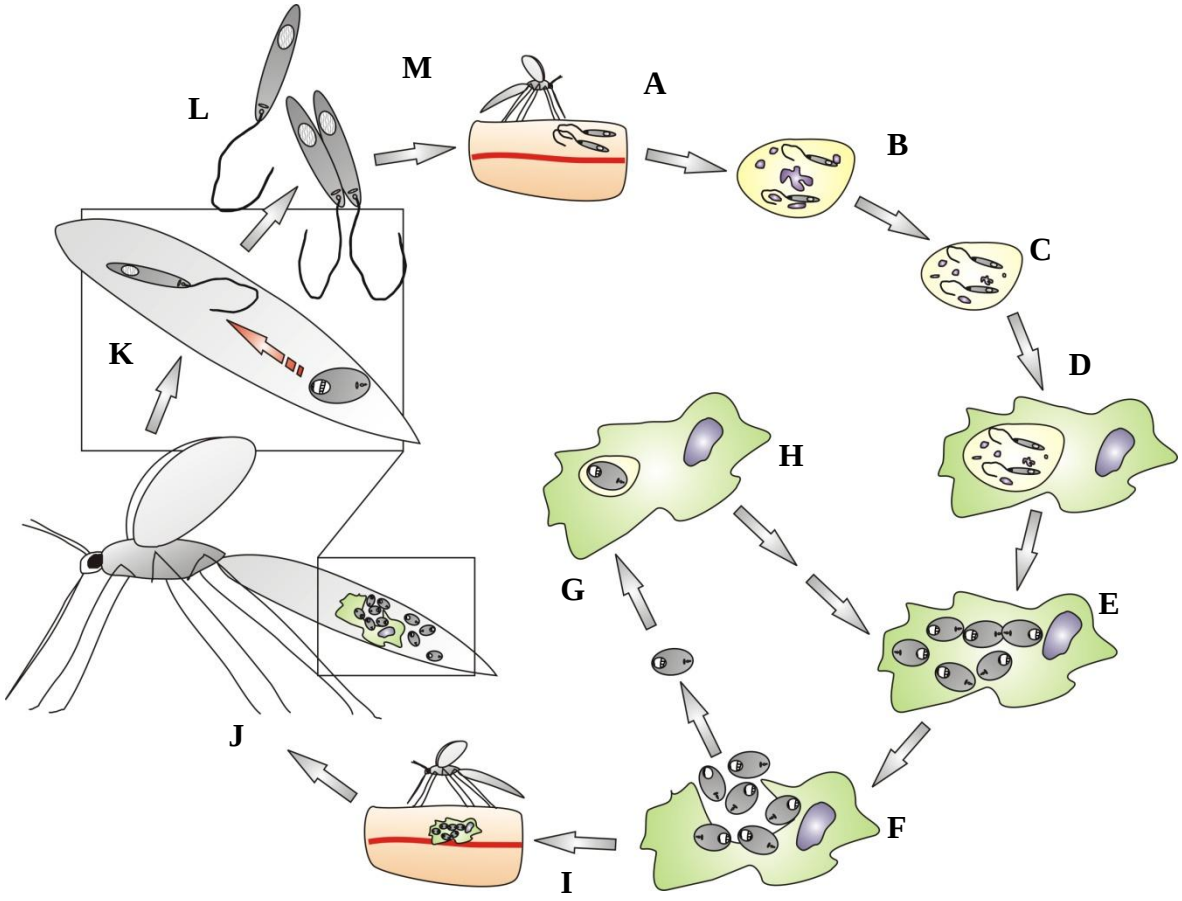

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Leishmanien. A zeigt die Transmission der virulenten metazyklischen Promastigoten sowie der apoptotischen Zellfraktion während der Blutmahlzeit einer Sandmücke an einem Säugetier (Haut und Blutbahn skizzenhaft dargestellt); **B** Aufnahme der Protozoen in Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN, gelb); **C** Apoptose der PMN; **D** Phagozytose der PMN durch Makrophagen; **E** Umwandlung der Promastigoten in Amastigoten und Proliferation; **F** Freisetzung von Amastigoten; **G** Infektion weiterer Makrophagen; **H** erneut Proliferation der Amastigoten; **I** Aufnahme der Makrophagen samt Amastigoten durch Sandmücken bei erneuter Blutaufnahme; **J** Freisetzung der Amastigoten aus den Makrophagen im Mitteldarm der Mücken; **K** Umwandlung der Amastigoten in prozyklische Promastigoten (symbolisiert durch den roten Pfeil) im Verdauungstrakt der Mücke (vergrößerter Ausschnitt in **K** markiert durch schwarzes Rechteck); **L** Proliferation der prozyklischen Promastigoten; **M** Umwandlung in metazyklische Promastigoten und Wanderung in die Speicheldrüsen der Phlebotominae. Schluss des Kreislaufes mit erneuter Blutmahlzeit und Transmission des virulenten Inokulums.

Im Verlauf der nächsten stattfindenden Blutaufnahme durch die Sandmücke gelangen nun Leishmanien, wobei sich hierunter sowohl apoptotische als auch vitale Zellen befinden, in

den zweiten Wirtsorganismus, wozu man Säugetiere und darunter auch den Menschen rechnet. Nun erfolgt die Aufnahme der apoptotischen und durch externalisierte Phospholipide charakterisierten Zellen in Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN), welche damit die ersten Wirtszellen darstellen und durch freigesetzten Leishmanien chemotaktischen Faktor (LCF) an die Stelle der Infektion gelockt werden (van Zandbergen u. Solbach 2003). Die vitalen Promastigoten nutzen die Aufnahme der apoptotischen Zellfraktion um unbemerkt ebenfalls in die Granulozyten zu gelangen, welche als intermediäre Wirtszellen fungieren (van Zandbergen et al. 2004); weitere PMNs werden durch das von den Phagozyten selbst freigesetzte Zytokin IL-8 angezogen.

Die nichtinflammatorische Immunreaktion erfährt nun ihre Fortsetzung, indem die Granulozyten ihrerseits in Apoptose gehen und von Makrophagen phagozytiert werden, wobei die lebendigen Promastigoten im Sinne einer trojanischen Pferd Strategie in die Makrophagen gelangen (van Zandbergen et al. 2004).

Im dortigen Phagolysosom mitsamt dessen sauren Milieus erfolgen Änderungen in den protozoischen Stoffwechselwegen (Rosenzweig et al. 2008; Saar et al. 1998) sowie die Umwandlung der Promastigoten in die unbegeißelten Amastigoten, welche sich in den Makrophagen (Sunderkötter et al. 1993) vermehren, diese verlassen und weitere Makrophagen infizieren. Erfolgt zu diesem Zeitpunkt erneut die Aufnahme von Blut durch eine Sandmücke, so gelangen die Amastigoten in den Makrophagen in den Gastrointestinaltrakt der Sandmücken, werden dort freigesetzt und transformieren sich nun in begeißelte Promastigoten, womit der Lebenszyklus geschlossen ist (Späth et al. 2003).

1.4. Leishmaniose – eine Zoonose beim Menschen

Wie im vorausgegangenen Abschnitt bereits erwähnt wurde, handelt es sich bei Leishmanien um protozoische Parasiten, welche auch im Rahmen einer Zoonose beim Menschen als Krankheitserreger auftreten können. Die dabei entstehende Erkrankung wird Leishmaniose genannt und tritt in drei Haupterscheinungsformen beim Menschen auf, als viszerale, kutane und mukokutane Form (Ashford 2000). Die Symptome sind je nach vorliegender Form sehr verschieden, sie reichen von selbstlimitierten Hautulcera, hervorgerufen durch *Leishmania major* und *Leishmania tropica* bis hin zu unbehandelt letal verlaufenden Organbefällen im Rahmen der durch Spezies aus dem *Leishmania donovani* Komplex verursachten viszeralen Leishmaniose, welche auch als Kala azar

bezeichnet wird und besonders häufig in Indien, Bangladesch, dem Sudan, Äthiopien und in Brasilien vorkommt (Rougeron et al. 2011; Stauch et al. 2011).

Weltweit leben etwa 350 Millionen Menschen in Gebieten, in welchen sie der potentiellen Gefahr durch die Infektion mit Leishmanien ausgesetzt sind, wobei eine jährliche Inzidenz von zwei Millionen neuen Fällen der Leishmaniose beobachtet wurde, hiervon wurden 1,5 Millionen Fälle der kutanen und etwa eine halbe Million Fälle der viszeralen Form zugeordnet (Committee on the control of Leishmaniases 2010).

Die angeborene Immunität gegen protozoische Parasiten wird durch T-Helferzellen vom Typ 1 vermittelt, wohingegen eine durch T-Helferzellen vom Typ 2 vermittelte Antwort zur Erkrankung führt (Sacks u. Sher 2002). Dies ist von besonderer Bedeutung, da in den letzten beiden Dekaden die Koinfektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und Leishmanien beobachtet wurde, dies besonders in Südeuropa (Alvar et al. 1997), und die Immunsuppression im Rahmen der Erkrankung für die klinische Apparenz und Schwere der viszeralen Leishmaniose von Bedeutung zu sein scheint (Guerin et al. 2002). Sowohl HIV als auch die Infektion mit Leishmanien modulieren die Immunantwort und führen zum Shift weg von der T_H-1 zur T_H-2 Antwort (Sinha et al. 2005).

1.5. Apoptose bei Leishmanien

Wie bereits angesprochen, können bestimmte Merkmale der Apoptose, wie sie für mehrzellige Organismen üblich sind, auch bei Leishmanien beobachtet werden. Hierzu zählen essentielle morphologische und biochemische Kriterien wie die Externalisierung von Phospholipiden, eine Caspase-ähnliche Aktivität in Verbindung mit dem Verlust des Potentials der Mitochondrienmembran sowie der Degradierung der Nukleinsäure der Leishmanien durch Endonucleasen und das Schrumpfen der Zellen im Verlauf des programmierten Zelltodes (Arnoult et al. 2002; Alzate et al. 2006; Paris et al. 2004; Sen u. Das et al. 2004; Shaha 2006; Zangger et al. 2002).

Da die aus mehrzelligen Eukaryonten bekannten molekularen Wege der Apoptose in Leishmanien abwesend sind und zwischen den einzelnen Komplexen wie *L. donovani* und *L. infantum* sowie zwischen den Stadien der Amastigoten und der Promastigoten Unterschiede, beispielsweise in der Caspase-ähnlichen Aktivität während der Stimulation

mit Antimon-Präparaten (Lee et al. 2002) auftreten, ist das Vorliegen eines Caspase unabhängigen Apoptoseweges in Leishmanien wahrscheinlich (BoseDasgupta et al. 2008).

In mehrzelligen Eukaryonten existiert eine mitochondriale Nuclease, welche während der Apoptose vom Mitochondrium zum Zellkern transloziert und dort DNA in nukleosomale Bruchstücke degradiert (Ishihara u. Shimamoto 2006; Li et al. 2001). Für verschiedene Trypanosomatidae, darunter auch *Leishmania spp.* wurde ein strukturell und funktionell sehr ähnliches Protein, eine Leishmanien Endonuclease G (EndoG), beschrieben (BoseDasgupta et al. 2008; Gannavaram et al. 2008; Rico et al. 2009). Eine Inhibition dieses Enzyms mittels Aurintricarbonsäure wurde in der Vergangenheit beschrieben (Ishihara u. Shimamoto 2006) und soll im Rahmen dieser Arbeit bei Promastigoten und Amastigoten Leishmanien in Flüssigkultur und Chemotherapeutikastimulation analysiert werden.

Der Kinetoplast spielt als Mitochondirenäquivalent der Leishmanien nicht nur im Rahmen der EndoG-Freisetzung eine Rolle im Verlauf der Apoptose, sondern auch als Entstehungsort von reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen der Zellatmung. Untersuchungen zeigten hierbei das Potential von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), bei Leishmanien der Gattung *L. donovani* den Zelltod samt der typischen apoptotischen Charakteristika zu induzieren (Das et al. 2001; Shaha 2006). In diesem Kontext ist ein Enzym von Interesse, welches im Intermembranraum der Innenseite der Kinetoplasten lokalisiert ist und dessen Überexpression eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen den oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 und die damit verbundene Apoptoseinduktion nach sich zieht, die *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase (LmAPX) (Adak u. Datta 2005; Dolai et al. 2008; Dolai et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der LmAPX eine erhöhte Stresstoleranz der protozoischen Zellen gegenüber oxidativen Einflüssen zur Folge hat und die LmAPX somit zum Schutz der Zellen vor Schäden durch ROS dient (Dolai et al. 2009). In diesem Rahmen ist anzumerken, dass Leishmanien sonstige antioxidativ wirksame Systeme wie das der Glutathion Peroxidase fehlen. Ein synthetisches Derivat von Cystein, welches den limitierenden Faktor im Glutathionhaushalt bei mehrzelligen Eukaryonten wie dem Menschen darstellt, ist N-Acetylcystein (NAC) (Aitio 2006; Zafarullah et al. 2003). Eine protektive Wirkung von NAC auf ROS induzierten Zellstress und folgende Apoptose konnte bereits bei Amastigoten der Gattung *L. donovani* gezeigt werden (Sudhandiran u.

Shaha 2003), folglich ist die Applikation von NAC im Verlauf dieser Arbeit ebenfalls von Interesse.

Im Zuge dieser Arbeit stehen zwei unterschiedliche chemische Agenzien zur Induktion der Apoptose bei Leishmanien im Fokus. Das Alkaloid Staurosporin ist seit Ende der 1970er Jahre als Inhibitor einer Vielzahl von Proteinkinasen bekannt (Nakano u. Omura 2009; Yang et al. 2012). Der exakte Mechanismus, welcher der Apoptoseinduktion durch Staurosporin zu Grunde liegt, ist bis heute als nicht gänzlich geklärt zu bezeichnen, jedoch ist bekannt, dass Staurosporin bei nichtprotozoischen Eukaryonten sowohl mittels Caspase vermittelten als auch über Caspase unabhängige Signalwege Apoptose zu induzieren scheint (Weil et al. 1996; Zhang et al. 2004).

Bei Protozoen scheint die apoptotische Wirkung dieses Alkaloids auf einer Caspase unabhängige Weise unter Miteinbeziehung des Kinetoplasten als Mitochondrienäquivalent zu beruhen, dies wurde bei Protozoen der Gattungen *Plasmodium* und *Blastocystis* beschrieben (Ch'ng et al. 2010; Yin et al. 2010).

Ein weiteres chemisches Agens ist das Chemotherapeutikum Miltefosin, das auch bei der Behandlung der Leishmaniose beim Menschen Anwendung findet. Es erlangte besonders in jüngerer Vergangenheit Bedeutung, da es gegen die üblicherweise zur first line Therapie eingesetzten Antimon-Präparate zunehmend resistente Leishmanien gab und somit Kombinationstherapien mit Miltefosin ersonnen wurden (Hadighi et al. 2006; Khademvatan et al. 2011; Richard u. Werbovetz 2010).

Die Wirkung von Miltefosin auf Leishmanien kann, analog zur Wirkung von Staurosporin, über die morphologischen Landmarken der Apoptose, wie etwa der Phospholipidexternalisation sowie der DNA Degradierung nach Stimulation, beschrieben werden. Miltefosin gehört zur Gruppe der Alkylphosphocholine, seine Apoptose induzierende Wirkung bei Leishmanien wurde in dosis- und zeitabhängiger Form beschrieben, allerdings sind die molekularen Pfade, welche den Zelltod vermitteln, nicht näher bekannt (Khademvatan et al. 2011; Paris et al. 2004; Santa-Rita et al. 2004; Verma u. Dey 2004).

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Die Mechanismen, welche bei Einzellern den morphologisch als Apoptose zu charakterisierenden programmierten Zelltod regulieren und an dessen Ablauf beteiligt sind, konnten bislang verglichen mit mehrzelligen Eukaryonten nur bruchstückhaft beschrieben werden und sind großteils unbekannt. Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Analyse bekannter und in der Detektion neuer Mechanismen im Rahmen der Apoptose bei Protozoen, wobei die folgenden Hypothesen aufgestellt wurden.

1. Mittels Stimulationen durch das Alkaloid Staurosporin und das Phospholipid Miltefosin soll sowohl bei prozyklischen Promastigoten als auch bei axenisch generierten Amastigoten bei einem möglichst konstanten Anteil der jeweiligen Population Apoptose induziert werden. Dies müsste durch die Externalisation von Phospholipiden sowie die Degradierung von DNA als zwei entscheidende Marker der Apoptose detektierbar sein, die Verifizierung beziehungsweise Falsifizierung dieses Ansatzes soll mit den Möglichkeiten der Durchflusszytometrie in Annexin- und Propidiumiodidfärbungen erfolgen.

2. Leishmanien zählen wie eingangs erwähnt zu den Kinetoplastea, der Kinetoplast ist von essentieller Bedeutung für das Überleben der Einzeller. Hierbei soll in diesem Kontext die Produktion von ROS im Fokus der Untersuchungen stehen, da diese an der Vermittlung apoptotischer Vorgänge beteiligt sein könnten. Von Interesse für diese Arbeit ist hierbei die Detektion verschiedener Arten an ROS, welche mittels differierender Affinität und Spezifität verschiedener Farbstoffe im Durchflusszytometer identifiziert werden sollen. Dieser experimentelle Ansatz ist sowohl für prozyklische Promastigoten als auch für axenisch generierte Amastigote geplant.

3. Es ist unsere hypothetische Vorstellung, dass die Inhibition von reaktiven Sauerstoffspezies mittels scavenger Molekülen wie N-Acetylcystein eine Änderung der durch die Chemotherapeutika induzierten Apoptoseraten bewirken könnte, dies gilt es sowohl an Amastigoten als auch an Promastigoten mittels FACS zu untersuchen.

4. Eine weitere Hypothese besagt, dass das Enzym *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase durch die Degradierung von ROS eine antiapoptotische Wirkung entfaltet und dass dessen Expression in Zusammenhang zur Stimulation mit den

genannten Chemotherapeutika steht. Hierzu ist die Analyse der Proteinmenge mittels Western Blot sowie die Analyse der durch die Stimulation möglicherweise modulierten transkribierten RNA Menge mittels Light Cycler geplant. Diese Untersuchungen sind vergleichend für Amastigoten und Promastigoten geplant um stadienspezifische Unterschiede aufzudecken, da in unserer Arbeitsgruppe Unterschiede in der Präsenz von ROS in den beiden Lebensformen vorbeschrieben wurden. Darüber hinaus soll die Darstellung der möglichen Enzymregulation mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgen.

5. Als weiteres bekanntes und im Rahmen der Apoptose bei Leishmanien bedeutsames Enzym rückt die Endonuclease G ins Blicklicht des nächsten Abschnittes dieser Arbeit. Eine mögliche Regulation der Enzymmenge nach Stimulation mit Staurosporin und Miltefosin soll bei Amastigoten und Promastigoten mittels Western Blot Verfahren analysiert werden. Zudem ist die Darstellung mittels Fluoreszenzmikroskopie geplant. Als weitere Fragestellung soll die Inhibition dieses Enzyms mittels Aurintricarbonsäure und deren Auswirkung auf die Apoptoserate im Durchflusszytometer überprüft werden, eine antiapoptotische Wirkung wird an dieser Stelle von uns postuliert.

6. Eine weitere Hypothese dieser Arbeit besagt, dass die Stimulation der Leishmanien mittels Staurosporin Einflüsse auf die Proteinbiosynthese und damit auf proapoptotische Mediatoren des Zelltodes und antiapoptotische Mediatoren für das Zellüberleben haben müsste. Sollte dies nicht zutreffen, müsste das Ausschalten der Proteinbiosynthese keinen Einfluss auf die Apoptoserate nach Stimulation haben. Zu diesem Zweck soll die Proteinbiosynthese der Leishmanien mittels Cyclohexamid blockiert werden um anschließend die Apoptoserate nach Staurosporin Stimulation zu vergleichen. Ergibt sich ein Unterschied, so ist die Analyse der Proteinexpression mittels Massenspektrometrie in Kooperation mit der Universität Mainz geplant. Nach Analyse der Daten sollen mögliche Mediatoren der Apoptose bei Leishmanien durch spezifische Inhibition einzelner Enzyme, welche nach biochemischer Plausibilität ausgewählt werden sollen, identifiziert werden und mittels Annexin- und Propidiumiodidfärbung die Änderungen in der Apoptoseinduktion durch Staurosporin überprüft werden. Eine Modulation der Transkription soll mittels RNA Isolation und anschließendem Light Cycler verifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialliste

2.1.1. Protozoen

Leishmania major	MHOM/ IL/ 81/FEBNI
Axenisch generierte Amastigoten und Promastigoten	

2.1.2. Agar und Kulturmedien

Alex-Amastigoten-Medium (AAM)	RPMI 1640 Medium 10 % (v/v) FCS 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin 3 mM L-Glutamin pH 5,5 eingestellt mit HCl Sterile Filtration mit 0,2 µm Spritzenaufsatzfilter
Flüssig-Medium	RPMI 199 Medium 10 % (v/v) FCS 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin 10 mM Hepes Puffer 5 ml 10 mM Adenin in 50 ml Hepes Puffer 1 ml 0,25 % Hemin in 50 % Triethanolamin 0,5 ml 0,1 % Biotin in 95 % Ethanol Bei eGFP transfizierten Stämmen zusätzlich 20 µg / ml Hygromycin

Leishmanien Medium	RPMI 1640 Medium
	5 % (v/v) FCS
	50 µM ß – Mercaptoethanol
	2 mM L-Glutamin
	10 mM Hepes Puffer
	100 U / ml Penicillin
	100 µg / ml Streptomycin
	Bei eGFP transfizierten Stämmen zusätzlich 20 µg / ml Hygromycin
Novy-Nicolle-McNeal (NNN) Agar	16.6 % (v/v) Kaninchenblut fibrinfrei
	16.6 % (v/v) 1 x PBS
	66.2 % (v/v) Brain Heart Infusion Agar
	66.2 U / ml Penicillin
	66.2 µg / ml Streptomycin

2.1.3. Chemische Agenzien und Puffer

Agarose	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Agarosegel 100 bp Leiter (0709)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Amersham™ ECL™ Detection Reagent für Western Blot	GE Healthcare Deutschland, München, Deutschland
Amersham™ ECL™ Hyperfilm™	GE Healthcare Deutschland, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Annexin V Alexa Fluor® 647	Molecular Probes, Poort Gebouw, Niederlande
Annexin V-FITC	Molecular Probes, Poort Gebouw, Niederlande
Annexin V-Fluos	Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland
Anode 1 Puffer	36,3 g Tris 200 ml Methanol ad 1000 ml A. dest.
Anode 2 Puffer	3,03 g Tris 200 ml Methanol ad 1000 ml A. dest.
Aqua destillata	Universitätsapotheke Ulm, Ulm, Deutschland
Aurintricarbonsäure (ATA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Blocking Agent (Amersham ECL^{TM})	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
Blockpuffer (5 %)	5g Blocking Agent ad 100 ml TBS-T
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Brain Heart Infusion Agar	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chlorwasserstoff (HCl)	
1M	J.T: Baker, Deventer, Niederlande
5M	Merck, Darmstadt, Deutschland
4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland

3,4-Dichloroisocoumarin (3,4-DCIC)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Dihydroethidium (DHE)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dihydrorhodamin 123 (DHR123)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (95 %)	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Färbepuffer für Fluoreszenzmikroskopie	0,3 % Triton X 100 2 % BSA ad Ringer Lösung
Fetales Kälber Serum (FCS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Gel-Färbe-Lösung für die Coomassie Blue Färbung	120 ml H_2O 40 ml Methanol ≥ 99,8 % 40 ml Roti Blue 5-fach Färbelösung; Zugabe unter ständigem Rühren
Gel-Fixations-Lösung für die Coomassie Blue Färbung	158 ml H_2O 40 ml Methanol ≥ 99,8 % 2 ml o-Phosphorsäure 85 %
Gel-Lagerungs-Lösung für die Coomassie Blue Färbung	20 g Ammoniumsulfat ad 100 ml H_2O
Gel Pilot Loading Dye (5-fach)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Gel-Trocknungs-Lösung für die Coomassie Blue Färbung	90 ml H_2O 10 ml Glycerol 99,5 %
Gel-Waschlösung für die Coomassie Blue Färbung	75 ml H_2O 25 ml Methanol ≥ 99,8 %
Glycerol 99,5 %	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H_2DCFDA)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hepes-Puffer	Biochrom, Berlin, Deutschland
Histopaque 1119	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Hygromycin	InvivoGen, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
ImProm-II Reverse Transktiption Systems	Promega GmbH Branch Office, Mannheim, Deutschland
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kathodenpuffer	5,3 g 6-Aminohexansäure 1 ml 10 % SDS 200 ml Methanol ad 1000 ml A. dest.
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Lämmlipuffer, 6-fach	7 ml Sammelgelpuffer 3,8 g Glycerin 1 g SDS

	0,93 g DTT 1,2 mg Bromphenolblau ad 10 ml A. dest.
Laufpuffer, 10-fach	30,2 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS Ad 1000 ml A. dest
LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I	Roche Diagnostics Deutschland GmbH Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
MDL 28170	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Methanol ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Normales Humanes Serum (hitzeinaktiviert)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Nucleasefreies Wasser	Promega GmbH Branch Office, Mannheim, Deutschland
o-Phosphorsäure 85 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
phosphate buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Pierce ® BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Polyacrylamid (30 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Millipore Corporation, Billerica, Vereinigte Staaten von Amerika
Ringer Lösung	Braun, Melsungen, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 / 199 Medium	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Roti® Blue (5-fach) Färbelösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotisilon® C/D	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPN800E Full-Range Rainbow Molekulargewicht Marker für Western Blot	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
Sammelgel (2 Gele)	12,2 ml A. dest. 5ml Sammelgelpuffer 2,6 ml 30 % Polyacrylamid 100 µl 10% APS 20 µl TEMED
Sammelgelpuffer	6,05 g Tris in 40 ml A. dest.

	pH 6,8 mit HCl eingestellt Zugabe von 0,4 g SDS, ad 100 ml A. dest.
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
SV Total RNA Isolation System	Promega GmbH Branch Office, Mannheim, Deutschland
Steriles Wasser	Braun, Melsungen, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Trenngel (12 %) 2 Gele	10 ml A. dest. 8 ml Trenngelpuffer (pH 8,8) 20 ml 30 % Polyacrylamid 200 µl 10 % APS 40 µl TEMED
Trenngelpuffer	91 g Tris in 300 ml A. dest. pH 8,8 eingestellt mit HCl Zugabe von 2 g SDS, ad 500 ml A. dest.
Triacsin C	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris Borat EDTA Puffer (TBE Puffer)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Tris Buffered Saline (TBS), 10-fach	88 g NaCl 12 g Tris

	680 mg NaN_3 pH 8,0 eingestellt mit HCl, ad 1000 ml A. dest.
Tris Buffered Saline mit Tween (TBS-T)	0,5 ml Tween ad 1000 ml TBS 1-fach
Triton® X 100	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Tween 20 (Polysorbat 20)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland

2.1.4. Antikörper

Primärantikörper	
Kaninchen anti rekombinantes (E. coli) Leishmania infantum Endo G (monoklonal)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. A. Jiménez-Ruiz, Universidad de Alcalá, Madrid, Spanien
Kaninchen anti *Leishmania major* APX (polyklonal)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. D. Zilberstein, Technion - Israel institute of technology, Haifa, Israel
Sekundärantikörper	
Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 488 Konjugat	Molecular Probes, Poort Gebouw, Niederlande
Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 568 Konjugat	Molecular Probes, Poort Gebouw, Niederlande
Ziege IgG anti Kaninchen HRP-konjugiert (Polyklonal)	Biocompare, Süd San Fransisco, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.5. Light Cycler Primer

Acetyl-CoA-Synthetase	ThermoFisher Scientific, Waltham,

FWD Primer: CCACATGATTACACCGATGC REV Primer: TGTAGTACCCGTCCACGTCA	Vereinigte Staaten von Amerika
Calpain-like Cysteine Peptidase FWD Primer: GTAAGCGGTTCGAGTTCCAC REV Primer: CTTGTACTCCGTCGTCAGCA	ThermoFisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Dipeptidyl Peptidase III FWD Primer: TCAACATCCAGACAGCGAAG REV Primer: GTTCTCGGTGATCTGCACAA	ThermoFisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
LmAPX FWD Primer: TGAGTGGTGCCATGTTTGTT REV Primer: CCGTCCTTCTTGAAGCAGTC	ThermoFisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
rRNA45 (Housekeeping Gene) FWD Primer: TCCCTCTCCAAACGAGAGAA REV Primer: ATTTCAGGCCTCAAGGTTCA	ThermoFisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.6. Verbrauchsgegenstände

Aluminiumfolie	Cofresco Frischhalteprodukte, Minden, Deutschland

Cellophanfolie	Melitta Zentralgesellschaft mbH & Co. KG, Minden, Deutschland
Deckgläser	
24 x 32 mm	VWR International, Darmstadt, Deutschland
24 x 50 mm	VWR International, Darmstadt, Deutschland
ELISA Platte (NUNC)	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
FACS - Röhrchen	BD labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Filterpapier für Western Blot	Millipore Corporation, Billerica, Vereinigte Staaten von Amerika
Light Cycler Kapillare 20 µl	Roche Diagnostics Deutschland GmbH Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Objektträger Cytoslide®	Shandon GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Petrischalen	
92 x 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
100 x 20 mm	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Pipetten, Multikanalpipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (gestopfte)	
Biosphere® Filter Tips (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Safe Lock Röhrchen (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Semper Care® Einmalhandschuhe	Semper Care®, Wien, Österreich
Serologische Glaspipetten, steril Stripette™ (2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Shandon Filter Cards für Cytospins	Shandon GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Spritzen (10 ml, 50 ml)	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Spritzenaufsatzfilter, 0,2 µm Membran	Pall GmbH, Dreieich, Deutschland
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatman® Papier	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflaschen 50 ml, 25 cm^2; 250 ml, 75 cm^2	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Zellkulturplatten 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich

2.1.7. Geräte und Apparaturen

Agarose Gel Guss Apparatur	Gibco-BRL, San Fransisco, Vereinigte Staaten von Amerika
AGFA Curix 60	Siemens AG, Erlangen, Deutschland
Amersham™ TE77PWR Semidry Blotter	GE Healthcare Deutschland, München,

	Deutschland
Biometra TRIO Thermoblock Heat Cycler	Biotron Limited, Sydney, Australien
Bio-Rad 543 Gel Trockner	Artisan Scientific, Champaign, Vereinigte Staaten von Amerika
CO2-Inkubatoren:	
Heraeus BBD 6220	Thermo, Dreieich, Deutschland
Thermo Forma 3010	Thermo, Dreieich, Deutschland
Durchflusszytometer	
FACSCalibur® II	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Edelstahlwannen	Renosan Chemie & Technik GmbH, München, Deutschland
Elektrophorese Kühlsystem LKB 2219 Multitemp II	LKB Bromma, Stockholm, Schweden
Elektrophorese Stromversorgung EPS 600	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Flockeneisbereiter AF80	Scottsman, Pogliano, Italien
Gefrierschränke:	
-20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
-80°C HFU586 STD-V12	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Glasflaschen	
500 ml, 1000 ml	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Light Cycler® System	Roche Diagnostics Deutschland GmbH Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland

Messbecher 1000 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Mikroskop Axio Imager M2	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Pipetten	
1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe:	
Accu-Jet® Pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetboy Acu	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetboy plus	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Rundkolben 1000 ml, 5000 ml	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Scanner Epson Expression 1600 Pro	EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch, Deutschland
Schüttelapparat GFL 3016	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sicherheitswerkbank:	
BDK UVF6 12S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Laminair® HBB 2448	Heraus GmbH, Hanau, Deutschland
MSC Advantage	Thermo, Dreieich, Deutschland
Tecan Infinite ® M200 Microplate Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Thermomixer (5436)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumierer	Caso, Berlin, Deutschland
Vortexer	
REAX 2000	Heidolph, Kelheim, Deutschland
RS1	iDL, Nidderau, Deutschland

Waagen	
AG 204	Mettler Toldeo, Giessen, Deutschland
Kern 470	Kern GmbH, Ettlingen, Deutschland
Wasserbad GFL 1008	GFL, Burgwedel, Deutschland
Western Blot Gel Guss Apparatur	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Western Blot Gelspatel – Wonder Wedge	Hoefer, Holliston, Vereinigte Staaten von Amerika
Zell-Zählkammer für Leishmanien Tiefe 0,02 mm; 0,0025 mm^2	Neubauer Improved, Marienfeld, Deutschland
Zentrifugen:	
Biofuge 3	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Cytospin 3 Zentrifuge	Shandon GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Microfuge® R	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Dreieich, Deutschland
Plattenzentrifuge Variofuge 3.OR	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifugeneinsätze, Cytoträger	Shandon GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland

2.1.8. Software:

CellQuest® Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CorelDRAW® Graphics Suite 12	COREL, Ottawa, Kanada

Gene^{DB}	Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Großbritannien
i-control™ – Microplate Reader Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ImageJ 1.44 o	National Institutes of Health, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft® Office Excel 2007	Microsoft Cooperation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft® Office Word 2007	Microsoft Cooperation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
Primer3	Duke-NUS Graduate Medical School, Singapur, Singapur
Summit V4.2®	DakoCytomation, Fort Collins, Vereinigte Staaten von Amerika

2.2. Methoden

2.2.1. Leishmanien zählen

Um die Anzahl der Leishmanien, beispielsweise in einer Flüssigkultur, zu ermitteln, wurden diese in einer speziellen Zählkammer (Neubauer Zählkammer) unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung betrachtet. Die Zählkammer hatte eine Tiefe von 0,02 mm und eine Fläche von 0,0025 mm^2, der Kammerfaktor betrug 1:50.000. Die Proben wurden im Allgemeinen zunächst im entsprechenden Medium verdünnt, wobei sich eine 1:10-fache Verdünnung als ausreichend erwies. Danach wurden 5 µl der Probe seitlich zwischen Zählkammer und Deckglas pipettiert. Anschließend wurden 16 Großfelder der Zählkammer ausgezählt (siehe Abbildung 5).

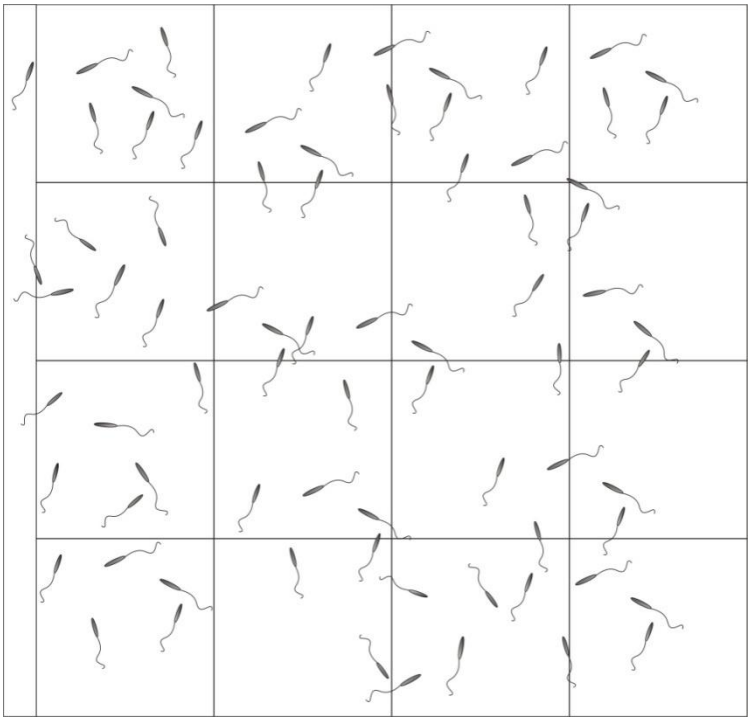

Abbildung 5: Promastigote Leishmanien in der Neubauer Zählkammer. Dargestellt sind 16 Großfelder samt zugehöriger Randspalte. Gezählt wurden alle 16 Felder samt Randspalte.

