

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

Apoptotische promastigote Leishmanien gelangen beim Eintritt in Makrophagen in ein Autophagie-Kompartiment

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

vorgelegt von
Stefan Gottwalt
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Ger van Zandbergen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Detlef Michel

Tag der Promotion: 08.05.2014

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
1.1	Taxonomie	1
1.2	<i>Leishmania</i> Lebenszyklus	2
1.3	Leishmaniose: Formen, Epidemiologie, Diagnostik und Therapie	3
1.4	Virulenzfaktoren auf der Oberfläche von <i>Leishmania</i>	4
1.5	Programmierter Zelltod von <i>Leishmania</i>	5
1.6	Makrophagen	6
1.7	Autophagie	7
1.8	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Humane Zellen	16
2.1.2	Leishmanien Stämme	16
2.1.3	Geräte	16
2.1.4	Laborbedarf	17
2.1.5	Chemische Reagenzien	19
2.1.6	Antikörper	20
2.1.7	Kulturmedien, Puffer, Agar	21
2.1.8	Software	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zellkultur	23
2.2.2	Labeling pro- und amastigoter Leishmanien	32
2.2.3	Vorbereitung für die Auswertung	34
2.2.4	Auswertung	36
3	Ergebnisse	39
3.1	Spezifitätskontrolle des LC3B Antikörpers	39
3.2	Abhängigkeit der LC3B Expression von der Zeit nach Infektionsbeginn	41
3.3	Zusammenhang zwischen dem Alter der infizierenden Promastigoten und dem Anteil LC3B positiver Kompartimente	44
3.4	Apoptose-abhängige Entwicklung LC3B positiver Kompartimente	47

3.5	Auftreten LC3B positiver Kompartimente nach Infektion mit Amastigoten	50
3.6	Entwicklung LC3B positiver Kompartimente nach Apoptoseinduktion bei Promastigoten	53
3.7	Die Rolle des Apoptosemarkers Phosphatidylserin bei der Entstehung LC3B positiver Kompartimente	57
3.8	Die Rolle des Virulenzfaktors Lipophosphoglykan bei der Entstehung LC3B positiver Kompartimente	60
3.9	Reifung LC3B positiver Kompartimente	62
3.10	Einfluss des Autophagie-Inhibitors Wortmannin auf die Entwicklung LC3B positiver Kompartimente	66
3.11	Einfluss der Inhibition von Autophagie auf die Infektionsrate	68
3.12	Entwicklung eines Modells zur spezifischen Labelung apoptotischer vs. vitaler <i>L. major</i>	70
4	Diskussion	78
4.1	Stellenwert der Autophagie	79
4.2	Die Kinetik der <i>Leishmania</i> induzierten Autophagie in Makrophagen	80
4.3	Lysosomen fusionieren mit <i>Leishmania</i> -beladenen Autophagosomen	81
4.4	Nur apoptotische Promastigoten liegen in LC3B positiven Kompartimenten ...	82
4.5	Miltefosin-induzierte Apoptose promastigoter Leishmanien hat keinen Einfluss auf das Auftreten von Autophagie	84
4.6	Phosphatidylserin wirkt nicht Autophagie induzierend	85
4.7	Amastigote <i>L. major</i> induzieren keine Autophagie	86
4.8	Promastigote <i>L. major</i> induzieren Autophagie in Makrophagen LPG-unabhängig	87
4.9	Autophagie in Makrophagen ist essentiell für das Überleben promastigoter Leishmanien	88
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	93
	Danksagung	107
	Lebenslauf	108

Abkürzungsverzeichnis

AAM	Kulturmedium (Alex Amastigoten Medium)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Ama	Amastigoten
Anx	Annexin
APC	professionelle Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
apoptot.	apoptotisch
Atg	Autophagie bezogene Gene (<i>autophagy related genes</i>)
BHI	Agar (Hirn Herz) (<i>brain heart infusion</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C3b	Komplementfaktor 3b (<i>component of complement 3b</i>)
C3bi	inaktivierter Komplementfaktor 3b (<i>inactivated component of complement 3b</i>)
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Differenzierungsmarker (<i>cluster of differentiation</i>)
Ch	Huhn (<i>chicken</i>)
CHO	Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters (<i>Chinese hamster ovary</i>)
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie (<i>chaperon mediated autophagy</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag (<i>day</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSC-H	Vorwärtsstreulicht Höhe, misst durchflusszytometrisch Zellvolumen (<i>forward scatter - height</i>)
g	mittlere Erdbeschleunigung
GIPL	Glykoinositolphospholipid
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>)
gp	Glykoprotein
Gt	Ziege (<i>goat</i>)
h	Stunde(n) (<i>hora</i>)
HCl	Chlorwasserstoff
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hsc	nicht stressinduziertes Hitzeschockprotein (<i>heat shock cognate</i>)
Hsp	Hitzeschockprotein
hu	menschlich (<i>human</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
KFERQ	Aminosäuresequenz Lysin-Phenylalanin-Glutaminsäure-Arginin-Glutamin
ko	knockout
L.	<i>Leishmania</i>
LAMP	Lysosomales Membranprotein (<i>lysosomal associated membrane protein</i>)

LC3	Leichte Kette 3 des Mikrotubuli assoziierten Proteins 1 (<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>)
LCF	Chemotaktischer Leishmanienfaktor (<i>leishmania chemotactic factor</i>)
Lipo	Lipobiotin
Lm	<i>Leishmania major</i>
Lm-Medium	Leishmanienmedium
LPG	Lipophosphoglykan
LPG -/-	Lipophosphoglykan knockout
LPG +/-	Lipophosphoglykan Wildtyp
LSM	Lymphozyten Separationsmedium (<i>lymphocyte separation medium</i>)
M	Molare Masse in [g/mol]
M	Stoffmengenkonzentration (Molarität) in [mol/l]
MACS	Magnetische Zelltrennung (<i>magnetic activated cell sorting, magnetic cell separation</i>)
mAK	monoklonaler Antikörper
M-CSF	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (<i>macrophage colony stimulating factor</i>)
MF I	Makrophagen Typ I
MF II	Makrophagen Typ II
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Milte	Miltefosin
MIP	Inflammatorisches Makrophagenprotein (<i>macrophage inflammatory protein</i>)
Ms	Maus (<i>mouse</i>)
mTOR	Ziel des Rapamycins in Säugetieren (<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>)
m/v	Massenkonzentration (Masse pro Volumen)
n	Anzahl
NHS	Normales Humanes Serum
NNN	Novy-Nicolle-McNeal
p	Signifikanzwert (<i>probability</i>)
pAK	polyklonaler Antikörper
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (<i>polymorphonuclear leukocytes</i>)
pos.	positiv
Pro	Promastigoten
PS	Phosphatidylserin
Rb	Kaninchen (<i>rabbit</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPMI	Kulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RT	Raumtemperatur
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>

Th	T Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
t _{p.i.}	Zeit nach Infektionsbeginn (<i>time post infection</i>)
vs.	gegen (<i>versus</i>)
v/v	Volumenkonzentration (Volumen pro Volumen)
α	anti
ρ	Dichte (<i>Rho</i>)

1 Einleitung

Bei *Leishmania* handelt es sich um einzellige Parasiten, die sich durch Zweiteilung vermehren. Ihre Entwicklung unterliegt einem Dimorphismus: im Zwischenwirt, Sandfliegen der Spezies *Phlebotomus* und *Lutzomyia*, liegen sie als begeißelte Promastigoten vor. Diese befinden sich extrazellulär und haben bei einem Durchmesser von 1,5 bis 3 µm eine Länge von ca. 15 µm. Am anterioren Pol tragen sie ein Flagellum, mit dem sie sich aktiv fortbewegen können.

1.1 Taxonomie

Leishmanien gehören als begeißelte Protozoen zur Ordnung der Kinetoplastida, da sie ein großes DNA-haltiges Mitochondrium tragen. Darunter werden sie neben anderen Kinetoplastida zur Familie der Trypanosomatida gezählt (Abbildung 1). Derzeit gibt es etwa 15 humanpathogene Spezies.

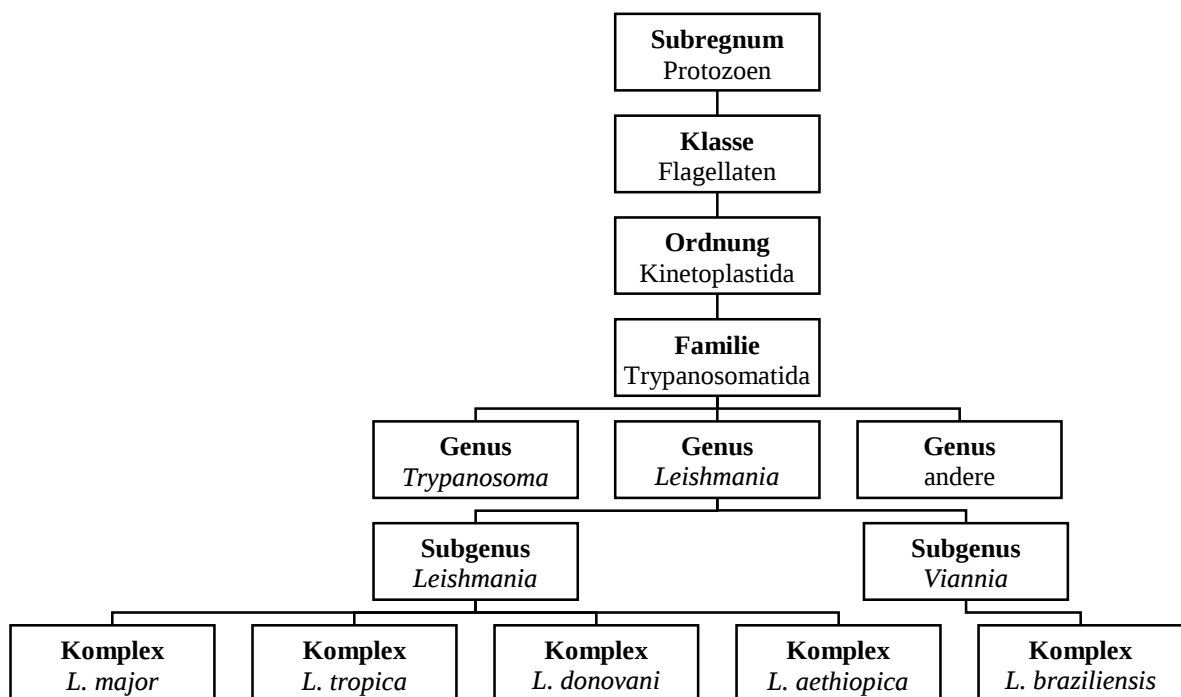


Abb. 1: Taxonomie der Leishmanien-Spezies.

1.2 *Leishmania* Lebenszyklus

Promastigote Leishmanien liegen in zwei Entwicklungsstadien vor, zum einen in einem nicht infektiösen prozyklischen Stadium, in dem sie am Mitteldarm der Sandfliege anhaften, zum anderen in einem infektiösen metazyklischen Stadium. Während dieses 4 bis 7 Tage andauernden Entwicklungsprozesses, der Metazyklogenese, kommt es zur Vermehrung der Promastigoten, zum Verlust der Adhäsion an den Mitteldarm und zur Wanderung in den Pharynx des Vektors (Giannini 1974, Sacks u. Perkins 1984, Pimenta et al. 1992).