Die ermittelte Leishmanienzahl wurde mit dem Kammerfaktor von 50.000 und der vorausgegangenen Verdünnung multipliziert, im Beispiel aus Abbildung 5 ergaben sich somit

$76 \times 50.000 \times 10 = 38 \times 10^6$ [Leishmanien pro ml]

Die oben dargestellte Zählkammer fand auch bei der quantitativen Vitalitätsbestimmung von Promastigoten Leishmanien Verwendung, hierbei wurde in Experimenten mit und

ohne Stimulation der Quotient aus motilen und immotilen Protozoen bestimmt, es dienten stets 16 Großfelder als Fläche zur Auszählung.

Das Zählverfahren fand bei der Erstellung einer Wachstumskurve der *in vitro* Flüssigkulturen Anwendung, wobei die Zellzahl der Promastigoten am Tag 0 auf 1 x 10^6 je ml eingestellt wurde und danach im Abstand von jeweils 24 h die Bestimmung der Zellkonzentration je ml erfolgte. Dies erfolgte für die Promastigoten des eGFP transfizierten Stammes und des wildtype Stammes.

2.2.2. Promastigote Leishmanien in Flüssigkultur

Die Kultur von Promastigoten Leishmanien erfolgte in einem biphasischen Kultursystem, bestehend aus einer Flüssigkultur mit Leishmanien Medium (bestehend aus 500 ml RPMI + 5 ml L- Glutamin + 5 ml Penicillin / Streptomycin + 5 ml Hepes- Puffer + 1 ml 25 mM ß-Mercaptoethanol + 5 % FCS) und einer soliden Phase, welche aus schräg in 96-Well Platten gegossenem Kaninchenblutagar bestand. Der Agar wurde hergestellt aus 400 ml BHI-Agar, 100 ml sterilem PBS, 100 ml defibriniertem Kaninchenblut und 4 ml Penicillin / Streptomycin (Novy-Nicolle-McNeal Agar, NNN-Agar).

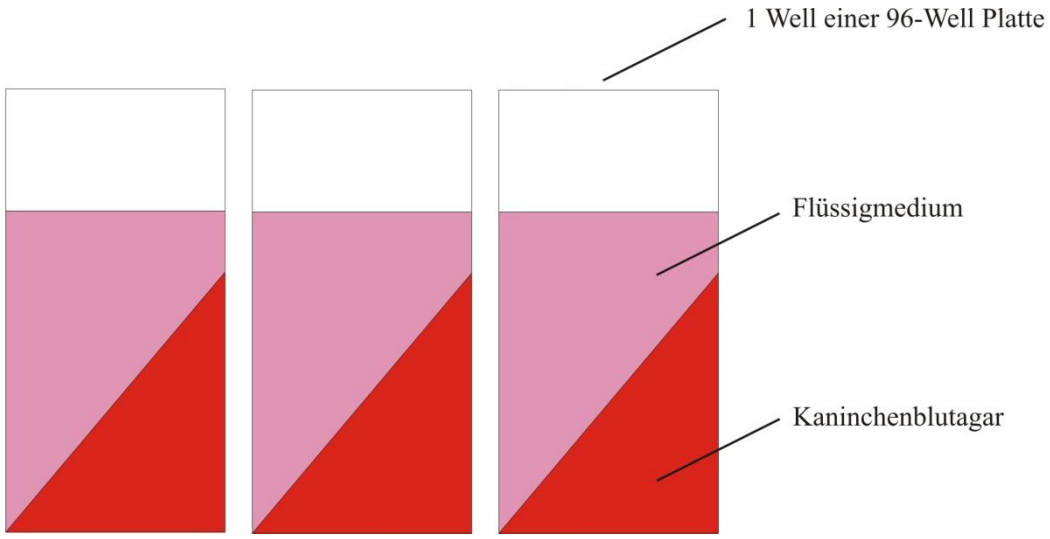

Abbildung 6: Schema der Leishmanienkultur im Flüssigmedium auf Kaninchenblutagar. Dargestellt sind drei exemplarische Wells einer 96-Well Platte. Rot dargestellt ist der NNN-Agar, welcher in Schräglage bis zum Erhärten pipettiert wurde; Rosa dargestellt ist die flüssige Phase mit 1 x 10^6 Promastigoten zu Beginn der Flüssigkultur.

In jedes Well wurden zu Tag 0 der Kultur 100.000 lebende Leishmanien eingesetzt, in einer Konzentration zu 1 x 10^6 je ml. Bei der Kultur von transfizierten Stämmen wie *Leishmania major* eGFP wurde zusätzlich 20 µg/ml Hygromycin in das Medium gegeben, was zur Aufrechterhaltung der Transfektion und Selektion diente. Nach jeweils 7 Tagen

erfolgte eine so genannte Passage der Protozoen, es wurden aus 4 Wells der eine Woche alten Kultur jeweils 100 µl entnommen, die Anzahl der Leishmanien bestimmt und anschließend auf eine Million Erreger pro ml eingestellt, nachfolgend wurden diese in eine neue Blutagarplatte pipettiert. Die Grenze für konsekutive Passagen lag bei 10, zur achten Passage wurden parallel neue Leishmanien, welche aus einem vollständigen Promastigoten-Amastigoten-Promastigoten Zyklus oder einer Passage in einer Maus stammten, in Kultur gebracht. Diese neuen Kulturen waren nach 2 Passagen, die zur Stabilisierung der Kultur dienten und mittels Wachstumskurven beobachtet wurden, ebenfalls für Versuche einsetzbar. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C und 5 % CO_2.

2.2.3. Generierung axenischer Amastigoten

Die Generierung axenischer Amastigoten erfolgte in mehreren Schritten und fand in 25 cm² großen Zellkulturflaschen statt.

Die Basis stellten prozyklische Promastigoten dar, welche sich am dritten bis vierten Tag in der logarithmischen Phase ihres Wachstums befanden. Es wurde die so genannte Präkultur hergestellt, dazu wurden die Promastigoten den weiter oben beschriebenen 96-Well Platten mit Kaninchenblutagar entnommen, für jede Präkulturflasche wurden hierbei 4 Wells benötigt, welche in einen Nähransatz, bestehend aus 500 µl FCS und 5 ml Flüssigmedium, pipettiert wurden. Die nachfolgende Inkubation in 25 cm² Kulturflaschen mit Filtereinsatz erfolgte für 4 Tage bei 27 °C und 5 % CO_2.

Die Präkultur wurde nun zur Umwandlung von Promastigoten in Amastigoten in das so genannte Amastigoten Flüssigmedium (AAM) transferiert. Dazu wurden die Promastigoten aus der Flüssigkultur in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 2400 g für 8 min bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml AAM resuspendiert, es folgte eine Zentrifugation bei 2400 g für 8 min bei RT. Das Pellet wurde in 1 ml AAM aufgenommen, die Leishmanienkonzentration bestimmt und anschließend auf einen Wert von 20 x 10^6 Leishmanien pro ml eingestellt. Jede Kulturflasche der nun hergestellten Vorkultur enthielt 5 ml mit folglich 100 x 10^6 Leishmanien. Die Inkubation erfolgte nun bei 33 °C und 5 % CO_2, die Amastigoten Leishmanien konnten nach 14 Tagen aus der Vorkultur isoliert werden, wobei 3 Tage vor der Isolierung nochmals ein ml AAM in jede Kulturflasche gegeben wurde.

2.2.3.1.Isolierung von Amastigoten

Die Ausführung dieses Protokolles stellte den finalen Schritt zur Gewinnung axenischer Amastigoter Leishmanien dar. Hierzu wurde ein Gradient aus Histopaque 1119 mit verschiedenen Anteilen AAM hergestellt, welcher die Auftrennung von Amastigoten, Promastigoten und Zelldetritus zur Aufgabe hatte. Die Schichtung erfolgte gemäß Abbildung 7, wobei die Leishmanien aus der Vorkultur geerntet und nach 8 minütiger unter Raumtemperatur stattfindender Zentrifugation bei 2400 g in der 70 % Phase der Histopaque / AAM Lösung resuspendiert und als oberste Schicht auf den Gradienten pipettiert wurden. Der vollständige Gradient wurde nun bei 2400 g für 35 min unter RT zentrifugiert, wobei die Beschleunigung und die Bremskraft der Zentrifuge auf den niedrigst möglichen Wert eingestellt waren um ein rasches Vermischen des Gradienten und eine Schädigung der Leishmanien zu verhindern.

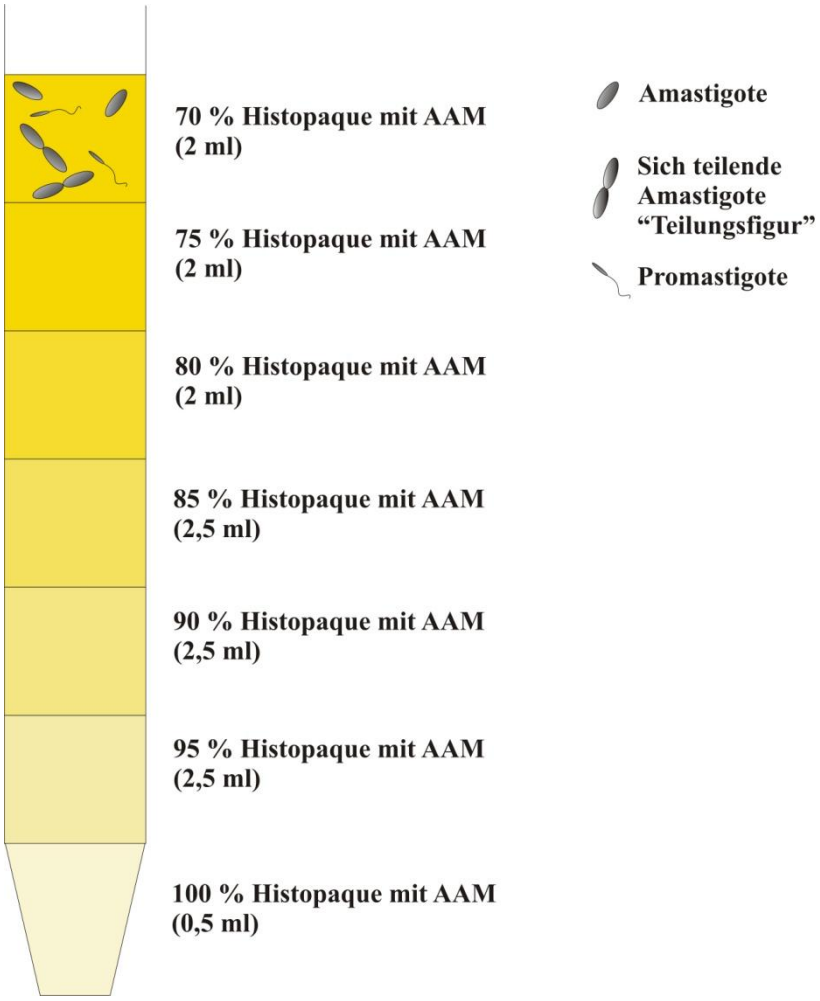

Abbildung 7: Schemazeichnung des Gradienten zur Isolierung Amastigoter Leishmanien aus einer Vorkultur. Der Gradient wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet, die farbliche Abstufung entspricht real dem abnehmenden Anteil von AAM in der Lösung mit Histopaque 1119. Schematische Zeichnung der Leishmanien erläutert in der Legende rechts. AAM steht für Alex-Amastigoten-Medium.

Nach der Zentrifugation wurden im Gradienten Banden sichtbar, welche durch voneinander getrennte Leishmanien hervorgerufen wurden. Diese Banden wurden nun mit Handpipetten vorsichtig abgenommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Aus jeder Schicht wurden 5 µl in der Neubauer Zählkammer ausgezählt und so die Zellzahl pro ml sowie die Reinheit der Amastigoten untersucht, dies geschah durch die Ermittlung eines Quotienten aus Amastigoten dividiert durch die Gesamtzellzahl bestehend aus Promastigoten und Amastigoten.

Es erfolgte die Selektion der für die Amastigotenkultur geeigneten Schichten, hierfür war neben der Amastigotenreinheit auch die Morphologie der Protozoen entscheidend, es sollten möglichst viele Teilungsfiguren, die in Abbildung 7 schematisch dargestellt sind, zu sehen sein.

Die oberste Schicht wurde bis zur ersten Bande verworfen, sie enthielt keine Amastigoten Leishmanien. Die 70 – 75 % und die 75 – 80 % Schichten enthielten ebenfalls zu viele Promastigoten und wurden verworfen. Die nachfolgenden Schichten mit Histopaque Anteilen von 80 – 85 %, 85 – 90 % und 90 – 95 % wiesen in der Regel eine Amastigotenreinheit von über 93 % auf und waren damit für die Kultur geeignet. Die Schicht mit 90 – 95 % enthielt neben Amastigoten auch Zelltrümmer und wurde somit verworfen.

Reine Schichten wurden zwei Mal mit AAM gewaschen um Reste des Histopaque zu entfernen, die Zentrifugation erfolgte bei 2400 g für 8 min bei RT.

Anschließend erfolgte die Einstellung der Konzentration der Leishmanien auf 20 x 10^6 Zellen je ml AAM, hiervon wurden 5 ml in jede 25 cm² große Kulturflasche gegeben, wobei maximal 10 Flaschen hergestellt wurden.

2.2.4. Stimulation von Leishmanien

Die Stimulation der Leishmanien erfolgte abhängig von der benötigten Menge in 96-Well, 48-Well, 12-Well oder 6-Well Platten. Dabei wurde die jeweils benötigte Menge der Protozoen im Falle der Promastigoten aus der flüssigen Phase der biphasischen Kultur aus den Blutagarplatten und bei den Amastigoten aus den Kulturflaschen geerntet und anschließend im zugehörigen Medium in die oben genannten Platten vorgelegt. Zur Analyse der Vorgänge während der Apoptose erfolgte nun die Zugabe verschiedener

Agenzien wie Enzyminhibitoren oder ROS-Scavenger, welche eine Präinkubation vor Zugabe der Chemotherapeutika erforderten, die Konzentrationen und Inkubationszeiten sind Tabelle 1 zu entnehmen. Anschließend wurden die Chemotherapeutika in gewünschter Konzentration zugegeben, die unterschiedlichen Konditionen sind ebenfalls Tabelle 1 zu entnehmen.

Nachfolgend wurden die Proben in den Brutschränken analog zu den Leishmanien-Kulturen für die benötigte Dauer inkubiert, im Regelfall betrug diese Zeit 18 Stunden.

Tabelle 1: Übersicht der in den Versuchen verwendeten Agenzien. Auf eine Präinkubation folgte die Stimulation mit Miltefosin oder Staurosporin, es wurde nicht für jedes Versuchsdesign jede Kombinationsmöglichkeit genutzt, die Tabelle dient zur Übersicht aller angesetzten Konditionen. Die Applikation von Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Negativkontrolle für die übrigen Konditionen, sofern die Agenzien in DMSO gelöst waren.

Agenz	**Konzentrationen für Inkubation auf Leishmanien**	**Inkubationszeit**
Staurosporin	5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 40 µM	3 h – 18 h
Miltefosin	25 µM	3 h – 18 h
Aurintricarboxylsäure	50 µM, 100 µM	2 h Präinkubation
N-Acetylcystein	400 µM, 800 µM, 1600 µM	2 h Präinkubation
Triacsin C	1 µM, 5 µM, 15 µM	2 h Präinkubation
MDL 28170	1 µM, 10 µM, 25 µM	2 h Präinkubation
3,4-Dichloroisocoumarin	5 µM, 20 µM, 100 µM	2 h Präinkubation
Dimethylsulfoxid	1 µM, 5 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM, 1 mM, 5 mM	18 h

2.2.5. Propidiumiodid Färbung

Diese Methode diente zur Untersuchung der DNA Menge in Zellen. Hierbei wird sich die Eigenschaft zunutze gemacht, dass sich Propidiumiodid in doppelsträngige Nucleinsäuren einlagert und dies wiederum als Signal im Durchflusszytometer sichtbar gemacht werden konnte. Nach Permeabilisierung der Zellen und Behandlung mit einer DNAse freien RNAse konnte folglich die ermittelte Fluoreszenz in Korrelation mit der vorhandenen DNA Menge entsprechend den Zellzyklusstadien (siehe Abbildung 8) gebracht wurden.

Die Färbung erfolgte dabei in folgenden Weise; 5 Millionen Leishmanien wurden bei 1500 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert (in 1,5 ml Eppendorfgefäßen), der Überstand wurde verworfen und es erfolgte ein Waschschritt mit 1-fach PBS (500 µl je Probe) bei denselben Zentrifugationseigenschaften wie zuvor. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde vorsichtig in 100 µl 1 x PBS resuspendiert, damit sich in den anschließend zugefügten 700 µl 70 % Ethanol keine Aggregate bildeten. Die Zellen verloren nun ihre Membranintegrität und wurden auf Eis für 30 Minuten inkubiert. An dieser Stelle konnte das Protokoll unterbrochen wurden, da sich die Proben in ihrem Zustand nun für eine stabile Lagerung bei -20 °C für mehrere Wochen eigneten.

Als nächster Schritt wurden die Proben in einer 5 minütigen Zentrifugation bei 2000 g unter Raumtemperatur bearbeitet, der Überstand wurde verworfen, wobei nun kein Pellet mehr am Boden des Gefäßes sichtbar wurde, sondern nur ein leichter Streifen am Rand zu sehen war. Dieser „Schleier“ wurde in 800 µl 1 x PBS mit 50 µM EDTA gewaschen, die Zentrifugation erfolgte bei 2000 g, 5 Minuten unter Raumtemperatur. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Resuspension der Proben in 400 µl der vorbereiteten Färbemischung. Diese Mischung enthielt 1 µg Propidiumiodid und 50 µg DNAse freie RNAse je ml 1 x PBS (mit 50 mM EDTA). Die nachfolgende Inkubation erfolgte nun bei 37 °C im Dunkeln für 30 Minuten.

Anschließend sollten die Proben möglichst zeitnah im Durchflusszytometer eingelesen werden, sie waren jedoch bei lichtgeschützter Lagerung und Kühlung auf 4 °C für etwa 3 Tage stabil.

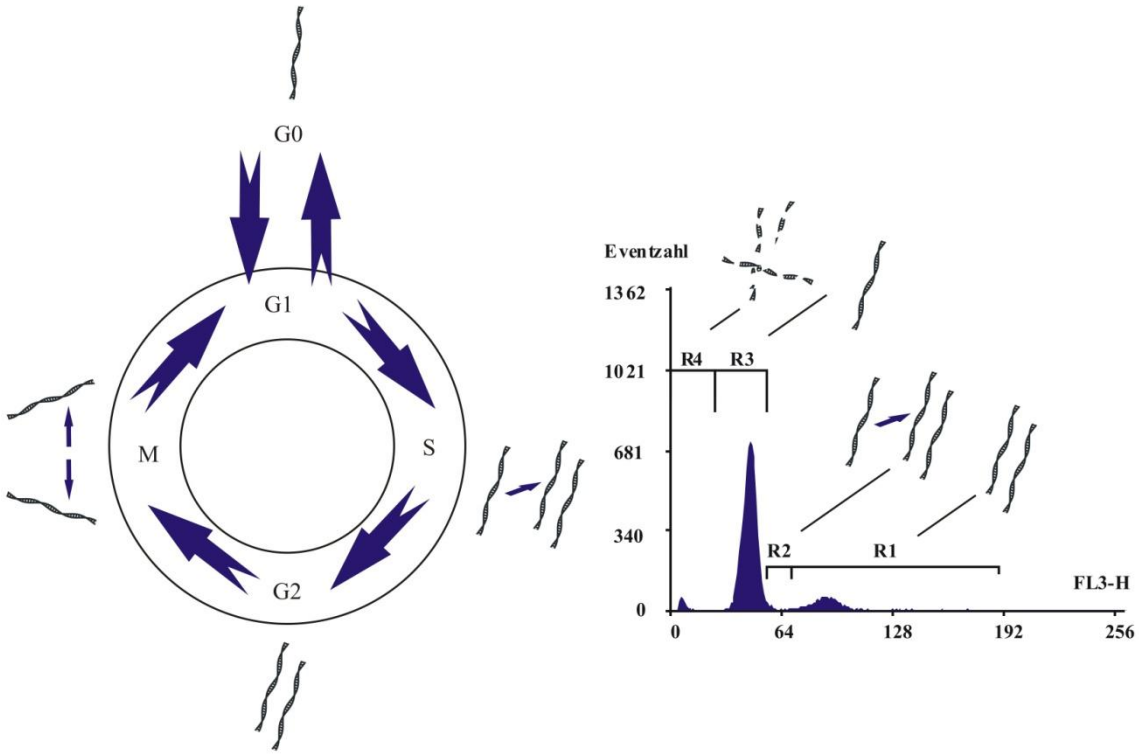

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Zellzyklus (linke Seite); exemplarische Darstellung eines FACS Histogrammes nach PI Färbung von *Leishmania major* wt Amastigoten (rechts). Schwarz dargestellt ist die DNA Menge, symbolisiert als eine Doppelhelix, eine Helix steht dabei für die einfache DNA Menge; der Maker R1 entspricht somit der verdoppelten DNA Menge wie sie in der Gap2 Phase (G2) des Zellzyklus vorliegt; R2 kann der Synthesephase (S) zugeordnet werden, welche sich zwischen Gap1 (G1) und G2 Phase befindet; R3 zeigt die einfache DNA Menge, die in der G1/G0 Phase vorhanden ist; im Bereich R4 spiegeln sich Zellen wider, welche eine fragmentierte DNA besitzen und werden folgend als subG1 Population bezeichnet. Die Abszisse zeigt die detektierte Fluoreszenz im FL3-H Kanal, die Ordinate gibt die Eventzahl wider. M steht für Mitosephase.

Die Analyse der Färbung erfolgte aus den Durchflusszytometrie Daten mit der Software Summit V4.2® von Beckman Coulter. Dabei wurde das Signal im FL3-H Kanal detektiert, die Proben wurden mit der Negativkontrolle (unbehandelte Leishmanien) verglichen und so die zugehörigen Populationen entsprechend den Zellzyklusphasen bestimmt. Dies war möglich, da das detektierte Signal mit der DNA Menge korrelierte und so eine Zuordnung zu subG1, G1/G0, S und G2 Phase möglich war (siehe Abbildung 8).

Mit Hilfe dieser Färbung wurden nun die Einflüsse der Apoptose stimulierenden Chemotherapeutika, namentlich Staurosporin (15 µM) und Miltefosin (25 µM), analysiert, indem der Anteil der hypoploiden Zellen entsprechend der subG1 Phase bestimmt wurde. Ebenfalls mittels Propidiumiodid Färbung untersucht wurde der Einfluss des Endonuclease G Inhibitors Aurintricarboxyläure, des ROS Scavengers N-Acetylcystein, des Acetyl-CoA-Synthetase Hemmers Triacsin C, des Dipeptidyl Peptidase III Inhibitors 3,4-

Dichloroisocoumarin und des Calpain-like Cystein Peptidase Inhibitors MDL28170 auf die subG1 Population.

2.2.6. Annexin Färbung für FACS-Proben

Die Färbung von Leishmanien mit Annexinfarbstoffen beruht auf der Tatsache, dass Protozoen phänotypische Änderungen zeigen, welche ähnlich derer höherer Eukaryonten sind, falls diese in Apoptose gehen. Hierzu zählt auch die Externalisierung von Phospholipiden, welche sich an der Innenseite der Plasmamembran befinden und im Zuge der Apoptose auf die Außenseite gelangen (Homburg et al. 1995; Weingärtner et al. 2012). Annexine sind Proteine eukaryonter Lebewesen, welche in Anwesenheit von Calcium an anionische Phospholipide binden können, eine Eigenschaft, die es ermöglicht, apoptotische Zellen anzufärben, indem man einen im Durchflusszytometer detektierbaren Farbstoff an das Annexin koppelt.

Die Durchführung der Färbung erfolgte in den nachfolgenden Schritten; zunächst wurden 5 x 10^6 Leishmanien gesammelt und in einer 96-Well V-Platte bei 2400 g für 8 min bei einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert, der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl Ringer Lösung resuspendiert, wobei das Calcium in der Ringer Lösung für die nachfolgende Bindung des Annexins an das Phospholipid von entscheidender Bedeutung war, dieser Schritt fungierte gleichfalls als Waschschritt, die Zentrifugation erfolgte bei 2400 g für 8 min und 4 °C, der Überstand wurde wieder verworfen. Für die Resuspension des nun farblosen Pellets benötigte man die Annexinfärbelösung, welche aus Ringer Lösung und der entsprechenden Menge des Annexin-gelabelten Farbstoffes (siehe Tabelle 2) bestand. Je Ansatz wurden 100 µl Färbelösung verwandt, die Proben wurden nun für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte mit je 400 µl Ringer Lösung um etwaige Reste des Farbstoffes zu entfernen, zentrifugiert wurde erneut bei 2400 g für 8 min und 4 °C. Abschließend wurden die Proben mit 400 µl Ringer Lösung in FACS Röhrchen überführt und konnten nun im Durchflusszytometer eingelesen wurden.

Tabelle 2: Übersicht der in der Annexin Färbung verwandten Farbstoffe. Abkürzungen: Anx steht für Annexin, FITC bedeutet Fluoresceinisothiocyanat, Fluos ist Eigenname, nm steht für Nanometer, µl gleich Mikroliter.

Name des Farbstoffes	Anregungs-wellenlänge [nm]	Emissions-wellenlänge [nm]	Hersteller	Packungsgröße
Anx V-FITC	494	518	Molecular Probes	500 µl für 100 assays
Anx V-Fluos	488	515	Roche	500 µl für 250 assays
Anx V Alexa Fluor® 647	650	665	Molecular Probes	500 µl für 100 assays

2.2.7. ROS Färbungen für FACS Analyse

Die Färbung der Leishmanien zur Detektion verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte in mehreren Schritten mit den in Tabelle 3 beschriebenen Konzentrationen der Farbstoffe.

Als erstes wurden die Leishmanien aus der Flüssigkultur geerntet und 5 x 10^6 Zellen in einer 96-Well Platte mit V-Boden bei 2400 g für 8 min und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 400 µl Ringer Lösung, dieser Schritt fungierte als Waschschritt zur Entfernung verbliebener Mediumreste, zentrifugiert wurde mit 2400 g für 8 min bei 4 °C, der Überstand wurde verworfen. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe einer Färbelösung, bestehend aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), welche keine primären und sekundären Amine enthielt, sowie der Farbstoffe entsprechend der Zielkonzentration (siehe Tabelle 3). Für jeden Ansatz wurden 100 µl Färbelösung zu den Pellets pipettiert und vorsichtig resuspendiert, die Proben wurden unverzüglich für 20 min auf Eis im Dunkeln, geschützt durch Aluminiumfolie, inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit jeweils 400 µl Ringer Lösung um die Reste der Färbelösung zu entfernen, die Zentrifugation erfolgte bei 2400 g für 8 min und 0 °C. Abschließend wurden die Proben in 100 µl Ringer Lösung resuspendiert und mit weiteren 300 µl Ringer Lösung in FACS Röhrchen überführt; nachfolgend fand die Detektion im Durchflusszytometer statt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Farbstoffe zur Detektion verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies. DHE steht für Dihydroethidium, DHR 123 steht für Dihydrorhodamin 123, H_2DCFDA steht für 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, nm ist Nanometer, µM bedeutet mikromolar.

Name des Farbstoffes	Anregungs-wellenlänge [nm]	Emissions-wellenlänge [nm]	Eingesetzte Konzentration
H_2DCFDA	492-495	517-527	1 µM
DHE	495	580	50 µM
DHR123	495	525-530	3 µM

2.2.8. Herstellung von Proben zur Fluoreszenzmikroskopie

Am Anfang der Färbung stand die Zentrifugation von 1 x 10^6 Leishmanien, deren Zellzahl zuvor in der Zählkammer bestimmt wurde, auf einen Cytoslide® Objektträger in der Cytospin Zentrifuge bei 2400 g für 8 min bei RT. Es folgte eine Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd Lösung für 30 min, lichtgeschützt bei RT; danach schloss sich ein Waschschritt mit 1 % PBS in Ringer Lösung an. Für 15 min erfolgte nun die Inkubation mit 100 µl des Färbepuffers. Nun wurde der ungelabelte Erstantikörper zugegeben, es handelte sich um Kaninchen anti LmAPX sowie um Kaninchen anti EndoG polyklonale Antikörper; diese wurden in Ringer Lösung mit einer Verdünnung von 1:500 verwandt. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C für 20 min. Es gliederte sich ein Waschschritt mit Ringer Lösung an, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Es erfolgte die Zugabe des Zweitantikörpers, entweder Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 488 konjugiert oder Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 568 konjugiert mit 1 µl der Stock-Lösung sowie zur Färbung des Nukleus 3 µl DAPI Farbstoff je Spin, alles in einem Endvolumen von 100 µl Ringer Lösung je Spin. Die Inkubation erfolgte erneut für 20 min bei 4 °C. Der nachfolgende Waschschritt mit Ringer Lösung diente der Entfernung ungebundenen Antikörpers und unspezifischer Färbekomplexe. Die Fixierung der Präparate erfolgte mittels ProLong® Gold Agenz unter einem Deckglas, welches ebenfalls fixiert wurde. Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei konstant 4 °C.

2.2.9. Quantitative Analyse von Nukleinsäuren mittels Real-Time PCR

2.2.9.1. RNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte unter Zuhilfenahme des Kits „SV Total RNA Isolation System“ von Promega. Zielsetzung dieser Methode war die Isolierung von RNA aus

Leishmanienproben, um auf Ebene der Transkription Hoch- und Herunterregulation von spezifischen Genen untersuchen zu können.

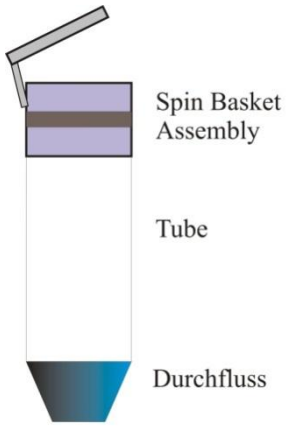

Abbildung 9: Schemazeichung der Spin Basket Assembly aus dem SV Total RNA Isolation System. Der Durchfluss wurde im Eppendorfgefäß aufgefangen.

Die Leishmanien wurden in den gewünschten Konditionen stimuliert und anschließend in Eppendorfgefäßen (1,5 ml) geerntet. Nachfolgend gliederte sich ein Waschschritt an um Reste des Flüssigkulturmediums zu entfernen, hierzu wurden die Leishmanien in kaltem PBS (4 °C) bei 2100 rpm für 8 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, nun folgte die Zugabe von 175 µl des im Kit enthaltenen Lysepuffers (versetzt mit 2% β-Mercaptoethanol), wobei die Zellen im Puffer resuspendiert wurden während die Zelllyse einsetzte. Im direkten Anschluss wurden 350 µl RNA Lösungspuffer (Bestandteil des Kits) zugegeben, um die Lyse zu verlangsamen, die Proben wurden dabei durch drei- bis viermaliges Invertieren der Tubes vermischt. Es folgte eine Erhitzung der Proben im Thermomixer bei 70 °C für 3 Minuten und anschließend eine Zentrifugation bei 12000 rpm, 10 Minuten lang bei RT. Der Überstand, der nun gleichermaßen DNA und RNA enthielt, wurde in ein neues Tube überführt, die Zugabe von 250 µl 95 % Ethanols sorgte für die Fällung der Nukleinsäuren; nachfolgend wurden die Proben in eine so genannte „Spin Basket Assembly“ transferiert (siehe Abbildung 9), in welcher eine weitere Zentrifugation bei 12000 rpm für eine Minute unter RT stattfand.

Der Durchfluss, welcher sich im Tube unter der Spin Basket Assembly sammelte, wurde verworfen. Nun wurden 600 µl der im Kit enthaltenen RNA Waschlösung zugegeben, die Zentrifugation erfolgte erneut bei 12000 rpm für eine Minute unter RT. Für jede Probe wurde nun ein DNAse Ansatz vorbereitet (mit sämtlichen Agenzien aus dem Kit), welcher 40 µl „Yellow Core Buffer“, 5 µl 0,09 M Magnesiumchloridlösung sowie 5 µl DNAse I enthielt. Es folgte das Auftragen von 50 µl der DNAse Mischung flächendeckend auf die

Membran des Körbchens, worauf sich eine 15 minütige Inkubation anschloss. Es folgte die Zugabe von 200 µl einer DNAse Stop Lösung (im Kit enthalten), danach wurde bei 12000 rpm eine Minute lang bei RT zentrifugiert. Die folgend zugegebenen 600 µl der RNA Waschlösung wurden unter denselben Bedingungen abzentrifugiert, der Durchfluss wurde erneut verworfen. Dieser Schritt wurde mit 250 µl der Waschlösung wiederholt, die Zentrifugation erfolgte bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten. Als letzter Schritt der RNA Isolierung wurde nun der Korbaufsatz auf ein neues Tube gesetzt und die nun gewonnene RNA mittels 100 µl nucleasefreien Wassers unter einminütiger Zentrifugation bei 12000 rpm unter RT in das Tube überführt.

Die RNA konnte nun entweder bei -20 °C gelagert oder direkt mittels Reverser Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben werden.

2.2.9.2. Generierung von cDNA

Die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde unter Verwendung des ImProm-II Reverse Transktiption Systems von Promega (Kat. 3800; Madison, WI, USA) durchgeführt. Aus den in der RNA Isolierung gewonnenen Proben konnte mit diesem Ansatz cDNA generiert werden, anschließend wurde eine Light-Cycler PCR durchgeführt.

Bevor die RNA in cDNA umgeschrieben werden konnte, musste die Konzentration der isolierten RNA gemessen werden. Dies konnte unter Zuhilfenahme des Tecan Infinite ® M200 Microplate Readers bewerkstelligt werden. Das Gerät maß die Absorption der Proben bei unterschiedlichen Wellenlängen (hier bei 260 nm und 280 nm) und damit die optische Dichte (OD), davon ausgehend wurde die RNA Konzentration durch die zugehörige Software (i-control microplate reader software) berechnet und in einer Excel-Datei ausgegeben. Zur Herstellung der cDNA wurde folgender Ansatz durchgeführt:

1 µl Random Primer (0,5 µg) + 50 ng RNA, aufgefüllt mit nucleasefreiem Wasser zum Endvolumen von 5 µl. Es folgte die Erhitzung auf 70 °C für 5 Minuten, danach wurden die Proben auf 4 °C für 5 Minuten abgekühlt. Nun wurden weitere Agenzien hinzugefügt, für jede Probe wurde folgende Menge benötigt:

6,5 µl nucleasefreies Wasser + 4 µl 5-fach Reaktionspuffer + 2 µl Magnesiumchloridlösung + 1 µl Denucleotide Mischung + 0,5 µl RNAsin Inhibitor + 1 µl Reverse Transkriptase

Die folgenden Schritte wurden im Biometra TRIO Thermoblock Heat Cycler durchgeführt, die Inkubation der Proben fand für 5 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 41 °C und 15 Minuten bei 72 °C statt. Anschließend wurden sie auf 4 °C gekühlt, sie konnten nun bei -20 °C aufbewahrt werden. Für die sich daran angliedernde Light Cycler Durchführung wurden 3 µl cDNA entsprechend 50 ng cDNA benötigt.

2.2.9.3. Quantitative Analyse der cDNA Proben mittels Real-Time PCR (qPCR, Light Cycler)

Die Durchführung erfolgte unter Verwendung des LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I von Roche, welches alle benötigten Agenzien und Enzyme enthielt. Das Design der Primer für die neu festgelegten Targets erfolgte mittels der online Software Primer3, nach Ausgabe der möglichen Primer durch das Programm wurden diese über die Gen Datenbank Gene^{DB} geblastet, um eine möglichst passende Sequenz für die quantitative Analyse auszuwählen.

Für die qPCR erfolgte als erstes die Vorbereitung des so genannten Master Ansatzes, für eine Probe bestand dieser aus 11 µl reinen Wassers (nukleasefrei), 2 µl des im Fokus stehenden Primermixes (forward und reverse) sowie 4 µl des Master Mixes aus dem Kit. Diese 17 µl wurden in die 20 µl Light Cycler Kapillare vorgelegt, hernach erfolgte die Zugabe von 3 µl cDNA Probe. Die Kapillaren wurden unter Eiskühlung zum Light Cycler gebracht.

Tabelle 4: Übersicht der im Light Cycler verwendeten Primer. Die Sequenzen finden sich in der Materialliste. LmAPX steht für *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase, rRNA für ribosomale Ribonukleinsäure.