Bei der Blutmahlzeit überträgt eine infizierte Sandfliege mit ihrem Speichel infektiöse metazyklische Promastigoten in den Wirtsorganismus. Dabei wird die Virulenz der Parasiten durch Speichelbestandteile erhöht (Titus u. Ribeiro 1988). In Säugetieren verläuft die Vermehrung von *Leishmania* intrazellulär ab. Zur Rekrutierung Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyten (PMN) setzen die Promastigoten Leishmania Chemotactic Factor (LCF) frei, wodurch PMN zum Ort der Infektion gelockt werden. Sie nehmen die Promastigoten auf und sezernieren Interleukin-8 (IL-8), das zur Rekrutierung weiterer PMN dient (van Zandbergen et al. 2002).

Innerhalb der PMN überleben die Promastigoten ohne abgetötet zu werden und nutzen die PMN somit als Zwischenwirtszelle. Nach der Aufnahme der Parasiten sezernieren die PMN weniger proinflammatorisch wirksames TNF- α , bei gleichzeitig erhöhter Sekretion des antiinflammatorischen TGF- β (van Zandbergen et al. 2007).

Neben IL-8 sezernieren die PMN Monocyte-attracting Chemotactic Factors, wie Macrophage inflammatory protein 1- β (MIP1- β), um Makrophagen anzulocken (van Zandbergen et al. 2004). Die Makrophagen phagozytieren die inzwischen apoptotischen, vitale Promastigoten enthaltenden PMN in der Art eines Trojanischen-Pferd-Mechanismus. Nach der Aufnahme apoptotischer PMN sezernieren die Makrophagen weniger proinflammatorisch wirksames TNF- α , bei gleichzeitig erhöhter Sekretion des antiinflammatorischen TGF- β (van Zandbergen et al. 2004). Innerhalb der Makrophagen befinden sich die Promastigoten in Phagosomen, die mit lysosomalen Strukturen verschmelzen und parasitophore Vakuolen bilden. In diesen Kompartimenten verdauen die Promastigoten ihr Flagellum, runden ab und wandeln sich im sauren Milieu des Kompartiments in 2 x 6 μ m messende unbegeißelte Amastigoten um (Bogdan u. Röllinghoff 1998, Ritter et al. 2009). Sie vermehren sich und gelangen nach Ruptur der Makrophagen in die Zirkulation. Bei erneutem Biss einer Sandfliege gelangen die Amastigoten in die Mücke und wandeln sich dort wieder in Promastigoten um.

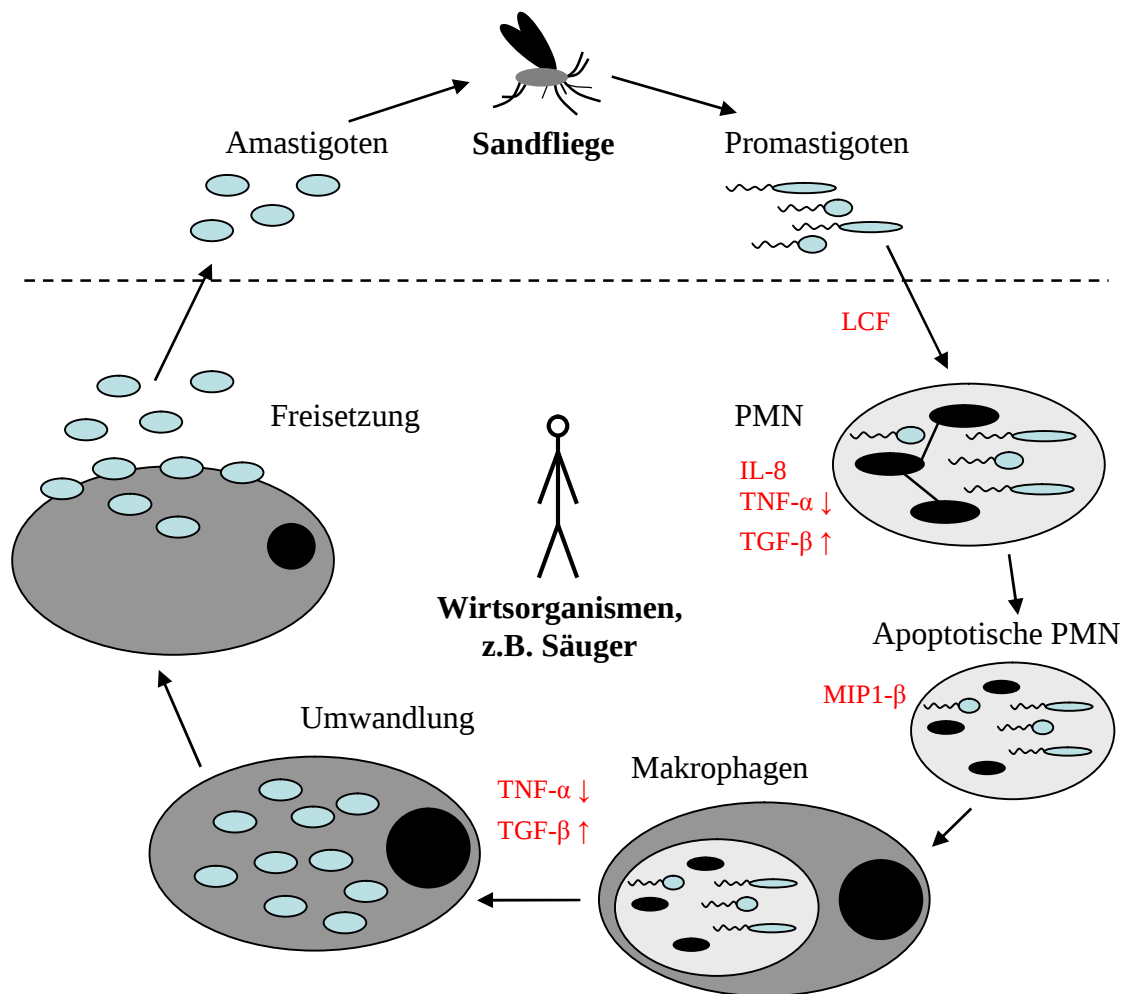


Abb. 2: Lebenszyklus von *Leishmania*.

PMN: Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyt; LCF: Leishmania Chemotactic Factor; IL-8: Interleukin-8; $\text{TNF-}\alpha$: Tumor Nekrose Faktor- α ; $\text{TGF-}\beta$: Transforming Growth Factor- β ; $\text{MIP1-}\beta$: Macrophage inflammatory protein 1- β ; $\uparrow$: Sekretion steigt; $\downarrow$: Sekretion sinkt.

1.3 Leishmaniose: Formen, Epidemiologie, Diagnostik und Therapie

Weltweit sind 350 Millionen Menschen in 88 Ländern von der Leishmaniose bedroht. Es handelt sich dabei um Staaten in Mittel- und Südamerika, Afrika, Südeuropa und im südlichen Asien. Australien ist als einziger Kontinent nicht betroffen. Bei 1 bis 2 Millionen Neuinfektionen pro Jahr durch Protozoen der Spezies *Leishmania* wird von 12 Millionen Infizierten ausgegangen (WHO 2011).

Schwere und Verlauf der Erkrankung sind von der Erregerspezies und vom Immunstatus des Infizierten abhängig. Im Mausmodell und auch in Hautläsionen von Patienten wurde nachgewiesen, dass die Infektion von der Art der T-Helferzell-Antwort abhängt. Heilung

tritt vor allem bei einer Th1-Antwort auf, Krankheit bei einer Th2-Antwort (Bourreau et al. 2003).

Die Symptome reichen von selbst heilenden Hautulzerationen bei der kutanen Leishmaniose („Orientbeule“) über Läsionen von Schleimhäuten im Nasenrachenraum bei der mukokutanen Leishmaniose („Espundia“) bis hin zu schwersten, lebensbedrohlichen viszeralen Schädigungen bei der viszeralen Leishmaniose („Kala Azar“) (Pearson u. Sousa 1996).

Verursacher der kutanen Leishmaniose sind u.a. *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica* (WHO 2011). Die mukokutane Form wird u.a. durch *L. braziliensis* hervorgerufen (Lohuis et al. 1997) während *L. donovani*, *L. infantum* und *L. chagasi* zu den Auslösern der viszeralen Leishmaniose zählen (Berman 1997).

Der Erregernachweis wird sowohl durch Mikroskopie oder Kultur als auch durch den Nachweis von DNA geführt. Dazu werden Proben aus Haut, Milz, Knochenmark oder Lymphknoten gewonnen und analysiert (Reithinger u. Dujardin 2007). Zudem besteht die Möglichkeit eines Antikörpernachweises (Berman 1997).

Hautläsionen bei der kutanen Leishmaniose heilen meist spontan und ohne Therapie, können aber durch topische Applikation von Paromomycin oder direktes Einbringen von Antimon in die Läsion behandelt werden (Berman 1997). Auch systemisch verabreichtes Miltefosin ist wirksam (Machado et al. 2010). Bei viszeraler Leishmaniose finden Pentavalentes Antimon, Amphotericin B, Pentamidin, Paromomycin und IFN- γ Anwendung (Berman 1997). Als hochwirksam gilt das oral applizierbare Miltefosin (Hexadecylphosphocholin) (Jha et al. 1999).

1.4 Virulenzfaktoren auf der Oberfläche von *Leishmania*

Promastigote Leishmanien tragen auf ihrer Oberfläche eine dichte Glykokalix. Neben der Protease Glykoprotein 63 (gp63), Proteophosphoglykanen und Glykoinositolphospholipiden (GIPLs) ist deren Hauptbestandteil das aus einem in der Oberflächenmembran haften Lipidanker und Polysachharid bestehende Lipophosphoglykan (LPG) (Turco u. Descoteaux 1992, Beverley u. Turco 1998).

Im prozyklischen Entwicklungsstadium promastigoter Leishmanien verhindert es deren Anheften an den Mitteldarm der Sandfliege. Im Laufe der Metazyklogenese der Promastigoten verändert das LPG seine molekulare Struktur und wird elongiert. Auf Grund dieser strukturellen Veränderungen kommt es schließlich zum Verlust der Adhäsion der metazyklischen Parasiten an den Mitteldarm (Sacks et al. 1995).

Nach dem Biss einer Sandfliege und der im Zuge der Blutmahlzeit stattgefundenen Transmission metazyklischer Promastigoten werden diese durch LPG vor komplementvermittelter Lyse geschützt. Dies geschieht durch spontanes Abspalten der auf metazyklischen Promastigoten bindenden Membranangriffskomplexe (Puentes et al. 1990). Des Weiteren schützt LPG die Promastigoten vor hydrolytischen Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Späth et al. 2003).

LPG ist zudem essentiell für die Virulenz promastigoter Leishmanien. Nach dem Knockout der UDP-Galaktopyranose Mutase, einem für die Synthese von LPG notwendigen Enzym, zeigen promastigote *L. major* eine stark eingeschränkte Virulenz (Späth et al. 2000, Kleczka et al. 2007). Neben LPG muss es noch weitere Virulenzfaktoren geben, da promastigote *L. mexicana* auch ohne LPG virulent sind (Ralton et al. 2003).

Amastigoten exprimieren im Gegensatz zu Promastigoten wesentlich weniger LPG, sind aber trotzdem zur Vermehrung in Makrophagen fähig (Schneider et al. 1993).

1.5 Programmierter Zelltod von *Leishmania*

Der programmierte Zelltod bzw. Apoptose war bis vor einigen Jahren nur bei Eukaryoten bekannt. Er dient dem Ziel, die Homöostase und Entwicklung des Organismus zu gewährleisten (Elmore 2007). Seit einigen Jahren ist das Vorkommen von Apoptose auch bei Einzellern anerkannt (Kaczanowski et al. 2011).

Eukaryotische Zellen, aber auch Leishmanien, die sich in Apoptose befinden, erfüllen eine Reihe von Kriterien: Zunächst wird das bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Plasmamembran gelegene Phosphatidylserin auf die Außenseite transloziert. Dort kann es mittels Phosphatidylserin bindendem Annexin A5 in Gegenwart von Calciumionen nachgewiesen werden (Martin et al. 1995).