Primer	Hersteller	Gelöst in
rRNA45 (Housekeeping Gen)	ThermoFisher Scientific	H_2O nucleasefrei
LmAPX	ThermoFisher Scientific	H_2O nucleasefrei
Dipeptidyl Peptidase III	ThermoFisher Scientific	H_2O nucleasefrei
Calpain-like Cysteine Peptidase	ThermoFisher Scientific	H_2O nucleasefrei
Acetyl-CoA Synthetase	ThermoFisher Scientific	H_2O nucleasefrei

Nach Ende der qPCR wurden die gewonnenen Daten in Microsoft® Office Excel® 2007 analysiert, es wurden die zu untersuchenden Enzyme in Relation zum Housekeeping Gen gesetzt und damit verglichen um eine Aussage über Hoch- und Herunterregulationen der isolierten RNA treffen zu können.

Zur Kontrolle der Light Cycler Produkte wurden diese mit einem Gel Pilot Loading Dye (5-fach) zu einem Volumen von 15 µl aufgefüllt und auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen, der Lauf erfolgte bei 131 V für eine Stunde, als Basenpaarmaßstab diente eine 100 bp Leiter. Anschließend wurde die Anfärbung des Agarosegeles mittels Ethidiumbromid durchgeführt und die Analyse der Größe der Light Cycler Produkte konnte vorgenommen werden, die Trocknung des Gels erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur.

2.2.10. Durchführung eines Westernblots

2.2.10.1. Gewinnung von Westernblot Lysaten

Um die Expression von Proteinen und deren Regulation in Leishmanien nach Applikation verschiedener Stimuli zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt. Hierbei gab es verschiedene Ansätze die Protozoen zu lysieren und die gewonnenen Proben aufzutragen, welche im Verlauf der Arbeit optimiert wurden. Zwei Verfahren haben sich hierbei als vorteilhaft herauskristallisiert.

Eine Möglichkeit bestand darin, die stimulierten Leishmanien zu ernten, hierbei wurden für ein Lysat 75 x 10^6 Promastigoten und 225 x 10^6 Amastigoten verwendet, da sich empirisch herausgestellt hatte, dass diese Zellzahl zu annähernd identischen Proteinmengen in den Lysaten führte. Nach der Zentrifugation der Leishmanien bei 2400 g für 8 min bei RT wurden diese mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Jede Probe wurde in 20 µl des 6-fach Lämmli Puffers aufgenommen und für 5 min bei 95 °C auf dem Heizblock erhitzt. Die Proben wurden nun mit sterilem Wasser zu einem Endvolumen von 120 µl, ausreichend für 2 Western Blots, aufgefüllt. Vor dem Aufbringen auf das Gel wurden die Proben bei 13000 rpm für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Zur Auftrennung der Proben diente das 12 % SDS Polyacrylamidgel. Falls die Proben nicht direkt für einen Western Blot benötigt wurden, war das Einfrieren bei -75 °C für eine spätere Verwendung möglich.

Die zweite Möglichkeit zur Herstellung der Lysate bestand in der Stimulation von 40 x 10^6 Leishmanien, welche bei 1300 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand nachfolgend verworfen wurde. Die Lyse der Zellen erfolgte in 100 µl des Western-Blot-Laufpuffers; wobei die Proben für 10 min bei 95 °C denaturiert wurden. Nachfolgend konnte die Beladung eines 10 % SDS Polyacrylamidgeles erfolgen.

2.2.10.2. Polyacrylamidgel gießen

Das Gel wurde einen Tag vor dem Gebrauch gegossen. Dabei wurde zunächst ein Gießstand zusammengebaut, der aus zwei Glasscheiben, einer Dichtungsschiene und einer Halteapparatur (jeweils für ein Gel) bestand. Die Platten wurden mit 80 % Ethanol gereinigt, danach mit Spülmittel und Aqua destillata gewaschen. Zwischen den Platten wurden Spacer in der gewünschten Stärke des zu gießenden Gels eingelegt. Der untere Rand der Glasplatten wurde im Bereich des Spacers mit Rotisilon® C/D eingefettet, um die Dichtigkeit der Apparatur zu gewährleisten. Nachfolgend wurde das Zweiphasengel gegossen, es bestand aus einer oberen Sammelgelphase, welche die Probentaschen beinhaltete und einer unteren Trenngelphase, welche zur Auftrennung der Proteine (siehe Abbildung 10) diente und später zum Blotten auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran Verwendung fand.



Abbildung 10: Darstellung des Westernblotgels. Die Proben (in blauer Farbe in den Probentaschen dargestellt) laufen in einem senkrecht zum Gel stehenden Stromfeld von oben durch das Sammel- und anschließend durch das Trenngel. Hierbei erfolgt die Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße und Gewicht.

Zunächst wurde das Trenngel (12 %) gegossen, der Ansatz für 2 Gele bestand dabei aus 10 ml Aqua destillata, 8 ml Trenngelpuffer (pH-Wert 8,8), 20 ml 30 % Polyacrylamid (PAA), 200 µl 10 % APS und 40 µl TEMED. Das Trenngel wurde mit 70 % Isopropanol überschichtet, um einen möglichst scharf begrenzten Rand des Trenngels zu erzeugen und damit später eine homogene Auftrennung der Proteine zu erreichen.

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol verworfen und das Sammelgel aufgeschichtet. Der Ansatz für 2 Gele beträgt hierbei 12,2 ml Aqua destillata, 5 ml Sammelgelpuffer, 2,6 ml 30 % PAA, 100 µl 10 % APS und 20 µl TEMED.

In das Sammelgel wurde nun zügig der Kamm eingetaucht, um die Taschen zur Auftragung der Proben zu formen. Das Gel wurde über Nacht unter Cellophanfolie bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Polymerisation zu gewährleisten.

2.2.10.3. BCA-Messung des Western Blot-Lysates

Das Lysat wurde frisch hergestellt oder alternativ aus -72 °C aufgetaut. Bevor die Auftragung auf das Gel stattfinden konnte, musste zunächst bestimmt werden, wie viel Protein sich in den Lysaten befand. Hierzu wurde das Pierce ® BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwandt.

Zunächst wurde eine Standardverdünnungsreihe hergestellt, die Reagenzien Solution A und Solution B aus dem Kit wurden im Verhältnis 50:1 gemischt (es wurden 200 µl je Standard und Probe benötigt), es entstand das so genannte Working Reagenz. Die Verdünnungsreihe für die Standardkurve des Serumalbumins ist in Abbildung 11 dargestellt.

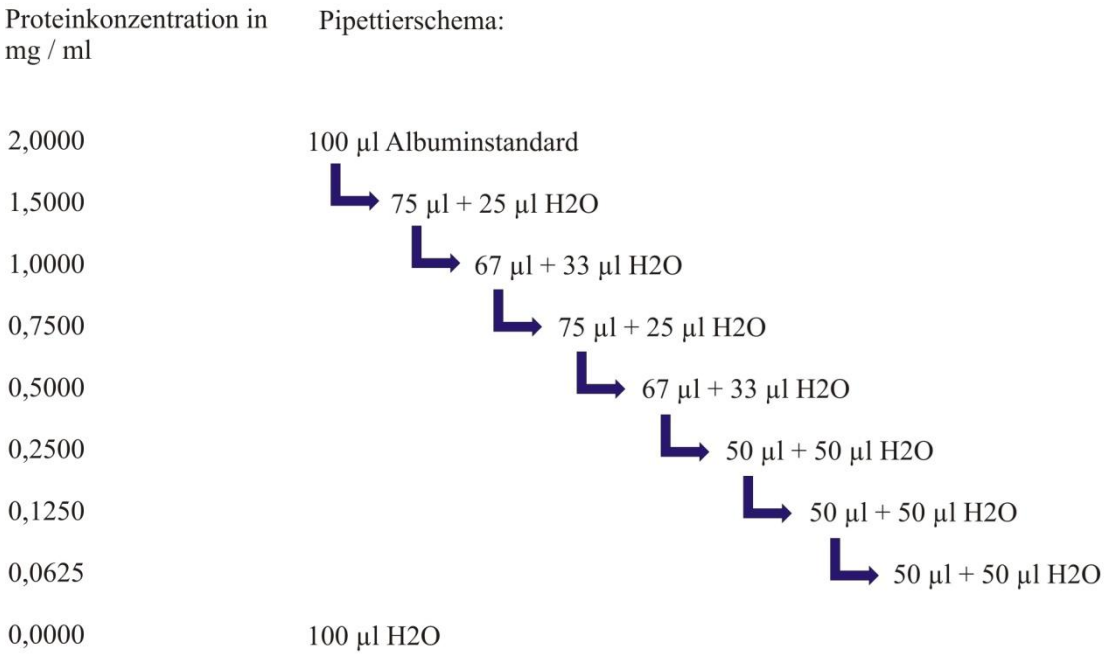

Abbildung 11: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe der BCA Messung; es wurde jeweils die mit dem blauen Pfeil markierte Menge aus der in der oben stehenden Zeile aufgeführten Stufe in die nächste darunterliegende Stufe pipettiert.

In eine ELISA Platte (NUNC) wurden je 10 µl des Standards und 200 µl des Working Reagenz pipettiert, bei den zu untersuchenden Proteinproben wurden 4 µl Probe mit 200 µl des Reagenz gemischt, wodurch sich im Vergleich zum Standard ein Faktor von 2,5 ergab, welcher später bei der Berechnung der Proteinkonzentration Berücksichtigung fand. Zur Gewährleistung einer exakten Messung wurden Doppelwerte von jeder zu untersuchenden Probe bestimmt. Nach Zusammenführung der Reagenzien wurde die Platte für 30 s auf einen Thermomixer gestellt, wodurch sich die Proben gleichmäßig durchmischten. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation im Dunkeln bei 37 °C. Der resultierende Farbumschlag war proportional zur Proteinkonzentration der Proben. Mittels Excel® Auswertung konnte nun die Standardreihe zur Bestimmung der Proteinmenge in den Proben verwandt werden; die Proben wurden dabei im TECAN Infinite M200 Microplate Reader eingelesen und als Excel® Datei ausgegeben. Beispiel für erhaltene Messwerte:

Tabelle 5: BCA Messung bei *Leishmania major* wt Promastigoten d3. Probe 1 = Mediumkontrolle; Probe 2 = 15 µM Staurosporin Stimulation; Probe 3 = 25 µM Miltefosin Stimulation.

	Probe 1 [ng/µl]	**Probe 2 [ng/µl]**	**Probe 3 [ng/µl]**
Messwert 1	2315,7	1768,7	1323,3
Messwert 2	2328,9	1819,8	1328,9
Proteinkonzentration	**2322,3**	**1794,3**	**1326,1**

Pro Geltasche konnten später maximal 50 µl Probe plus 10 µl Laufpuffer aufgetragen werden. Im Beispiel ergaben sich demzufolge für die mit Miltefosin stimulierten Proben maximal 1326 ng/µl x 50 µl = 66300 ng = 66,3 µg je Tasche. Im Idealfall sollten die Taschen mit 50 µg je Tasche geladen werden, was in diesem Fall also möglich war.

Es wurde nun die gewünschte Proteinmenge aus der Probe mit sterilem Wasser aufgefüllt (zusammen 50 µl). Zu jeder dieser Proben wurde 10 µl 6 x Lämmli-Puffer (Laufpuffer) gegeben und anschließend für eine Dauer von 5 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min unter Raumtemperatur.

Nun konnte der Überstand für die Gelelektrophorese verwandt werden.

2.2.10.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen durch eine SDS-PAGE erfolgte nach der Molekülgröße, entscheidend für die Trennung der Proteine war die Porengröße des Polyacrylamidgeles, welche wiederum vom Verhältnis des Polyacrylamids zum Methylenbisacrylamid bestimmt wurde.

Es wurde wie folgt verfahren; der Überstand der Proben (nach dem letzten Schritt aus Abschnitt II) wurde nun in die Kammern des Gels pipettiert (mit Transferpipetten), für jede Kammer standen 60 µl Gesamtvolumen zur Verfügung. Die Glasplatten, zwischen denen sich das Gel samt Proben befand, wurden nun aus der Gießhalterung genommen und in die Elektrodenhalterung geklemmt.
In das Elektrophoresemodul wurden 4,5 l 1 x Laufpuffer gegeben, die Elektrodenhalterung samt Glasplatten wurde hierin eingetaucht.
In die Halterung wurden darauf folgend 500 ml des 1 x Laufpuffers gegeben. Es erfolgte nun der Anschluss der Elektroden und die Einstellung des Netzgerätes.
Für 30 min wurde eine Leistung von 12 Watt je Gel eingestellt. In diesem Zeitraum sammelten sich die Proben im oberen Teil des Geles, dem Sammelgel.
Anschließend konnte die Leistung bis zum Laufende auf 24 Watt pro Gel erhöht wurden, es erfolgte die Auftrennung der Proben im Trenngel.

2.2.10.5. Western Blot

Für den Western Blot wurden je Gel 18 Blatt Filterpapier und eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran mit den Abmessungen 12 x 14,5 cm benötigt. In verschiedenen Edelstahlwannen wurden nun die benötigten Puffer (Anode 1 -, Anode 2- und Kathodenpuffer) eingefüllt. Nach dem Laufende wurde die Gelkammer aus der Elektrophoresekammer entnommen, der Laufpuffer wurde verworfen. Die Glasplatten mussten mit einem Spatel getrennt werden, das Gel wurde direkt in den Anode 2 Puffer transferiert, um ein Austrocknen zu verhindern.

Es folgte die Tränkung von Papier und Gel mit den in Tabelle 6 aufgeführten Inkubationszeiten in den genannten Puffern, nachfolgend wurden Schichten erstellt, wie es in Abbildung 12 veranschaulicht ist.

Tabelle 6: Schema für die Vorbereitung von Gel und Filterpapier zum Blotting. Die PVDF Membran wurde vor der Inkubation im Anode 2 Puffer kurz in Methanol befeuchtet; - keine Inkubation in dieser Konstellation. PVDF steht für Polyvinylidenfluorid.

Puffer	Filterpapier	Gel	PVDF Membran
Anode 1	6 Blatt für 2 min	-	-
Anode 2	3 Blatt für 2min	5 min	5 min
Kathode	9 Blatt für 2 min	-	-

Nach dem Schließen des Blottransfersystems wurden die Einstellungen vorgenommen, die Stromstärke betrug dabei 0,8 mA/cm^2, bei der vorliegenden Fläche entsprechend 139 mA, wobei die Laufzeit 120 min betrug.

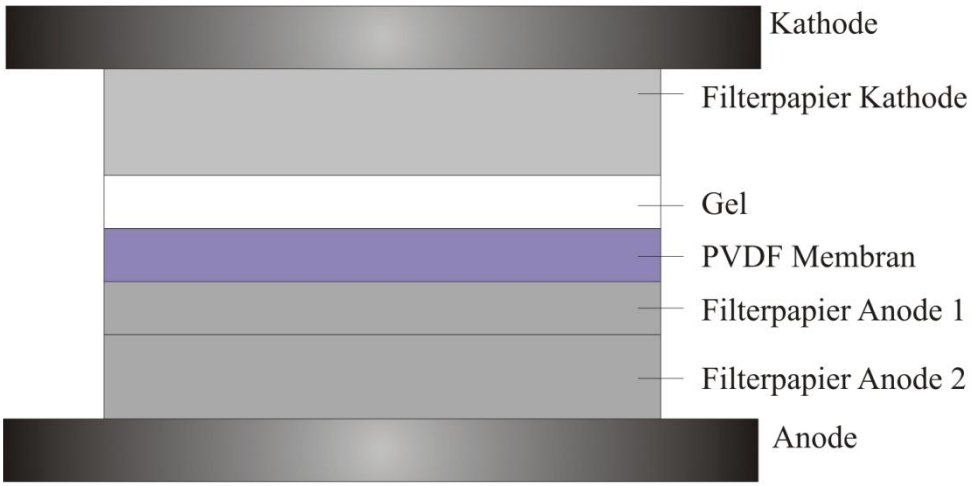

Abbildung 12: Schichtenfolge beim Blotten des Polyacrylamidgels auf die PVDF Membran. Oben im Blotter: Kathode, unten: Anode; hellgrau: Filterpapier getränkt im genannten Puffer. PVDF steht für Polyvinylidenfluorid.

Nach Ende des Blottingvorganges wurde das Gerät ausgeschaltet, das Gel anschließend zur Coomassie-Blue Färbung vorbereitet (s. unten) und die Membran in 5 % Membran Blocking Agent (in TBS-T) für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschritt, nach kurzem Abspülen der Membran wurde diese für 10 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit einer Schüttelfrequenz von 1 Hz gewaschen um Reste des Blocking Agents zu entfernen.

Der Primärantikörper wurde in 1-fach TBS-T angesetzt, siehe hierzu auch Tabelle 7, wobei auf die genannte Fläche von 174 cm^2 10 ml der Antikörperlösung aufgetragen wurden. Um eine gleichmäßige Verteilung der Lösung zu gewährleisten und ein Austrocken gleichzeitig zu verhindern, wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und auf einem Schüttler für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Teilweise erfolgte diese Inkubation auch über Nacht, in einem solchen Falle jedoch gekühlt bei 4°C und ebenfalls unter Bewegung auf einem Schüttler. Zur Entfernung der Erstantikörperlösung wurde die Membran erneut mit TBS-T (1-fach) abgespült und auf dem Schüttler 20 min lang in TBS-T (1-fach) gewaschen. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in 1-fach TBS-T angesetzt, vergleiche hierzu Tabelle 7, und mitsamt der Membran in Folie eingeschweißt. Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde.

Die Membran wurde danach mit TBS-T (1-fach) abgespült und 20 min auf dem Schüttler mit TBS-T (1-fach) gewaschen. Zur Entwicklung des Blots erfolgte nun die Versiegelung in dünner Folie, wobei eine Seite der Folientasche offen blieb, hier wurde das Amersham Western Blot Detection Reagenz, welches das Substrat für die an den Zweitantikörper

gekoppelte Horseradish Peroxidase (HRP) darstellte, auf die Membran gegeben und dort für die Dauer von einer Minute belassen, es bedurfte hierzu 0,125 ml/cm² Membranfläche. Nachfolgend wurde das Amersham Detection Reagenz gründlich abgestrichen und die letzte Seite der Folientasche vollständig verschweißt.

Tabelle 7: Übersicht der verwandten Erstantikörper zur Inkubation auf PVDF Membranen. Endo G für Endonuclease G; goat englisch für Ziege; HRP englisch Horseradish Peroxidase für Meerrettichperoxidase; LmAPX für *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase; Rb englisch rabbit für Kaninchen; RT Raumtemperatur; TBS-T für Tris gepufferte Salzlösung mit Tween.

Primärantikörper	**Gelöst in**	**Inkubationszeit**
Rb anti Endo G	1:100 in TBS-T (1-fach)	2 h bei RT
Rb anti LmAPX	1:2000 in TBS-T (1-fach)	2 h bei RT
Sekundärantikörper	**Gelöst in**	**Inkubationszeit**
Goat IgG anti Rb HRP	1:4000 in TBS-T (1-fach)	1 h bei RT

In der Dunkelkammer der Zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm wurde im direkten Anschluss an die oben genannten Schritte der ECL™ Hyperfilm™ auf die PVDF Membran gelegt. Die Belichtungsdauer des Filmes wurde variiert, eine Kurzbelichtung in einer Dauer zwischen einer und fünf Minuten diente zur Orientierung und Festlegung der nachfolgenden Belichtungszeiten, welche zwischen zwei Stunden und 12 Stunden betrugen. Die Entwicklung erfolgte im AGFA Curix 60 in der Dunkelkammer.

2.2.10.6. Coomassie Färbung

Um die gleichmäßige Beladung des Blots mit Protein zu überprüfen und eine quantifizierende Analyse durchführen zu können, wurde das Polyacrylamidgel nach Ende des Blots unter Befolgung des Coomassie Färbe Protokolls mit Roti®-Blue bearbeitet. Das Protokoll wurde in Edelstahlwannen durchgeführt.

Das Polyacrylamidgel wurde direkt nach der PAGE in 200 ml der Gel-Fixations-Lösung transferiert und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt war auch gekühlt bei 4 °C über Nacht möglich. Anschließend wurde das Gel in 200 ml Roti®-Blue Färbelösung umgebettet und unter Rütteln für 2 – 15 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Unerwünschte Farbkomplexe wurden durch 5 minütiges Waschen mit 100 ml der Coomassie Waschlösung entfernt.

An dieser Stelle konnte das Gel entweder getrocknet und damit dauerhaft fixiert oder in einer Storage Solution gelagert werden.

Das Trocknen des Gels erfolgte im Bio-Rad 543 Geltrockner in den folgenden Schritten. Das Gel und zwei Cellophanfolien wurden für 30 min unter Schütteln in die Trockenlösung getaucht. War zuvor eine Lagerung in der Storage Solution erfolgt, so musste die Trockenlösung nach 15 min ausgetauscht werden

Das Gel wurde in der Trockenkammer des Bio-Rad 543 Geltrockners zwischen den beiden Cellophanfolien platziert und diese wiederum zwischen zwei Whatman®-Papiere gelegt. Die Schichtung erfolgte im Geltrockner auf einer einliegenden Trockenmatte.

Das Gel wurde unter Erzeugung eines Vakuums für 120 min bei 80 °C getrocknet und konnte anschließend archiviert und am PC eingescannt wurden.

2.2.11. Anmerkungen zu Software und Statistik

Die Auswertungen der FACS Versuche erfolgte mittels der Software Summit® von DakoCytomation, die daraus gewonnenen Daten wurden in Microsoft® Office Excel® 2007 analysiert. Für sämtliche Abbildungen wurde die Standardabweichung und nach Überprüfung der Normverteilung der Daten der Standardfehler (SEM) bestimmt. Die Hypothesentestung auf Signifikanz erfolgte mit dem studentischen t-Test, der Test wurde für die Schaubilder mit der Seitenlänge 2 durchgeführt, es wurde eine homoskedastische Verteilung der Werte angenommen. Ergebnisse des t-Tests mit $p > 0,05$ wurden als nicht signifikant, mit $p < 0,05$ als signifikant (Symbol *), mit $p < 0,01$ als sehr signifikant (Symbol **) und mit $p < 0,001$ als hoch signifikant (Symbol ***) festgelegt.

Die Densitometrie der Western Blots erfolgte mittels ImageJ 1.44o. Die Intensität der Banden wurde auf Basis des Coomassie gefärbten Gels, welches als Ladungskontrolle diente, fehlerkorrigiert, dies geschah wiederum in Microsoft® Office Excel® 2007.

Die Primer für die qPCR wurden unter Verwendung des online Programmes Primer 3 v0.4.0 erstellt.

3. Ergebnisteil

3.1. Wachstumsverhalten

Um in den nachfolgenden Versuchen die Charakteristika der Apoptose bei Leishmanien näher zu untersuchen, mussten Protozoen generiert werden, welche sich stets in denselben Phasen ihres Lebenszyklus befanden und damit eine Wiederholbarkeit der Versuche gewährleisteten. Es erfolgte die Zählung der in biphasischer Flüssigkultur generierten Leishmanien mittels Durchlichtmikroskopie und Neubauer Zählkammer im Abstand von jeweils 24 h. Die Werte für die Anzahl der Leishmanien je ml Medium ergaben nach Auftragung gegen die Zeit die in Abbildung 13 dargestellten Wachstumskurven für die Stämme *Leishmania major* wildtype und für *Leishmania major* eGFP transfiziert. Als Ergebnis zeigte sich für die beiden Stämme ein signifikant unterschiedliches Wachstum, wobei der wildtype Stamm bis zum siebten Tag mehr Leishmanien pro ml aufwies. Das Maximum der Zellzahl pro ml wurde gleichfalls am siebten Tag erreicht, bei *Leishmania major* wildtype waren dies 284,0 x 10^6 ± 5,9 x 10^6 Zellen pro ml, bei *Leishmania major* eGFP ergaben sich 202,0 x 10^6 ± 4,7 x 10^6 Protozoen je ml.

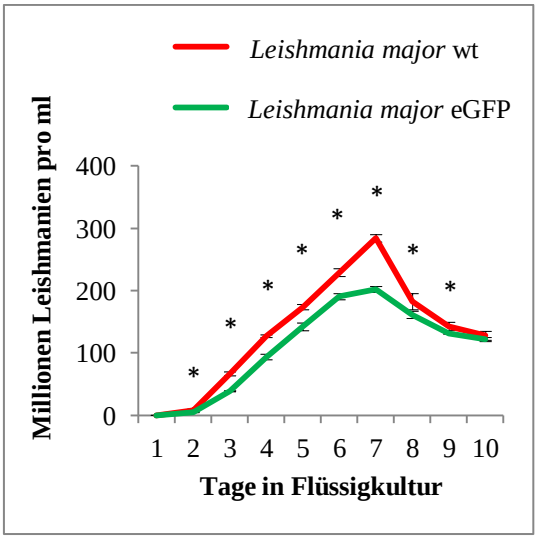

Abbildung 13: Wachstumskurve von Promastigoten Leishmanien. Zur Analyse des Wachstumsverhaltens erfolgte die Kultur Promastigoter Leishmanien in biphasischer Flüssigkultur. Die Entnahme und Zählung erfolgte jeweils nach 24 h, dargestellt ist die Wachstumskurve für *Leishmania major* wildtype (■) und für *Leishmania major* eGFP (■). Die Auszählung erfolgte in einer Neubauer Zählkammer über einen Zeitraum von 10 Tagen. Dargestellt ist der Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler, * signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) beim Vergleich der beiden Zellkulturen. eGFP steht für enhanced green fluorescent protein, wt bedeutet wildtype.

Zu Beginn der Kurve, in den ersten drei Tagen, zeigten die Populationen ein näherungsweise exponentielles Wachstum, entsprechend der log-Phase ihrer

Populationskinetik. Nachfolgend nimmt die Steilheit der Wachstumskurve ab, die Wachstumsgeschwindigkeit verringert sich.

Die aus drei unabhängigen Versuchen gewonnenen Daten zeigten die in Abbildung 13 dargestellte Wachstumskinetik für unabhängig gewonnene Zellkulturen mit geringen Standardfehlern, womit eine Vergleichbarkeit des Wachstums von Leishmanien unterschiedlicher Kulturpassagen zu einem bestimmten Zeitpunkt für nachfolgende Versuche gegeben war. Ob der *in vitro* beobachtete Rückgang der Zellzahl nach dem siebten Tag der Zellkultur durch das Absterben eines Teils der Leishmanien Population bedingt sein könnte, ist die Fragestellung der nächsten Versuchsreihe. Um dies zu überprüfen, wurden nachfolgend charakteristische Merkmale der Apoptose in der Zellkultur untersucht.

3.2. Apoptoserate in der Zellkultur

Für den *in vitro* beobachteten Rückgang der Zellzahl in der biphasischen Flüssigkultur wurde an dieser Stelle die Apoptose als Typus des programmierten Zelltodes postuliert. Zur Verifizierung dieser These erfolgte zunächst die Anfärbung der Protozoen mit Annexin V Farbstoff, um die Externalisierung negativ geladener Phospholipide im Frühstadium der Apoptose zu analysieren.

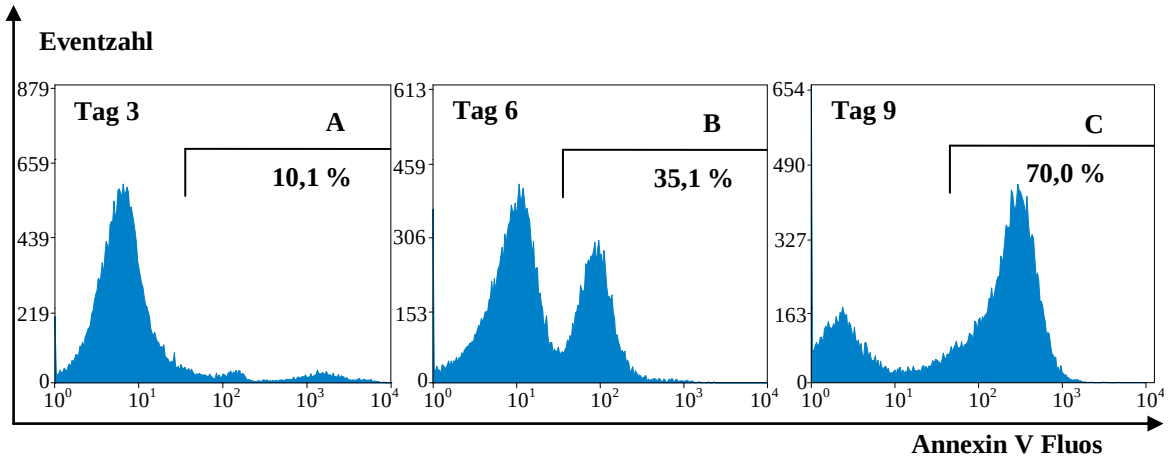

Abbildung 14: Annexin V Färbung von Promastigoten. Promastigote *Leishmania major* wildtype aus biphasischer Flüssigkultur wurden mit Annexin V Fluos gefärbt, die Detektion erfolgte im FACS. Dargestellt sind repräsentative FACS Histogramme aus drei unabhängigen Experimenten, wobei Abbildungsteil **A** die Population an Tag 3, **B** an Tag 6 und **C** an Tag 9 zeigt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil Annexin V positiver Protozoen in Bezug auf die Gesamtpopulation, dieser wird durch die schwarzen Rahmen (┌ ┐) verdeutlicht.

Die erste Untersuchung fokussierte sich dabei auf die Überprüfung der Phospholipid Externalisation als frühes Zeichen der Apoptose, zunächst bei Promastigoten Leishmanien. Eine Subpopulation der Promastigoten zeigte sich im FACS positiv für Anx5 Färbung (Abbildung 14). Der Anteil der Annexin bindenden Zellen belief sich im repräsentativ ausgesuchten Beispiel nach drei Tagen auf 10,1 % der Gesamtpopulation, nach sechs Tagen auf 35,1 % sowie nach neun Tagen auf 70,0 % der gesamten Zellen. Damit zeigte im zeitlichen Verlauf ein größer werdender Anteil der *Leishmania major* Population ein Merkmal apoptotischer Zellen. Die nächste Versuchsreihe befasste sich nun mit der Möglichkeit, im experimentellen Setting Apoptose bei Protozoen via Stimulation zu induzieren.

3.3. Apoptoseinduktion bei Promastigoten und Amastigoten Leishmanien

Der nächste Schritt in dieser Arbeit bestand damit in der chemischen Stimulation von Promastigoten und Amastigoten Leishmanien mit dem Ziel der Induktion von charakteristischen morphologischen Merkmalen der Apoptose. Die Datenerhebung fokussierte sich hierbei als erstes auf den Nachweis von externalisiertem PL mit der Anfärbung durch Anx5 Farbstoffe. Abbildung 15 zeigt die Apoptoseinduktion bei 3 Tage alten Promastigoten. Nach der Inkubation betrug der Anteil der AnxV positiven Subpopulation im Fall von Staurosporin 27,0 %.

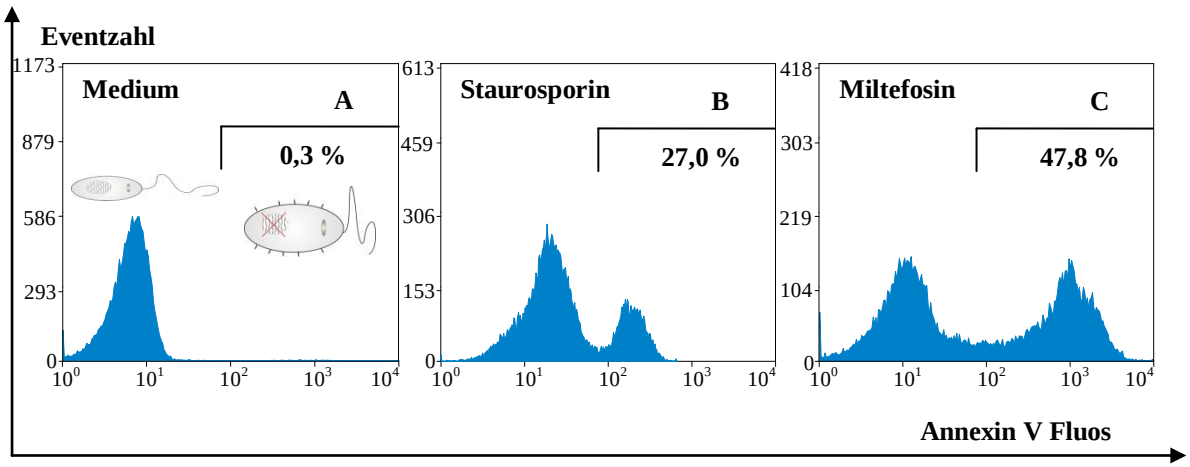

Abbildung 15: Apoptose bei stimulierten Promastigoten. 3 Tage alte Promastigote *Leishmania major* wildtype wurden mit Stimulanzien 18 h behandelt und nachfolgend mit Annexin V Fluos gefärbt, die Detektion erfolgte im FACS. Dargestellt sind drei repräsentative Histogramme aus unabhängigen Versuchen (n = 3), wobei Abbildungsteil **A** die Mediumkontrolle prozyklischer Promastigoter an Tag 3 der Flüssigkultur, **B** die Stimulation der Promastigoten mit Staurosporin und **C** die Stimulation der Promastigoten mit Miltefosin zeigt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil Annexin V positiver Protozoen in Bezug auf die Gesamtpopulation, dieser wird durch die schwarzen Rahmen (┌──┐) verdeutlicht. A zeigt die schematische Darstellung einer vitalen begeißelten Promastigoten (links) sowie einer apoptotischen, leicht abgerundeten Promastigoten (rechts), wobei die strichförmigen Markierungen auf der Membran das präsentierte Phospholipid darstellen.

Nach Stimulation mit Miltefosin lag der Wert der AnxV positiven Zellen bei 47,8 %, in der Mediumkontrolle lag der Wert der Phospholipid externalisierenden Zellen bei 0,3 %.

Derselbe Ansatz wurde für axenisch generierte Amastigoten durchgeführt und ist in Abbildung 16 dargestellt. In der Mediumkontrolle lag der Wert AnxV positiver Amastigoten bei 9,1 %. Nach Stimulation mit Staurosporin stieg die Subpopulation der PL positiven Zellen auf 35,8 % der Gesamtpopulation. Die Stimulation mit Miltefosin zeigte bei den axenisch generierten Amastigoten eine AnxV Positivität von 19,1 % der Zellen in der Flüssigkultur.

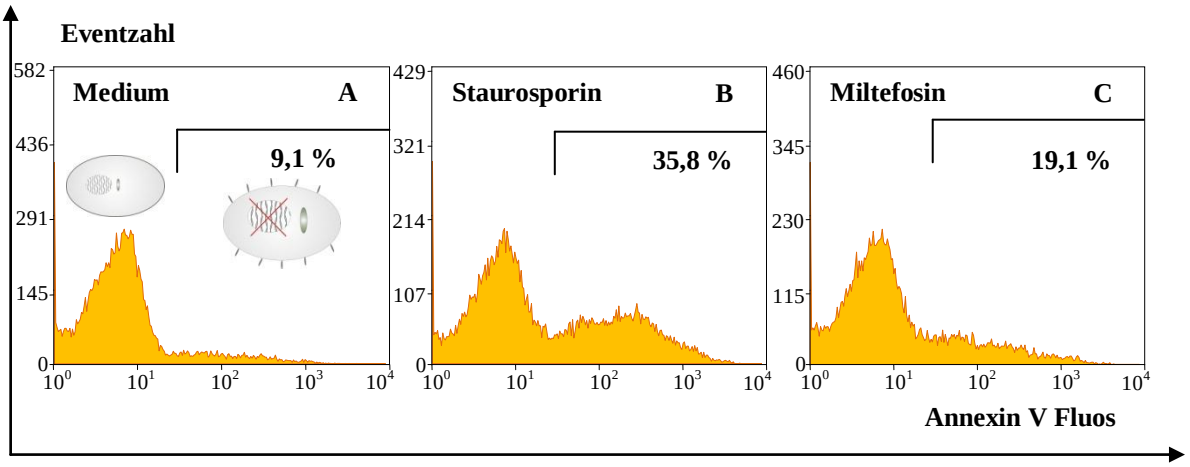

Abbildung 16: Apoptose bei stimulierten Amastigoten. Frisch isolierte Amastigoten *Leishmania major* wildtype wurden mit Stimulanzien 18 h behandelt und nachfolgend mit Annexin V Fluos gefärbt, die Detektion erfolgte im FACS. Dargestellt sind drei repräsentative Histogramme aus unabhängigen Versuchen (n = 3), wobei Abbildungsteil **A** die Mediumkontrolle Amastigoter an Tag 3 der Flüssigkultur, **B** die Stimulation der Protozoen mit Staurosporin und **C** die Stimulation der Leishmanien mit Miltefosin zeigt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil Annexin V positiver Protozoen in Bezug auf die Gesamtpopulation, dieser wird durch die schwarzen Rahmen (┌──┐) verdeutlicht. A zeigt die schematische Darstellung einer vitalen Amastigoten (links) sowie einer apoptotischen, leicht abgerundeten Amastigoten (rechts), wobei die strichförmigen Markierungen auf der Membran das präsentierte Phospholipid darstellen.