Weitere Zeichen des programmierten Zelltodes bei *Leishmania* sind negative Veränderungen im Membranpotential des Kinetoplasten, ein Zuwachs an Permeabilität der Plasmamembran, die Kondensierung des Chromatins und die Fragmentierung des Zellkerns. Promastigote Leishmanien verlieren ihre torpedoförmige Gestalt und runden während dieses Vorgangs ab (Lee et al. 2002, Jimenez-Ruiz et al. 2010).

Bei *Leishmania* kommt es im Verlauf der Metazyklogenese zur Apoptose. Zum Zeitpunkt der höchsten Virulenz sind ca. 50 % der Promastigoten Phosphatidylserin positiv und damit apoptotisch (van Zandbergen et al. 2006). Da Phosphatidylserin als „eat me signal“ auf Phagozyten wirkt, nehmen PMN die Promastigoten auf und verändern die Sekretion von

TNF- α und TGF- β hin zu einer Abschwächung der Immunreaktion. Dadurch können die Promastigoten innerhalb der PMN, die nach 2 Tagen ihrerseits apoptotisch werden, überleben. Makrophagen phagozytieren die Phosphatidylserinpositiven PMN und verändern ebenfalls die Sekretion von TNF- α und TGF- β zu Gunsten einer Dämpfung der Immunreaktion. Apoptotische Zellen haben also einen das Immunsystem dämpfenden und damit die Leishmanieninfektion begünstigenden Effekt (Voll et al. 1997, Fadok et al. 1998, van Zandbergen et al. 2006).

Neben dem in Kultur und in Sandfliegen vorkommenden natürlichen Zelltod promastigoter Leishmanien induziert das antileishmaniös wirksame Miltefosin (Hexadecylphosphocholin) ebenfalls Apoptose (Jha et al. 1999, Paris et al. 2004, Khademvatan et al. 2011).

Auch Staurosporin ist in der Lage in *Leishmania* Apoptose zu induzieren (Arnoult et al. 2002).

1.6 Makrophagen

Humane Makrophagen gehören als Phagozyten zum angeborenen Immunsystem. Bei ihnen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe. Zum einen gibt es ortsständige Gewebemakrophagen, wie Kupfferzellen in der Leber oder Mikroglia im Gehirn. Zum anderen gibt es im peripheren Blut zirkulierende Monozyten. Diese können *in vitro* durch Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren zur Differenzierung in Makrophagen Typ I und II angeregt werden (Verreck et al. 2004).

Der Subtyp I entsteht nach Stimulation von Monozyten aus peripherem Blut mit Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Nach Antigenkontakt sezernieren sie proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 und TNF- α . Zudem produzieren sie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Stickstoffderivate und Komplementfaktoren. Auf ihrer Oberfläche präsentieren sie in erhöhtem Maße MHC Klasse I und II und aktivieren Th1 Zellen (Verreck et al. 2004, Cassol et al. 2010). Sie weisen damit ein proinflammatorisches Profil auf.

Im Gegensatz dazu stehen die nach Stimulation von Monozyten aus peripherem Blut mit Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) entstehenden Makrophagen Typ II. Auf der Zelloberfläche tragen sie den Marker CD 163, was sie von den CD 163 negativen Makrophagen Typ I abgrenzt (Xu et al. 2006, Xu et al. 2007). Makrophagen Typ II produzieren nach Aufnahme apoptotischer Zellen antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und

TGF- β . Sie weisen zudem eine höhere Phagozytosekapazität als Makrophagen Typ I auf, womit sich für sie ein antiinflammatorisches Profil ergibt (Xu et al. 2006).

Als Phagozytose wird die Aufnahme von Zellschrott oder Mikroorganismen durch Phagozyten bezeichnet. Zu den Phagozyten werden Dendritische Zellen, PMN und Makrophagen gerechnet. Die Phagozytose dient damit auf der einen Seite der Verteidigung des Wirtsorganismus, auf der anderen Seite profitieren obligat intrazelluläre Parasiten wie *Leishmania* von ihr (von Stebut 2007).

Promastigote *L. major* tragen auf ihrer Oberfläche als Bestandteil der Glykokalix neben LPG, Proteophosphoglykanen und Glykoinositolphospholipiden (GIPLs) die in hoher Anzahl und Dichte vorkommende Metalloprotease Glykoprotein 63 (gp63). Die auch als Leishmaniolysin bezeichnete Protease dient dazu, den auf der Oberfläche der Promastigoten vorhandenen Komplementfaktor C3b zu C3bi zu inaktivieren. C3bi bindet mit hoher Affinität an den auf Makrophagen vorkommenden Komplementrezeptor C3R, zudem hemmt C3bi die Bildung der C5-Konvertase und damit die Bildung des Membranattackierungskomplexes (Brittingham et al. 1995).

Nach der Bindung von C3bi an den auf Makrophagen vorkommenden Komplementrezeptor C3R kommt es zur „leisen“ Aufnahme der Promastigoten in die Makrophagen: Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β wird reduziert oder für IL-12 komplett eingestellt. Auch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ist in ihrer Aktivität reduziert (Wilson u. Pearson 1988, Carrera et al. 1996).

Auch nach Aufnahme promastigotenhaltiger apoptotischer PMN durch Makrophagen kommt es zu einer Verschiebung des Zytokinsekretionsprofils der Makrophagen zur antiinflammatorischen Seite (van Zandbergen et al. 2004).

1.7 Autophagie

Bei der Autophagie handelt es sich um einen physiologischen, in eukaryotischen Zellen ablaufenden Prozess, der dazu dient, alte Proteine und Zellorganellen zu degradieren und zu recyceln. Die für die zelluläre Homöostase wichtige Autophagie tritt auf bei Nahrungsmangel, Zell- und Gewebsuntergang und Zelltod (Levine u. Klionsky 2004).

Autophagie schützt den Organismus vor Malignomen, kardialen und muskulären Erkrankungen, Neurodegeneration, verschiedenen Pathogenen und Alterung durch den Abbau schädlicher Stoffe.

Es existieren drei verschiedene Formen von Autophagie (Chaperon-vermittelt, Mikro- und Makroautophagie), die sich in der Art des Transportes zum Lysosom und in ihrer physiologischen Funktion unterscheiden. Allen ist gemein, dass der zu degradierende zytoplasmatische Bestandteil von einer Doppelmembran umschlossen wird, die anschließend mit Endosomen und Lysosomen zum Autolysosom fusioniert, in dem der Abbau des umschlossenen Inhalts erfolgt (Levine u. Kroemer 2008).

Neben höheren Organismen kommt Autophagie auch in *Saccharomyces cerevisiae*, *Leishmania major*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* vor (Besteiro et al. 2006, Kourtis u. Tavernarakis 2009).

Weiterhin ist Autophagie sowohl Bestandteil der angeborenen Immunität (Abbau in Autolysosomen) als auch der adaptiven Immunität (Präsentation zytoplasmatischer Antigene auf MHC Klasse II) (Schmid u. Münz 2007). Eine besondere Form der Autophagie ist die Xenophagie, die vor intrazellulären Pathogenen schützt (Levine 2005).

1.7.1 Chaperon-vermittelte Autophagie

Die Chaperon-vermittelte Autophagie (Chaperon mediated autophagy, CMA) wird durch Stress, wie z.B. Nahrungsmangel ausgelöst und macht ca. 30 % des Abbaus zytosolischer Proteine aus. Es werden spezifisch nur bestimmte Proteine erkannt, die ein 5 Peptide langes KFERQ-ähnliches Motiv aufweisen (Terlecky et al. 1992, Dice 2007).

Das Motiv wird durch einen Komplex aus der konstitutiv exprimierten zytosolischen Isoform (Hsc 70) des Hitzeschockproteins 70 (Hsp 70) und Co-Chaperonen erkannt. Hsp 70 ist an der Faltung von Proteinen beteiligt (Cuervo u. Dice 1996).

Nach dem Erkennen des zu degradierenden Proteins kommt es zur Bindung an das sich auf der Lysosomenoberfläche befindlichen LAMP2a. Das Protein wird entfaltet und mit Hilfe von lysosomalem Hsc 70 in das Lysosomeninnere transloziert, wo es degradiert wird. Das Hsc 70 wird danach wieder in das Zytosol entlassen, wo es erneut binden kann (Majeski u. Dice 2004, Dice 2007).

1.7.2 Mikroautophagie

Bei der konstitutiv aktiven Mikroautophagie werden die zu degradierenden Strukturen durch direkte Invagination der lysosomalen Membran in das Innere des Lysosoms aufgenommen wo sie anschließend degradiert werden.

Dabei können sowohl frei im Zytosol befindliche Strukturen als auch ganze Organellen abgebaut werden (Sattler u. Mayer 2000, Roberts et al. 2003).

1.7.3 Makroautophagie

Bei der Makroautophagie, im Folgenden nur noch als Autophagie bezeichnet, handelt es sich um einen hoch konservierten Prozess, der dem Abbau gealterter oder beschädigter Strukturen dient (Levine u. Klionsky 2004). Das zu degradierende Material wird in den *de novo* entstehenden Organellen von einer doppelten Isolationsmembran umgeben, die sich zum Autophagosom schließt. Die Autophagosomen fusionieren mit dem Lysosom, wo sie wie in der Chaperon-assoziierten Autophagie und in der Mikroautophagie abgebaut werden (Dunn 1990).

Die Herkunft der umhüllenden Membran ist nach wie vor unklar. Es gibt aber Hinweise, dass Teile der Membran aus Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi Apparat oder der Phagosomenmembran stammen (Axe et al. 2008, Hailey et al. 2010, Ravikumar et al. 2010).

Als wichtigster Inhibitor der Autophagie steht die Serin / Threoninkinase mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) an oberster Stelle der autophagischen Kaskade. Bei ausreichender Nahrungsversorgung liegt mTOR in aktivem Zustand vor und wirkt inhibierend auf Autophagie. Medikamentös lässt sie sich durch Rapamycin hemmen, wodurch ihr inhibitorischer Effekt auf Autophagie entfällt (Lum et al. 2005).

Zur Entstehung der Isolationsmembran für die Bildung der Autophagosomen tragen dann Autophagy related genes (Atg) bei. Die beiden Ubiquitin ähnlichen (Komplexe) Atg5-Atg12 und Atg8-PE (Phosphatidylethanolamin) sind notwendig für die Synthese des Autophagosoms (Ohsumi 2001).

Die Initiation der Bildung der Isolationsmembran erfolgt durch die Typ III Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3 Kinase) hVps34 und durch Atg6 (Beclin-1) (Liang et al. 1999, Lindmo u. Stenmark 2006).

Nach der Initiation werden für die Elongation der Isolationsmembran zwei gekoppelte Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme benötigt (Ohsumi 2001). Dabei kommt es durch die Enzyme Atg7 und Atg10 katalysiert zur Konjugation von Atg5 an Atg12, es entsteht der Atg5-Atg12-Komplex. Dieser bindet Atg16L1 nicht kovalent und es bildet sich der Atg5-Atg12-Atg16L1-Komplex, der essentiell für die Bildung und Elongation der Isolationsmembran zum Autophagosom ist (Mizushima et al. 1998, Mizushima 2003). Dieser Komplex befindet sich auf der Außenseite der Isolationsmembran (Mizushima et al. 2001).