Somit zeigten sowohl drei Tage alte Promastigoten als auch frisch via Gradient isolierte Amastigoten einen deutlichen Anstieg der Annexin bindenden Subpopulation im Fall der Staurosporin Stimulation (Abbildungen 15 B und 16 B) und ebenfalls nach Miltefosin Stimulation (Abbildungen 15 C und 16 C). Neben der Externalisierung von PL sollten nun weitere Merkmale der Apoptose, hierunter die Degradierung von DNA, nach Stimulation der Protozoen mit Staurosporin und Miltefosin, analysiert werden.

3.4. Analyse der Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid Färbung

Neben den bereits beschriebenen Erkenntnissen zur Externalisierung von PL unter dem Einfluss von Staurosporin und Miltefosin sollte in diesem Teil der Arbeit die Auswirkung der Stimulanzien auf den DNA Gehalt der Protozoen und damit ein zweites Charakteristikum im Ablauf apoptotischer Prozesse analysiert werden. Grundlage ist die Hypothese, dass bei Promastigoten und Amastigoten mit Staurosporin und Miltefosin eine Degradierung der DNA nach Stimulation nachgewiesen werden kann. Zur Prüfung dieser Aussage wurden drei Tage alte Promastigoten und frisch isolierte Amastigoten 18 h mit Staurosporin und Miltefosin stimuliert und anschließend mit Propidiumiodid gefärbt. Die Analyse der vorhandenen DNA Menge erfolgte nachfolgend im FACS.

Die erhobenen Daten aus dem FACS sind für prozyklische Promastigoten aus Tag drei der Flüssigkultur in Abbildung 17 dargestellt.

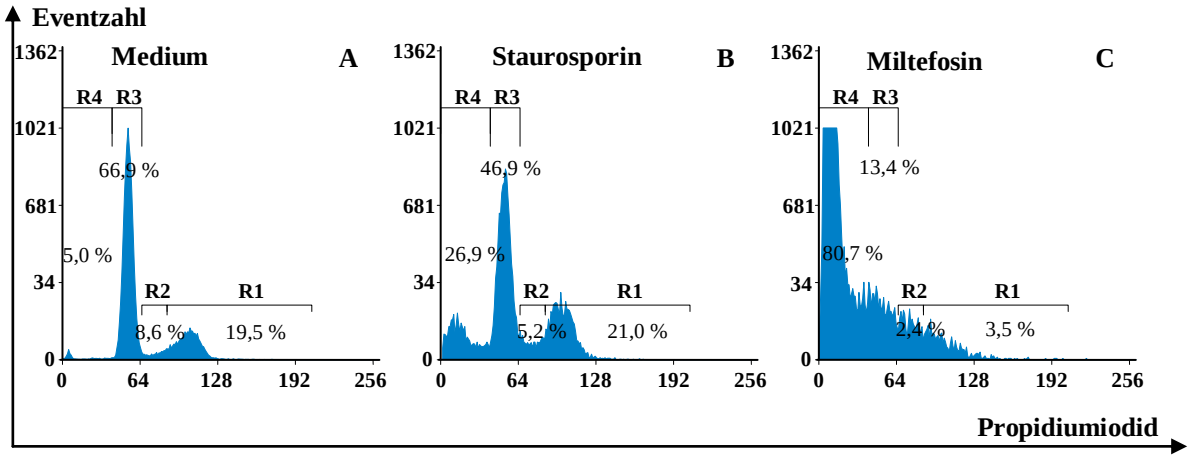

Abbildung 17: Zellzyklusphasen bei Promastigoten. Promastigote *Leishmania major* wildtype aus Tag 3 der Flüssigkultur wurden mit Staurosporin und Miltefosin je 18 h stimuliert und nachfolgend mit Propidiumiodid gefärbt, die Detektion erfolgte im FACS. Die Histogramme geben repräsentative Daten aus unabhängigen Experimenten (n = 3) wider, wobei Teil **A** die Mediumkontrolle prozyklischer Promastigoter an Tag 3 der Kultur, **B** die Stimulation mit Staurosporin und **C** die Stimulation der Protozoen mit Miltefosin zeigt. Die Marker entsprechen folgenden Zellzykluspopulationen: R1 = G2 Phase, R2 = S Phase, R3 = G1/G0 Phase, R4 = subG1 Phase.

In Abbildung 17 zeigt sich die unterschiedliche Größe der sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befindlichen Leishmanien in Abhängigkeit von der zu Grunde liegenden Kondition. Im Fall der Mediumkontrolle der prozyklischen Promastigoten (Abbildung 17 A) befanden sich im repräsentativ ausgewählten Fall die Subpopulationen zu 19,5 % in der G2, 8,6 % in der S, 66,9 % in der G1/G0 und 5,00 % in der subG1 Phase.

Nach Stimulation mit Staurosporin (Abbildung 17 B) ergab sich eine Aufteilung der Subpopulationen zu 21,0 % in der G2, 5,2 % in der S, 46,9 % in der G1/G0 und 26,9 % in der subG1 Phase befindlichen *Leishmania major*.

Für die Miltefosin Applikation (Abbildung 17 C) ergaben sich Werte zu 3,5 % in der G2, 2,4 % in der S, 13,4 % in der G1/G0 und 80,7 % in der subG1 Phase.

Zusammenfassend konnte für Staurosporin eine Zunahme der hypoploiden Zellfraktion um 21,9 % und für Miltefosin eine Zunahme um 75,7 % detektiert werden. Damit konnte eine im Sinne der Hypothese der durch beide Stimulanzien induzierten Apoptose stehende Degradierung von DNA bei Promastigoten demonstriert werden.

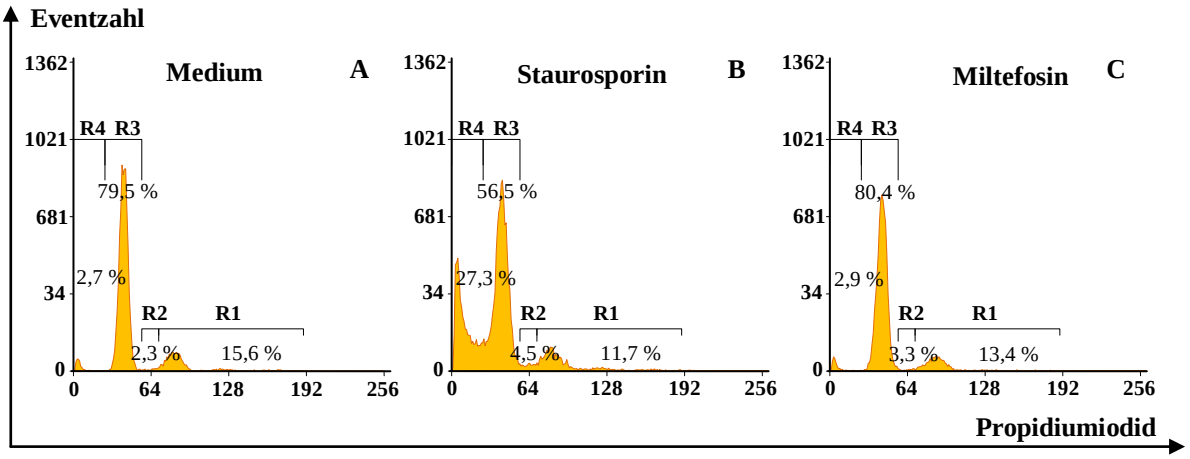

Abbildung 18: Zellzyklusphasen bei Amastigoten. Frisch isolierte Amastigote *Leishmania major* wildtype wurden mit Staurosporin und Miltefosin je 18 h stimuliert und konsekutiv mit Propidiumiodid gefärbt, die Analyse erfolgte im FACS. Die Histogramme geben repräsentative Daten aus unabhängigen Experimenten (n = 3) wider, wobei Teil **A** die Mediumkontrolle axenisch generierter Amastigoter, **B** die Stimulation mit Staurosporin und **C** die Stimulation der Amastigoten mit Miltefosin zeigt. Die Marker entsprechen den folgenden Zellzykluspopulationen: R1 = G2 Phase, R2 = S Phase, R3 = G1/G0 Phase, R4 = subG1 Phase.

Das experimentelle Setting der Promastigoten wurde unverändert bei Amastigoten durchgeführt. Für die Mediumkontrolle (Abbildung 18 A) der axenisch generierten Amastigoten ergaben sich Werte der Subpopulationen zu 15,6 % für die G2, 2,3 % für die S, 79,5 % für die G1/G0 sowie 2,7 % für die subG1 Phase.

Für die mit Staurosporin stimulierten Amastigoten (Abbildung 18 B) zeigten sich die Anteile an den Zellzyklusphasen zu 11,7 % für die G2, 4,5 % für die S, 56,5 % für die G1/G0 sowie 27,3 % für die subG1 Phase.

Die Inkubation mit Miltefosin (Abbildung 18 C) resultierte in einer Verteilung von 13,4 % für die G2, 3,3 % für die S, 80,4 % für die G1/G0 sowie 2,9 % für die subG1 Phase.

Zusammenfassend wurde hiermit eine Zunahme der hypoploiden Zellfraktion um 24,6 % nach Staurosporin Stimulation, des Weiteren eine Zunahme der hypoploiden Subpopulation nach Miltefosin Stimulation um 0,2 % gefunden. Somit konnte für Staurosporin eine gemäß der Hypothese durch die nach Stimulation induzierte Apoptose hervorgerufene Degradierung von DNA bei Amastigoten demonstriert werden, nicht jedoch für Miltefosin.

Die in den vorausgegangenen Abschnitten dieser Arbeit beschriebenen morphologischen Veränderungen charakterisieren den vorliegenden Zelltod als Apoptose. Im nun folgenden Teil der Arbeit sollten Moleküle bestimmt werden, welche an der molekularen Vermittlung der Apoptose Induktion in Zusammenhang mit den Stimulanzien Staurosporin und Miltefosin beteiligt sind.

3.5. Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei Promastigoten und Amastigoten Leishmanien

In der Vergangenheit wurde die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Induktion der Apoptose bei Leishmanien diskutiert. Zudem gilt das Auftreten von ROS als entscheidender Teil des Wirkmechanismus bei anderen Stimulanzien, beispielsweise dem Protein Kinase Inhibitor Withaferin A. Die nachfolgende Versuchsreihe diente der Untersuchung des Vorkommens unterschiedlicher Arten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in verschiedenen Konditionen bei axenischen Amastigoten und prozyklischen Promastigoten. Nach Stimulation mit Staurosporin respektive mittels Miltefosin wurden Leishmanien mit dem Farbstoff Dihydroethidium (DHE) gefärbt, die Analyse erfolgte mittels FACS, repräsentative Histogramme zeigt Abbildung 19.

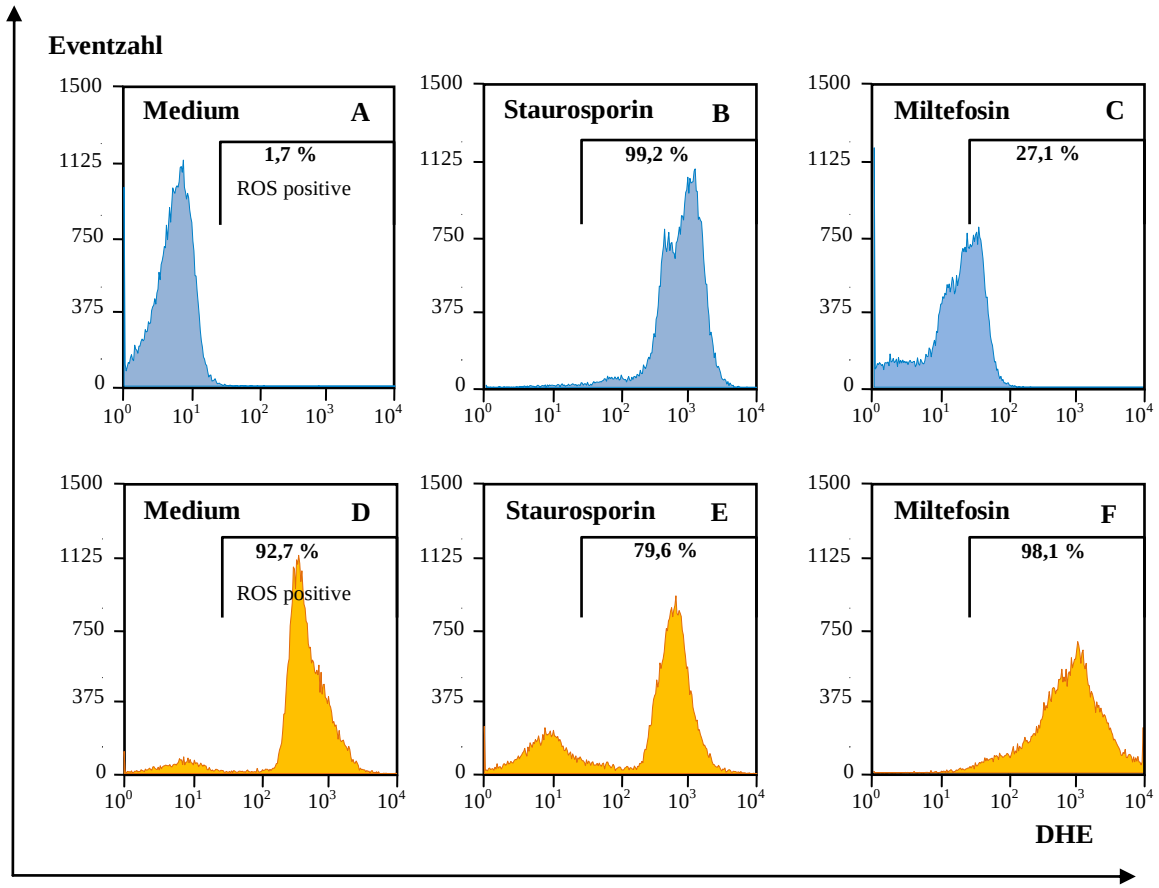

Abbildung 19: ROS Vorkommen bei Promastigoten und Amastigoten Leishmanien. Die Protozoen wurden nach Kultivierung in Flüssigmedium für 18 h stimuliert und nachfolgend mit DHE gefärbt, die Analyse der Färbung erfolgte mittels FACS. Die gezeigten Histogramme stammen aus FACS Daten unabhängiger Experimente (n = 3) für prozyklische Promastigoten in der oberen Zeile (**A-C**) und für axenische Amastigoten in der unteren Zeile (**D-F**), die Prozentzahl und der schwarze Rahmen (⌜⌝)geben den Anteil der DHE positiven Zellen an der Gesamtpopulation an. **A** zeigt die Mediumkontrolle der prozyklischen Promastigoten, **B** die mit Staurosporin stimulierten Promastigoten, **C** zeigt die mit Miltefosin stimulierten Promastigoten. In **D** wird die Mediumkontrolle der axenisch generierten Amastigoten dargestellt, in **E** die mit Staurosporin stimulierten und in **F** die mit Miltefosin stimulierten Amastigoten. DHE steht für Dihydroethidium, ROS für Reaktive Sauerstoffspezies.

Bei den Promastigoten Leishmanien konnte gezeigt werden, dass sie in der Mediumkontrolle (Abbildung 19 A) zu 98,3 % negativ für den ROS Farbstoff DHE und die damit nachweisbaren ROS Spezies sind. Nach Applikation von Staurosporin (Abbildung 19 B) wurden 99,2 % der Population positiv für DHE. Für die Miltefosinstimulation (Abbildung 19 C) lag dieser Wert bei im Vergleich zur Mediumkontrolle erhöhten 27,1 %.

Bei den Amastigoten ergaben sich die folgenden Werte nach der Färbung mittels DHE. In der Mediumkontrolle waren a priori 92,7 % der Zellen positiv in der DHE Färbung (Abbildung 19 D). Nach Stimulation mit Staurosporin sank der Wert auf 79,6 % (Abbildung 19 E) der Zellen. Die Inkubation mit Miltefosin führte zu einer detektierbaren Fluoreszenz von 98,1 % der Protozoen (Abbildung 19 F).

Zusammenfassend zeigte sich bei Promastigoten eine Vergrößerung der Subpopulation DHE positiver Zellen sowohl nach Staurosporin als auch nach Miltefosin Stimulation. Bei den Amastigoten wurde eine Abnahme der DHE Positivität nach Staurosporin Stimulation detektiert. Um eine weitere Differenzierung unterschiedlicher ROS zu erreichen und das Spektrum detektierbarer ROS zu erweitern, wurden im folgenden Versuchsteil die Farbstoffe Dichlorodihydrofluorescein (H2DCFDA) und Dihydrorhodamin (DHR123) zur ROS Detektion herangezogen.

3.6. Differenzierung des Auftretens unterschiedlicher ROS Spezies bei Promastigoten und Amastigoten Leishmanien

Um die postulierte Bedeutung von ROS bei apoptotischen Prozessen in protozoischen Zellen zu untersuchen, dienten die nachfolgenden Messungen der Differenzierung unterschiedlicher reaktiver Sauerstoffspezies und wurden mit drei Farbstoffen unterschiedlicher Spezifität für verschiedene ROS durchgeführt. Bei den Farbstoffen handelte es sich um Dichlorodihydrofluorescein (H2DCFDA), Dihydrorhodamin (DHR123) sowie um Dihydroethidium (DHE), die Detektion erfolgte im FACS.

Die drei Tage alten Promastigoten stellten sich in den drei Färbungen in der Mediumkontrolle mit Subpopulationen positiver Zellen zu 4,0 % ± 2,3 % bei H2DCFDA (Abbildung 20 A), 3,4 % ± 0,9 % bei DHE (Abbildung 20 B) und 5,4 % ± 1,6 % (Abbildung 20 C) bei DHR123 schwach positiv für ROS Farbstoffe dar.

Nach Stimulation mit Staurosporin ergab sich ein signifikanter Anstieg der ROS Positivität auf 77,8 % ± 8,8 % bei H2DCFDA (Abbildung 20 A), auf 90,8 % ± 8,1 % bei DHE (Abbildung 20 B) sowie auf 55,0 % ± 8,2 % in der DHR123 Färbung (Abbildung 20 C).

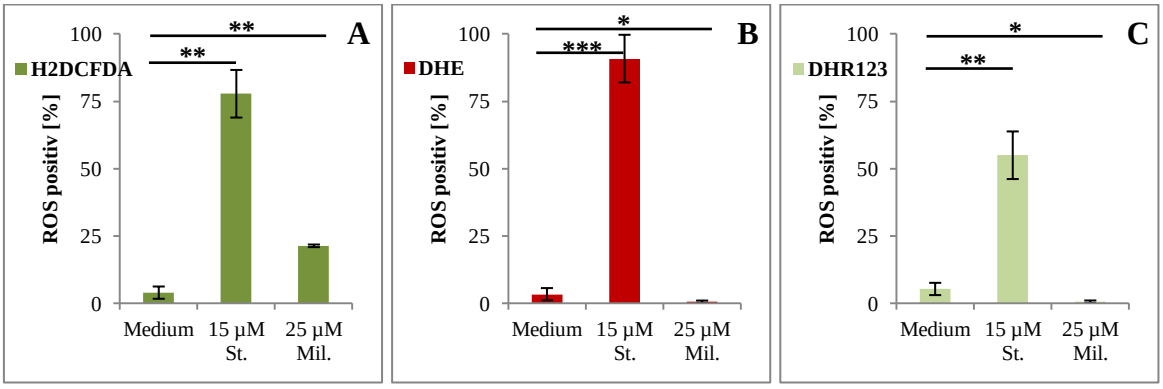

Abbildung 20: Änderungen des ROS Vorkommens bei stimulierten Promastigoten. Die drei Tage alten Promastigoten wurden für 18 h stimuliert, nach Stimulation erfolgte die Färbung mit Dichlorodihydrofluorescein (■ H2DCFDA), Dihydroethidium (■ DHE) und Dihydrorhodamin (■ DHR123) und anschließende Detektion im FACS. Angegeben ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler. **A** zeigt Daten für H2DCFDA, **B** zeigt die Färbung mit DHE, **C** zeigt DHR123. Signifikante Änderungen sind markiert durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Mil. bedeutet Miltefosin, ROS gleich reaktive Sauerstoffspezies, St. steht für Staurosporin.

Die Stimulation mit Miltefosin führte bei der Messung mittels H2DCFDA zu einer Subpopulation von 21,4 % ± 0,5 % ROS positiven Zellen (Abbildung 20 A). Dieser moderate Anstieg der Fluoreszenz war ebenfalls signifikant. Die Messungen ergaben für DHE und DHR123 mit Werten von 0,6 % ± 0,1 % (DHE) und 0,6 % ± 0,2 % (DHR123) positiver Zellen (Abbildung 20 B und C) annähernd ROS negative Populationen.

Zur weiteren Analyse der Differenzen zwischen ROS negativen Promastigoten und ROS positiven Amastigoten erfolgte die nachfolgende Versuchsreihe an Amastigoten. Die Untersuchung des ROS Status bei stimulierten Konditionen im Vergleich zur Mediumkontrolle erfolgte bei frisch isolierten Amastigoten, stimuliert wurde mittels Staurosporin und Miltefosin. Die Färbung erfolgte analog zu den Promastigoten mittels Dichlorodihydrofluorescein (H2DCFDA), Dihydrorhodamin (DHR123) und Dihydroethidium (DHE), die Detektion erfolgte mit FACS.

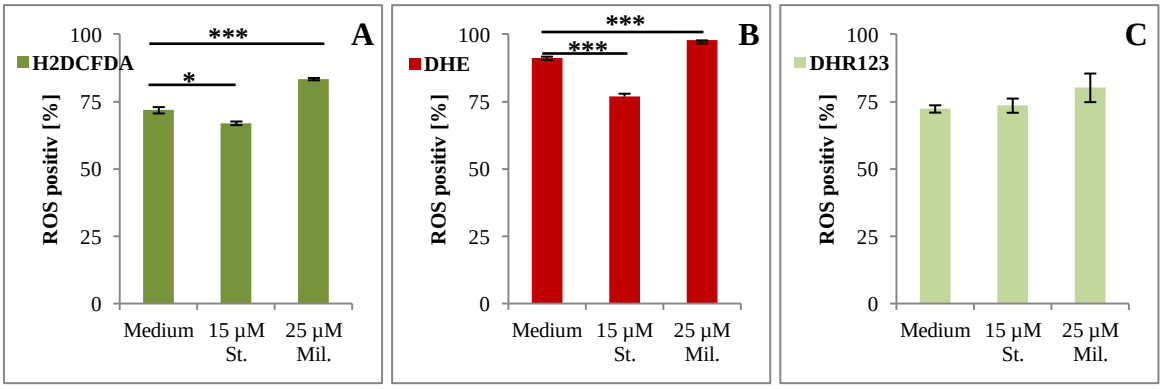

Abbildung 21: Änderungen des ROS Vorkommens bei stimulierten Amastigoten. Die isolierten Amastigoten wurden für 18 h in Flüssigkultur stimuliert, nach Stimulation erfolgte die Färbung mit Dichlorodihydrofluorescein (■ H2DCFDA), Dihydroethidium (■ DHE) und Dihydrorhodamin (■ DHR123) und anschließende Detektion im FACS. Aufgetragen ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler. **A** zeigt die Resultate für H2DCFDA, **B** bildet die Färbung mit DHE, **C** jene mit DHR123 ab. Signifikante Änderungen sind markiert durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Mil. bedeutet Miltefosin, ROS gleich reaktive Sauerstoffspezies, St. steht für Staurosporin.

Die Amastigoten zeigten in der Mediumkontrolle eine positive Subpopulation mit 71,9 % ± 1,2 % bei H2DCFDA (Abbildung 21 A), 91,1 % ± 0,6 % bei DHE (Abbildung 21 B) und 72,4 % ± 1,4 % bei DHR123 (Abbildung 21 C). Nach vorausgegangener Staurosporin Stimulation änderten sich diese Werte auf eine positive Subpopulation mit 67,0 % ± 0,7 % bei H2DCFDA (Abbildung 21 A), auf 77,0 % ± 1,1 % bei DHE (Abbildung 21 B) sowie auf 73,6 % ± 2,6 % bei DHR123 (Abbildung 21 C).

Nach der Inkubation mit Miltefosin stieg der Anteil der ROS positiven Protozoen in der H2DCFDA Färbung auf 83,4 % ± 0,4 % (Abbildung 21 A), bei DHE auf 97,7 % ± 0,1 % (Abbildung 21 B) und auf 80,2 % ± 5,3 % im Falle von DHR123 (Abbildung 21 C).

Um die zu Beginn dieses Abschnittes der Arbeit gestellte Frage nach dem Vorkommen differenter ROS Arten bei Promastigoten und Amastigoten sowohl physiologisch unter den Bedingungen der *in vitro* Kultur als auch nach Stimulation zu beantworten, wurde Tabelle 8 erstellt. Unter Berücksichtigung der Spezifität und Sensitivität der verschiedenen Farbstoffe für bestimmte reaktive Sauerstoffspezies lässt sich eine Übersicht der in den verschiedenen Konditionen vorkommenden reaktiven Sauerstoffspezies erstellen, wie sie Tabelle 8 zu entnehmen ist.

Dabei wurden Färbungen, in denen weniger als 10,0 % der Populationen Fluoreszenz für den jeweiligen Farbstoff zeigten, als negativ gewertet (-), für den Bereich zwischen 10,0 % und 25,0 % ROS positiver Zellen eine einfache Positivität festgesetzt (+), für Messungen

mit ROS positiver Subpopulation zwischen 25,0 % und 70,0 % eine deutliche Positivität (++) sowie für alle Konditionen mit mehr als 70,0 % ROS positiver Zellen eine hohe Positivität (+++) definiert.

Tabelle 8: Differenziertes Vorkommen verschiedener Sauerstoffspezies bei Leishmanien. Synopsis der durch unterschiedliche FACS Färbungen detektierten ROS in unterschiedlichen Konditionen. Getrennte Darstellung für Promastigoten (links) und Amastigoten (rechts) mit den folgenden Definitionen für das Vorkommen von ROS: – bedeutet ROS negative Population; + entspricht einem Anteil von 10,0 – 25,0 % ROS positiver Zellen; ++ entspricht 25,0 – 70,0 % ROS Positivität und +++ symbolisiert mehr als 70,0 % positive Zellen in der Population. Mil. bedeutet Miltefosin, ROS gleich reaktive Sauerstoffspezies, St. steht für Staurosporin. Abkürzungen der Sauerstoffspezies: Hydroxyl-Radikal (OH^-), Hypochlorige Säure (HOCl), Peroxynitrit-Anion ($ONOO^-$), Superoxid-Anion(O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

ROS Spezies	**Promastigoten**			**Amastigoten**		
	Medium	**15 µM St.**	**25µM Mil.**	**Medium**	**15 µM St.**	**25µM Mil.**
H_2O_2	-	++	-	+++	++	+++
OH^-	-	+++	+	+++	++	+++
$ONOO^-$	-	++	-	+++	++	+++
O_2^-	-	+++	-	+++	+++	+++
HOCl	-	++	-	+++	+++	+++

Die prozyklischen Promastigoten zeigten sich für alle detektierbaren Spezies negativ in der Mediumkontrolle, während nach der Staurosporin Stimulation alle reaktiven Sauerstoffspezies in einer Subpopulation detektiert werden konnten. Für die Stimulation mit Miltefosin ergab sich lediglich eine einfache Positivität in Hinblick auf Hydroxyl-Radikale.

Die axenisch generierten Amastigoten waren in der Mediumkontrolle hoch positiv für jegliche Art von reaktiven Sauerstoffspezies; nach Stimulation mit Staurosporin nahm der positive Anteil der Population für Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikale und Peroxynitrit-Anionen von hoch positiv auf deutlich positiv ab, blieb für Superoxid-Anionen und Hypochlorige Säure unverändert. Die Inkubation mit Miltefosin ergab keine Änderung des Vorkommens einzelner Sauerstoffspezies. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass ROS bei der Vermittlung der Apoptose bei *Leishmania major* eine Rolle zukommen könnte, da im Fall der mit Staurosporin inkubierten Promastigoten ein deutlicher Anstieg der ROS positiven Subpopulation im Rahmen der Stimulation stattfand. ROS Induktion könnte somit ein Teil des Wirkmechanismus bei der Apoptose Induktion durch Staurosporin sein. Im Folgenden sollte demnach untersucht werden, welcher

Einfluss über die Modulation des ROS Levels in den protozoischen Zellen auf die induzierbare Apoptoserate genommen werden kann.

3.7. Untersuchung der Modulationsmöglichkeit der Apoptose Induktion durch den ROS Fänger N-Acetylcystein (NAC)

Nachdem die Unterschiede zwischen Amastigoten und Promastigoten in Flüssigkultur sowie der Anstieg an ROS bei Promastigoten nach Staurosporin Stimulation detektiert wurden, führte dies zur Hypothese, dass die Modulation des ROS Gehaltes im Rahmen der Stimulationsversuche zu einer veränderten Apoptoserate führen müsste. Zur Untersuchung des Einflusses der reaktiven Sauerstoffspezies auf Apoptosevorgänge wurden die Leishmanien mit N-Acetylcystein (NAC) behandelt, da NAC die Eigenschaft eines ROS Fängers hat. Um die Einflüsse des vorab beschriebenen veränderten ROS Aufkommens nach Staurosporin Stimulation zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen NAC getestet, wobei dieses als 2 h Präinkubation vor der Stimulation (18 h) mit Staurosporin appliziert wurde. Nach Inkubation mit Staurosporin wurde erneut durchflusszytometrisch die Größe der für ROS Farbstoffe positiven Subpopulation bestimmt, die Färbung erfolgte mittels H2DCFDA, die Detektion im FACS.

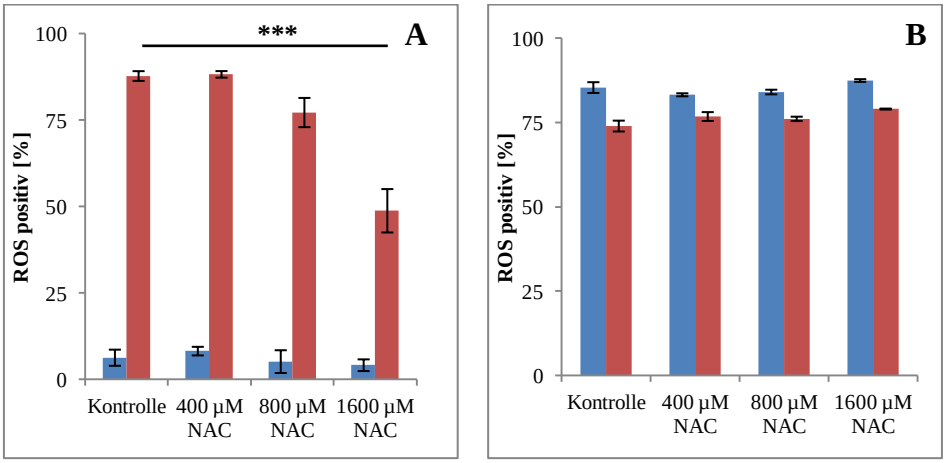

Abbildung 22: ROS Modulation durch N-Acetylcystein (NAC) Präinkubation vor Staurosporin Stimulation. Die Untersuchung erfolgte an drei Tage alten Promastigoten und axenischen Amastigoten nach Gradientenisolation. Nach zwei stündiger Präinkubation und Stimulation mit Staurosporin erfolgten die Färbung der Protozoen mit H2DCFDA sowie die Detektion der Fluoreszenz im FACS. Angegeben ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler. **A** zeigt Daten für prozyklische Promastigoten, **B** zeigt Resultate für axenisch generierte Amastigoten. Kontrolle steht für Negativkontrolle; 400 µM NAC, 800 µM NAC und 1600 µM NAC bezeichnet die Präinkubation mit NAC von unstimulierten und Staurosporin stimulierten Protozoen; Mediumkontrolle (■), Staurosporin Stimulation (■). Signifikante Änderungen markiert durch *** $p < 0{,}001$. ROS steht für reaktive Sauerstoffspezies.

Bei den Promastigoten (Abbildung 22 A) zeigte sich keine signifikante Änderung des ROS Status zwischen der Mediumkontrolle und der Negativkontrolle bestehend aus Medium mit NAC Applikation. Die mit Staurosporin behandelten Leishmanien zeigten eine Abnahme der ROS Positivität auf eine Subpopulation von 48,8 % ± 0,5 % ROS positiver Zellen nach 1600 µM NAC Applikation

Bei den isolierten Amastigoten bewirkte die Inkubation mit NAC weder in der Mediumkontrolle noch in der mit Staurosporin stimulierten Kondition eine signifikante Änderung der ROS Positivität (Abbildung 22 B).

Nachfolgend sollten die Auswirkungen der NAC Gabe, mit der einhergehend beobachteten verringerten Positivität für H2DCFDA Farbstoff und einem möglicherweise verringerten ROS Level, auf die Apoptoseinduktion mittels Staurosporin eruiert werden. Es erfolgte die Analyse der PL Externalisation sowie der DNA-Degradierung mittels Annexin V Färbung beziehungsweise Propidiumiodid-Färbung und anschließender Analyse im FACS.

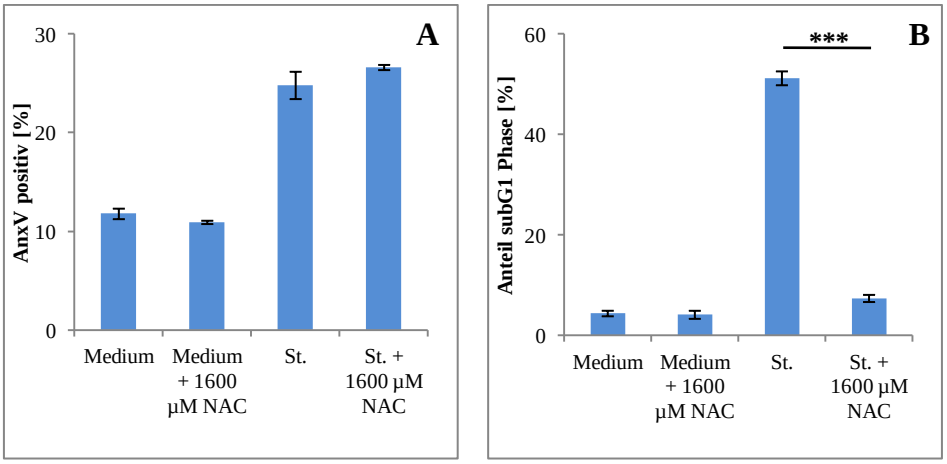

Abbildung 23: N-Acetylcystein (NAC) Einfluss auf die Apoptoseinduktion bei Promastigoten. Die Analyse erfolgte an drei Tage alten Promastigoten. Nach 2 h Präinkubation mit NAC und 18 h Stimulation mit Staurosporin erfolgten die Färbung der Protozoen mit Annexin V (Abbildungsteil **A**) sowie mit Propidiumiodid (Abbildungsteil **B**) und die Detektion im FACS. Angegeben ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler. AnxV steht für Annexin V, Medium steht für Mediumkontrolle, 1600 µM NAC zeigt eine 2 stündige Präinkubation mit N-Acetylcystein an, St. steht für Staurosporin, subG1 bezeichnet Zellen mit hypoploider Zellfraktion unterhalb der G1/G0 Phase. Signifikante Änderungen markiert durch *** $p < 0{,}001$.

Die Größe der AnxV positiven Subpopulation (Abbildung 23 A) zeigte sich sowohl in der Mediumkontrolle als auch in der mit Staurosporin stimulierten Kondition ohne signifikante Änderungen.

Die Analyse der Zellzyklusphasen bei drei Tage alten Promastigoten (Abbildung 23 B) ergab eine hoch signifikante Änderung des Anteils an Protozoen, welche eine, einer hypoploiden DNA-Gehalt entsprechenden, Fluoreszenz nach PI Färbung aufwiesen. In der Staurosporin stimulierten Kondition lag der Anteil an subG1 Zellen durchschnittlich bei 51,2 % ± 1,4 % und sank nach zwei stündiger Präinkubation mit NAC auf 7,4 % ± 0,7 % und lag damit noch 3,0 % über dem Wert der Mediumkontrolle, welche eine 4,4 % ± 0,6 % messende Subpopulation an Zellen im subG1 Bereich beinhaltete.

Da Amastigoten wie vorab beschrieben im Flüssigmedium mit einem Großteil der Gesamtpopulation positiv für ROS Farbstoffe waren, sollte ein möglicher Einfluss von NAC auf die Apoptose Induktion durch Staurosporin bei Amastigoten im Vergleich zu den Promastigoten betrachtet werden. Für frisch isolierte Amastigoten wurde die Messung der AnxV Positivität sowie die Analyse des zellulären DNA Gehaltes über Propidiumiodid Färbung analog zu den Färbungen der Promastigoten durchgeführt, die Auswertung erfolgte im FACS.

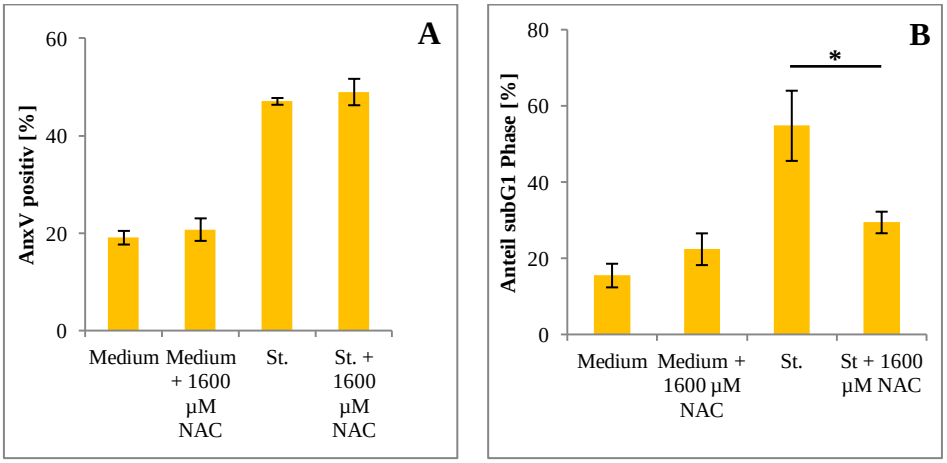

Abbildung 24: N-Acetylcystein (NAC) Einfluss auf die Apoptoseinduktion bei Amastigoten. Die Versuchsreihe erfolgte an frisch über Gradienten isolierten Amastigoten. Nach 2 h Präinkubation mit NAC und 18 h Stimulation mit Staurosporin erfolgten die Färbung der Leishmanien mit Annexin V (Abbildungsteil **A**) sowie mit Propidiumiodid (Abbildungsteil **B**) und die Analyse im FACS. Angegeben ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler. AnxV steht für Annexin V, Medium steht für Mediumkontrolle, 1600 µM NAC zeigt eine 2 stündige Präinkubation mit N-Acetylcystein an, St. steht für Staurosporin, subG1 bezeichnet Zellen mit hypoploider Zellfraktion unterhalb der G1/G0 Phase. Signifikante Änderungen markiert durch * $p < 0,05$.

Wie bei den Ergebnissen zur Versuchsreihe mit Promastigoten dargelegt, zeigte sich auch bei Amastigoten kein signifikanter Einfluss von NAC auf die Färbung mit AnxV Farbstoff und damit auf die Präsentation von Phospholipiden auf der Oberfläche der protozoischen Zellen (Abbildung 24 A).

Die Färbung mittels Propidiumiodid (Abbildung 24 B) ergab, dass der Anteil der DNA degradierten Zellen von durchschnittlich 54,8 % ± 9,2 % nach Staurosporin Stimulation auf 29,4 % ± 2,8 % mit vorausgegangener Präinkubation mit NAC zurück ging.

3.8. Analyse der Enzymregulation im Zusammenhang mit ROS – Untersuchung der *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase

Nach den Beobachtungen zum Vorkommen von ROS im Zuge apoptotischer Stimulation bei Leishmanien stellte sich die Frage nach Enzymen, welche an der Regulation dieser Molekülgruppe beteiligt sind. Der Fokus lag hierbei zunächst auf dem Enzym *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase (LmAPX), dessen antiapoptotische Wirkung im Rahmen einer experimentellen Überexpression bereits von anderen Arbeitsgruppen diskutiert wurde. In dieser Arbeit wurde die Hypothese vertreten, dass LmAPX bei der Degradierung von ROS bei Leishmanien von Bedeutung ist und möglicherweise einen protektiven Effekt auf die protozoischen Zellen ausübt. Um dies zu verifizieren oder zu falsifizieren, wurden drei Tage alte Promastigoten und frisch isolierte Amastigoten mit Staurosporin und Miltefosin stimuliert, bei den aufbereiteten Proben wurde nachfolgend die Proteinmenge an LmAPX mittels Western Blot bestimmt und mit der Mediumkontrolle verglichen.

Die Analyse der Daten (Abbildung 25 A-D) für prozyklische Promastigoten ergab eine Abnahme der Proteinmenge für die mit Staurosporin stimulierte Kondition in der densitometrischen Messung im Vergleich zur Mediumkontrolle auf 67,7 % ± 17,3 %.

Die Abnahme der Proteinmenge in der mit Miltefosin stimulierten Kondition auf 51,6 % ± 13,7 % der Vergleichsmenge aus der Mediumkontrolle lag im statistisch signifikanten Bereich. Das experimentelle Setting sowie die Analyse der Proben mittels Western Blot und Densitometrie zur Bestimmung der relativen Menge an LmAPX erfolgte ebenfalls für axenisch generierte Amastigoten.

Hierbei zeigte sich, wie Abbildung 26 veranschaulicht, eine Abnahme der relativen LmAPX Menge auf 44,8 % ± 1,9 % nach Staurosporin Stimulation. Die Abnahme der relativen Menge LmAPX lag im Fall der mit Miltefosin stimulierten Protozoen bei 68,8 % ± 33,0 % der Vergleichsmenge aus der Mediumkontrolle.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mittels Western Blot sowohl bei Promastigoten als auch bei Amastigoten nach Staurosporin und Miltefosin Stimulation eine

Herunterregulation der relativen Proteinmenge LmAPX im Vergleich zur Mediumkontrolle detektiert wurde.

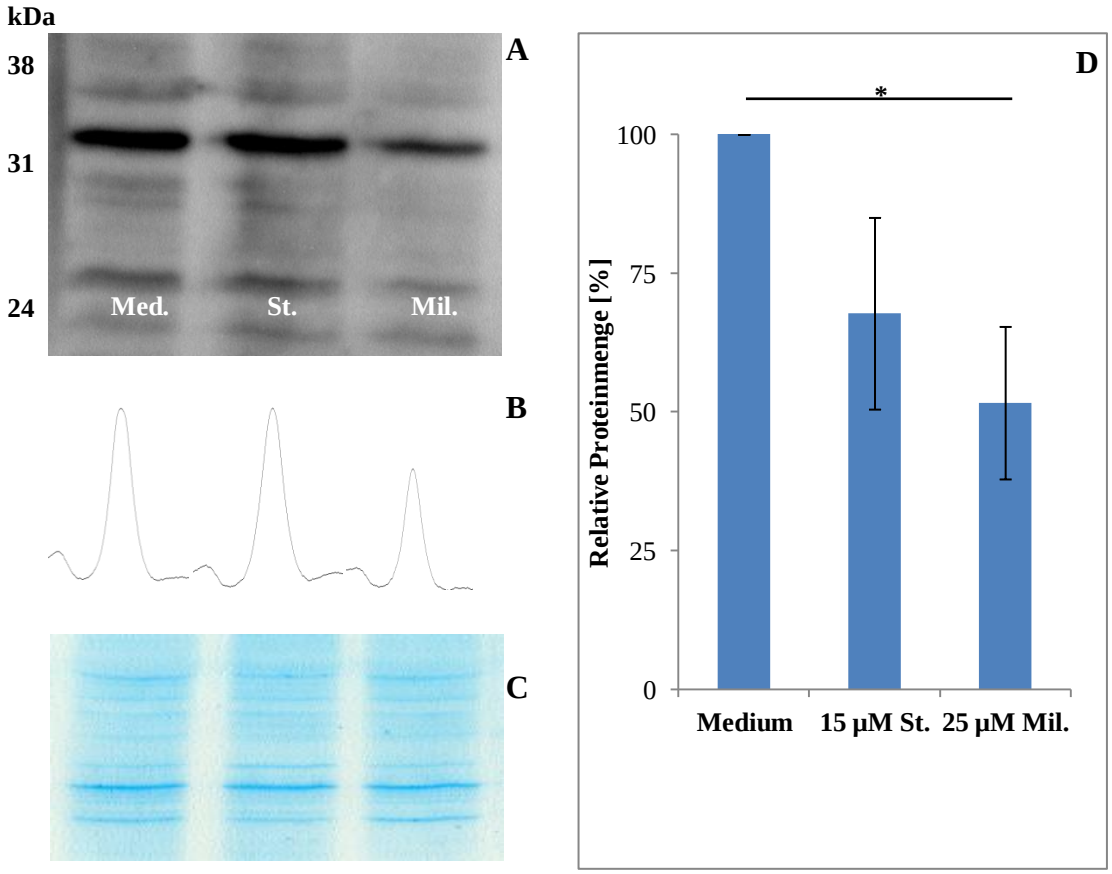

Abbildung 25: Änderungen der Proteinmenge der *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase bei prozyklischen Promastigoten. Zur Untersuchung wurden drei Tage alte Promastigoten aus biphasischer Kultur verwandt. Nach Stimulation mit Staurosporin und Miltefosin erfolgte die Aufarbeitung der Proben für den Western Blot und anschließend die densitometrische Auswertung der Proben, dargestellt sind die Ergebnisse aus unabhängigen Experimenten (n = 3). **A** zeigt exemplarische Banden eines Western Blots nach Inkubation mit Kaninchen anti LmAPX Erstantikörper und anti Kaninchen HRP Zweitantikörper, die Konditionen sind: Mediumkontrolle (Med.), Inkubation mit Staurosporin (St.), Inkubation mit Miltefosin (Mil.); **B** zeigt die zugehörige Auswertung der Western Blot Membranen mit Densitometrie; **C** zeigt die Ladungskontrolle des Coomassie Blue gefärbten SDS Geles, selbe Konditionen wie unter A;. **D** zeigt ein Balkendiagramm der relativen Menge an LmAPX in den Konditionen, die Mediumkontrolle wurde mit 100 % gleichgesetzt, angegeben ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler. Signifikante Änderungen markiert durch * $p < 0,05$. kDa bedeutet Kilodalton.

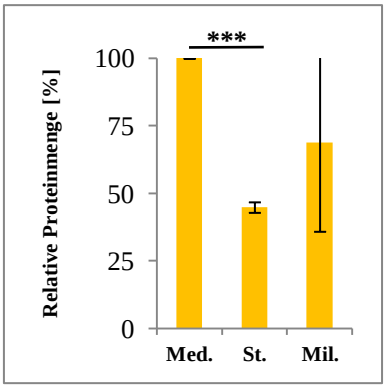

Abbildung 26: Änderung der Proteinmenge von LmAPX bei Amastigoten. Im Experiment wurden frisch isolierte Amastigoten eingesetzt. Nach Stimulation mit Staurosporin und Miltefosin erfolgte der Western Blot und anschließend die densitometrische Auswertung der Proben, dargestellt sind die Ergebnisse aus unabhängigen Experimenten (n = 3). Angegeben ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler. Med. steht für Mediumkontrolle, Mil. für Miltefosin und St. für Staurosporin. Signifikante Änderungen markiert durch *** $p < 0{,}001$.

Zur Verifizierung der aus den Western Blot Analysen gewonnenen Daten, wurde RNA aus der Mediumkontrolle sowie aus den mit Staurosporin über 18 h stimulierten Amastigoten und Promastigoten gewonnen, danach in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR analysiert. Die Resultate sind in Abbildung 27 veranschaulicht.

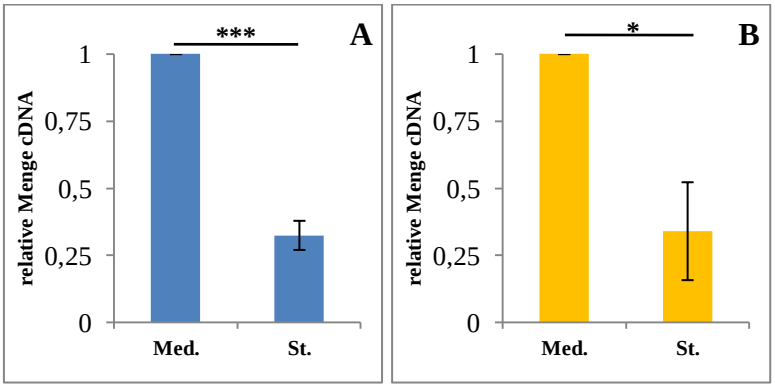

Abbildung 27: Änderung der cDNA Menge der LmAPX bei Promastigoten und Amastigoten. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler aus unabhängigen Experimenten (n = 3) an drei Tage alten Promastigoten (■) in **A** und frisch isolierten Amastigoten (■) in **B**. Nach 18 h Stimulation mit Staurosporin und Miltefosin erfolgte die Isolierung der RNA und Generierung der cDNA und nachfolgend die LightCycler Analyse. Bei der Angabe der relativen cDNA Menge wurde die Mediumkontrolle gleich 1 gesetzt. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konditionen. cDNA steht für komplementäre DNA, Med. steht für Mediumkontrolle, St. für Staurosporin. Signifikante Änderungen markiert durch * $p < 0{,}05$, *** $p < 0{,}001$.

Bei den Promastigoten (Abbildung 27 A) zeigte sich eine Abnahme der cDNA Menge im Vergleich zur Mediumkontrolle um 67,5 % auf verbleibende 32,5 % ± 5,4 % in der mit Staurosporin stimulierten Kondition. Für Miltefosin liegt lediglich ein einfacher Datensatz vor, er ist nicht dargestellt.

Die Amastigoten (Abbildung 27 B) zeigten ebenfalls eine Abnahme der cDNA Menge von LmAPX. Der Vergleich zwischen Medium und Staurosporin stimulierten Protozoen zeigte hier einen Rückgang um 66,0 % auf 34,0 % ± 18,2 % der Referenzmenge. Ein einfacher Datensatz für Miltefosin ist nicht abgebildet.

Die mit Light Cycler ausgewerteten Proben der mit Staurosporin zur Apoptose stimulierten Leishmanien zeigten somit eine gleichsinnige Regulation der cDNA Menge der LmAPX wie zuvor die Daten zur Proteinmenge dieses Enzymes bei Promastigoten und Amastigoten *Leishmania major*. Ein weiterer Nachweis der Hypothese einer herunter regulierten Proteinmenge der LmAPX nach Staurosporin Stimulation sollte im nächsten Teil der Arbeit durch die Möglichkeit der Fluoreszenzmikroskopie erreicht werden.

3.9. Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung von LmAPX

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises von LmAPX in Leishmanien besteht in der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung einer *in vitro* Flüssigkultur und stimulierter Protozoen.

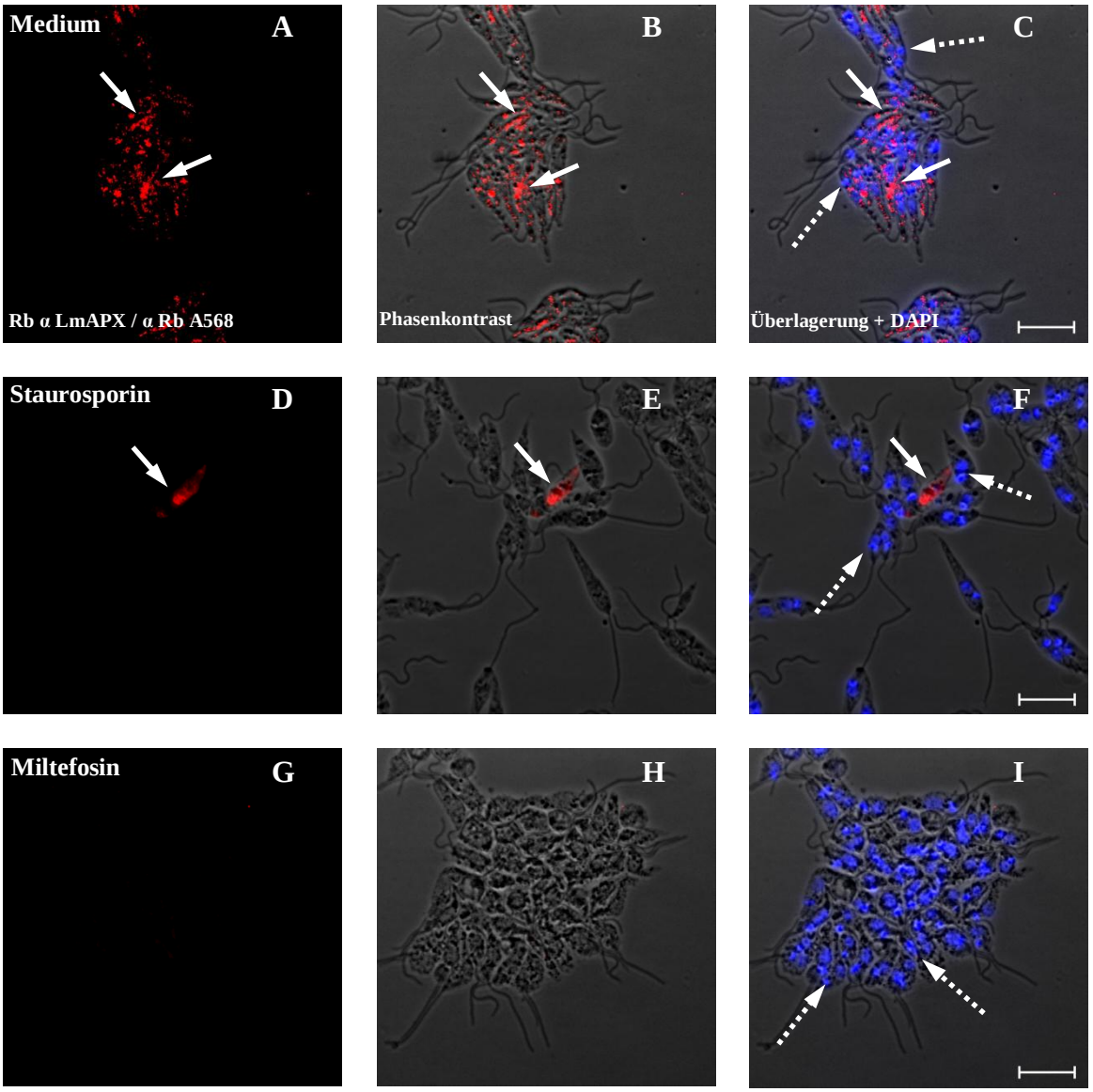

Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der LmAPX bei Promastigoten. Die experimentelle Untersuchung erfolgte an drei Tage alten Promastigoten. Nach Stimulation erfolgte die Färbung mit Kaninchen-anti-LmAPX als Erstantikörper und anti-Kaninchen-A568 (rot) als Zweitantikörper sowie zur Darstellung der DNA in Zellkernen und Kinetoplasten mit DAPI (blau). Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus unabhängigen Experimenten (n = 3). Die oberste Zeile (**A, B, C**) zeigt die Mediumkontrolle, die mittlere Zeile (**D, E, F**) wurde mit Staurosporin stimuliert, die unterste Zeile (**G, H, I**) mit Miltefosin. Die erste Spalte (**A, D, G**) zeigt Kaninchen-anti-LmAPX/anti-Kaninchen-A568, die zweite Spalte (**B, E, H**) Selbiges plus Phasenkontrast, die dritte Spalte (**C, F, I**) zusätzlich DAPI. Weiße ausgefüllte Pfeile deuten auf intrazelluläres Signal der LmAPX Färbung, gestrichelte Pfeile auf DAPI gefärbte Zellkerne und Kinetoplasten. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Abkürzungen: α bedeutet anti, DAPI bedeutet 4′,6-Diamidin-2-phenylindol, LmAPX für *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase, Rb steht für rabbit.

Hierzu wurden drei Tage alte Promastigoten mit Staurosporin und Miltefosin stimuliert und folgend mit Kaninchen-anti-LmAPX/anti-Kaninchen-A568 zur Färbung der LmAPX sowie mit 4‘,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) zur Anfärbung der DNA gefärbt. Die repräsentativen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen nach Färbung mit Kaninchen-anti-LmAPX/anti-Kaninchen-A568 plus Überlagerung rote Fluoreszenz im Zytosol der prozyklischen Promastigoten in der Mediumkontrolle (Abbildung 28 B, gefüllte weiße Pfeile). Dies würde dem vorbeschriebenen Vorkommen der LmAPX im Kinetoplasten von *Leishmania major* entsprechen, eine exaktere Differenzierung der Lokalisation ist bei den dargestellten Aufnahmen jedoch nicht möglich. Die drei Tage alten Promastigoten stellen sich im Durchlicht elongiert und begeißelt dar (Abbildung 28 B, C), was der Morphologie nach vitalen Promastigoten entspricht.

In der mit Staurosporin stimulierten Kondition zeigt sich im Sichtfeld ein Zellkörper positiv für die LmAPX Färbung (Abbildung 28 D-F). Die übrigen Protozoen sind gänzlich negativ für Kaninchen-anti-LmAPX/anti-Kaninchen-A568. Im Fall der Staurosporin Stimulation zeigt sich das Auftreten von abgerundeten Zellkörpern (Abbildung 28 E, F), wobei die Abrundung ein morphologisches Charakteristikum der Apoptose darstellt.

Die Stimulation mit Miltefosin ergab keine Anfärbbarkeit für Kaninchen-anti-LmAPX/anti-Kaninchen-A568 im repräsentativen dargestellten Sichtfeld (Abbildung 28 G-I). Wie bei den abgebildeten mit Staurosporin inkubierten Protozoen zeigt sich auch nach Miltefosin Stimulation das Bild von abgerundeten, in Konglomeraten liegenden Promastigoten. Auch hier ist die Abrundung ein morphologisches Charakteristikum der Apoptose.

In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich damit eine Abnahme des Signals nach Färbung mit Kaninchen-anti-LmAPX/anti-Kaninchen-A568 und Betrachtung im Zeiss Axio Imager M2 sowohl nach Staurosporin als auch nach Miltefosin Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Änderung ist gleichsinnig zu der Abnahme der Proteinmenge der LmAPX im Western Blot sowie zur Abnahme der cDNA Menge der LmAPX im Light Cycler.

Neben der LmAPX sollte nun ein weiteres Enzym, welchem im Rahmen apoptotischer Vorgänge bei *Leishmania major* Bedeutung beigemessen wird, mit FACS Analyse, Western Blotting und Light Cycler näher beleuchtet werden. Es handelt sich um die Endonuclease G bei Amastigoten und Promastigoten *Leishmania major*.

3.10. Analyse der Enzymmenge im Zusammenhang mit der Degradierung von DNA während der Apoptose – Untersuchung von Endonuclease G

Wie in Abschnitt 4 – Analyse der Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid Färbung beschrieben wurde, zeigte die Apoptoseinduktion mit Staurosporin und Miltefosin Auswirkungen auf die Größe der Subpopulationen der Leishmanien in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Im Fokus steht das Enzym Endonuclease G, welches die Degradierung von DNA unter Stimulation bewirken könnte; dieser Vorgang wurde bereits für andere Stimulanzien wie Nelfinavir beschrieben.

Der hier postulierte Zusammenhang zwischen der Degradierung von DNA und dem Auftreten hypoploider Zellen besteht in einer möglichen Regulation der Endonuclease G im Zuge der Apoptoseinduktion bei Leishmanien. Es könnte sich um ein proapoptotisches Enzym handeln, welches nach Stimulation der Protozoen eine Hochregulation der Proteinmenge zeigen könnte, was an dieser Stelle untersucht wurde.

In der Versuchsreihe wurden drei Tage alte Promastigoten sowie frisch via Gradienten isolierte Amastigoten für 18 h mit Staurosporin oder Miltefosin stimuliert. Die Proben wurden für das Anfertigen von Western Blots aufbereitet, es erfolgte die Inkubation mit Kaninchen anti Endonuclease G Erstantikörper und anti Kaninchen HRP Zweitantikörper (Abbildung 29 A). Bei der Auswertung mit Densitometrie (Abbildung 29 B) wurde die relative Proteinmenge in Relation zur Negativkontrolle ermittelt.

Die Analyse der Western Blot Daten mittels Densitometrie (Abbildung 29 A und B) ergab, dass es unter Stimulationsbedingungen zu einer signifikanten Hochregulation der relativen Proteinmenge nach Staurosporin-Gabe auf 143,3 % ± 13,3 % im Vergleich zur Mediumkontrolle kam.

Nach Stimulation mit Miltefosin ergab sich ein statistisch signifikanter Anstieg der relativen Proteinmenge auf durchschnittlich 148,6 % ± 10,3 % des Wertes der Negativkontrolle.

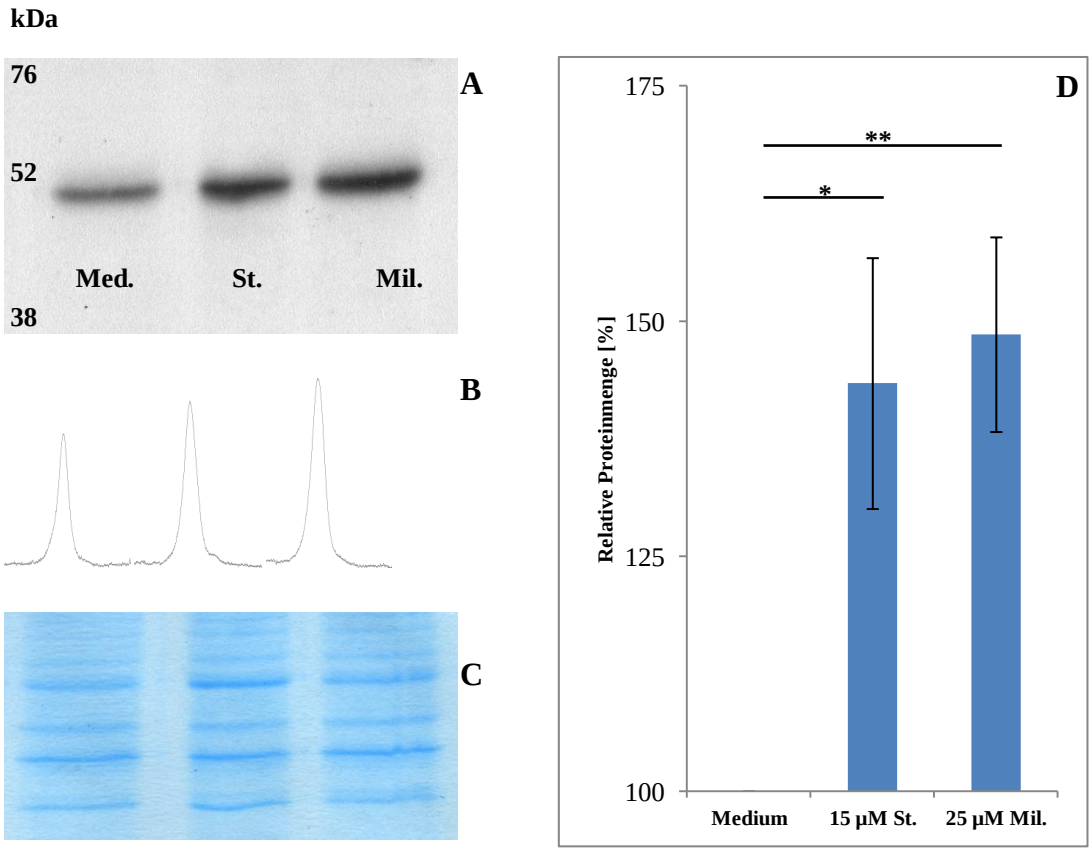

Abbildung 29: Änderungen der Proteinmenge der Endonuclease G bei Promastigoten. Zur Untersuchung wurden drei Tage alte Promastigoten aus biphasischer Flüssigkultur verwandt. Nach Stimulation mit Staurosporin und Miltefosin erfolgte die Bearbeitung der Proben für den Western Blot und anschließend die densitometrische Analyse der Proben, dargestellt sind die Ergebnisse aus unabhängigen Experimenten (n = 3). **A** zeigt exemplarische Banden eines Western Blots nach Inkubation mit Kaninchen anti Endonuclease G Erstantikörper und anti Kaninchen HRP Zweitantikörper, die Konditionen sind: Mediumkontrolle (Med.), Inkubation mit Staurosporin (St.), Inkubation mit Miltefosin (Mil.); **B** zeigt die Auswertung der Western Blot Membranen mittels Densitometrie; **C** zeigt die Ladungskontrolle des mit Coomassie Blue gefärbten SDS Geles, selbe Konditionen wie unter A;. **D** zeigt die relative Menge an LmAPX in den Konditionen, die Mediumkontrolle wurde mit 100 % gleichgesetzt, angegeben ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler. Signifikante Änderungen markiert durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. HRP steht für horseradish peroxidase, kDa bedeutet Kilodalton.

Die Versuchsanordnung wurde unter analogen Stimulationsbedingungen mit frisch isolierten Amastigoten durchgeführt und ergab für Selbige die in Abbildung 30 dargestellten Werte für die densitometrische Analyse der Western Blot Banden. Die relative Menge der EndoG wird in Relation zur Mediumkontrolle, deren Wert mit 100,0 % gleichgesetzt wurde, angegeben.

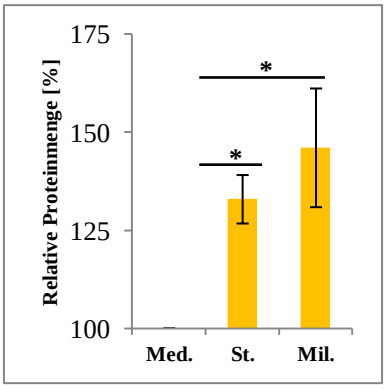

Abbildung 30: Änderungen der Proteinmenge der Endonuclease G bei Amastigoten. Nach Stimulation frisch isolierter Amastigoter mit Staurosporin und Miltefosin erfolgte der Western Blot und anschließend die densitometrische Auswertung der Proben. Dargestellt sind die Resultate als Mittelwert ± Standardfehler aus unabhängigen Experimenten (n = 3). Angegeben ist die relative Proteinmenge, die Mediumkontrolle wurde mit dem Wert 100 % gleichgesetzt. Med. steht für Mediumkontrolle, Mil. für Miltefosin und St. für Staurosporin. Signifikante Änderungen markiert durch * $p < 0,05$.

Die mit Staurosporin inkubierten Amastigoten zeigten in der Densitometrie einen signifikanten Anstieg der relativen Menge an Endonuclease G auf 133,0 % ± 6,2 % des Wertes der Mediumkontrolle.

Die Stimulation mit Miltefosin ergab einen Anstieg der Proteinmenge auf 146,1 % ± 15,1 % des Vergleichswertes der Negativkontrolle, auch dieser war statistisch signifikant.

Die Daten aus dieser Versuchsreihe zeigten bei drei Tage alten Promastigoten und bei frisch isolierten Amastigoten signifikante Anstiege der densitometrisch bestimmten relativen EndoG Proteinmenge, sowohl bei Staurosporin- als auch bei Miltefosin Stimulation. Da dies für die Bedeutung der Endonuclease G im Sinne einer proapoptotischen Wirkung sprechen könnte, sollten im nun folgenden Abschnitt dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Aufschluss über diese Hypothese geben.

3.11. Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung von Endonuclease G

Die Darstellung der Endonuclease G erfolgte bei drei Tage alten Promastigoten in der Negativkontrolle sowie nach Staurosporin und Miltefosin Stimulation (18 h) durch Färbung der Protozoen mit Kaninchen-anti-EndoG Erstantikörper und anti-Kaninchen-A488 Zweitantikörper (Rb α EndoG / α Rb A488). Die Färbung der Nukleinsäuren erfolgte mittels DAPI. Abbildung 31 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder aus Abbildung 31 geben Aufschluss über die Verteilung von Endonuclease G in den protozoischen Zellen. In der Mediumkontrolle (Abbildung 31 B) zeigt sich eine granuläre Anfärbung mittels Rb α EndoG / α Rb A488 im Bereich der Flagellartasche respektive des Kinetoplasten (siehe auch Überlagerung in Abbildung 31 C). Die Zellen entsprechen ihrer physiologischen prolongierten Form.

Nach Inkubation mit Staurosporin zeigte sich eine stärkere Anfärbung bei etwa einem Viertel der Zellen, im Vergleich zur Mediumkontrolle, sichtbar ist dies beim Vergleich von Abbildung 31 D mit Abbildung 31 A. Das Signal der protozoischen Zellen auf die Rb α EndoG / α Rb A488 Färbung scheint nach Staurosporin Stimulation auch das Zytosol einzuschließen (Abbildung 31 E). Desweiteren zeigen sich die Promastigoten nach Stimulation in ihrer Zellmorphologie deutlich abgerundet im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Die Stimulation mit Miltefosin und nachfolgende Färbung mit Rb α EndoG / α Rb A488 zeigte ein deutlich stärkeres Signal (Abbildung 31 G) bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung als bei der Mediumkontrolle. Das Verteilungsmuster der Fluoreszenz schloss hierbei neben dem Kinetoplasten das Zytosol der Promastigoten mit ein (Abbildung 31 H und I). Analog zur Staurosporin Stimulation zeigten sich die Leishmanien in ihrer Form abgerundet und plump im Vergleich zur Morphologie der Protozoen in der Mediumkontrolle.

Zusammenfassend lässt sich für diese Versuchsreihe festhalten, dass Promastigote Leishmanien nach Stimulation mit Staurosporin und Miltefosin in Aufnahmen mit durchlichtmikroskopischem Anteil (Abbildung 31 E, F und H, I) morphologisch abgerundet und plump erscheinen, dies entspricht einem Merkmal der Apoptose. Die Antikörper-Färbung für EndoG zeigte für beide Stimulanzien einen Intensitätsanstieg im fluoreszenzmikroskopischen Bild (Abbildung 31 D und G). Dies ist gleichsinnig mit den in

Abschnitt 3.10. dieser Arbeit detektierten relativ erhöhten Mengen an Endonuclease G im Western Blot.