Das andere Ubiquitin-ähnliche System (Atg8 = LC3, Isoformen A, B, C) entsteht aus dem inaktiven Vorläufer Pro-LC3. Durch Aktivität der Protease Atg4 entsteht durch Abspaltung des carboxyterminalen Endes aus Pro-LC3 die zytoplasmatische Form LC3-I. Durch Aktivität von Atg7 und Atg3 wird das zytosolische LC3-I an Phosphatidylethanolaminreste der Membran des Autophagosoms gekoppelt, wodurch die aktive Form LC3-II entsteht (Ichimura et al. 2000, Kabeya et al. 2000, Kirisako et al. 2000).

Während LC3-I an die Membran gekoppelt und dadurch zu LC3-II aktiviert wird, verlässt der Atg5-Atg12-Atg16L1-Komplex die Membran und wird im Zytosol recycelt. LC3-II ist gleichmäßig auf der Innen- und Außenseite der Autophagosomenmembran verteilt und eignet sich daher gut als autophagosomaler Marker (Kabeya et al. 2000).

Bei der Bildung des Autolysosoms durch Fusion des Autophagosoms mit Lysosomen kommt es zur Degradation des Inhalts sowie der inneren Membran des Autolysosoms durch lysosomale Proteasen (Levine u. Klionsky 2004).

Dabei wird sich auf der äußeren Membran befindliches LC3-II durch Atg4 abgespalten und recycelt während das LC3-II der inneren Membran auch degradiert wird (Tanida et al. 2004).

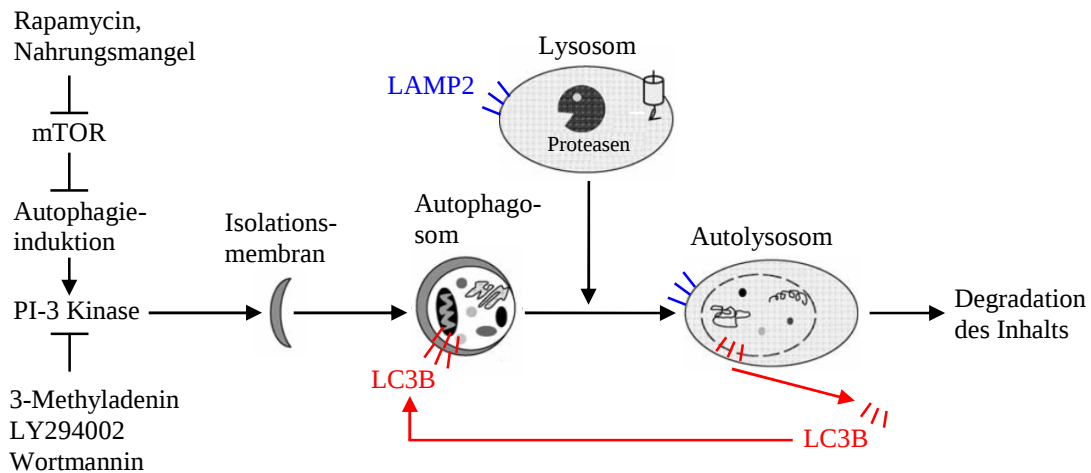


Abb. 3: Ablauf der Makroautophagie.

Erläuterungen zum Schema im Text. Abbildung modifiziert (Kourtis u. Tavernarakis 2009).
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin.

1.7.4 Autophagie und Antigenpräsentation

Im Rahmen der adaptiven Immunabwehr werden Antigene, die im Zytoplasma durch Proteasomen degradiert wurden, von MHC Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Dort werden sie von CD 8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkannt. MHC Klasse I Molekülen kommen auf der Zelloberfläche von fast allen kernhaltigen Zellen vor (Cresswell et al. 2005).

Extrazelluläre Peptide hingegen, die über den lysosomalen Weg degradiert worden sind, werden mittels MHC Klasse II Molekülen auf professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) dargeboten. Dort werden sie von CD 4⁺ T-Helferzellen erkannt. Zu den APCs zählen Dendritische Zellen sowie Monozyten und Makrophagen (Bryant u. Ploegh 2004).

Neben exogenen Peptiden werden über MHC Klasse II Moleküle aber auch nukleäre und zytoplasmatische Peptide präsentiert (Li et al. 2005). Um diese Peptide im Lysosom abzubauen bedarf es Autophagie (Dunn 1990). Schmid et al. konnten zeigen, dass Autophagosomen mit MHC Klasse II Molekülen beladenen Kompartimenten fusionieren, was z.B. Bedeutung bei der Abwehr von *Influenza* hat (Schmid et al. 2007).

1.7.5 Autophagie in Leishmanien

Auch in Leishmanien-Spezies ist Autophagie beschrieben worden, wobei der molekulare Ablauf mit oben Geschildertem vergleichbar ist.

Zum einen wird in Hungersituationen Autophagie induziert (Bates 2006, Besteiro et al. 2006).

Zum anderen ist Autophagie von großer Bedeutung für die Metazyklognese und die Entwicklung von Amastigoten aus metazyklischen Promastigoten. Dabei kommt es zum vermehrten Auftreten von Autophagosomen und vermehrter Proteindegradation was auf ablaufende zelluläre Umbauprozesse hindeutet (Alves et al. 2005, Besteiro et al. 2006, Williams et al. 2006).

Auch bei *Trypanosoma cruzi* ist Autophagie während der Entwicklung und bei Nahrungsknappheit hochreguliert (Alvarez et al. 2008 a, Alvarez et al. 2008 b)

1.7.6 Pathogene und Autophagie im Rahmen einer Infektion

Für Säugetiere spielt die Autophagie eine wichtige Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Bakterien und Viren im Rahmen der angeborenen Immunabwehr (Kirkegaard et al. 2004). Einige Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Streptokokkus pyogenes* haben Mechanismen etabliert, mit denen sie, nach Aufnahme in die Zelle, das Phagosom verlassen können und in das Zytosol gelangen. *Mycobacterium tuberculosis* inhibiert nach phagosomaler Aufnahme in Makrophagen die Reifung des Phagosoms und somit seine Elimination (Armstrong u. D'Arcy Hart 1971). Die Stimulation der Makrophagen mit IFN- γ oder Rapamycin führte zur Koloalisation von LC3 mit den Tuberkelbakterien enthaltenen Phagosomen und zur anschließenden Degradation dessen Inhalts durch Autophagie (Gutierrez et al. 2004, Deretic et al. 2009).

Streptokokkus pyogenes hingegen lysiert die Membran des ihn umhüllenden Phagosoms mit Streptolysin O und gelangt in das Zytosol wo es in Autophagosomen aufgenommen und degradiert wird (Nakagawa et al. 2004, Yoshimori 2006).

Daneben gibt es Pathogene wie *Listeria monocytogenes*, *Rickettsia conorii* und *Shigella flexneri*, die auch der Abwehr durch Autophagie entgehen. *Listeria monocytogenes* verlässt mit Hilfe von Listeriolysin O das Phagosom und gelangt in das Zytosol. Um der Degradation durch Autophagie zu entgehen, bedient es sich verschiedener das Autophagosom zer-

störender Phospholipasen C und Aktin-gestützter Beweglichkeit (Birmingham et al. 2007, Birmingham et al. 2008).

Shigella flexneri exprimiert auf der Oberfläche das für Motilität wichtige VirG, das aber durch Bindung an Atg5 der Wirtszelle Autophagie-induzierend wirkt. Mittels eines Typ III Sekretionssystems sezerniert *Shigella flexneri* IcsB, das an VirG bindet und es so für die autophagische Erkennung maskiert (Ogawa et al. 2005, Ogawa u. Sasakawa 2006).

Zudem gibt es eine dritte Gruppe von Pathogenen, die im Autophagosom der Wirtszelle replizieren. Dazu zählen *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, *Porphyromonas gingivalis*, *Toxoplasma gondii* und *Trypanosoma brucei*. Alle besitzen ein Typ IV Sekretionssystem mit dem sie die Kompartimente der Wirtszelle für sich positiv beeinflussen. Im Falle von *Brucella abortus* und *Porphyromonas gingivalis* fusionieren mit Pathogenen beladene Autophagosomen nicht mit Lysosomen. Dadurch bleibt die Degradation der Pathogene aus und sie replizieren (Dorn et al. 2002).

Coxiella burnetii dagegen überlebt und repliziert in sauren und hydrolasereichen LC3 positiven Kompartimenten (Gutierrez et al. 2005).

Ebenso überlebt *Legionella pneumophila* in sauren, LAMP1 und Cathepsin D positiven Autolysosomen (Sturgill-Koszycki u. Swanson 2000).

Auch das Wachstum von *Toxoplasma gondii* und *Trypanosoma brucei* ist abhängig von der Autophagie der Wirtszelle. In diesen Zellen induzieren *Toxoplasma gondii* und *Trypanosoma brucei* Autophagie in Abhängigkeit von Atg5 der Wirtszelle (Romano et al. 2009, Wang et al. 2009).

1.7.7 Inhibition der Autophagie

Wichtigster negativer Regulator des Autophagie induzierenden Pathways ist die Serin / Threoninkinase mammalian Target Of Rapamycin (mTOR). Durch Rapamycin lässt sich ihre Autophagie-hemmende Wirkung antagonisieren (Lum et al. 2005).

3-Methyladenin, LY294002 und Wortmannin hingegen hemmen die Bildung von Autophagosomen durch Inhibition der Phosphatidylinositol-3 Kinase, Initiatorenzym zur Bildung der Isolationsmembranen (Blommaart et al. 1997).

1.7.8 Zusammenhang zwischen einer Leishmanien-Infektion und Autophagie in der Wirtszelle

Bei mit *L. donovani* infizierten Patienten wurde beobachtet, dass es nach der Infektion zur Induktion von Autophagie im Knochenmark kam (Mitroulis et al. 2009).

Auch im Mausmodell wurde nach Hungerphasen oder nach Stimulation mit IFN- γ eine Induktion von Autophagie in BALB/C, nicht aber in C57BL/6 Mäusen beobachtet. Damit einher ging bei Infektion der Mäuse mit *Leishmania amazonensis* eine erhöhte Zahl intrazellulärer Parasiten und eine gesteigerte Infektionsrate in den beobachteten Makrophagen. Durch den Autophagie-Inhibitor Wortmannin konnte diese Effekte gehemmt werden. Pinheiro et al. folgerten, dass das Auftreten von Autophagie in der Wirtszelle das Outcome in *Leishmania amazonensis* infizierten Makrophagen mitbestimmte (Pinheiro et al. 2009).

Auch im Falle einer Infektion mit *Leishmania infantum* führte eine Inhibition der PI-3 Kinase in Dendritischen Zellen (DCs) zu einer starken Abnahme der Infektionsrate (Mitroulis et al. 2009). Nach Infektion induziert *Leishmania infantum* rasch die PI-3 Kinase und aktiviert so den autophagischen Pathway (Neves et al. 2010). All diese Manuskripte deuten auf die Wichtigkeit von Autophagie bei der Etablierung einer Infektion mit *Leishmania* hin.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Es ist bekannt, dass bei einer Infektion von Makrophagen mit metazyklischen promastigoten *L. major* apoptotische Promastigoten den vitalen Promastigoten in altruistischer Weise zu überleben helfen.

Zudem wurde bei mit promastigoten *L. amazonensis* infizierten murinen Makrophagen entdeckt, dass das Auftreten von Autophagie mit erhöhten Infektionsraten korreliert.

Daraus wurde als Grundhypothese der vorliegenden Arbeit abgeleitet, dass ein Zusammenhang zwischen Autophagie in der Wirtszelle und Infektionsrate besteht. Dieser Zusammenhang soll in aus humanem Blut isolierten Monozyten untersucht werden.