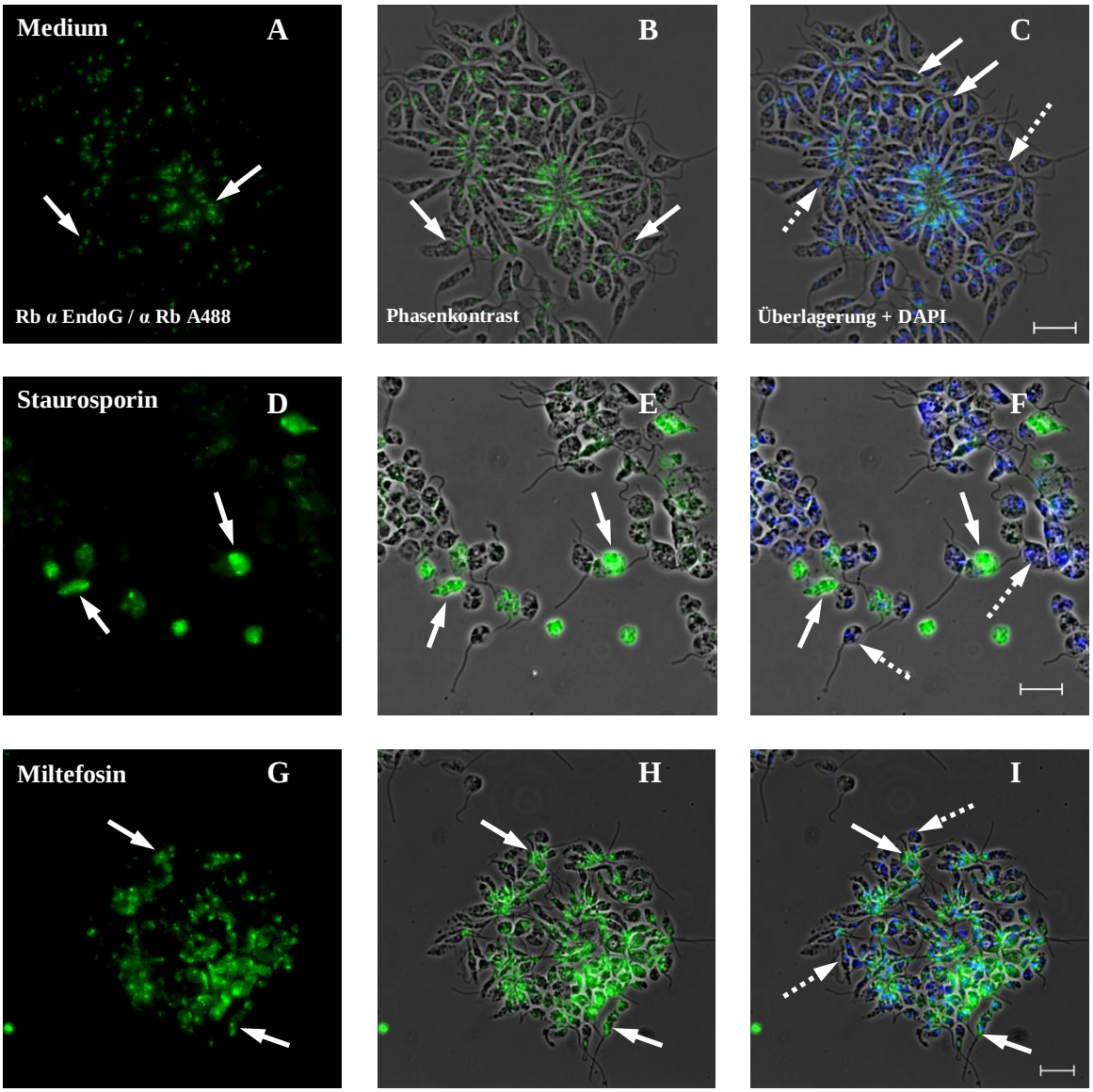

Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der EndoG bei prozyklischen Promastigoten. Die experimentelle Untersuchung erfolgte an drei Tage alten Promastigoten, die Stimulation erfolgte für 18 h. Nachfolgend wurden die Leishmanien mit Kaninchen-anti-EndoG/anti-Kaninchen-A488 (grün) als Zweitantikörper sowie zur Darstellung des Zellkerns und Kinetoplasten mit DAPI (blau) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus unabhängigen Experimenten (n = 3). Die oberste Zeile (**A, B, C**) zeigt die Mediumkontrolle, die mittlere Zeile (**D, E, F**) wurde mit Staurosporin behandelt, die unterste Zeile (**G, H, I**) mit Miltefosin. Die erste Spalte (**A, D, G**) bildet Kaninchen-anti-EndoG/anti-Kaninchen-A488 ab, die zweite Spalte (**B, E, H**) Selbiges plus Phasenkontrast, die dritte Spalte (**C, F, I**) zusätzlich DAPI. Weiße gefüllte Pfeile deuten auf das intrazelluläre Signal der EndoG Färbung, gestrichelte Pfeile auf mit DAPI angefärbte Zellkerne und Kinetoplasten. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Abkürzungen: α bedeutet anti, DAPI bedeutet 4′,6-Diamidin-2-phenylindol, EndoG für Endonuclease G, Rb steht für rabbit. Die Experimente zur Abbildung 31 wurden durchgeführt von Frau Julia Garz im Rahmen ihrer Bachelorarbeit „The role of reactive oxygen species in the death and life of *Leishmania major*“ (Garz 2010).

Der nächste Teil dieser Arbeit sollte nun die funktionelle Bedeutung der Endonuclease G im Rahmen apoptotischer Prozesse bei stimulierten *Leishmania major* Protozoen beleuchten. Hierzu war eine Inhibition des Enzymes und einhergehend die Analyse des Einflusses auf die mit Stimulanzien erzielbare Apoptoserate geplant.

3.12. Inhibition der Endonuclease G mittels Aurintricarbonsäure

In den vorausgegangenen Abschnitten der Arbeit konnte eine Zunahme der relativen Proteinmenge an Endonuclease G, sowohl nach Stimulation mit Staurosporin als auch mit Miltefosin, beobachtet werden. Außerdem zeigte sich eine gesteigerte Intensität auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Rb α EndoG / α Rb A488 Färbung für beide Stimulanzien. Sollte die EndoG gemäß der hier angenommenen Hypothese für die Degradierung der DNA bei Leishmanien mitverantwortlich sein, so kann durch die Inhibition des Enzymes eine verringerte DNA Degradierung während der Apoptoseinduktion angenommen werden. In den folgenden Experimenten sollte nun die Auswirkung einer Blockade der Endonuclease G mittels Aurintricarbonsäure (ATA) getestet werden. In Vorversuchen zeigte sich 50 µM ATA als effektive Konzentration, da keine durch ATA hervorgerufenen Einflüsse auf die Vitalität der Kontrollpopulation in Hinblick auf Zellmorphologie und Zellzyklusverhalten erkenntlich wurden.

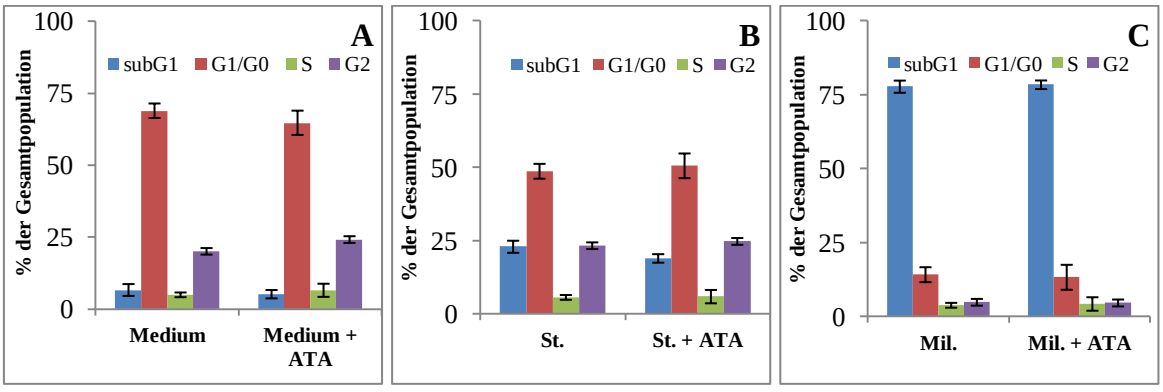

Abbildung 32: Änderung der Zellzyklusphasen bei Promastigoten durch ATA. Die Versuchsreihe wurde mit Promastigoten aus Tag drei der Flüssigkultur durchgeführt. Nach 2 h Präinkubation mit Aurintricarbonsäure (ATA) erfolgte für 18 h die Stimulation mit Staurosporin und Miltefosin und nachfolgend die Färbung mit Propidiumiodid und FACS Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 4) ± Standardfehler. **A** zeigt die Mediumkontrolle, **B** zeigt die Staurosporin Stimulation, **C** zeigt mit Miltefosin stimulierte Promastigoten. Aufgetragen ist der Prozentsatz der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase, gemessen an der Gesamtheit der Zellen. Mil. steht für Miltefosin, St. steht für Staurosporin, Zellzyklusphasen: (■) subG1 Phase, (■) G1/G0 Phase, (■) S Phase, (■) G2 Phase.

Die Analyse der Wirkung einer EndoG Inhibierung erfolgte an drei Tage alten Promastigoten (Abbildung 32) sowie an frisch isolierten Amastigoten (Abbildung 33), welche mit ATA 2 h präinkubiert, nachfolgend mit Staurosporin und Miltefosin stimuliert, danach mit Propidiumiodid gefärbt und im FACS analysiert wurden. Bei den Promastigoten zeigte sich kein signifikanter Einfluss von ATA auf die Größe der subG1 Populationen in den untersuchten Konditionen. Die Abnahme der subG1 Population von 23,0 % ± 3,3 % in der mit Staurosporin stimulierten Kondition auf 19,0 % ± 1,0 % nach Präinkubation mit ATA und nachfolgender Stimulation mit Staurosporin (Abbildung 32 B) war statistisch nicht signifikant. Auch in der mit Miltefosin stimulierten Bedingung gab es keine signifikante Änderung (Abbildung 32 C).

Für die Amastigoten ergaben sich die folgenden Änderungen, die Präinkubation mit ATA hatte keinen Einfluss auf die Mediumkontrolle (Abbildung 33 A), die subG1 Population war mit 6,1 % ± 2,0 % (ohne ATA) respektive 7,6 % ± 1,9 % (mit ATA) nicht signifikant unterschiedlich. Für die mit Staurosporin stimulierten Amastigoten (Abbildung 33 B) zeigte sich eine Abnahme der subG1 Population, welche der Subpopulation an Zellen mit hypoploider DNA entspricht, von 32,2 % ± 9,0 % in der mit Staurosporin stimulierten Kondition auf im Mittel 23,1 % ± 3,9 % nach vorausgegangener Inkubation mit ATA. Im Falle der mit Miltefosin stimulierten Amastigoten ergab sich kein signifikanter Unterschied mit 9,8 % ± 4,3 % zu 11,3 % ± 2,0 % im Vergleich der Konditionen ohne und mit vorausgegangener ATA Inkubation (Abbildung 33 C).

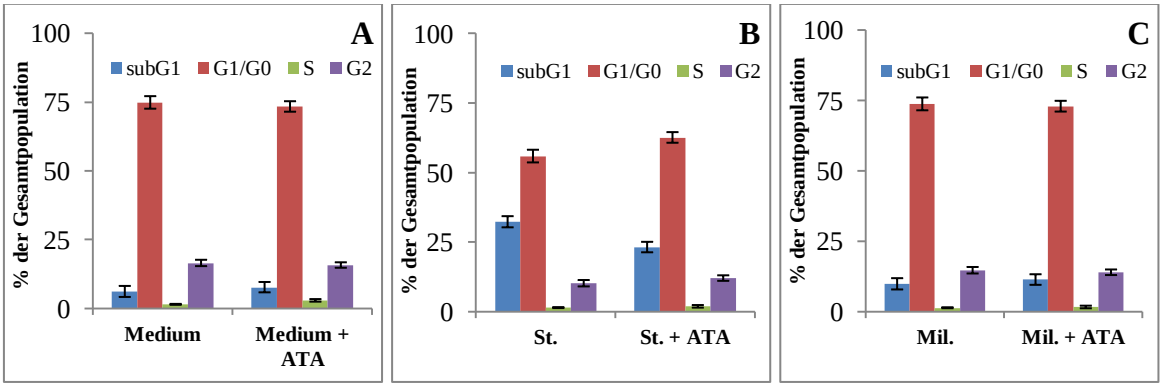

Abbildung 33: Änderung der Zellzyklusphasen bei Amastigoten durch ATA. Die Versuchsreihe wurde mit frisch isolierten axenisch generierten Amastigoten durchgeführt. Nach Präinkubation (2 h) mit Aurintricarbonsäure (ATA) erfolgte für 18 h die Stimulation mit Staurosporin und Miltefosin und darauf folgend die Färbung mit Propidiumiodid und die Analyse im FACS. Dargestellt ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 4) ± Standardfehler. **A** zeigt die Mediumkontrolle, **B** zeigt die Staurosporin Stimulation, **C** zeigt mit Miltefosin stimulierte Parasiten. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen im Verhältnis zur Gesamtheit der Zellen. Mil. steht für Miltefosin, St. steht für Staurosporin, Zellzyklusphasen: (■) subG1 Phase, (■) G1/G0 Phase, (■) S Phase, (■) G2 Phase.

3.13. Suche nach unbekannten Mediatoren der Apoptose auf Proteinebene

Um die Einflüsse der Proteinregulation auf Prozesse während der Apoptose nach Stimulation der Leishmanien zu untersuchen, wurde in verschiedenen Konzentrationen Cyclohexamid (CX) zur Blockade der Proteinbiosynthese eingesetzt und nachfolgend die Stimulation mit Staurosporin durchgeführt. Die Präinkubation dauerte zwei Stunden, die nachfolgende Stimulation erfolgte für 18 Stunden. Die Analyse des Effekts von Cyclohexamid erfolgte durch AnxV Färbung und FACS Messung.

Im Falle der Promastigoten (Abbildung 34 A) zeigte die Mediumkontrolle nach der Behandlung mit 2,5 mM Cyclohexamid einen signifikanten Anstieg der Annexinpositivität auf durchschnittlich 11,2 % ± 0,9 % von ursprünglichen 6,1 % ± 0,3 %. Der Anteil der AnxV Farbstoff positiven Zellen stieg von 16,9 % ± 0,3 % in der Staurosporin stimulierten Kondtition auf durchschnittlich 33,3 % ± 0,8 % bei zusätzlicher vorheriger Applikation von CX, die Differenz ist statistisch hoch signifikant.

Bei den Amastigoten (Abbildung 34 B) zeigte sich im selben Versuchssetting kein signifikanter Einfluss von CX auf die Mediumkontrolle mit durchschnittlich 11,1 % ± 0,5 % Annexin positiven Zellen ohne und 11,7 % ± 0,2 % mit CX Applikation. Die Änderung zwischen reiner Staurosporin Stimulation mit einer Subpopulation von 26,8 % ± 0,1 % apoptotischen Zellen und vorausgegangener CX Applikation mit einem Anteil von 41,6 % ± 1,0 % positiven Zellen ist statistisch hoch signifkant.

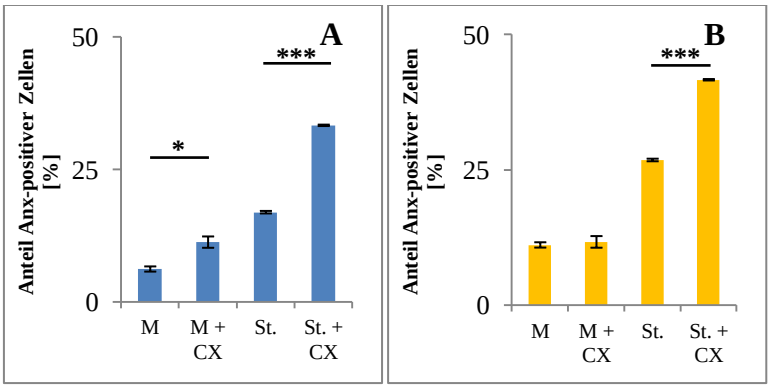

Abbildung 34: Apoptoserate durch Cyclohexamid bei Promastigoten und Amastigoten. Die abgebildeten Daten bilden den Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler ab. Untersucht wurden drei Tage alte Promastigote aus Flüssigkultur sowie frisch via Gradient isolierte Amastigote. Nach 2 h Präinkubation mit Cyclohexamid (CX) erfolgte die Stimulation (18 h) mit Staurosporin und Miltefosin und nachfolgend die Färbung mit AnxV Farbstoff sowie die FACS Analyse. Abbildungsteil **A** zeigt Werte für prozyklische Promastigoten (■), Abbildungsteil **B** zeigt Resultate für Amastigoten (■). Angegeben ist der Prozentsatz der mit Annexin Farbstoff anfärbbaren Zellen als Anteil der Gesamtpopulation. Anx steht für Annexin, CX steht für Cyclohexamid, M steht für Mediumkontrolle, St. steht für Staurosporin. Signifikante Änderungen markiert durch * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Insgesamt betrachtet lässt sich für diesen Abschnitt der Arbeit festhalten, dass sowohl bei Promastigoten als auch bei Amastigoten durch die Anwendung von CX, zur Inhibition der Proteinbiosynthese, eine signifikant gesteigerte Apoptoseinduktion durch Staurosporin möglich war. Dies spräche für die Blockade antiapoptotischer Proteine, deren Existenz an dieser Stelle angenommen wird. Zudem zeigte sich bei Promastigoten nach Anwendung von CX auf die Mediumkontrolle, dass hierbei eine signifikant gesteigerte AnxV Anfärbung auftrat. Somit wäre auch hier die Inhibition von für das Überleben bedeutenden Proteinen denkbar. Zur weiteren Abklärung dieser Hypothese wurden Proben zur massenspektrometrischen Analyse aufbereitet.

3.14. Massenspektrometrische Analyse der Protozoen

Zur Untersuchung der Hoch- und Herunterregulation von Proteinen, wurden Leishmanien als massenspektrometrische Proben und zur Untersuchung an Stefan Tenzer (PhD, Institut für Immunologie der Universität Mainz) und Univ.-Prof. Dr. med. Esther von Stebut-Borschitz (Universitäts-Hautklinik Mainz) gesandt.

Die erhaltenen Daten wurden nachfolgend statistisch ausgewertet, wobei nach signifikanten Regulationen von Proteinen, derer es 707 unterschiedliche in den zu untersuchenden Proben gab, gesucht wurde. Im Fokus sollten hierbei Proteine stehen, welche einen signifikanten Unterschied zwischen der Ausgangskondition, also der Mediumkontrolle und der mit Staurosporin stimulierten (18 h) Kondition zeigten. Dies wurde für prozyklische Promastigoten, für metazyklische Promastigoten und für axenisch generierte Amastigoten analysiert. Die statistische Auswertung wurde unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur durchgeführt um die Alphafehlerkumulation der multiplen Paarvergleiche zu neutralisieren.

Es konnten 123 Proteine identifiziert werden, welche in einer oder mehreren Konditionen im Vergleich zu den übrigen Konditionen signifikant hochreguliert waren (Abbildung 35 A). 13 Proteine waren bei prozyklischen Promastigoten erhöht, 3 bei Staurosporin stimulierten Promastigoten, 74 bei metazyklischen Promastigoten, 16 bei axenischen Amastigoten, 6 bei Staurosporin stimulierten Amastigoten und weitere 11 sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Amastigoten.

Bei 200 Proteinen zeigte sich in einer oder mehreren Konditionen eine signifikante Herunterregulation (Abbildung 35 B). Bei prozyklischen Promastigoten waren dies 3 Proteine, nach Staurosporin Stimulation 7, sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Promastigoten 5 gemeinsame Proteine. Bei metazyklischen Promastigoten waren 79 Proteine herunterreguliert, bei axenischen Amastigoten 13 ohne und 22 mit Staurosporin Stimulus. Als Überschneidung der beiden Konditionen zeigten sich 50 herunterregulierte Proteine. Weitere Schnittmengen ergaben sich aus stimulierten Amastigoten und prozyklischen Promastigoten mit einem Protein, aus stimulierten Promastigoten und metazyklischen Promastigoten ebenfalls mit einem Protein, aus axenischen Amastigoten und metazyklischen Promastigoten mit einem Protein, aus stimulierten Amastigoten und metazyklischen Promastigoten mit 4 Proteinen, aus prozyklischen Promastigoten und metazyklischen Promastigoten und Apoptose induzierten Promastigoten mit 10 Proteinen, aus metazyklischen Promastigoten und axenischen Amastigoten und Apoptose stimulierten Amastigoten mit 3 Proteinen, sowie aus prozyklischen Promastigoten, axenischen Amastigoten und Staurosporin stimulierten Amastigoten mit einem Protein.

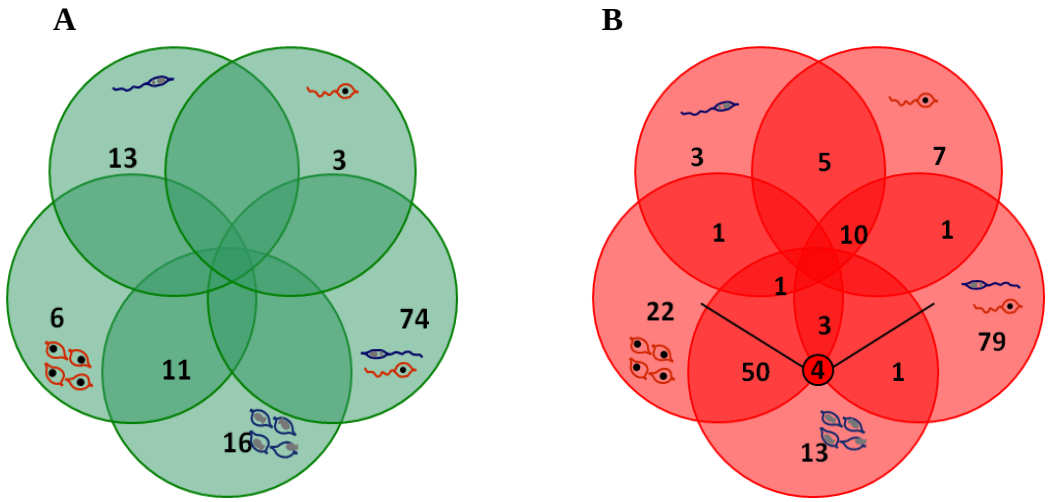

Abbildung 35: Zahl spezifisch regulierter Proteine bei Amastigoten und Promastigoten. Veranschaulicht wird die Hochregulation von Proteinen in **A** (grün), die Herunterregulation von Proteinen in **B** (rot). Blaue Figuren kennzeichnen vitale Leishmanien (Mediumkontrolle), rote Figuren markieren apoptotische Leishmanien, gemischte Populationen (rote und blaue Promastigoten) stehen für die metazyklische Lebensform. Schwarze Zahlen stehen für die Anzahl an Proteinen, welche für die jeweiligen Konditionen spezifisch reguliert sind. Zahlen in Schnittmengenfeldern stehen für Proteine, welche in den an den Schnittmengenfeldern beteiligten Konditionen signifikant hoch oder herunter reguliert vorliegen. Beispiel aus Abbildung 35 **A**: für apoptotische Amastigoten und vitale Amastigoten ergibt sich eine Schnittmenge aus 11 signifikant hochregulierten Proteinen.

Um Mediatoren der Apoptose unter den identifizierten Proteinen auszumachen, wurden diejenigen Proteine betrachtet, welche sich in den mit Staurosporin stimulierten Konditionen sowohl bei axenischen Amastigoten als auch bei prozyklischen Promastigoten im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle hoch- oder herunterreguliert zeigten. Somit könnten sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine unter den in Tabelle 9 aufgeführten Proteinen zu finden sein.

Tabelle 9: Synopsis regulierter Proteine bei Promastigoten und Amastigoten. Darstellung von 16 exemplarisch ausgewählten Proteinen, welche in spezifischen Konditionen signifikant hoch- oder herunter-reguliert vorliegen. Die signifikante Regulation lag im Vergleich zur Mediumkontrolle vor. kDa bedeutet Kilodalton, LMJ steht für *Leishmania major*, MG steht für molekulares Gewicht.

	Proteinname	**MG [kDa]**	**LMJ Nummer**
Promastigoten 15 µM Staurosporin stimuliert			
Hoch-reguliert	Histone H2A *Leishmania major* strain Friedlin	13822	F29.1720
	Calpain-like Cystein Peptidase Clan CA Familie C2 *Leishmania*	17089	F20.1280
	Calmodulin *Leishmania major* strain Friedlin	16825	F09.0910
Herunter-reguliert	Ras related Rab 4 *Leishmania major* strain Friedlin	22166	F32.0490
	Surface Antigen Protein 2 *Leishmania major* strain Friedlin	66798	F12.0850
	Surface Antigen Protein 2 *Leishmania major* strain Friedlin	61847	F12.0760
	Transaldolase *Leishmania major* strain Friedlin	36963	F16.0760
Amastigoten 15 µM Staurosporin stimuliert			
Hoch-reguliert	10 kDa Heat Shock Protein *Leishmania major* strain Friedlin	10609	F26.0640
	Acetyl-CoA Synthetase *Leishmania major* strain Friedlin	78523	F23.0540
	Quinonoid Dihydropteridin Reductase *Leishmania major*	23551	F34.4360
	Tryparedoxin *Leishmania major* strain Friedlin	16544	F29.1160
Herunter-reguliert	Dipeptidyl Peptidase III Metallo Peptidase Clan M Family M49 *Leishmania major* strain Friedlin	75968	F05.0960
	Metallo Peptidase Clan MA E Family M3 *Leishmania major*	76568	F02.0740
	NADH Ubiquinon Oxidoreductase 78 Kd Subunit like Protein *Leishmania major*	28684	F18.1480
	Paraflagellar Rod Component *Leishmania major* strain Friedlin	68250	F09.1320
	Receptor Type Adenylat Cyclase b *Leishmania major*	143851	F17.0235

Beispielhaft stehen nun drei ausgewählte Targets im Fokus, welche als molekulare Bausteine der Apoptose in unbekannter Weise fungieren könnten. Hierzu ausgewählt wurde die Calpain-like Cystein Peptidase Clan CA Familie C2 Leishmania (CLCP), welche bei prozyklischen Promastigoten nach Staurosporin Stimulation hochreguliert war.

Im Falle der gleichfalls mit Staurosporin stimulierten axenisch generierten Amastigoten zeigte sich bei der Acetyl-CoA Synthetase (A-CoA S) eine Hochregulation; für die Dipeptidyl Peptidase III Metallo Peptidase Clan M Family M49 (DPPD) bestand die signifikante Regulation in einer Abnahme der Proteinmenge bei Amastigoten nach Staurosporin Stimulation.

3.15. Calpain-like Cystein Peptidase (F20.1280)

Als erstes, möglicherweise für das Überleben der Protozoen bedeutsames Enzym, wurde die Calpain-like Cystein Peptidase bei drei Tage alten Promastigoten untersucht. Die Analyse des Einflusses der CLCP auf die Apoptoseinduktion erfolgte mit Hilfe der Inhibition dieses Enzyms durch den Inhibitor MDL28170, welcher in einer Konzentration von 10 µM appliziert wurde (zwei Stunden vorausgehend zur Stimulation mit Staurosporin). Die durchflusszytometrische Auswertung der Proben ergab den in Abbildung 36 A gezeigten Sachverhalt; die Inhibition der CLCP resultierte in einem signifikanten Anstieg der Annexin V positiven Subpopulation von 5,4 % ± 1, 5 % in der Mediumkontrolle auf 28,2 % ± 5,1 % in der mit MDL28170 vorbehandelten Mediumkontrolle. Die Staurosporin Stimulation bewirkte im Mittel eine Annexin Positivität bei 29,4 % ± 4,1 % der Population, dieser Wert sank statistisch signifikant auf durchschnittlich 11,7 % ± 1,5 % nach vorausgegangener MDL28170 Applikation.

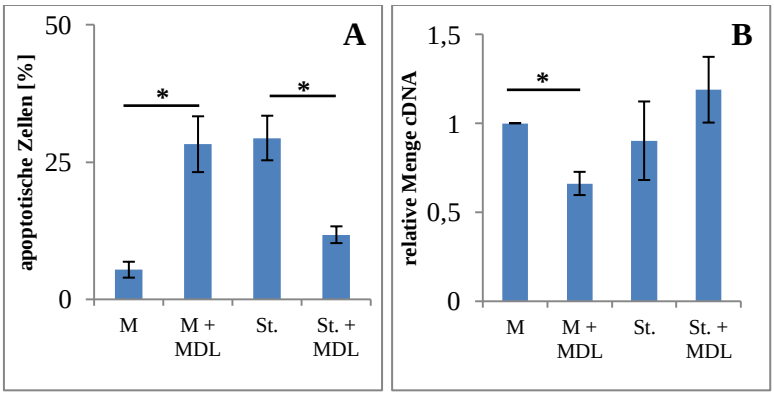

Abbildung 36: Wirkung von MDL28170 auf die Calpain-like Cystein Peptidase bei Promastigoten. Dargestellt ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler, durchgeführt an drei Tage alten Promastigoten. Nach 2 h Präinkubation mit 10 µM MDL28170 erfolgte die Stimulation mit Staurosporin (18 h) und nachfolgend die Färbung mit AnxV Farbstoff (**A**) sowie die FACS Analyse. Abbildungsteil **B** zeigt Daten aus der Isolation der RNA und nachfolgender Generierung von cDNA und LightCycler Analyse. Angegeben ist der Prozentsatz der für AnxV Farbstoff positiven Zellen als Anteil der Gesamtpopulation (**A**), außerdem die relative cDNA Menge in Bezug zur Mediumkontrolle (**B**). cDNA steht für komplementäre DNA, M steht für Mediumkontrolle, MDL steht für MDL28170, St. steht für Staurosporin. Signifikante Änderungen markiert durch * $p < 0,05$.

Die Isolation von RNA, die daraus erfolgte Generierung von cDNA und deren quantitative Analyse in der quantitativen PCR ergab die Daten, welche grafisch in Abbildung 36 B dargestellt sind. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der relativen Menge an CLCP cDNA nach Applikation von MDL28170 im Vergleich zur Mediumkontrolle auf die durchschnittlich 0,7 ± 0,1-fache Menge. Die übrigen zu beobachtenden Änderungen, darunter ein Anstieg der relativen Menge auf das 1,2 ± 0,2-fache des Ausgangswertes nach MDL und Staurosporin Applikation waren statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Versuchsreihe ein signifikanter Anstieg der AnxV positiven Subpopulation bei Promastigoten, nach Inhibition des Enzymes CLCP mit dem Wirkstoff MDL28170, festgestellt wurde. Zudem zeigte sich im Light Cycler die relative cDNA Menge der CLCP nach MDL28170 Applikation verringert.

3.16. Acetyl-CoA Synthetase *Leishmania major* strain Friedlin

Die in der Massenspektrometrie gefundene Hochregulation des Enzyms Acetyl-CoA Synthetase, sowie die gleichsinnige Regulation der Acyl-CoA Synthetase bei den axenisch generierten Amastigoten soll im Folgenden durch Blockade des Enzyms mittels Triacsin C näher untersucht werden. Im Fokus steht auch hier die Frage, ob die Blockade des Enzymes einen Einfluss auf die Apoptoseindukation durch das Chemotherapeutikum Staurosporin in 15 µM Konzentration hat und somit ein Teil der Apoptosemaschinerie bei den Protozoen sein könnte.

Die Analyse der Amastigoten (siehe Abbildung 37 A) mittels Annexin V Färbung und Detektion im FACS zeigte keine signifikante Änderung der Anwendung von 15 µM Triacsin C auf die Mediumkontrolle.

Nach vorausgegangener Inkubation mit 15 µM Triacsin C und nachfolgender Stimulation mit 15 µM Staurosporin ergab sich eine Abnahme der durchschnittlichen Größe der AnxV positiven Subpopulation. Diese lag bei alleiniger Staurosporin Stimulation bei 62,8 % ± 9,7 % und sank um 17,2 % auf 45,6 % ± 3,5 % nach zweistündiger Präinkubation mit Triacsin C. Dieser Rückgang war jedoch statistisch nicht signifikant.

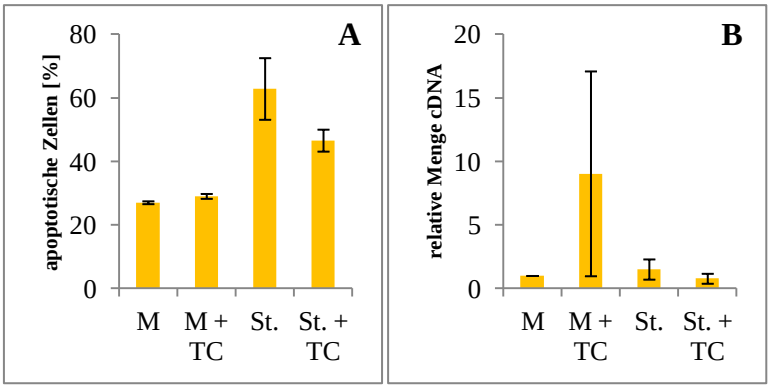

Abbildung 37: Wirkung von Triacsin C auf die Acetyl-CoA Synthetase bei Amastigoten. Abgebildet ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler, durchgeführt an frisch isolierten Amastigoten. Nach 2 h Präinkubation mit 15 µM Triacsin C erfolgte die Stimulation mit Staurosporin (18 h) und anschließend die Färbung mit AnxV Farbstoff (**A**) sowie die FACS Analyse. Abbildungsteil **B** zeigt Resultate aus der Isolation der RNA und der nachfolgenden Generierung von cDNA und Light Cycler Analyse. Angegeben ist der Prozentsatz der AnxV positiven Zellen als Anteil der Gesamtpopulation (**A**), sowie die relative cDNA Menge in Bezug zur Mediumkontrolle (**B**). cDNA steht für komplementäre DNA, M steht für Mediumkontrolle, St. steht für Staurosporin, TC für Triacsin C.

Die Analyse der RNA-Menge, welche über Generierung von cDNA und deren quantitative Analyse im Light Cycler erfolgte, ergab die Daten zur Abbildung 37 B. Es konnte eine Zunahme der relativen Menge an Acetyl-CoA Synthetase cDNA nach Inkubation mit Triacsin C im Vergleich zur Mediumkontrolle auf die im Mittel 9,0 ± 8,1-fache Menge beobachtet werden, dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Nach Staurosporin Stimulation stieg die Menge auf das 1,5 ± 0,8-fache des Ausgangswertes an, die Inhibition mittels Triacsin C zusätzlich zur Staurosporin Anwendung führte zu einem Rückgang auf das 0, 8 ± 0,4-fache des Mediumwertes. Beide Änderungen waren nicht statistisch signifikant.

3.17. Dipeptidyl Peptidase III Metallo Peptidase Clan M Family M49 *Leishmania major* strain Friedlin

Die statistisch auffällige Regulation des Enzymes Dipeptidyl Peptidase III trat bei axenisch generierten Amastigoten auf und bestand wie Tabelle 9 zu entnehmen ist, in einer Herunterregulation der Enzymmenge nach Staurosporin Stimulation.

Das Enzym Dipeptidyl Peptidase III kann mit 3,4-Dichloroisocoumarin inhibiert werden. Zur Untersuchung des Einflusses dieser Metallo Peptidase wurde der Hemmstoff in einer Konzentration von 20 µM angewandt. Die Inhibition erfolgte im experimentellen Setting zwei Stunden vor der Applikation von Staurosporin (18 h) zur Apoptoseinduktion. Im

Fokus stand dabei zunächst die Auswirkung auf die Phospholipid Externalisation, angefärbt mit Annexin V Farbstoff, gemessen im FACS und dargestellt in Abbildung 38 A. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme der Annexin bindenden Zellen nach 3,4-Dichloroisocoumarin Inkubation im Vergleich zur Mediumkontrolle auf durchschnittlich 69,7 % ± 0,9 % der Population.
Unter Staurosporin Stimulation gingen 50,9 % ± 11,5 % der Protozoen in Apoptose, nach vorausgegangener Inkubation mit 3,4-Dichloroisocoumarin lag der Wert bei 67,0 % ± 1,7 %. Die Änderung zwischen der Staurosporin Kondition und der zusätzlich mit 3,4-Dichloroisocoumarin präinkubierten Staurosporin Stimulation waren im Vergleich nicht statistisch signifikant.