Für die Untersuchungen werden zwei Hypothesen aufgestellt:

1. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Autophagie und der als Altruismus zu bezeichnenden Tatsache, dass apoptotische Promastigoten vitalen Promastigoten dabei helfen, in Makrophagen zu überleben, weil
2. apoptotische Promastigoten bei der Infektion von Makrophagen mit dem autophagischen Pathway der Wirtszelle interagieren und so den vitalen Promastigoten beim Überleben helfen.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, wird

- das Auftreten von Autophagie in Abhängigkeit vom Anteil apoptotischer Promastigoten in der infizierenden Population untersucht
- die Kinetik der Autophagie untersucht
- nach dem Induktor der Autophagie bei *L. major* gesucht und dabei Phosphatidylserin und LPG untersucht
- das Auftreten von Autophagie nach Amastigoten Infektion untersucht
- eine neue Färbemethode auf Promastigoten etabliert und damit deren Verhalten bzgl. Autophagie analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Zellen

Buffy Coat

DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg
– Hessen, Institut Ulm, Deutschland

2.1.2 Leishmanien Stämme

Leishmania major Isolate

Isoliert aus einer Hautbiopsie eines israeli-
schen Patienten

MHOM/IL/81/FEBNI

Freundlicherweise bereitgestellt von Dr. F
Ebert, Bernhard Nocht Institut für Tropen-
medizin, Hamburg, Deutschland

MHOM/SU/73/5-ASKH

Freundlicherweise bereitgestellt von Prof.
Dr. F. H. Routier, Medizinische Hochschule
Hannover, Deutschland

2.1.3 Geräte

CO₂ Inkubatoren

Heraeus BBD 6220

Thermo Forma 3010

Thermo, Dreieich, Deutschland

Thermo, Dreieich, Deutschland

Durchflusszytometer

FACSCalibur® II

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Flockeneisbereiter AF 80

Scotsman, Pogliano, Italien

Gefrierschränke

-20 °C Öko Super

-80 °C Herafreeze

Liebherr, Bulle, Schweiz

Heraeus Sepatech GmbH, Osterode,
Deutschland

MACS® MultiStand

Milteny Biotec, Bergisch Gladbach,
Deutschland

Mikroskope

Axio Imager M2

Axiovert 40 CFL

LSM 710

Olympus CH-2

Olympus IMT-2

Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Olympus, Tokio, Japan

Olympus, Tokio, Japan

pH-Meter, digital pH-Meter pH 525

WTW GmbH, Weilheim, Deutschland

Pipetten inkl. Multikanalpipette 1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfen Accu-Jet [®] Pro PIPET BOY acu PIPET BOY plus	Brand, Wertheim, Deutschland Tecnomara, Fernwald, Deutschland Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Sicherheitswerkbänke BDK UVF 6.12 S Lamin Air [®] HBB 2448 MSC Advantage	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland Thermo, Dreieich, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer REAX 2000 RS1	Heidolph, Kelheim, Deutschland IDL, Nidderau, Deutschland
Waagen AG 204 Kern 470	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland Kern GmbH, Ettlingen, Deutschland
Wasserbad GFL	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zählkammern Leishmanien: Tiefe 0,02 mm; 0,0025 mm ² Makrophagen: Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm ²	Neubauer Improved, Marienfeld, Deutschland Neubauer Improved, Marienfeld, Deutschland
Zentrifugen Biofuge 3 Cytospin 3 Zentrifuge Microfuge [®] R Multifuge 3 S-R (Platten)zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland Shandon, Frankfurt, Deutschland Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland Heraeus, Thermo, Dreieich, Deutschland Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland

2.1.4 Laborbedarf

Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Aqua bidest	Apotheke Universität Ulm, Ulm, Deutschland
Chamber Slide Tm Lab-Tek Tm 8 Wells	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Cytoträger Zentrifugeneinsätze	Shandon, Pittsburg, PA, USA
Deckglas 24 x 32 mm 24 x 50 mm	VWR International, Darmstadt, Deutschland VWR International, Darmstadt, Deutschland

Einmalhandschuhe Semper Care [®]	Semper Care [®] , Wien, Österreich
FACS-Röhrchen	
1,4 ml	Micronic, Lelystad, Niederlande
5 ml	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Filterplättchen Shandon Filter Cards für Cytospins	Shandon, Pittsburg, PA, USA
MACS [®] Annexin V Micro Bead Kit	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrotiterplatte 6, 96 Well Microtest [™] Flachboden	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Nagellack	Manhattan, Eislingen, Deutschland
Objektträger Cytoslide [®]	Shandon, Frankfurt, Deutschland
Petrischale	
92 x 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
100 x 20 mm	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Pipettenspitzen, gestopft	
Bioshere [®] 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
Serologische Pipetten	
Stripette [™] 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Inc., New York, USA
Spritzen	
10 ml, 50 ml	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Spritzenfilter	
25 mm, 0,2 µm Membran	Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen	
50 ml, 25 cm ² ; 250 ml, 75 cm ²	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Zellschaber	
16 cm	Sarstedt, Newton, USA
23 cm	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	
15 ml, 50 ml	BD Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich

2.1.5 Chemische Reagenzien

3-Methyladenin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Adenin	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Ammoniumchlorid	Molecular Sigma Biology, St. Louis, USA
Annexin V FLUOS	Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Biotin	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Sigma, Deisendorf, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA, Pasching, Österreich
Brain Heart Infusion Agar	Oxoid, Basingstoke, Großbritannien
Calcium Chlorid Dihydrat	Fluka, Buchs, Schweiz Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diff-Quik-Färbeset	Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz
Ethanol 95 %	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälber Serum (FCS)	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Formaldehyd	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Hemin	Sigma, Deisendorf, Deutschland
HEPES Puffer 1 M	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Histopaque [®] 1119	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Humaner rekombinanter Granulozyten Makrophagen Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	Bayer Healthcare Pharmaceutical, Leverkus- en, Deutschland
Hygromycin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Immersionsöl Immersol 518 F	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Isopropanol	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Kaninchenblut, fibrinfrei	Elocin-Lab GmbH, Gladbeck, Deutschland
Kaninchenserum	Sigma, Deisendorf, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lipobiotin	Freundlicherweise bereitgestellt von PD Dr. N. Reiling, Forschungszentrum Borstel, Deutschland
Lymphozyten Separations Medium 1077 (LSM 1077)	PAA, Pasching, Österreich
Makrophagen Colony Stimulating Factor (M-CSF)	PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Natronlauge 1 mol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normales humanes Serum (hitzeinaktiviert) (NHS)	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phleomycin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
ProLong [®] Gold antifade reagent	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rekombinantes Hühner Annexin A5	Responsif GmbH, Erlangen, Deutschland
Ringer Lösung Ecotainer [®]	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 199, 1640 Medium	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Salzsäure	
1 mol/l	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
37 %	VWR International, Darmstadt, Deutschland
5 mol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saponin aus Quillaja Rinde	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Triethanolamin	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Wortmannin	Sigma, Deisendorf, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Anti humanes LAMP2 Maus monoklonaler Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti humanes LC3B Kaninchen polyklonaler Antikörper	Cell Signalling, Boston, USA
Anti Kaninchen Ziege Alexa Fluor [®] 568 Konjugatantikörper	Molecular Probes Europe, Poort Gebouw, Niederlande
Anti Leishmanien Maus polyklonaler Antikörper (Serum <i>L. major</i> infizierter BALB/c Mäuse nach 14 tägiger Infektion)	Freundlicherweise bereitgestellt von PD Dr. G. van Zandbergen, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland
Anti Maus Kaninchen Alexa Fluor [®] 488 Konjugatantikörper	Molecular Probes Europe, Poort Gebouw, Niederlande
Streptavidin Alexa Fluor [®] 647 Konjugatantikörper	Molecular Probes Europe, Poort Gebouw, Niederlande
Succinimidyl Ester Alexa Fluor [®] 350	Molecular Probes Europe, Poort Gebouw, Niederlande

2.1.7 Kulturmedien, Puffer, Agar

Alex Amastigoten Medium (AAM)	RPMI 1640 Medium 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin 10 % (v/v) FCS 2 % (v/v) L-Glutamin pH 5,5 eingestellt mit HCl Steril filtriert mit 0,2 µm Spritzenfilter
FACS Puffer	PBS 1 % (m/v) BSA 1 % (v/v) FCS 1 % (v/v) NHS
Färbepuffer 1	PBS 1 % (m/v) BSA 1 % (v/v) FCS 1 % (v/v) NHS
Färbepuffer 2	PBS 0,5 % (m/v) Saponin (steril filtriert mit 0,2 µm Spritzenfilter) 1 % (m/v) BSA 1 % (v/v) FCS 1 % (v/v) NHS
Fixierlösung	PBS 4 % (v/v) Formaldehyd
Flüssigmedium	RPMI 199 Medium 0,2 % (v/v) 0,25 % Hemin 0,4 % (v/v) 0,1 % Biotin 1 % (v/v) 10 mM Adenin 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin 10 % (v/v) FCS 2 % (v/v) HEPES Puffer pH 7,5
Komplettmedium	RPMI 1640 Medium 0,2 % Beta-Mercaptoethanol 1 % (v/v) HEPES Puffer 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin 10 % (v/v) FCS
Leishmanienmedium (<i>Lm</i> -Medium)	RPMI 1640 Medium 0,2 % (v/v) Beta-Mercaptoethanol 1 % (v/v) HEPES Puffer 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin 5 % (v/v) FCS

MACS-Puffer 1	Ringerlösung 0,5 % (m/v) BSA pH 5,5 eingestellt mit HCl Steril filtriert mit 0,2 µm Spritzenfilter
MACS-Puffer 2	PBS 0,5 % (m/v) BSA pH 5,5 eingestellt mit HCl Steril filtriert mit 0,2 µm Spritzenfilter
Novy-Nicolle-McNeal Agar (NNN-Agar)	16,6 % (v/v) Kaninchenblut fibrinfrei 16,6 % (v/v) PBS 62,2 % (v/v) Brain Heart Infusion Agar 66,2 U/ml Penicillin 66,2 µg/ml Streptomycin
Waschpuffer	PBS 5 % (v/v) Komplettmedium

2.1.8 Software

Axio Visio 4.8	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
CellQuest [®] Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Microsoft [®] Office Excel 2003	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
Microsoft [®] Office PowerPoint [®] 2003	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
Microsoft [®] Office Word 2003	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
Summit 4.2	DakoCytomation, Fort Collins, USA
Zen 2009 Light Edition	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Zen 2010	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellzahlbestimmung von Leishmanien und Makrophagen

Zur Bestimmung der Anzahl der in einem bestimmten Volumen enthaltenen Leishmanien oder Makrophagen wurden Neubauer Improved Zählkammern unterschiedlicher Tiefe verwendet.

Für Leishmanien bzw. Makrophagen wurden Zählkammern der Tiefe 0,02 mm bzw. 1 mm verwendet.

Zwischen Glasplatte und Deckglas der Zählkammer wurden 5 µl der zu zählenden Leishmanien- bzw. 10 µl der zu zählenden Makrophagenlösung pipettiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde lichtmikroskopisch die Anzahl der Leishmanien bzw. Makrophagen in 16 Großquadraten bestimmt und mit dem Kammerfaktor multipliziert. Der Kammerfaktor betrug für die Leishmanien 50.000, für Makrophagen 10.000.

Das Ergebnis gibt die Anzahl der Leishmanien bzw. Makrophagen pro ml der Ausgangslösung an.

2.2.1.2 Parasiten

2.2.1.2.1 Kultur promastigoter Leishmanien

Die bei -140 °C in flüssigem Stickstoff lagernden promastigoten Leishmanien wurden für die Kultur bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, mit 4 ml FCS versetzt und anschließend für 8 Minuten bei 2.400 g abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml Leishmanienmedium (*Lm*-Medium) aufgenommen und für 8 Minuten bei 2.400 g abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Leishmanien in *Lm*-Medium aufgenommen, auf eine Konzentration von 10^6 vitale Leishmanien/ml *Lm*-Medium eingestellt und in 96-Well-Flachboden-Blutagarplatten mit Novy-Nicolle-McNeal-Agar (NNN-Agar) eingesetzt. Bei *Leishmania major* wurde das *Lm*-Medium ohne Zusätze verwendet, bei *Leishmania major* 5 ASKH wurde das *Lm*-Medium mit 5 µg Phleomycin/ml und 50 µg Hygro-

mycin/ml versetzt. Jedes Well wurde mit 100 µl der Leishmanienlösung (10^5 vitale Parasiten) bestückt.

Bei dem schräg in die 96-Wells-Flachbodenplatte gegossenem Novy-Nicolle-McNeal-Agar (NNN-Agar) handelte es sich um einen aus 100 ml defibriniertem Kaninchenblut, 100 ml sterilem PBS, 4 ml Penicillin/ Streptomycin und 400 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) Agar hergestellten Blutagar.

Durch Zugabe der in *Lm*-Medium gelösten Leishmanien zu der festen Agarphase entstand ein für die Entwicklung der Parasiten günstiges Zweiphasensystem.

Die Promastigotenkultur wurde bei 27 °C und 5 % CO₂ für 7 Tage inkubiert. Nach 7 Tagen erfolgte die Passagierung der sich in der stationären Wachstumsphase befindlichen Parasiten in eine neue Blutagarplatte. Nach mehrfachem Resuspendieren wurde die flüssige Phase aus 5 Wells entnommen und die Zahl der darin enthaltenen vitalen Parasiten bestimmt. Die Konzentration wurde auf 10^6 /ml *Lm*-Medium eingestellt und mit einer Multikanalpipette in eine 96-Wells-Flachboden-Blutagarplatte zu je 100 µl (100.000 vitale Leishmanien) pro Well überführt.

Nach 9maliger Passage wurde die Kultur verworfen.

2.2.1.2.2 Generierung amastigoter Leishmanien

2.2.1.2.2.1 Flüssigkultur

Zur Generierung amastigoter Leishmanien wurden aus einer Flachboden Blutagarplatte mit einer 3 bis 4 Tage alten, sich in der log-Phase befindlichen Promastigotenkultur Parasiten aus 4 Wells entnommen, in 5 ml Flüssigmedium aufgenommen und in eine 25 cm² messende Kulturflasche überführt, in der sie für 3 Tage bei 27 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden.

2.2.1.2.2.2 Vorkultur

Die promastigoten Leishmanien wurden anschließend in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 8 Minuten bei 1.450 g und 20 °C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml Alex Amastigoten Medium (AAM) resuspendiert und erneut für 8 Minuten bei 2.400 g und 20 °C abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in AAM resuspendiert, die Konzentration der promastigoten Leishmanien auf $20 \times 10^6/\text{ml}$ AAM eingestellt und in einer Menge von maximal $100 \times 10^6/\text{Kulturflasche}$ in 25 cm^2 Kulturflaschen überführt.

Während der 7 bis 14 Tage bei 33°C und $5\% \text{ CO}_2$ andauernden Inkubation wandelten sich auf Grund des sauren pH-Wertes (5,5) des AAMs promastigote in amastigote Leishmanien um.

2.2.1.2.2.3 Isolierung reiner amastigoter Leishmanien

Die Aufreinigung der durch Umwandlung entstandenen amastigoten Leishmanien von verbliebenen Promastigoten erfolgte mittels eines 5 stufigen Dichtegradienten diskontinuierlichen Volumens, bestehend aus AAM und auf 37°C vorgewärmtem Histopaque[®] 1119.

Die amastigoten Leishmanien wurden aus den Kulturflaschen heraus in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, für 8 Minuten bei 2.400 g und 20°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 ml $50\% \text{ (v/v)}$ ($\rho = 1,0595 \text{ g/ml}$) Histopaque[®] 1119 aufgenommen.

Der in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgeschichtete Gradient bestand aus von unten nach oben aufeinanderfolgenden Schichten unterschiedlicher Dichte: 3 ml $100\% \text{ (v/v)}$ ($\rho = 1,119 \text{ g/ml}$) Histopaque[®] 1119, 2 ml $90\% \text{ (v/v)}$ ($\rho = 1,1071 \text{ g/ml}$) Histopaque[®] 1119, 3 ml $80\% \text{ (v/v)}$ ($\rho = 1,0952 \text{ g/ml}$) Histopaque[®] 1119, 2 ml $70\% \text{ (v/v)}$ ($\rho = 1,0833 \text{ g/ml}$) Histopaque[®] 1119 gefolgt von den leishmanienhaltigen 2,5 ml $50\% \text{ (v/v)}$ ($\rho = 1,0595 \text{ g/ml}$) Histopaque[®] 1119.

Der Gradient wurde bei niedrigster Beschleunigung und Abbremsung für 35 Minuten bei 2.400 g und 20°C zentrifugiert

Nach der Zentrifugierung waren 4 Banden an den Übergängen zwischen den einzelnen Dichteabstufungen sichtbar. Jede Bande wurde mit dem darüberliegenden Medium in je ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zum Auswaschen des Histopaque[®] 1119 mit 6 ml AAM verdünnt und für 8 Minuten bei 2.400 g und 20°C abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte derselbe Waschschrift erneut. Danach wurde das Pellet in AAM gelöst, die Konzentration der amastigoten Leishmanien auf $20 \times 10^6/\text{ml}$ AAM eingestellt und in einer Menge von maximal $100 \times 10^6/\text{Kulturflasche}$ in 25 cm^2 Kulturflaschen überführt. Diese wurden bei 33°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert.

Zur Kontrolle der Reinheit der amastigoten Leishmanien der einzelnen Banden wurden teilweise Cytospin Präparate (s.u.) angefertigt, die nach Färbung mittels Diff-Quik (s.u.)

mikroskopisch analysiert werden konnten. Die höchste Reinheit (> 95%) wurde in der Schicht 70 bis 80 % (v/v) Histopaque[®] 1119 erreicht.

2.2.1.2.3 Abtöten promastigoter Leishmanien mit Miltefosin und Staurosporin

Zum Abtöten promastigoter Leishmanien wurden Promastigoten einer 7 Tage alten Kultur aus einer 96-Wells-Flachboden-Blutagarplatte entnommen und auf eine Konzentration von 100×10^6 /ml mit Miltefosin bzw. Staurosporin vorbehandeltem *Lm*-Medium eingestellt.

Für das Abtöten mit Miltefosin war das *Lm*-Medium zuvor durch Zugabe von 73 mM in DMSO gelöstem Miltefosin auf eine Wirkstoffkonzentration von 25 μ M eingestellt worden. Für das Abtöten mit Staurosporin wurde das *Lm*-Medium durch Zugabe von 2,1 mM in DMSO gelöstem Staurosporin auf eine Wirkstoffkonzentration von 15 μ M eingestellt. Die abzutötenden Leishmanien wurden für mindestens 18 Stunden bei 27 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.1.2.4 Blockade von Phosphatidylserin mittels Annexin

Um das auf der Oberfläche apoptotischer Leishmanien vorkommende Phosphatidylserin zu blockieren, wurden aus einer 7 Tage alten Kultur Promastigoten entnommen. Nach Zentrifugierung für 8 Minuten bei 2.400 g wurde das Pellet in Kompletmedium resuspendiert und auf eine Konzentration von 100×10^6 Parasiten/ml eingestellt. Davon wurden 100 μ l (10×10^6 Parasiten) mit 3,85 μ l einer 1 M CaCl₂dihydrat Lösung versetzt, wodurch sich eine Konzentration von 38,5 mM CaCl₂dihydrat einstellte.

Davon wiederum wurden 40 μ l (4×10^6 Parasiten) entnommen und mit 16 μ l rekombinanten Hühner Annexin A5 versetzt und für mindestens 15 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert.

Durch Zugabe von 10 μ l der mit Annexin vorbehandelten Parasiten zu sich in 100 μ l Kompletmedium befindlichen Makrophagen in einem Chamber Slide reduzierte sich die CaCl₂dihydrat Konzentration auf für die Zelle erträgliche 2,5 mM.

2.2.1.2.5 MACS, Auftrennung apoptotischer und lebendiger Leishmanien

Zum Erhalt reiner apoptotischer (Phosphatidylserin positiv) und reiner vitaler (Phosphatidylserin negativ) promastigoter Leishmanien wurde eine Trennung mittels MACS (Magnetic Activated Cell Sorting, Magnetic Cell Separation) durchgeführt.

Für die Trennung wurden zwei Puffer benötigt: zum einen ein calciumhaltiger Puffer (MACS-Puffer 1), in dessen Gegenwart auf Grund des enthaltenen Calciums Annexin an das auf der Oberfläche apoptotischer Leishmanien zu findende Phosphatidylserin binden kann, zum anderen ein calciumfreier Puffer (MACS-Puffer 2).

Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur wurden auf eine Konzentration von 250×10^6 Parasiten/ml eingestellt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Nachfolgend wurden 10 ml MACS-Puffer 1 zu der Leishmanienlösung gegeben und für 10 Minuten bei 2650 g und 4 °C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte erneut oben beschriebener Waschschrift.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 400 µl Macs-Puffer 1 resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl Annexin A5 beads für 15 Minuten in einem Kühlschrank inkubiert.

Danach wurde das Volumen mit 10 ml MACS-Puffer 1 erhöht und erneut für 10 Minuten bei 2650 g und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml MACS-Puffer 1 gelöst und auf die eisenkugelhaltige Trennsäule gegeben. Diese wurde in einen für 30 Minuten auf -20 °C abgekühlten Magneten eingehängt.

Die apoptotische und vitale Leishmanien enthaltende Lösung durchfloss die Trennsäule, wobei die mit Annexin A5 beads markierten apoptotischen Leishmanien in der Trennsäule haften blieben. Die durchfließenden reinen vitalen Leishmanien wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen, im Folgenden Zentrifugenröhrchen 1 genannt, aufgefangen.

Um restliche noch in der Trennsäule verbliebene vitale Leishmanien zu erhalten, wurde die Trennsäule 3mal mit je 3 ml MACS-Puffer 1 gespült. Die durchfließenden vitalen Leishmanien minderer Reinheit wurden in einem zweiten Zentrifugenröhrchen, im Folgenden Zentrifugenröhrchen 2 genannt, aufgefangen.

Um die apoptotischen Leishmanien zu gewinnen, wurden 2 ml MACS-Puffer 2 auf die Trennsäule gegeben, wobei sich auf Grund der Abwesenheit von Calcium die Bindung zwischen dem Phosphatidylserin apoptotischer Leishmanien und den Annexin markierten magnetischen beads löste. In einem weiteren Zentrifugenröhrchen, im Folgenden Zentrifu-

genröhrchen 3 genannt, wurden die minder reinen apoptotischen Leishmanien aufgefangen.

Nachfolgend wurde die Trennsäule mit 4 mal 3 ml MACS-Puffer 2 gespült um alle verbliebenen Phosphatidylserin positiven Leishmanien zu gewinnen. Die hoch reinen apoptotischen Parasiten wurden in einem weiteren Zentrifugenröhrchen, im Folgenden Zentrifugenröhrchen 4 genannt, aufgefangen.

Nach Austausch der Trennsäule gegen eine neue, ebenfalls mit 4 mal 3 ml MACS-Puffer 1 vorbefeuchtete Trennsäule, wurden die vitalen Leishmanien minderer Reinheit auf die Trennsäule gegeben und die nun hochreinen Parasiten in Zentrifugenröhrchen 1 aufgefangen.