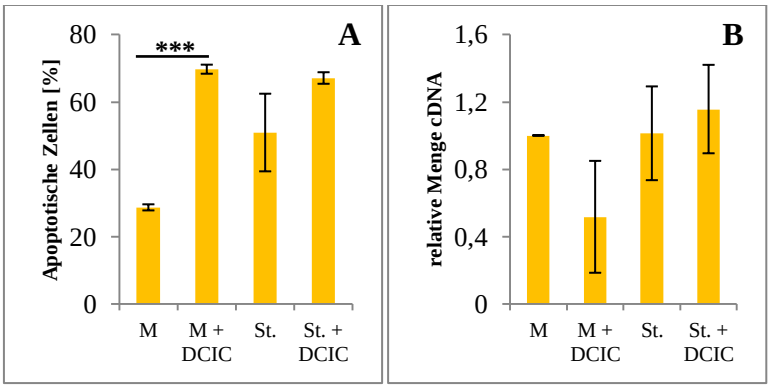

Abbildung 38: Auswirkung von 3,4-Dichloroisocoumarin auf die Dipeptidyl Peptidase III bei Amastigoten. Grafisch dargestellt ist der Mittelwert aus unabhängigen Experimenten (n = 3) ± Standardfehler, erhoben an frisch isolierten Amastigoten. Nach 2 h Präinkubation mit 20 µM 3,4-DCIC erfolgte die Stimulation mit Staurosporin (18 h) und konsekutiv die Färbung mit AnxV Farbstoff (**A**) und die FACS Analyse. Abbildungsteil **B** zeigt Ergebnisse aus der Isolation von RNA und der nachfolgenden Generierung von cDNA sowie Light Cycler Analyse. Abgebildet ist der Prozentsatz der AnxV positiven Zellen als Anteil aller Zellen (**A**), sowie die relative cDNA Menge in Bezug zur Mediumkontrolle (**B**). cDNA steht für komplementäre DNA, DCIC steht für 3,4-Dichloroisocoumarin, M bedeutet Mediumkontrolle, St. steht für Staurosporin.

Die Darstellung der mittels Light Cycler gewonnen Daten zur relativen Menge an cDNA der Dipeptidyl Peptidase III im Verhältnis zur Negativkontrolle, erfolgte ebenfalls unter der Inhibition mittels 3,4-DCIC und ist in Abbildung 38 B wiedergegeben.

Beobachtet wurde eine Abnahme der relativen cDNA Menge der Dipeptidyl Peptidase III nach Inkubation mit 3,4-DCIC im Vergleich zur reinen Mediumkontrolle auf die gemittelt 0,5 ± 0,3-fache Menge, ohne statistische Signifikanz zu besitzen. Nach Applikation von Staurosporin stieg die Menge auf das 1,0 ± 0,1-fache des Wertes der Mediumkontrolle an. Die Inhibition der Peptidase mittels 3,4-DCIC vorausgehend zur Stimulation mit

Staurosporin induzierte einen Anstieg auf das 1,2 ± 0,3-fache der cDNA Menge in der Mediumkontrolle. Die letztgenannten beiden Änderungen waren statistisch nicht signifikant.

Abschließend lässt sich für die Versuchsreihe zur DPPD eine signifikante Zunahme der Annexin bindenden Subpopulation der Amastigoten nach vorheriger 3,4-DCIC Inkubation im Medium im Vergleich zur Negativkontrolle festhalten.

4. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war zunächst die Analyse und Modulation bekannter Apoptose Mediatoren bei Protozoen, und darüber hinaus die Identifikation neuer molekularer Mechanismen im Rahmen apoptotischer Vorgänge, wobei die Untersuchungen an Amastigoten und Promastigoten Erregern der Spezies *Leishmania major* erfolgten. Die in biphasischer Flüssigkultur gezüchteten Leishmanien zeigten im zeitlichen Verlauf der Kultur eine größer werdende Subpopulation an Zellen mit morphologischen Charakteristika der Apoptose, wobei die Anfärbbarkeit mit Annexin Farbstoffen sowie die Analyse der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie (FACS) als Parameter dienten. Die *in vitro* Stimulation der Protozoen mit dem Proteinkinase Inhibitor Staurosporin sowie mit dem Chemotherapeutikum Miltefosin führte zur Induktion einer signifikanten Subpopulation aus apoptotischen Zellen. Hierbei zeigten Amastigoten und Promastigoten eine differierende Suszeptibilität gegenüber den eingesetzten Stimulanzien. Die FACS Analyse des DNA Gehaltes der Zellen mit Propidiumiodid (PI) Färbung bestätigte durch den Nachweis einer induzierbaren hypoploiden Zellfraktion das apoptotische Potential beider Stimulanzien sowohl bei Promastigoten als auch bei Amastigoten.

Nachfolgend wurde die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen der Apoptoseinduktion analysiert. Hierbei gelang der Nachweis von physiologischerweise ROS negativen Promastigoten und ROS positiven Amastigoten. Zudem konnte eine Änderung hin zur ROS Positivität bei nahezu allen Zellen der Promastigoten Population nach Staurosporin Stimulation beobachtet werden. Die postulierte Bedeutung von ROS für den Ablauf der Apoptose bei Leishmanien sollte somit durch den ROS Fänger N-Acetylcystein (NAC) moduliert werden. Der nach NAC Inkubation erzielte Rückgang der Größe der hypoploiden Subpopulation wurde als Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der ROS Homöostase und der Apoptose gewertet.

Die nachfolgenden Experimente sollten eine mögliche Regulation des als antiapoptotisch beschriebenen Enzymes *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase (LmAPX) im Rahmen von Stimulationsversuchen eruieren, wobei für die LmAPX eine Abnahme der relativen Proteinmenge für *Leishmania major* nach Stimulation nachgewiesen werden konnte. Im Light Cycler sowie in der Fluoreszenzmikroskopie fand sich gleichermaßen eine Verringerung der LmAPX cDNA respektive des LmAPX Fluoreszenzsignals. Dies wurde als Hinweis auf eine antiapoptotische Wirkung der LmAPX gewertet. Im Fall des Enzymes

Endonuclease G (EndoG) bestätigte die erhöhte relative Proteinmenge nach Stimulation Amastigoter und Promastigoter die Hypothese einer proapoptotischen Wirkungsweise, was mit Fluoreszenzmikroskopie optisch bestätigt wurde. Die Hypothese der Auswirkung einer Inhibition der EndoG mit Aurintricarbonsäure im Sinn einer verringerten induzierbaren Apoptoserate konnte hingegen nicht verifiziert werden.

Zur Identifikation neuer Enzyme im Kontext apoptotischer Prozesse wurde die Proteinbiosynthese der Protozoen mit Cyclohexamid (CX) blockiert, was in der Folge zu einem Anstieg der Apoptoserate nach Stimulation führte. In der Folge konnten 323 in relevanter Weise regulierte Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert werden, wovon drei Enzyme näher untersucht wurden. Die Calpain-like Cystein Peptidase zeigte in Inhibitionsversuchen eine möglicherweise antiapoptotische Funktion bei Promastigoten. Für die Acetyl-CoA Synthetase bei Amastigoten wurde in dieser Arbeit eine proapoptotische Funktion postuliert, was in Inhibitionsversuchen nicht bestätigt werden konnte. Die Dipeptidyl Peptidase III wurde bei Amastigoten inhibiert, wobei die gefundenen Ergebnisse die Hypothese einer antiapoptotischen Bedeutung stützen.

4.1. Morphologische Charakteristika der Apoptose bei *Leishmania major* Promastigoten und deren Wachstumsverhalten

Die für mehrzellige Eukaryonten beobachteten morphologischen Charakteristika der Apoptose wie die Externalisierung von Phospholipiden, der Abfall des Potentials über die Mitochondrienmembran sowie die Degradierung von Nukleinsäuren durch die Aktivität von Endonucleasen bei Erhalt der Zellmembranintegrität und damit fehlender Anfärbbarkeit mittels Propidiumiodid wurden in der Literatur in jüngerer Vergangenheit von verschiedenen Gruppen auch für einzellige Eukaryonten wie beispielsweise *Leishmania mexicana*, *Leishmania donovani* und *Leishmania major* beschrieben (Arnoult et al. 2002; Rico et al. 2009; Sen u. Das, et al. 2004; Shaha 2006; Zangger et al. 2002).

Der im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* beobachtete und als Apoptose klassifizierte Zelltod bei Promastigoten sowie Amastigoten wurde in der Literatur als Teil der Immunevasionsstrategie und als essentieller Bestandteil einer erfolgreichen Infektion des Wirtsorganismus mit Leishmanien beschrieben, er ist *in vivo* entscheidend für eine dauerhafte Infektion und entspricht dem virulenten Agens im Zuge des Lebenszyklus der

Leishmanien (da Silva u. Sacks 1987; Howard et al. 1987; Pimenta et al. 1991; van Zandbergen et al. 2006; van Zandbergen et al. 2010).

Um die Möglichkeit einer Apoptoseinduktion mit Agenzien *in vitro* zu testen, erfolgte die Inkubation der Leishmanien mit Staurosporin und Miltefosin. Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit sollte das apoptotische Potential der Stimulanzien eruiert werden.

4.2. Analyse der Apoptoserate durch Stimulation bei Amastigoten und Promastigoten

Die Untersuchung des apoptotischen Potentials von Staurosporin und Miltefosin, wobei letzteres als Chemotherapeutikum bei der Behandlung der viszeralen Leishmaniose Anwendung findet (Arnoult et al. 2002; Marinho et al. 2011; Shaha 2006), zeigte im Vergleich zu in der Literatur vorbeschriebenen Werten einen niedrigeren Anteil apoptotischer Zellen im Falle des Staurosporins (27 %); hierbei wurden Werte um 55 % Annexin positiver Zellen unter 4 µM Staurosporin beschrieben (Arnoult et al. 2002). Für Miltefosin liegt der in dieser Arbeit erzielte Wert im Bereich der von anderen Gruppen beobachteten Werte, publiziert wurden hierbei Daten reichend von 15,7 % Annexin positiven Zellen nach 40 µM Stimulation (Marinho et al. 2011) bis hin zu 50 % apoptotischen Zellen bei 25 µM Stimulation (Khademvatan et al. 2011). Die Unterschiede zwischen den vorliegenden Resultaten und der Literatur lassen sich nicht durch Inkubationszeiten erklären, diese waren mit 24 h identisch. Mögliche Ursachen liegen in unterschiedlichen Spezies der Leishmanien, in dieser Arbeit *Leishmania major*, in Publikationen bei Miltefosin *Leishmania amazoniensis* und *Leishmania donovani* (Marinho et al. 2011; Paris et al. 2004). Zudem stammten die Stimulanzien von verschiedenen Herstellern und die Annexin Färbeprotokolle wiesen Unterschiede auf. Für die Versuche dieser Arbeit zeigte sich ein höheres apoptotisches Potential bei Promastigoten *Leishmania major* für Miltefosin.

Für die axenisch generierten Amastigoten ergaben sich verglichen mit den Promastigoten in den durchgeführten Versuchen andere Apoptoseraten in den Stimulationskonditionen, was auf Unterschiede im Metabolismus und der Zellhomöostase hindeuten könnte. In der Mediumkontrolle zeigten sich drei Tage nach der Isolation der Amastigoten 9,1 % der Zellen anfärbbar für Annexin V Fluos, nach Staurosporin Stimulation waren dies 35,8 % und in der mit Miltefosin stimulierten Kondition 19,1 %. Damit beobachteten wir eine

höhere Suszeptibilität der Amastigoten für die Apoptoseinduktion mittels Staurosporin im direkten Vergleich zu den prozyklischen Promastigoten, wohingegen die Wirkung von Miltefosin bei den axenisch generierten Amastigoten eine geringere war.

4.3. Messung des DNA Gehaltes in Promastigoten und Amastigoten mittels Propidiumiodid Färbung

Neben der Externalisierung von Phospholipiden ist die Kondensation von Chromatin sowie die Degradierung von DNA bei gleichzeitig intakter Kernmembran ein entscheidendes Kriterium für das Vorliegen von Apoptose (Kerr et al. 1972; Weil et al. 1996). Die Anfärbung der Nukleinsäuren wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels modifiziertem Propidiumiodid Protokoll erreicht; die verschiedenen Anteile an protozoischen Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen konnten Aufschluss über die Wirkung der Stimulanzien geben, wobei ein Anstieg der subG1/G0-Phase, der auch als Zustand der Hypoploidie bezeichnet wird, sowie eine Abnahme des Anteils der Zellen in der G2- und S-Phase Kennzeichen für die Apoptoseinduktion waren (Alzate et al. 2006; BoseDasgupta et al. 2008; Khademvatan et al. 2011; Kumar et al. 2010; Rico et al. 2009).

In Hinblick auf die prozyklischen Promastigoten führte die Inkubation mittels Staurosporin zu einem signifikanten Anstieg des (subG1/G0)/(G2 und S) Quotienten von ursprünglich 0,2 in der Mediumkontrolle auf 1,0 nach der Stimulation. Somit stimulierte Staurosporin einen durchschnittlich fünffach höheren Anteil der Zellen in Apoptose zu gehen, als dies in der Mediumkontrolle der Fall war. Für Miltefosin ergab sich ein Quotient von 13,7. Dies lässt den Schluss zu, dass Miltefosin bei Promastigoten ein mehr als 13-faches Potential zur Induktion von DNA Kondensation und Degradierung in den vorliegenden Versuchen besaß.

Die Auswertung der durchflusszytometrisch bestimmten Daten für axenisch generierte Amastigoten ergab im Falle der Mediumkontrolle ein Verhältnis von hypoploiden und damit apoptotischen Zellen zu teilungsfähigen und vitalen Zellen in der G2- und S-Phase einen Wert von 0,2 und lag damit auf ähnlichem und nicht signifikant anderem Niveau als bei den prozyklischen Promastigoten. Für die Staurosporin Stimulation stieg das Verhältnis zu Gunsten der apoptotischen Zellfraktion auf signifikant höhere 1,7. Damit war die Apoptoseinduktion bei axenischen Amastigoten mittels Staurosporin ähnlich effektiv wie bei den prozyklischen Promastigoten. Für die Inkubation mit Miltefosin zeigte sich ein

anderes Bild, der Quotient lag hier bei 0,2, womit er nicht signifikant anders war als der Wert der Mediumkontrolle und somit keine Apoptoseinduktion bei Amastigoten durch Miltefosin mit dem Marker der DNA Degradierung nachweisbar war.

Zusammenfassend lässt sich für das vorhandene Datenmaterial sagen, dass sich Promastigoten für beide Agenzien suszeptibel mit Blick auf die Induktion von hypoploider Erbinformation und damit einer Landmarke der Apoptose zeigten, wobei Miltefosin das deutlich stärkere proapoptotische Potential aufwies. Amastigoten zeigten sich ähnlich empfindlich für durch Staurosporin induzierte DNA Degradierung und waren bezüglich dieses Parameters gleichzeitig unempfänglich für die Miltefosin Stimulation. Bei Letzterem wäre eine Kombination aus Annexin Färbung und Propidiumiodid Färbung möglicherweise aufschlussreich gewesen, da sich wie bereits beschrieben Amastigoten unter Miltefosin Stimulation mit Annexin Farbstoffen anfärben ließen. Eine solche Färbung wurde in jüngerer Literatur für *Leishmania amazonensis* Promastigoten beschrieben und zeigte hierbei eine hohe Übereinstimmung zwischen Propidiumiodid- und Annexin Färbung (Marinho et al. 2011). Eine Erklärung für die nicht signifikant erhöhte hypoploide Zellfraktion bei Amastigoten unter Miltefosin Stimulation besteht möglicherweise in dem zeitlich differenzierten Auftreten der apoptotischen Marker, wobei die Phospholipidexternalisation als frühapoptotischer Marker (Martin et al. 1995) und die DNA Degradierung tendenziell als spätapoptotischer Marker zu sehen sind.

4.4. Bedeutung und Vorkommen von verschiedenen Arten reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen der Apoptose

Die bislang beschriebenen Färbungen und Analysen bezogen sich auf zwei bedeutende Charakteristika der Apoptose – die Externalisierung von Phospholipiden und die Degradierung der DNA. Eine heterogene Gruppe von Molekülen, welche sowohl im Laufe der Apoptose als auch bei der Zellproliferationskontrolle ebenfalls von Bedeutung sind, stellen die reaktiven Sauerstoffspezies, kurz ROS, dar (Cadenas 2004; Lander et al. 1996). In der Vergangenheit wurde bereits die Apoptose induzierende Wirkung einzelner ROS diskutiert, so beispielsweise diejenige von H_2O_2 bei Promastigoten *Leishmania donovani* (Das et al. 2001) oder bei Promastigoten *Leishmania amazonensis* (Fonseca-Silva et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese verifiziert werden, die besagt, dass ROS die Induktion von Apoptose bei Promastigoten und Amastigoten *Leishmania major*

beeinflussen können. Desweiteren wird angenommen, dass ROS in ihrer Wirkung moduliert werden können und stadienspezifische Unterschiede im Vorkommen verschiedener Sauerstoffspezies bestehen und diese damit einen Einfluss auf die Vorgänge während der Apoptose besitzen.

Zunächst erfolgte die Färbung von prozyklischen Promastigoten und axenisch generierten Amastigoten mittels Dihydroethidium (DHE), welches für Superoxidanionen sensitiv ist, nicht jedoch für Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikale, Peroxynitrit-Anionen sowie hypochlorige Säure. Es zeigte sich, dass Promastigoten in unstimulierter Kondition zu über 98 % negativ für Superoxidanionen waren. Nach Stimulation mittels Staurosporin zeigte sich ein Anstieg der positiven Subpopulation auf über 99 %, unter Miltefosin hingegen lediglich auf 27,1 %. Für die Amastigoten ergab sich ein deutlich unterschiedliches Bild, selbige zeigten sich unstimuliert hoch positiv mit 92,7 % Anteil der Gesamtpopulation; nach Staurosporin Stimulation sank der Prozentsatz auf 79,6 %, für Miltefosin stieg er leicht auf 98,1%. Die stadienspezifischen Unterschiede des ROS Status der Leishmanien könnten in Zusammenhang mit den unterschiedlichen biochemischen Milieus, in denen Promastigoten und Amastigoten vorkommen, stehen. Hierbei ist der Prozess der Autophagie, welcher als ein Kontrollmechanismus für die Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten Leishmanien diskutiert wird und gleichzeitig für die Virulenz der protozoischen Infektion wichtig zu sein scheint (Besteiro et al. 2006; Williams et al. 2012), von Bedeutung. Für diesen Prozess, welcher in Situationen mit erhöhtem biochemischem Zellstress aktiv wird und entweder zu einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit der Zelle oder zum Eintritt in die Apoptose führen kann, wird eine Regulation durch ROS, beispielsweise durch H_2O_2 (Scherz-Shouval et al. 2007), vermittelt durch Redox-sensitive Proteasen diskutiert (Liu u. Lenardo 2007).

Die Schlussfolgerung, dass Staurosporin einen ROS vermittelten Apoptoseweg bei Promastigoten Leishmanien zu induzieren scheint, wurde durch die Färbungen mit den Farbstoffen 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H_2DCFDA) und Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) verifiziert, welche für Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikale und Peroxynitrit-Anionen (H_2DCFDA) respektive für Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit-Anionen sowie hypochlorige Säure (DHR 123) sensitiv sind und somit ein weiteres Spektrum an ROS im Vergleich zu DHE abdecken.

Bei den axenischen Amastigoten ergaben die Färbungen mit H_2DCFDA und DHE eine signifikante Abnahme des ROS Gehaltes nach Staurosporin Stimulation, sowie eine

signifikante Zunahme der ROS positiven Subpopulation nach Miltefosin Stimulation. Die Abnahme der ROS positiven Zellen könnte mit einem steigenden Anteil an apoptotischen Zellen unter der Staurosporin Stimulation zusammenhängen und gäbe einen Hinweis auf die entscheidende Rolle, welche die Homöostase der Sauerstoffspezies und die Balance zwischen Zelldifferenzierung einerseits und programmiertem Zelltod andererseits haben könnte.

Der Abgleich unterschiedlicher Spezifitäten der verschiedenen Farbstoffe in Hinblick auf die untersuchten reaktiven Sauerstoffspezies, ergab durch gegenseitigen Ausschluss das Vorkommen von Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikalen, Peroxynitrit-Anionen sowie hypochloriger Säure bei Promastigoten nach Stimulation durch Staurosporin und bei Amastigoten in allen getesteten Konditionen. Lediglich für Miltefosin zeigte sich ein alleiniges Auftreten von Hydroxyl-Radikalen nach Stimulation der Promastigoten. Der bislang nur lückenhaft verstandene Mechanismus, welcher der proapoptotischen Wirkung von Miltefosin bei Leishmanien zu Grunde liegt, könnte damit neben der in der Literatur postulierten Wirkung von Cystein-Proteasen (Khademvatan et al. 2011; Paris et al. 2004; Verma u. Dey 2004) auch die Änderung der ROS Homöostase beinhalten.

Neben den beschriebenen Veränderungen des Vorkommens von reaktiven Sauerstoffspezies im Zuge der Apoptose bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Modulation der apoptotischen Mechanismen, welche unter anderem durch die veränderte ROS Homöostase beeinflusst zu sein scheinen. Ein Agens, welches als Radikalfänger und Antioxidans experimentell Anwendung findet und klinisch als Mukolytikum bekannt wurde, ist N-Acetylcystein (NAC) (Aitio 2006; Zafarullah et al. 2003). Im Rahmen der Forschung mit Leishmanien wurde in der Vergangenheit eine protektive Wirkung von NAC bei Amastigoten *Leishmania donovani* beschrieben (Sudhandiran u. Shaha 2003). In den Versuchen dieser Arbeit konnte eine Minderung der ROS Induktion bei der Staurosporin Stimulation im Falle der Promastigoten um 39,0 % beobachtet werden, was die Hypothese der Minderung reaktiver Sauerstoffspezies durch NAC unterstützt (Zafarullah et al. 2003). Da diese Änderung mit einem p-Wert von 0,00001 hoch signifikant war, erfolgte die Analyse der Annexin Bindung und der hypoploiden Zellen in der Propidiumiodid Färbung. Für die Phospholipid Externalisation ergab sich keine signifikante Änderung, jedoch nahm die subG1 Phase nach Präinkubation mit NAC um hoch signifikante 43,8 % ab. Die Änderung dieser während der Apoptose zeitlich im Vergleich zur Phospholipid Externalisation später auftretenden Landmarke legt den

Schluss nahe, dass die Mechanismen, welche bei der DNA Degradierung und bei der Phospholipid Präsentation in unterschiedlichem Maße durch ROS beeinflussbar sind.

Für die axenisch generierten Amastigoten zeigten sich keine signifikanten Änderungen des ROS Gehaltes der Zellen im Vergleich von Mediumkontrolle und Staurosporin Stimulation. Entsprechend war auch kein Unterschied in der Phospholipid Externalisierung unter der Wirkung von NAC mittels Annexin Färbung detektierbar. Überraschenderweise zeigte sich jedoch in der PI Färbung ein signifikanter Rückgang der hypoploiden Zellfraktion für die mit 1600 µM inkubierten und nachfolgend mit Staurosporin stimulierten Zellen um 25,4 % im Vergleich zur Staurosporin Stimulation ohne NAC Präinkubation. Dies könnte bedeuten, dass entweder die ROS Färbung nicht korrekt ausgeführt wurde, was jedoch bei mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen sowie unter Berücksichtigung der vorab genannten Ergebnisse nicht wahrscheinlich erscheint. Eine andere Erklärung könnte darin bestehen, dass die Detektion der ROS Elimination durch NAC mittels FACS Färbung nicht sensitiv genug war, jedoch zelluläre Effekte im Sinne von degradierter DNA mit PI Färbung sensitiver bestimmt werden konnten.

Zur weiteren Verifizierung der beobachteten Effekte bei der Analyse der ROS Level und der Auswirkungen von NAC auf die Apoptose Induktion mittels durchflusszytometrischer Messungen erfolgte die Messung von Enzymexpression nach Stimulation mittels Western Blot und quantitativer Polymerasekettenreaktion.

4.5. Analyse der Enzymregulation unter Apoptose Stimulation im Fall der *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase

Die Erkenntnisse über die ROS Entstehung sowie deren Auftreten und deren Modulation während der Apoptoseinduktion führten zur Frage, welche Enzyme an deren Metabolismus in den protozoischen Zellen beteiligt sind. In jüngerer Vergangenheit wurde in diesem Zusammenhang das Enzym *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase (LmAPX) näher untersucht, da es im Intermembranraum der Innenseite der Kinetoplasten lokalisiert ist (Dolai et al. 2009) und strukturell sowie funktionell anderen Peroxidasen, wie der Hefen Peroxidase, ähnelt (Jasion et al. 2011). Es konnte demonstriert werden, dass die LmAPX eine entscheidende Rolle bei der Abwendung von zellulären Schäden durch die reaktive Wirkung von verschiedenen ROS, darunter H_2O_2, hat und im experimentellen Setting eine

Überexpression protektiv und antiapoptotisch wirkt (Adak u. Datta 2005; Dolai et al. 2008; Dolai et al. 2009;). Funktionell scheint die LmAPX ein Hybrid aus Cytochrom C Peroxidase und Ascorbat Peroxidase zu sein (Dolai et al. 2007; Dolai et al. 2008). Zudem ist sie möglicherweise auch für die Zelldifferenzierung sowie die Etablierung einer dauerhaften Infektion in Zusammenhang mit der Umwandlung der prozyklischen Promastigoten zu metazyklischen Promastigoten von Bedeutung (Pal et al. 2010; Yadav et al. 2011).

In dieser Arbeit wurde die Regulation des Enzyms in stimulierten Konditionen im Vergleich zur *in vitro* Kontrolle bestimmt. Bei den prozyklischen Promastigoten zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der Enzymmenge nach Staurosporin Stimulation im Western Blot. Im Fall der Miltefosin Stimulation kam es zu einer signifikanten Reduktion auf 51,6 % des Referenzwertes. Eine Reduktion der Menge dieses in der Literatur als möglicherweise antiapoptotisch beschriebenen Enzymes (Dolai et al. 2009) ist eine denkbare Erklärung für die Wirkungsweise der Apoptose induzierenden chemischen Agenzien. Mit dieser Deutung kann allerdings nicht die Beobachtung erklärt werden, dass sich die Staurosporin und Miltefosin Stimulationen der prozyklischen Promastigoten in Hinblick auf das Vorkommen verschiedener Arten von ROS deutlich unterscheiden, da die Enzymmenge in beiden Konditionen im Vergleich zur Mediumkontrolle verringert und überdies bei Miltefosin noch niedriger als bei Staurosporin war. Dies steht in scheinbarem Gegensatz zur Beobachtung, dass die ROS Level in Promastigoten nach Staurosporin Stimulation deutlich höher waren als unter Miltefosin Gabe. Eine denkbare Erklärung wäre, dass die Hauptwirkung von Miltefosin ROS unabhängig einsetzt und die Herunterregulation von LmAPX lediglich ein Nebeneffekt sein könnte, wohingegen im Falle von Staurosporin die Verringerung der LmAPX Menge ein relevanter Teil der proapoptotischen Wirkungsweise sein könnte.

Die densitometrische Auswertung der Daten für axenische Amastigoten ergab eine hoch signifikante Reduktion der LmAPX Menge auf 44,8 % des Wertes der Mediumkontrolle nach Staurosporin Stimulation sowie eine nicht signifikante Abnahme der Proteinmenge nach Miltefosin Stimulation. Die gemessene Abnahme der Enzymmenge im Falle der Miltefosin Stimulation erscheint logisch in Zusammenhang mit den vorab detektierten angestiegenen ROS Leveln, da hier möglicherweise, unter Berücksichtigung der Spezifität von H_2DCFDA und DHR, ein Anstieg an H_2O_2 beobachtet wurde, was mit der unlängst

publizierten Aktivität der LmAPX als Cytochrom C ähnliche Peroxidase konform gehen würde (Jasion et al. 2011; Jasion u. Poulos 2012).

Für die mit Staurosporin stimulierten Amastigoten ergibt sich ein differenziertes Bild, da es trotz der gemessenen Abnahme der Menge an LmAPX gleichsinnig zu einer Abnahme des Anteils ROS positiver Zellen kam. Dieser Widerspruch könnte dadurch erklärt werden, dass Staurosporin bei Amastigoten eine andere Wirkung zeigt als bei Promastigoten, da die Amastigoten physiologisch in den *in vitro* Kulturen hoch positiv für ROS waren, was angesichts des im Phagolysosom der Makrophagen herrschenden oxidativen Milieus im Rahmen einer Leishmanien Infektion beim Menschen plausibel erscheint, zumal die unterschiedlichen Reaktionen von Promastigoten und Amastigoten auf eine ROS reiche Umgebung sowie die Überlebensstrategien der Protozoen gegenüber oxidativen Zellschäden in der Vergangenheit Gegenstand akademischer Diskussionen waren (Barr u. Gedamu 2003; Dolai et al. 2007; Miller et al. 2000; Murray u. Nathan 1999).

Zur weiteren Abklärung der Wirkung von Staurosporin auf Ebene der Genexpression wurden Light Cycler Proben von prozyklischen Promastigoten und axenisch generierten Amastigoten angefertigt, wobei sich die cDNA Menge der LmAPX bei den Promastigoten hoch signifikant auf 32,5 % des Mediumkontrollwertes reduzierte und im Fall der Amastigoten signifikant auf 34,0 % des Referenzwertes abnahm. Diese Werte sind gleichsinnig mit den Werten, welche densitometrisch aus den Western Blots gewonnen wurden und stützen deren Aussage.

Da in der Vergangenheit über das Vorkommen der LmAPX in unterschiedlichen Zellkompartimenten diskutiert und hierbei der Kinetoplast als wahrscheinlichste Lokalisation beschrieben wurde (Dolai et al. 2008; Ilgoutz et al. 1999), erfolgte in dieser Arbeit nun die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der LmAPX. Hierbei zeigte sich, dass die prozyklischen Promastigoten in der unstimulierten Kontrolle bei Färbung mit Kaninchen-anti-LmAPX/anti-Kaninchen-A568 Farbstoff deutlich positiv für LmAPX waren. Das positive Signal befand sich hierbei nach Bildung eines Overlays aus Fluoreszenz- und Phasenkontrastbild besonders im Bereich der Kinetoplasten, schwächer im Zytosol und abwesend im Bereich des Kernes. Nach Staurosporin Stimulation verschwand die Positivität der LmAPX Färbung nahezu vollständig, sowie im Falle von Miltefosin vollständig. Dieser Verlust der mikroskopischen Nachweisbarkeit der LmAPX nach Stimulation sowie die Übereinstimmung der mit der in der Literatur beschriebenen Lokalisation des Enzymes unterstützen die gewonnenen Daten aus Western Blot und Light

Cycler Analyse. Für eine exaktere Lokalisation und Kontrolle der Lage im Bereich der Kinetoplasten, wäre möglicherweise eine zusätzliche Färbung mittels MitoTracker® sinnvoll gewesen.

4.6. Untersuchung der Enzymmenge an Endonuclease G bei zur Apoptose stimulierten Leishmanien

Eine weitere Hypothese dieser Arbeit fokussiert sich auf die Aktivität der Endonuclease G im Kontext der apoptotischen Stimulation von *Leishmania major* durch Staurosporin und Miltefosin und der dabei beobachteten DNA Degradierung, wobei ein kausaler Zusammenhang zwischen der Stimulation der Protozoen und der Expression des Enzymes sowie dessen Wirkung im Rahmen der apoptotischen Vorgänge angenommen wird. Demnach wäre im Falle einer Hochregulation des Enzymes gleichsinnig dem beobachteten Anstieg der hypoploiden Zellfraktion von einer proapoptotischen Wirkung der Endonuclease G auszugehen.

Wie von anderen Gruppen bereits beschrieben, handelt es sich bei der in höheren Eukaryonten bekannten Endonuclease G um eine mitochondrial lokalisierte Nuklease, welche im Rahmen apoptotischer Vorgänge aus dem Mitochondrium freigesetzt wird und damit ihre Funktion als DNAse aufnimmt (Ishihara u. Shimamoto 2006; Li et al. 2001). Ebenfalls wurde das Vorkommen einer zur Endonuclease der höheren Eukaryonten homologen Endonuclease G bei Trypanosomatiden diskutiert (Gannavaram et al. 2008; Gannavaram u. Debrabant 2012) sowie deren Präsenz bei Leishmanien beschrieben (Rico et al. 2009). Funktionell wurde von einer Freisetzung der Endonuclease G nach apoptotischen Stimuli, sowie einerseits von einer proapoptotischen Wirkung im Falle der Überexpression und andererseits von einer Reduktion des Effekts apoptotischer Stimuli bei Knock-down Protozoen berichtet (BoseDasgupta et al. 2008; Gannavaram et al. 2008; Kumar et al. 2010).

Zur Überprüfung des Effektes auf die Enzymexpression von Staurosporin und Miltefosin auf prozyklische Promastigoten und axenische Amastigoten erfolgte die Analyse der Enzymmenge an Endonuclease G mittels Western Blot und Densitometrie. Dabei zeigte sich für Promastigote Leishmanien ein signifikanter Anstieg der Enzymmenge auf 143,4 % des Mediumkontrollwertes nach Staurosporin Stimulation sowie ein signifikanter Anstieg auf 148,6 % des Mediumwertes nach Miltefosin Stimulation. Dies erklärt die vormals

beobachtete Zunahme der hypoploiden Zellfraktion nach Stimulation durch ein erhöhtes Vorkommen der Endonuclease G und die damit verbundene Degradierung der DNA.

Bei den axenischen Amastigoten folgte auf die Staurosporin Gabe eine signifikante Zunahme der Enzymmenge auf 133,0 % des Kontrollwertes sowie nach Inkubation mit Miltefosin eine Zunahme auf im Vergleich zur Referenz signifikant erhöhte 146,1 %. Für Staurosporin ergibt sich damit ein analoges Bild zu den Promastigoten, welches den beobachteten Anstieg der subG1 Fraktion nach Stimulation als apoptotischen Marker auch bei den Amastigoten durch die DNAse Funktion der Endonuclease G erklären kann. Lediglich die vorab beobachtete nicht signifikante Erhöhung der subG1 Fraktion bei Amastigoten nach Miltefosin Stimulation lässt sich mit der gemessenen erhöhten Enzymmenge nicht erklären.

Zur optischen Bestätigung der Beobachtungen in Hinblick auf die Expression der Endonuclease G bei Promastigoten Leishmanien erfolgte als nächster Schritt die Anfertigung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der Mediumkontrolle sowie der stimulierten Konditionen. Hierbei zeigte sich optisch eine Zunahme der Fluoreszenz nach Staurosporin und Miltefosin Stimulation sowie eine Änderung des Färbeverhaltens der Zellen. Die anfänglich als granular zu bezeichnende Fluoreszenz im Bereich der Flagellartasche beziehungsweise im Bereich des Kinetoplasten nach Kaninchen-anti-EndoG/Anti-Kaninchen-A488 Färbung wurde nach Stimulation diffuser und im Overlay mit Phasenkontrast und DAPI Färbung ebenfalls im Bereich des Kernes sichtbar. Die Beobachtung der Intensitätszunahme entspricht den zuvor beschriebenen Änderungen der Enzymmenge im Western Blot, die Änderung des Fluoreszenzmusters geht konform mit der in der Literatur beschriebenen Translokation der Enonuclease G während der Apoptose vom Mitochondrium zum Zellkern (BoseDasgupta et al. 2008; Ishihara u. Shimamoto 2006).

Gemäß der Hypothese, der zufolge die Aktivität der Endonuclease G entscheidend für die Vermittlung der Apoptose nach Stimuli bei Leishmanien ist und unter Berücksichtigung der bereits diskutierten Beobachtungen sollte nun die Hypothese überprüft werden, ob die Blockade der Endonuclease G eine reduzierte Apoptoserate zur Folge hätte. Hierzu wurde das Agens Aurintricarbonsäure (ATA) als Präinkubation vor Staurosporin und Miltefosin Gabe bei Promastigoten und Amastigoten appliziert; andere Arbeitsgruppen hatten in, zu den in dieser Arbeit verwandten Protozoen und Versuchsanordnungen verschiedenen,

proapoptotischen Konditionen eine Reduktion der hypoploiden Zellfraktion beobachtet (BoseDasgupta et al. 2008; Ishihara u. Shimamoto 2006).

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich jedoch keine signifikante Abnahme der hypoploiden Protozoenzellen nach Präinkubation mit ATA bei Promastigoten und Amastigoten gleichermaßen, obwohl die Konzentration mit 50 µM ATA entsprechend dem in der Literatur beschriebenen Wert war. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass in den vorbeschriebenen Versuchen andere Leishmanien (*Leishmania donovani*), keine Amastigoten Leishmanien sowie andere Stimuli (Baicalein) untersucht wurden.