Die Zentrifugenröhrchen 1 und 2 wurden auf Eis gelagert um dem Auftreten von Apoptose vorzubeugen.

Zur Kontrolle des Erfolges der Trennung wurde im Anschluss eine durchflusszytometrisch auszuwertende Färbung der apoptotischen (Zentrifugenröhrchen 4) bzw. vitalen (Zentrifugenröhrchen 1) Leishmanien auf Phosphatidylserinpositivität mit Annexin V FLUOS durchgeführt.

2.2.1.3 Humane Zellen

2.2.1.3.1 Isolation mononukleärer Zellen (PBMCs) aus peripherem Blut

Zur Isolation humaner mononukleärer Zellen (PBMCs) wurden aus Vollblutspenden generierte Buffy Coats verwendet.

Der Buffy Coat (30 ml) wurde mit PBS auf ein Volumen von 100 ml verdünnt. Zur Trennung der Monozyten von den restlichen Blutbestandteilen wurde ein Dichtegradient verwendet. Dazu wurde in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen je 15 ml auf 37 °C vorgewärmtes Lymphozytenseparationsmedium (LSM) 1077 vorgelegt und mit je 25 ml des verdünnten Blutes überschichtet.

Anschließend wurde bei niedrigster Beschleunigung und Abbremsung für 30 Minuten bei 1.600 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Die Monozyten enthaltende Bande und der sich darüber befindliche Überstand wurden abgenommen und in 6 neue Zentrifugenröhrchen überführt und mit Waschpuffer auf jeweils 50 ml aufgefüllt.

Zum Auswaschen von Erythrozyten, Thrombozyten und Resten von LSM wurde danach bei maximaler Beschleunigung und Abbremsung für 8 Minuten bei 2.400 Umdrehun-

gen/Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets in Waschpuffer resuspendiert und anschließend mit Waschpuffer auf 50 ml aufgefüllt.

Dieser Waschschrift erfolgte nach demselben Muster erneut bei 1.600 und 800 Umdrehungen/Minute.

Nach dem letzten Waschschrift wurden durch Zugabe von 15 ml einer 0,15 Molaren Ammoniumchloridlösung pro Zentrifugenröhrchen die verbliebenen Erythrozyten lysiert. Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurde die Lysereaktion durch Zugabe von Waschpuffer auf ein Volumen von 50 ml beendet. Im Anschluss daran wurde für 8 Minuten bei 800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert.

Nach dem Verwerfen der Überstände wurden die Pellets mit Waschpuffer resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt, mit Waschpuffer auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 8 Minuten bei 800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert.

Da die Monozyten die Fähigkeit zur Plastikadhärenz haben, wurden zur weiteren Kultivierung der Zellen 25 cm² messende Zellkulturflaschen verwendet. Dazu wurden die Monozyten auf 9 bis 11 x 10⁶/ml Inkubationsmedium (Komplettmedium mit 1 % adhäsionsförderndem hitzeinaktiviertem Plasma) eingestellt.

In jede Zellkulturflasche wurden zwischen 45 x 10⁶ und 55 x 10⁶ Zellen in einem Gesamtvolumen von 5 ml Inkubationsmedium gegeben und anschließend für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium mit den sich darin befindlichen nicht adhären Zellen verworfen. Jede Zellkulturflasche wurde zweimal durch mehrmaliges Überspülen des Flaschenbodens mit auf 37 °C vorgewärmtem Waschpuffer von verbliebenen Erythrozyten, Lymphozyten und nicht adhären Monozyten befreit.

Zur Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen Typ I bzw. Typ II wurden die frisch adhären Zellen mit Wachstumsfaktoren behandelt: 10 ng GM-CSF/ml Komplettmedium zur Differenzierung zu Makrophagen Typ I bzw. 50 ng MCSF/ml Komplettmedium zur Differenzierung zu Makrophagen Typ II. Dabei wurden pro Zellkulturflasche 5 ml des mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor versetzten Komplettmediums zugegeben.

Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 bis 7 Tage inkubiert.

2.2.1.3.2 Blockade der PI-3 Kinase

Zur Blockade von Autophagie wurde die PI-3 Kinase als Initiatorenzym mit 3-Methyladenin bzw. Wortmannin blockiert.

2.2.1.3.2.1 Inhibition der PI-3 Kinase durch 3-Methyladenin

Das als Pulver vorliegende 3-Methyladenin ($M = 149 \text{ g/mol}$) wurde auf eine Konzentration von 5 mM, 10 mM und 20 mM in Kompletmedium eingestellt.

Die zu behandelnden und in Kompletmedium gelösten Makrophagen waren zuvor mindestens 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert worden, um eine ausreichende Adhärenz an das Plastik des Chamber Slides zu erreichen (s.u.).

Die mit 5 mM, 10 mM bzw. 20 mM 3-Methyladenin behandelten Makrophagen wurden für 1,5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Anschließend wurden die Wells 2-mal mit Waschpuffer gewaschen, um freies 3-Methyladenin zu entfernen.

Die Infektion mit Leishmanien erfolgte wie unter 2.2.1.3.3 geschildert.

2.2.1.3.2.2 Inhibition der PI-3 Kinase durch Wortmannin

100 μM in DMSO gelöstes Wortmannin wurde auf eine Konzentration von 100 nM in Kompletmedium eingestellt. Die zu behandelnden und in Kompletmedium gelösten Makrophagen waren zuvor mindestens 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert worden um eine ausreichende Adhärenz an das Plastik des Chamber Slides bzw. der 96-Wells-Flachbodenplatte zu erreichen.

Die mit 100 nM Wortmannin behandelten Makrophagen wurden für 1,5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Anschließend wurden die behandelten adhärennten Makrophagen 2-mal mit Waschpuffer gewaschen, um freies Wortmannin zu entfernen.

Die Infektion mit Leishmanien erfolgte wie unter 2.2.1.3.3 geschildert.

2.2.1.3.3 Infektion von Makrophagen

Für die Infektion wurden mindestens 5 Tage alte Makrophagen verwendet. Am Tag vor der Infektion wurde mikroskopisch die Differenzierung der Zellen geprüft.

Bei hinreichender Differenziertheit wurden die Kulturflaschen für mindestens 30 Minuten auf Eis gestellt um die Adhärenz der Zellen an das Plastik der Kulturflaschen zu lösen.

Danach wurden die Makrophagen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Um in der Kulturflasche verbliebene Makrophagen zu erhalten, wurden die Kulturflaschen zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gespült und der Waschpuffer ebenfalls in das 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Dieses wurde für 8 Minuten bei 2.200 Umdrehungen/Minute und 20 °C abzentrifugiert, das Pellet in Kompletmedium aufgenommen, die Anzahl der Makrophagen darin bestimmt und die gewünschte Konzentration eingestellt.

Bei Infektionen in Chamber Slides und 96-Wells-Flachbodenplatten wurde eine Konzentration von 10^6 Makrophagen/ml Kompletmedium gewählt, wobei jedes Well mit 10^5 Makrophagen (100 µl) bestückt wurde. Zur Adhärenz der Makrophagen an das Plastik wurde der Chamber Slide bzw. die 96-Wells-Flachbodenplatte anschließend für mindestens 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Danach erfolgte in entsprechenden Versuchen wie unter 2.2.1.3.2 geschildert eine 1,5 stündige Präinkubation mit den PI-3 Kinase Inhibitoren 3-Methyladenin bzw. Wortmannin.

Die zur Infektion genutzten Leishmanien wurden auf eine Konzentration von 100×10^6 Leishmanien/ml Kompletmedium eingestellt und in einem Volumen von 10 µl (10^6 Parasiten) pro Well zu den adhärennten Makrophagen gegeben. Somit ergab sich ein zehnfacher Überschuss an Parasiten bezogen auf die Menge der Makrophagen.

Der/ die mit infizierten Makrophagen beladene Chamber Slide/ 96-Wells-Flachbodenplatte wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Bei Kurzzeitinkubationen (Inkubationsdauer ≤ 3 Stunden) wurde nach Ende der Inkubationszeit (15 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden) jedes Well 2-mal mit je 100 µl auf 37 °C vorgewärmtem Waschpuffer gewaschen um nicht aufgenommene, extrazelluläre Leishmanien zu entfernen.

Dieselben Waschschrte wurden auch bei Langzeitinkubationen (Inkubationsdauer > 3 Stunden) nach 3 Stunden durchgeführt. Auch hier wurde nach Ende der Inkubationszeit jedes Well zweimal mit je 100 µl auf 37 °C vorgewärmtem Waschpuffer gewaschen.

Im Falle des Chamber Slides wurden die Zellen mit 100 µl Fixierlösung fixiert. Die Chamber Slides konnten in diesem Zustand bis zu 72 Stunden bei 4 °C lichtgeschützt gelagert werden.

Im Falle der 96-Wells-Flachbodenplatte erfolgte im Anschluss eine wie unter 2.2.3.3 geschilderte Diff-Quik-Färbung.

2.2.2 Labeling pro- und amastigoter Leishmanien

Zur Visualisierung pro- und amastigoter Leishmanien wurden diese mit Succinimidyl Ester Alexa Fluor® 350 bzw. Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 angefärbt.

2.2.2.1 Konzentrationstestung für das Labeling mit Lipobiotin und Streptavidin

Die zu labelnden Leishmanien wurden auf eine Konzentration von 100×10^6 /ml RPMI eingestellt und in einer Menge von 10×10^6 /100 µl RPMI in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese wurde für 6 Minuten bei 3.800 g und 10 °C abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in 100 µl verdünntem Lipobiotin aufgenommen und für 1 Stunde lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Dabei sollte der Lipidanteil des Lipobiotins in die Membran der Parasiten integrieren, der Biotinanteil nach außen ragen.

Das Lipobiotin wurde für die Ermittlung seiner optimalen Konzentration mit RPMI 1:50, 1:100, 1:150 und 1:200 verdünnt.

Danach erfolgte eine Zentrifugierung für 6 Minuten bei 3.800 g und 10 °C. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in 100 µl RPMI gewaschen um Reste freien Lipobiotins zu entfernen und erneut für 6 Minuten bei 3.800 g und 10 °C abzentrifugiert.

Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 100 µl 1:100 in RPMI verdünntem Streptavidin Alexa Fluor® 647 aufgenommen und für 1 Stunde lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Das Streptavidin bindet dabei mit hoher Affinität an das freiliegende Biotinende des Lipobiotins.

Nach Ende der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße für 6 Minuten bei 3.800 g und 10 °C abzentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets in 100 µl RPMI aufgenommen.

Jeweils 50 µl davon wurden für durchflusszytometrische Analysen verwendet.

2.2.2.2 Labeling mit Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 sowie DAPI

Die zu labelnden Leishmanien wurden auf eine Konzentration $100 \times 10^6/\text{ml}$ RPMI eingestellt und in einer Menge von $10 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ RPMI in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Dieses wurde für 6 Minuten bei 3.800 g und 10°C abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in $100 \mu\text{l}$ Labelinglösung 1 aufgenommen und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Labelinglösung 1 bestand aus 1:75 in RPMI verdünntem Lipobiotin.

Danach erfolgte eine Zentrifugierung für 6 Minuten bei 3.800 g und 10°C . Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in $100 \mu\text{l}$ RPMI gewaschen um Reste freien Lipobiotins zu entfernen und erneut für 6 Minuten bei 3.800 g und 10°C abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $100 \mu\text{l}$ Labelinglösung 2 aufgenommen und für mindestens 1 Stunde lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Die Labelinglösung 2 bestand aus 1:100 in RPMI verdünntem Streptavidin Alexa Fluor® 647 und 1:50 in RPMI verdünnten DAPI.

Nach Ende der Inkubation wurde für 6 Minuten bei 3.800 g und 10°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in $100 \mu\text{l}$ RPMI aufgenommen.