4.7. Suche nach weiteren Mediatoren der Apoptose; Hemmung der Proteinbiosynthese mittels Cyclohexamid

Die nachfolgenden Untersuchungen hatten die Detektion neuer Mediatoren der Apoptose bei Leishmanien zum Gegenstand, da, wie bereits beschrieben, ein Großteil der von mehrzelligen Eukaryonten bekannten Apoptosemaschinerie abwesend ist und die an der Vermittlung der morphologisch eindeutig als Apoptose zu identifizierenden Vorgänge beteiligten molekularen Mechanismen zu einem Großteil als unbekannt zu bezeichnen sind. Hypothetisch müssten sich pro- und antiapoptotisch wirksame Proteine nach Inhibition der Proteinbiosynthese und nachfolgender apoptotischer Stimulation in der anschließenden Analyse der Änderung der Apoptoserate im Vergleich zu Protozoen mit nicht inhibierter Proteinbiosynthese durch veränderte Apoptoseraten bemerkbar machen. In dieser Arbeit wurde hierzu der Inhibitor Cyclohexamid (CX) eingesetzt (Mukherjee et al. 2002).

Für die Promastigoten führte dieser Versuchsansatz zum Ergebnis, dass nach CX Anwendung die mittels Staurosporin erreichte Apoptoserate im Sinne einer Annexin positiven Anfärbbarkeit signifikant höher lag als ohne vorherige CX Inkubation. Auch unter Berücksichtigung eines signifikanten proapoptotischen Effekts von CX auf die Mediumkontrolle mit leicht gesteigerter Annexin Positivität im Vergleich zur Mediumkontrolle ohne CX zeigt sich hierin ein Hinweis auf eine veränderte molekulare Apoptose Vermittlung nach Blockade der Proteinbiosynthese. Dies lässt den Schluss zu, dass möglicherweise antiapoptotisch wirksame Proteine nicht mehr synthetisiert wurden und damit ein stärkerer Effekt durch Staurosporin Stimulation erreicht werden konnte.

Bei Betrachtung der Amastigoten Leishmanien zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Effekt durch die Blockade der Proteinbiosynthese mittels CX. Der Anteil der Annexin positiven Protozoenzellen stieg signifikant nach vorheriger CX Applikation und folgender Staurosporin Stimulation im Vergleich zur alleinigen Staurosporin Stimulation. Somit scheinen auch hierbei antiapoptotisch wirksame Mediatoren nicht mehr synthetisiert worden zu sein.

4.8. Massenspektrometrische Analyse der protozoischen Proteinregulation und Identifikation dreier möglicher Mediatoren im Rahmen apoptotischer Vorgänge bei *Leishmania major*

Die massenspektrometrische Analyse des Vorkommens protozoischer Proteine erfolgte in Kooperation mit Stefan Tenzer (PhD, Institut für Immunologie der Universität Mainz) und Univ.-Prof. Dr. med. Esther von Stebut-Borschitz (Universitäts-Hautklinik Mainz). Hierbei wurden 707 Proteine identifiziert, wovon mittels statistischer Auswertung und Durchführung einer Bonferroni-Korrektur zum Ausgleich der Alphafehlerkumulation bei multiplen Paarvergleichen noch 123 Proteine mit signifikant erhöhtem Vorkommen und 200 Proteine mit signifikant verringertem Vorkommen im Vergleich einer Kondition zu allen übrigen Konditionen verblieben. Es erfolgte nun die Auswahl dreier Enzyme, welche möglicherweise in ihrer Regulation einen pro- oder antiapoptotischen Effekt im Rahmen der Staurosporin Wirkung haben könnten. Als Arbeitshypothese sollten diese Enzyme nun mit Inhibitoren blockiert und dadurch Einfluss auf die erzielbare Apoptoserate genommen werden.

Bei den prozyklischen Promastigoten, welche zuvor mittels Staurosporin stimuliert worden waren, zeigte sich das Enzym Calpain-like Cystein Peptidase (CLCP, LmjF20.1280) signifikant erhöht. Dies könnte entweder auf eine Wirkung in proapoptotischer Weise im Rahmen eines apoptotischen Signalweges, oder aber auf eine Hochregulation zur Protektion vor dem apoptotischen Stimulus hindeuten. Calpaine zählen zu den Calcium abhängigen Cystein-Proteasen, welche vermutlich im Rahmen des zytoskelettalen Umbaus sowie bei Zellmigration von Bedeutung sind (Carragher 2006; Ennes-Vidal et al. 2010).

Da bei Protozoen der Gattung *Trypanosoma cruzi in vitro* eine toxische Wirkung durch die Applikation des Calpain Inhibitors MDL28170 beschrieben wurde (Ennes-Vidal et al. 2010) aber ebenfalls eine Minderung der apoptotischen Vorgänge nach MDL28170

Applikation bei neuronalen Rattenzellen beobachtet wurde (Ray et al. 2000), wäre sowohl eine proapoptotische als auch eine antiapoptotische Wirkung der CLCP denkbar.

In den Versuchen dieser Arbeit zeigte sich bei den Promastigoten eine toxische Wirkung des Inhibitors MDL28170 in 10 µM Konzentration, sichtbar in einem signifikanten Anstieg der Annexin positiven Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle um 22,9 %. Dies spricht für eine antiapoptotische und damit für das Überleben wichtige Rolle der CLCP. Im Vergleich zur Staurosporin Stimulation wurde demnach eine Zunahme der Apoptoserate nach zusätzlicher Vorinkubation mit MDL28170 erwartet. In den Experimenten zeigte sich jedoch im Gegensatz hierzu eine signifikante Abnahme der Annexin positiven Zellen nach MDL28170 Vorinkubation und nachfolgender Staurosporin Stimulation um 17,7 % der Gesamtpopulation, was gegen eine antiapoptotische Wirkung der CLCP spricht. Möglicherweise interferieren jedoch die Wirkungen von MDL28170 und Staurosporin auf unbekannte Weise, oder es wurde der zeitliche Abstand zwischen MDL28170 und Staurosporin Gabe so gewählt, dass der Effekt des CLCP Inhibitors nicht eintreten konnte. Die Analyse der Zellzyklusphasen mittels PI Färbung ergab gleichsinnige Ergebnisse wie die hier diskutierte Annexin Färbung und bestätigte deren Ergebnisse damit.

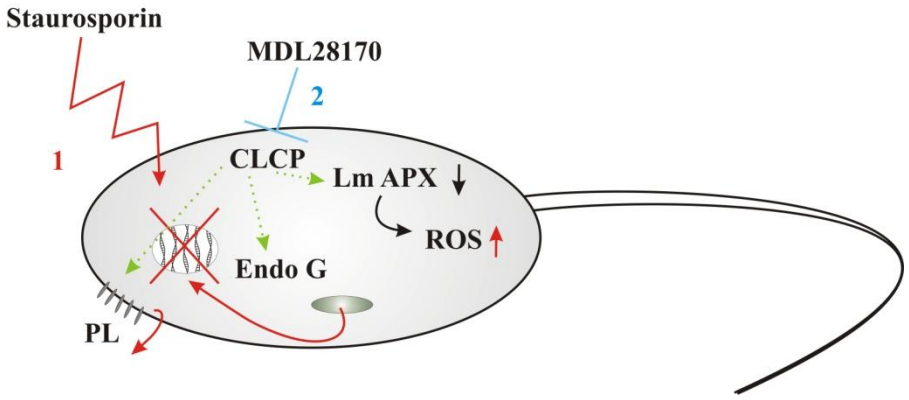

Abbildung 39: Schematische Darstellung der gefundenen Auswirkungen einer Inhibition der CLCP mittels MDL28170 bei prozyklischen Promastigoten. Ziffer **1** beschreibt die Auswirkungen der Staurosporin Stimulation mit Degradierung der DNA durch EndoG, Phospholipidexternalisierung, Steigerung der ROS Bildung (rote Pfeile). Ziffer **2** beschreibt die möglichen Folgen der MDL28170 Applikation (blauer Pfeil) und nachfolgende Staurosporin Stimulation mit abnehmender Phospholipidexternalisierung und verringerter DNA Degradierung; unklare Wirkungswege über gestrichelte grüne Pfeile dargestellt. CLCP: Calpain-like Cystein Peptidase; EndoG: Endonuclease G; LmAPX: *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase; PL: Phospholipid; ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

Zur Überprüfung des Einflusses von MDL28170 auf die Expression der CLCP erfolgte eine Analyse mittels Light Cycler, welche als Ergebnis die signifikante Herunterregulation der relativen CLCP-Menge nach MDL28170 Applikation zur Mediumkontrolle auf das

0,7-fache des Mediumkontrollwertes ergab. Dies stützt das Bild einer Wirkung im Sinne des Überlebens der Protozoenzellen im Vergleich zur Mediumkontrolle, erklärt jedoch nicht die Beobachtung im Rahmen der Vorinkubation zur Staurosporin Stimulation.

Die Analyse der massenspektrometrischen Daten zeigte eine signifikante Hochregulation des Enzymes Acetyl-CoA Synthetase *Leishmania major* strain Friedlin (ACoAS, LmjF23.0540) bei axenisch generierten Amastigoten nach Staurosporin Stimulation. Das Enzym, welches beim Anabolismus von Acetly-Coenzym A aus oxidativer Decarboxylierung von Pyruvat beziehungsweis aus ß-Oxidation von Fettsäuren entscheidend ist (Tielens et al. 2010), könnte damit im Rahmen der Überlebensstrategie der Amastigoten auf den apoptotischen Stimulus durch Staurosporin von Bedeutung sein. Zudem zeigte sich das Enzym Acyl-CoA Synthetase (LmjF03.0230), welches im Stoffwechsel von Fettsäuren eine zweiteilige Aktivierungsreaktion der Fettsäuren katalysiert, gleichsinnig zur ACoAS bei Amastigoten nach Staurosporin Stimulation hochreguliert, dies jedoch in nicht signifikanter Weise nach Durchführung der Bonferroni Korrektur. Da die Bedeutung der ß-Oxidation im Rahmen der Zelldifferenzierung und des fortschreitenden Lebenszyklus der Leishmanien von Bedeutung zu sein scheint (Kaur et al. 2011; Rosenzweig et al. 2008; Saxena et al. 2007), wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Blockade der genannten Enzyme mittels Triacsin C (Tomoda et al. 1987) einen Einfluss auf die mit Staurosporin zu induzierende Apoptoserate haben müsste. Die Auswertung der Messdaten zeigte in der Annexin Färbung der Protozoen keine Auswirkung von alleiniger Triacsin C Stimulation im Vergleich zur Mediumkontrolle; im Fall der Staurosporin Stimulation führte eine vorausgegangene Triacsin C Inkubation zu einer nicht signifikanten Abnahme der induzierbaren Apoptoserate um 17,2 %. Eine Rolle der ACoAS im Rahmen der proapoptotischen Vorgänge nach Staurosporin wäre damit denkbar, allerdings ergab auch die Untersuchung der Enzymmenge an ACoAS keine signifikante Änderung durch Triacsin C Inkubation und konnte diese Vermutung damit nicht bestätigen.

Ein weiteres Enzym, die Dipeptidyl Peptidase III *Leishmania major* strain Friedlin (DPPD, F05.0960), zeigte in der Massenspektrometrie bei axenischen Amastigoten nach Staurosporin Stimulation eine signifikante Herunterregulation. Damit könnte sie ein

antiapoptotisch bedeutsames Molekül sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte die Inhibition der Exopeptidase durch Applikation von 3,4-Dichloroisocoumarin (3,4-DCIC), einem bekannten Inhibitor von Serin-Proteasen (Fukasawa et al. 1998) um eine gesteigerte Apoptoseinduktion nach Staurosporin Stimulation zu erreichen. Die Analyse der FACS Daten zeigte einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen durch Inkubation mit 3,4-DCIC auf 69,7 % der Gesamtzellzahl. Die Inkubation mit 3,4-DCIC und nachfolgender Staurosporin Stimulation erzielte eine im Vergleich zur alleinigen Staurosporin Stimulation um 16,1 % gesteigerte Apoptoserate, wobei dies jedoch nicht signifikant war. Insgesamt unterstützen diese beiden Beobachtungen eine mögliche antiapoptotische Wirkung der DPPD.

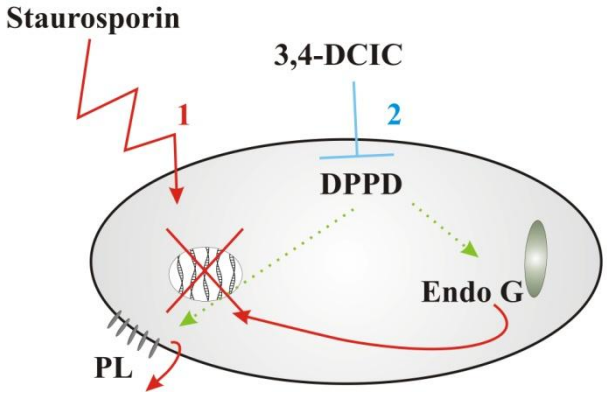

Abbildung 40: Schemazeichnung der beobachteten Effekte einer Inhibition der DPPD mit 3,4-DCIC bei axenischen Amastigoten. Ziffer **1** beschreibt die durch Staurosporin Stimulation induzierte Degradierung der DNA durch EndoG, sowie die Phospholipidexternalisierung (rote Pfeile). Ziffer **2** bezeichnet die möglichen Folgen der 3,4-DCIC Applikation (blauer Pfeil) und konsekutiv folgender Staurosporin Stimulation mit steigender Phospholipidexternalisierung und gesteigerter DNA Degradierung; die unklaren Wirkungswege werden über gestrichelte grüne Pfeile dargestellt. 3,4-DCIC: 3,4-Dichloroisocoumarin; DPPD: Dipeptidyl Peptidase III; EndoG: Endonuclease G; PL: Phospholipid.

Zur Überprüfung der Regulation und einer möglichen Abnahme der DPPD Menge, erfolgte eine Untersuchung mittels Light Cycler. Dabei führte die Applikation von 3,4-DCIC im Vergleich zur Mediumkontrolle zu einer Abnahme auf das 0,5-fache des Referenzwertes, im Falle einer nachfolgenden Staurosporin Stimulation zeigte sich keine signifikante Änderung der relativen Menge. Da diese Änderungen statistisch nicht signifikant waren ($p > 0,05$), sind sie nur eingeschränkt aussagekräftig, lassen sich jedoch im Sinne einer Abnahme eines möglicherweise antiapoptotischen Moleküls nach Inhibition mit 3,4-DCIC deuten.

Abschließend lassen sich einige Ausblicke und Fragestellungen formulieren, welche sich aus den im Verlauf dieser Arbeit dargestellten Widersprüchen zwischen den vorliegenden experimentellen Erkenntnissen und der zugehörigen Literatur ergeben.

Zunächst wäre hierbei die genauere Analyse des Einflusses von Miltefosin auf die ROS Homöostase der Protozoen zu nennen, welche beispielsweise um einen zeitlichen Faktor ergänzt und apoptotische Marker zu unterschiedlichen Messpunkten im Kontext der ROS Entstehung analysiert werden könnten.

Der bei Amastigoten gefundene Widerspruch zwischen unverändertem ROS Niveau nach N-Acetylcystein Gabe und veränderter Darstellung der Subpopulationen in der Propidiumiodid Färbung als Hinweis auf apoptotische Vorgänge könnte um eine direkte Messung der ROS Level aus isolierten Kinetoplasten, wie sie bei *Leishmania donovani* vorbeschrieben wurde (Roy et al. 2008), erweitert werden.

Im Fall der *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase wäre im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie eine exaktere Lokalisation des Kinetoplasten mit MitoTracker® und damit ein noch aussagekräftigeres Overlay Bild denkbar.

Weitere experimentelle Studien wären auch im Fall der Calpain-like Cystein Peptidase denkbar, um eine eventuell proapoptotische Wirkung dieses Enzymes zu eruieren. Hierbei wären Knock-out Leishmanien in Kombination mit Stimulationsversuchen denkbar.

5. Zusammenfassung

Die Spezies *Leishmania major* ist ein bedeutender humanpathogener Parasit, welcher in der Vergangenheit in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rückte. Von entscheidender Bedeutung war hierbei die Entdeckung, dass einzellige Lebewesen morphologische Charakteristika des programmierten Zelltodes aufweisen. Über die exakten molekularen Abläufe während der Apoptose bei Protozoen gelangen bislang nur bruchstückhafte Nachweise. Das erste Ziel dieser Arbeit bestand demnach in der Untersuchung einiger ausgesuchter Abläufe während der Apoptose bei *Leishmania major*. Im Zuge von Stimulationsversuchen wiesen Amastigoten und Promastigoten eine differente Suszeptibilität gegenüber Stimulanzien auf, erstere zeigten bei Staurosporin, letztere bei Miltefosin höhere Annexin Farbstoff positive Subpopulationen. Untersuchungen mit Durchflusszytometrie (FACS) bestätigten für beide Stimulanzien das apoptotische Potential durch induzierbare Subpopulationen hypoploider Zellen.

Als nächstes wurde die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei der Apoptoseinduktion näher beleuchtet. Es konnte mittels FACS Auswertung der Nachweis von stadienspezifischen Unterschieden erbracht werden, wobei sich physiologischerweise Promastigoten ROS negativ und Amastigoten ROS positiv darstellten. Die Hypothese des Einflusses von ROS im Kontext der Apoptose konnte durch eine nahezu vollständige ROS Positivität der Promastigoten nach Stimulation gezeigt werden, die Modulation durch ROS Fänger bestätigte dies durch den Rückgang der hypoploiden Subpopulation.

Die nachfolgenden Experimente konzentrierten sich auf die *Leishmania major* Ascorbat Peroxidase (LmAPX) und die Endonuclease G (EndoG), zwei bedeutsame Enzyme im Zellhaushalt der Protozoen. Für die LmAPX konnte eine Abnahme der relativen Proteinmenge nach Stimulation nachgewiesen werden, bestätigt durch Ergebnisse aus Light Cycler sowie Fluoreszenzmikroskopie, was als antiapoptotische Wirkung des Enzymes gemäß seiner postulierten ROS abbauenden Funktion gewertet wurde. Bezüglich der relativen Proteinmenge an EndoG bestätigte deren erhöhtes Vorliegen die angenommene proapoptotischen Wirkungsweise. Die Modulation mit dem Inhibitor Aurintricarbonsäure zeigte hingegen nicht den erwarteten Effekt. Zur Identifikation weiterer Mediatoren der Apoptose, wurde die Proteinbiosynthese der Protozoen durch Cyclohexamid blockiert, wodurch die Apoptoserate nach Stimulation anstieg. Unter den in der Massenspektrometrie 323 signifikant reguliert erscheinenden Proteinen, wurde für die Calpain-like Cystein Peptidase sowie für die Dipeptidyl Peptidase III eine möglicherweise antiapoptotische Funktion in Inhibitionsversuchen gefunden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adak S, Datta A K:** *Leishmania major* encodes an unusual peroxidase that is a close homologue of plant ascorbate peroxidase: a novel role of the transmembrane domain. The biochemical journal 390: 465-474 (2005)
2. **Aitio M L:** N-acetylcysteine - passe-partout or much ado about nothing? British journal of clinical pharmacology 61: 5-15 (2006)
3. **Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J:** *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clinical microbiology reviews 10: 298-319 (1997)
4. **Alzate J F, Alvarez-Barrientos A, González V M, Jiménez-Ruiz A:** Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. Apoptosis: an international journal on programmed cell death 11: 161-171 (2006)
5. **Ameisen, J C:** The origin of programmed cell death in the flow of evolution and its role in host-pathogen interactions. Comptes rendus des séances de la société de biologie et de ses filiales 192: 1095-1098 (1998)
6. **Ameisen, J C:** On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. Cell death and differentiation 9: 367-393 (2002)
7. **Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit P X, Estaquier J:** On the evolution of programmed cell death : apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. Cell death and differentiation 9: 65-81 (2002)
8. **Ashford, R W:** The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. International journal for parasitology 30: 1269-1281 (2000)
9. **Baņuls A, Hide M, Tibayrenc M:** Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. International journal for parasitology 29: 1137–1147 (1999)
10. **Barr S D, Gedamu L:** Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. The journal of biological chemistry 278: 10816-10823 (2003)
11. **Besteiro S, Williams R, Morrison L S, Coombs G H, Mottram J C:** Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. The journal of biological chemistry 281: 11384-11396 (2006)

12. **BoseDasgupta S, Das B B, Sengupta S, Ganguly A, Roy A, Dey S, Tripathi G, Dinda B, Majumder H K:** The caspase-independent algorithm of programmed cell death in *Leishmania* induced by baicalein: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA "degradesome". Cell death and differentiation 15: 1629-1640 (2008)
13. **Cadenas, E:** Mitochondrial free radical production and cell signaling. Molecular aspects of medicine 25: 17-26 (2004)
14. **Carragher, N O:** Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. Current pharmaceutical design 12: 615-638 (2006)
15. **Ch'ng J-H, Kotturi S R, Chong a G-L, Lear M J, Tan K S-W:** A programmed cell death pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* has general features of mammalian apoptosis but is mediated by clan CA cysteine proteases. Cell death & disease 1: 26 (2010)
16. **Committee on the control of Leishmaniases (WHO):** Control of the leishmaniases. World Health Organization technical report series 949: 1-186 (2010)
17. **Couppié P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet J P, Carme B, Pradinaud R:** Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. The American journal of tropical medicine and hygiene 71: 558-560 (2004)
18. **Das M, Mukherjee S B, Shaha C:** Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Journal of cell science 114: 2461-2469 (2001)
19. **Dolai S, Yadav R K, Datta A K, Adak S:** Effect of thiocyanate on the peroxidase and pseudocatalase activities of *Leishmania major* ascorbate peroxidase. Biochimica et biophysica acta 1770: 247-256 (2007)
20. **Dolai S, Yadav R K, Pal S, Adak S:** *Leishmania major* ascorbate peroxidase overexpression protects cells against reactive oxygen species-mediated cardiolipin oxidation. Free radical biology & medicine 45: 1520-1529 (2008)
21. **Dolai S, Yadav R K, Pal S, Adak S:** Overexpression of mitochondrial *Leishmania major* ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. Eukaryotic cell 8: 1721-1731 (2009)

22. **Ennes-Vidal V, Menna-Barreto R F S, Santos A L S, Branquinha M H, D'Avila-Levy C M:** Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* in vitro. The journal of antimicrobial chemotherapy 65: 1395-1398 (2010)

23. **Fonseca-Silva F, Inacio J D F, Canto-Cavalheiro M M, Almeida-Amaral E E:** Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. PLoS one 6: e14666 (2011)

24. **Fukasawa K, Fukasawa K M, Kanai M, Fujii S, Hirose J, Harada M:** Dipeptidyl peptidase III is a zinc metallo-exopeptidase. Molecular cloning and expression. The biochemical journal 329: 275-282 (1998)

25. **Galluzzi L, Vitale I, Abrams J M, Alnemri E S, Baehrecke E H, Blagosklonny M V, Dawson T M, Dawson V L, El-Deiry W S, Fulda S, Gottlieb E, Green D R, Hengartner M O, Kepp O, Knight R A, Kumar S, Lipton S A, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter M E, Piacentini M, Rubinsztein D C, Shi Y, Simon H-U, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G:** Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell death and differentiation 19: 107-120 (2012)

26. **Gannavaram S, Debrabant A:** Involvement of TatD nuclease during programmed cell death in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. Molecular microbiology 83: 926-935 (2012)

27. **Gannavaram S, Vedvyas C, Debrabant A:** Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. Journal of cell science 121: 99-109 (2008)

28. **Garz J:** The role of reactive oxygen species in death and life of *Leishmania major*. Bachelor Arbeit, Universität Ulm, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (2010)

29. **Green D R:** Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. Cell 102: 1-4 (2000)

30. **Guerin P J, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft S L, Desjeux P, Wasunna M K, Bryceson A D M:** Personal view visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. The lancet 2: 494-501 (2002)

31. **Hadighi R, Mohebali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M:** Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. PLoS medicine 3: e162 (2006)
32. **Hengartner M O:** The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770-776 (2000)
33. **Higuchi M, Honda T, Proske R J, Yeh E T:** Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. Oncogene 17: 2753-2760 (1998)
34. **Homburg C H, de Haas M, von dem Borne A E, Verhoeven A J, Reutelingsperger C P, Roos D:** Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. Blood 85: 532-540 (1995)
35. **Howard M K, Sayers G, Miles M A:** *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. Experimental parasitology 64: 147-156 (1987)
36. **Ilgoutz S C, Mullin K A, Southwell B R, McConville M J**: Glycosylphosphatidylinositol biosynthetic enzymes are localized to a stable tubular subcompartment of the endoplasmic reticulum in *Leishmania mexicana*. The embo journal 18: 3643-3654 (1999)
37. **Ishihara Y, Shimamoto N:** Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. The journal of biological chemistry 281: 6726-6733 (2006)
38. **Jacobson M D, Weil M, Raff M C:** Programmed cell death in animal development. Cell 88: 347-354 (1997)
39. **Jasion V S, Polanco J A, Meharenna Y T, Li H, Poulos T L:** Crystal structure of *Leishmania major* peroxidase and characterization of the compound i tryptophan radical. The journal of biological chemistry 286: 24608-24615 (2011)
40. **Jasion V S, Poulos T L:** *Leishmania major* peroxidase is a cytochrome c peroxidase. Biochemistry 51: 2453-2460 (2012)
41. **Kassiri H, Javadian E:** Species composition of Phlebotomine sandflies (Diptera : Psychodidae) in Nikshahr county, south-eastern Iran. Journal of vector borne diseases 48: 159-162 (2011)

42. **Kaur J, Tiwari R, Kumar A, Singh N:** Bioinformatic analysis of *Leishmania donovani* long-chain fatty acid-CoA ligase as a novel drug target. Molecular biology international 2011: 278051 (2011)

43. **Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R:** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer 26: 239-257 (1972)

44. **Khademvatan S, Gharavi M J, Rahim F, Saki J**: Miltefosine-induced apoptotic cell death on *Leishmania major* and *L. tropica* strains. The Korean journal of parasitology 49: 17-23 (2011)

45. **Kroemer G, El-Deiry W S, Golstein P, Peter M E, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny M V, Malorni W, Knight R A, Piacentini M, Nagata S, Melino G:** Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell death and differentiation 12: 1463-1467 (2005)

46. **Kumar P, Lodge R, Trudel N, Ouellet M, Ouellette M, Tremblay M J:** Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated, caspase-independent apoptosis in *Leishmania* amastigotes. PLoS neglected tropical diseases 4: e642 (2010)

47. **Lander H M, Jacovina A T, Davis R J, Tauras J M:** Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. The journal of biological chemistry 271: 19705-19709 (1996)

48. **Laurent M, Steinert M:** Electron microscopy of kinetoplastic DNA from *Trypanosoma mega*. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America 66: 419-424 (1970)

49. **Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi H L:** Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. Cell death and differentiation 9: 53-64 (2002)

50. **Li L Y, Luo X, Wang X:** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature 412: 95-99 (2001)

51. **Liu B, Liu Y, Motyka S A, Agbo E E C, Englund P T:** Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. Trends in parasitology 21: 363-369 (2005)

52. **Liu Z, Lenardo M J:** Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases. Developmental cell 12: 484-485 (2007)

53. **Marinho F D A, Gonçalves K C D S, de Oliveira S S, de Oliveira, A-C D S C, Bellio M, D'Avila-Levy C M, dos Santos A L S, Branquinha M H:** Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Memórias do instituto Oswaldo Cruz 106: 507-509 (2011)

54. **Martin S J, Reutelingsperger C P, McGahon A J, Rader J A, van Schie R C, LaFace D M, Green D R:** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. The journal of experimental medicine 182: 1545-1556 (1995)

55. **Miller M A, McGowan S E, Gantt K R, Champion M, Novick S L, Andersen K A, Bacchi C J, Yarlett N, Britigan B E, Wilson M E:** Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. The journal of biological chemistry 275: 33883-33889 (2000)

56. **Minocha N, Kumar D, Rajanala K, Saha S:** Kinetoplast morphology and segregation pattern as a marker for cell cycle progression in *Leishmania donovani*. The journal of eukaryotic microbiology 58: 249-253 (2011)

57. **Mukherjee S B, Das M, Sudhandiran G, Shaha C:** Increase in cytosolic Ca^{2+} levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. The journal of biological chemistry 277: 24717-24727 (2002)

58. **Murray H W, Nathan C F:** Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. The journal of experimental medicine 189: 741-746 (1999)

59. **Nakano H, Omura S:** Chemical biology of natural indolocarbazole products: 30 years since the discovery of staurosporine. The journal of antibiotics 62: 17-26 (2009)

60. **Pal S, Dolai S, Yadav R K, Adak S:** Ascorbate peroxidase from *Leishmania major* controls the virulence of infective stage of promastigotes by regulating oxidative stress. PLoS one 5: e11271 (2010)

61. **Paris C, Loiseau P M, Bories C, Bréard J:** Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrobial agents and chemotherapy 48: 852-859 (2004)

62. **Pimenta P F, Saraiva E M, Sacks D L:** The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. Experimental parasitology 72: 191-204 (1991)

63. **Ray S K, Fidan M, Nowak M W, Wilford G G, Hogan E L, Banik N L:** Oxidative stress and Ca^{2+} influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells. Brain research 852: 326-334 (2000)

64. **Richard J V, Werbovetz K A:** New antileishmanial candidates and lead compounds. Current opinion in chemical biology 14: 447-455 (2010)

65. **Rico E, Alzate J F, Arias A Au, Moreno D, Clos J, Gago F, Moreno I, Domínguez M, Jiménez-Ruiz A:** *Leishmania infantum* expresses a mitochondrial nuclease homologous to EndoG that migrates to the nucleus in response to an apoptotic stimulus. Molecular and biochemical parasitology 163: 28-38 (2009)

66. **Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson R W, Zilberstein D:** Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. FASEB journal 22: 590-602 (2008)

67. **Rougeron V, De Meeûs T, Hide M, Le Falher G, Bucheton B, Dereure J, El-Safi S H, Dessein A, Bañuls A-L:** Multifaceted population structure and reproductive strategy in *Leishmania donovani* complex in one Sudanese village. PLoS neglected tropical diseases 5: e1448 (2011)

68. **Roy A, Ganguly A, Bosedasgupta S, Das B B, Pal C, Jaisankar P, Majumder H K:** Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-Diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. Molecular pharmacology 74: 1292-1307 (2008)

69. **Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J, Turco S J, Zilberstein D:** Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. Molecular and biochemical parasitology 95: 9-20 (1998)

70. **Sacks D, Sher A:** Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nature immunology 3: 1041-1047 (2002)

71. **Santa-Rita R M, Henriques-Pons A, Barbosa H S, de Castro S L:** Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against

Leishmania amazonensis. The journal of antimicrobial chemotherapy 54: 704-710 (2004)

72. **Saxena A, Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y, Volpin H, Myler P J, Zilberstein D:** Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. Molecular and biochemical parasitology 152: 53-65 (2007)
73. **Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z:** Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. The embo journal 26: 1749-1760 (2007)
74. **Sen N, Das B B, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder He K:** Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. The journal of biological chemistry 279: 52366-52375 (2004)
75. **Sen N, Das B B, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S, Rakshit S, Sen T, Majumder H K:** Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. Cell death and differentiation 11: 924-936 (2004)
76. **Shaha C:** Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. The Indian journal of medical research 123: 233-244 (2006)
77. **Shapiro T A, Englund P T:** The structure and replication of kinetoplast DNA. Annual review of microbiology 49: 117-143 (1995)
78. **da Silva R, Sacks D L:** Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. Infection and immunity 55: 2802-2806 (1987)
79. **Sinha P K, Pandey K, Bhattacharya S K**: Diagnosis & management of *Leishmania*/HIV co-infection. The Indian journal of medical research 121: 407-414 (2005)
80. **Späth G F, Epstein L, Leader B, Singer S M, Avila H A, Turco S J, Beverley S M:** Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America 97: 9258-9263 (2000)

81. **Späth G F, Garraway L A, Turco S J, Beverley S M:** The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America 100: 9536-9541 (2003)

82. **Stauch A, Sarkar R R, Picado A, Ostyn B, Sundar S, Rijal S, Boelaer M, Dujardin J-C, Duerr H-P:** Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control. PLoS neglected tropical diseases 5: e1405 (2011)

83. **Sudhandiran G, Shaha C:** Antimonial-induced increase in intracellular Ca2+ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. The journal of biological chemistry 278: 25120-25132 (2003)

84. **Sunderkötter C, Kunz M, Steinbrink K, Meinardus-Hager G, Goebeler M, Bildau H, Sorg C:** Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. Journal of immunology 151: 4891-4901 (1993)

85. **Tielens A G M, van Grinsven K W A, Henze K, van Hellemond J J, Martin W:** Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists. International journal for parasitology 40: 387-397 (2010)

86. **Tomoda H, Igarashi K, Omura S:** Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsins. Biochimica et biophysica acta 921: 595-598 (1987)

87. **Vaux D L, Korsmeyer S J, Walter T:** Cell death in development review. Development 96: 245-254 (1999)

88. **Verma N K, Dey C S:** Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. Antimicrobial agents and chemotherapy 48: 3010-3015 (2004)

89. **Vilela M L, Azevedo C G, Carvalho B M, Rangel E F:** Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and putative vectors of leishmaniases in impacted area by hydroelectric plant, state of tocantins, Brazil. PLoS one 6: e27721 (2011)

90. **Weil M, Jacobson M D, Coles H S, Davies T J, Gardner R L, Raff K D, Raff M C:** Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. The journal of cell biology 133: 1053-1059 (1996)

91. **Weingärtner A, Kemmer G, Müller F D, Zampieri R A, Gonzaga Dos Santos M, Schiller J, Pomorski T G:** *Leishmania* promastigotes lack

Phosphatidylserine but bind Annexin V upon permeabilization or Miltefosine treatment. PLoS one 7: e42070 (2012)

92. **Williams R A M, Smith T K, Cull B, Mottram J C, Coombs G H:** ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. PLoS pathogens 8: e1002695 (2012)
93. **Yadav R K, Pal S, Dolai S, Adak S:** Role of proximal methionine residues in *Leishmania major* peroxidase. Archives of biochemistry and biophysics 515: 21-27 (2011)
94. **Yang H, Lee B K, Kook K H, Jung Y-S, Ahn J:** Protective rffect of grape seed extract against oxidative stress-induced cell death in a Staurosporine-differentiated retinal ganglion cell line. Current eye research 37: 339-344 (2012)
95. **Yin J, Howe J, Tan K S W:** Staurosporine-induced programmed cell death in *Blastocystis* occurs independently of caspases and cathepsins and is augmented by calpain inhibition. Microbiology 156: 1284-1293 (2010)
96. **Zafarullah M, Li W Q, Sylvester J, Ahmad M:** Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cellular and molecular life sciences 60: 6-20 (2003)
97. **van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Müller A, Hölscher 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: 13837-13842 (2006)
98. **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: 6521-6525 (2004)
99. **van Zandbergen G, Lüder C G K, Heussler V, Duszenko M:** Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection? Trends in parasitology 26: 477-483 (2010)
100. **van Zandbergen G, Solbach W:** Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes ? Trends in microbiology 11: 210-214 (2003)
101. **Zangger H, Mottram J C, Fasel N:** Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? Cell death and differentiation 9: 1126-1139 (2002)

102. **Zhang X D, Gillespie S K, Hersey P:** Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. Molecular cancer therapeutics 3: 187-197 (2004)

7. Danksagung

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

Herrn PD Dr. Ger van Zandbergen gilt hierbei in vielerlei Hinsicht mein Dank, welchen ich an dieser Stelle in besonderem Maße zum Ausdruck bringen möchte. Zunächst für das Überlassen des Dissertationsthemas, sowie für die Anleitung meiner Person zu wissenschaftlicher Arbeits- und Denkweise. Darüber hinaus für die vielfältigen inhaltlichen Anregungen und für die persönlichen Gespräche, welche mich in den unterschiedlichen Stadien dieser Arbeit stets voran gebracht haben.

Mein weiterer Dank gilt den wissenschaftlichen MitarbeiterInnen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, für deren Hilfestellungen im Laboralltag und den wohlwollenden, kollegialen Umgang.

Dankend erwähnt werden soll an dieser Stelle zudem die Förderung meiner Arbeit durch ein Stipendium im Rahmen des „Promotionsprogrammes Experimentelle Medizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die immer währende Unterstützung, Förderung und Beratung in den zurückliegenden Jahren bedanken.

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.