Die Parasiten wurden sowohl für durchflusszytometrische als auch in Form von Diff-Quik-Präparaten für licht- und fluoreszenzmikroskopische Analysen verwendet.

Zudem wurden Makrophagen mit auf diese Weise, aber ohne DAPI, gelabelten Promastigoten infiziert.

2.2.2.3 Labeling mit Succinimidyl Ester Alexa Fluor® 350

Die zu labelnden Leishmanien wurden auf eine Konzentration $100 \times 10^6/\text{ml}$ *Lm*-Medium eingestellt. Davon wurden 10×10^6 Parasiten ($100 \mu\text{l}$) in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 6 Minuten bei 3.800 g und 10°C abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in $100 \mu\text{l}$ 1:30 in *Lm*-Medium verdünntem Succinimidyl Ester Alexa Fluor® 350 aufgenommen und für mindestens 1 Stunde bei 27°C und 4 % CO_2 inkubiert.

Danach erfolgte eine Zentrifugierung für 6 Minuten bei 3.800 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $100 \mu\text{l}$ RPMI aufgenommen.

Danach wurden die Parasiten für licht- und fluoreszenzmikroskopische Analysen verwendet.

Zudem wurden Makrophagen mit auf diese Weise gelabelten Promastigoten infiziert.

2.2.3 Vorbereitung für die Auswertung

2.2.3.1 Intrazelluläre Färbung

Zur Visualisierung intrazellulärer Strukturen und sich innerhalb der Makrophagen befindlicher Leishmanien wurde eine intrazelluläre Färbung durchgeführt.

Dafür wurden zweierlei Puffer verwendet: zum einen ein saponinfreier Puffer, im Folgenden Färbepuffer 1 genannt, zum anderen ein saponinhaltiger Puffer, im Folgenden Färbepuffer 2 genannt, wobei das Saponin durch Komplexbildung innerhalb der Zellmembran zur Entstehung von Poren in derselben führte. Durch diese Poren konnten Moleküle, im Falle der intrazellulären Färbung Antikörper (AK), in die Zelle eindringen.

Zunächst wurde die Fixierlösung, mit der die infizierten Makrophagen nach Ende der Inkubationszeit überschichtet worden waren, entfernt.

Danach wurden in jedes zu färbende Well 100 µl des Färbepuffers 1 gegeben. Nach Abnehmen des Überstandes wurde jedes Well mit 100 µl Färbepuffer 2 beladen.

Nach Entfernen des Überstandes wurde in jedes Well 100 µl der die Erstantikörper enthaltende Färbelösung gegeben, wobei die Erstantikörper in Färbepuffer 2 gelöst waren. Die Chamber Slides wurden für mindestens 30 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert.

Danach wurde der Überstand abgenommen und in jedes Well 100 µl Färbepuffer 2 gegeben. Der Überstand wurde wiederum entfernt und in jedes Well 100 µl Zweitantikörper enthaltende Färbelösung gegeben, wobei die Zweitantikörper in Färbepuffer 2 gelöst waren. Die Chamber Slides wurden für mindestens 30 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert.

Danach wurde der Überstand erneut abgenommen, jedes Well mit 100 µl Färbepuffer 2 gewaschen, anschließend der Überstand wiederum abgenommen und jedes Well mit 100 µl Färbepuffer 1 beladen.

Nach Abnehmen des Überstandes wurde die auf den Chamber Slide geklebte Kammerung entfernt, 3 Tropfen ProLong[®] Gold Antifade Reagent gleichmäßig auf dem nun ebenen Chamber Slide verteilt und das Präparat mit einem 24 x 50 mm messenden Deckglas eingedeckt. Zur Fixierung des Deckglases wurde ein Streifen handelsüblichen Nagellackes auf den Übergang zwischen Chamber Slide und Deckglas aufgetragen.

Die Präparate wurden lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tab. 1: Anzufärbende intrazelluläre Strukturen und die dafür verwendeten Erst- und Zweitantikörper.

„+“ markiert in Kombination angefärbte intrazelluläre Strukturen. *Lm*: *Leishmania major*; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; mAK: monoklonaler Antikörper; pAK: polyklonaler Antikörper.

Anzufärbende intrazelluläre Strukturen	Erstantikörper (in Färbepuffer 2)	Zweitantikörper (in Färbepuffer 2)
LC3B +	Kaninchen anti humanes LC3B polyklonaler AK 1:200 (Rb α hu LC3B pAK)	Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 568 AK 1:100 (Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK)
Leishmanien +	Maus anti Leishmanien polyklonaler AK 7:100 (Ms α <i>Lm</i> pAK)	Huhn anti Maus Alexa Fluor® 488 konjugierter AK 1:100 (Ch α Ms Alexa Fluor® 488 konjugierter AK)
Zellkern von Makrophagen und Leishmanien, Kinetoplast		DAPI
LC3B +	Kaninchen anti humanes LC3B polyklonaler AK 1:200 (Rb α hu LC3B pAK)	Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 568 AK 1:100 (Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK)
LAMP2 (CD 107 b) +	Maus anti humanes CD 107 b monoklonaler Antikörper (Ms α hu LAMP2 mAK)	Huhn anti Maus Alexa Fluor® 488 konjugierter AK 1:100 (Ch α Ms Alexa Fluor® 488 konjugierter AK)
Zellkern von Makrophagen und Leishmanien, Kinetoplast		DAPI

2.2.3.2 Erstellen von Cytospin-Präparaten

Zum Aufbringen von Zellen auf Objektträger wurden mittels einer Shanon Cytospin 3 Zentrifuge Cytospin-Präparate angefertigt. 10^5 Makrophagen bzw. 10^6 Leishmanien wurden in 100 μ l PBS gelöst und für 10 Minuten bei 500 Umdrehungen/Minute (Makrophagen), bzw. für 5 Minuten bei 1.500 Umdrehungen/Minute (Leishmanien) auf die Objektträger aufzentrifugiert.

Vor der weiteren Behandlung der Präparate wurden diese bei RT luftgetrocknet.

2.2.3.3 Diff-Quik-Färbung

Die erstellten Zytospin Präparate wurden nach Lufttrocknung für 5 Minuten in der methanolhaltigen Fixierlösung des Diff-Quik-Färbekits fixiert. Anschließend wurde das Präparat für jeweils 5 Minuten in die Diff-Quik-Färbelösung 1 und 2 eingestellt.

Nach dem Entfernen überflüssiger Färbelösung durch Schwenken in destilliertem Wasser wurde das Präparat bei RT an der Luft getrocknet und anschließend mikroskopisch analysiert.

Gleiches Procedere galt auch für in 96-Wells-Flachbodenplatten durchgeführte Infektionen von Makrophagen. Dazu wurden Zellen in jedem zu färbenden Well mit 100 µl der o.g. Lösungen überschichtet und für je 5 Minuten inkubiert. Nach Abnehmen der Diff-Quik-Färbelösung 2 wurde überflüssige Färbelösung durch Übergießen und Schwenken der 96-Wells-Flachbodenplatte unter fließendem Wasser entfernt. Die Platte wurde bei RT an der Luft getrocknet und anschließend mikroskopisch analysiert.

2.2.3.4 Annexin Färbung

Zur Kontrolle der Vitalität von Leishmanien diente die Färbung mit Annexin V FLUOS. Dazu wurden 10^6 Parasiten in 200 µl calciumhaltiger Ringerlösung aufgenommen und mit in weiteren 200 µl Ringerlösung gelöstem 0,5 µl Annexin V FLUOS versetzt.

Die mit Annexin gefärbten Leishmanien wurden für mindestens 15 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch auf die von Annexin V FLUOS hervorgerufene Grünfluoreszenz hin analysiert. Annexin V FLUOS positive Parasiten werden in der vorliegenden Arbeit als apoptotisch definiert.

2.2.4 Auswertung

2.2.4.1 Lichtmikroskopische Auswertung

2.2.4.1.1 Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Präparate

Die Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Präparate erfolgte mittels des Axio Imager M2 von Zeiss unter Zuhilfenahme der Software Axio Vision 4.8.

2.2.4.1.2 Identifikation und Zählung von in LC3B positiven Kompartimenten gelegenen Leishmanien

Zur Untersuchung des Prozentsatzes in LC3B positiven Kompartiment gelegener Leishmanien wurden die eingedeckten Chamber Slide Präparate licht- und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Pro Kondition wurden 3 Gesichtsfelder ausgezählt und in jedem davon die Anzahl intrazellulärer Leishmanien und LC3B positiver Kompartimente ermittelt.

Aus dem Quotienten ergab sich der prozentuale Anteil der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf die Gesamtheit der intrazellulären Parasiten.

2.2.4.1.3 Identifikation und Zählung von LAMP2 (CD 107 b) positiver Makrophagen und Analyse des gemeinsamen Vorkommens LC3B und LAMP2 positiver Kompartimente

Ebenfalls licht- und fluoreszenzmikroskopisch erfolgte die Bestimmung der Zahl der für LAMP2 (CD 107 b) Kompartimente positiver Makrophagen. Dazu wurden 3 Gesichtsfelder ausgewertet und in jedem davon die Zahl der für LAMP2 Kompartimente positiven Makrophagen bestimmt.

Zur Bestimmung des gemeinsamen Vorliegens LC3B und LAMP2 positiver Kompartimente wurden 3 Gesichtsfelder ausgewertet und in jedem davon die Anzahl der LC3B positiven Kompartimente ermittelt. Als gemeinsam mit LAMP2 vorkommend galten jene Kompartimente, die auch für LAMP2 positiv gewertet waren.

2.2.4.1.4 Bestimmung der Infektionsrate infizierter Makrophagen

Zur Bestimmung der Infektionsrate infizierter Makrophagen Typ I und Typ II wurde das inverse Forschungsmikroskop IMT-2 von Olympus eingesetzt.

Dabei wurden mindestens 200 Makrophagen analysiert und hinsichtlich Infektion quantifiziert. Die Infektionsrate ergab sich aus dem Quotienten infizierter Zellen zur Gesamtzahl der analysierten Zellen.

2.2.4.2 Konfokalmikroskopische Auswertung

Zur Erstellung konfokalmikroskopischer Bilder (siehe Abb. 12) wurde das LSM 710 von Zeiss unter Zuhilfenahme der Software Zen 2010 und Zen 2009 Light Edition verwendet.

2.2.4.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie diene als Methode zur raschen Analyse großer Zellmengen bzgl. deren Granularität und Volumens. Durch Markierung bestimmter zellulärer Strukturen mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper konnte eine Aussage hinsichtlich dieser Strukturen getroffen werden.

Die Methode wurde zur Analyse der Vitalität der für die Infektion von Makrophagen verwendeten Leishmanien durchgeführt. Dafür wurden 25.000 der wie oben beschrieben mit Annexin V FLUOS markierten Leishmanien eingelesen.

Des Weiteren wurden mit Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor[®] 647 gelabelte Leishmanien zur Kontrolle des Erfolges des Labelings analysiert. Es wurden dazu 25.000 der gelabelten Leishmanien eingelesen.

Die Analyse erfolgte mittels der Software CellQuest[®] Pro, die weitere Bearbeitung der Daten mittels der Software Summit Version 4.2.

2.2.4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme von Microsoft[®] Office Excel 2003. Die Diagramme zeigen jeweils Mittelwerte von Daten aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Als Maß für die Standardabweichung wird der Standard Error of the Mean verwendet.

Zur Berechnung statistischer Signifikanz wird der Student t-Test in zweiseitiger, gepaarter Form verwendet. Ab $p \leq 0,05$ wird von einem signifikanten Unterschied ausgegangen, bei $p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,001$ von sehr bzw. hoch signifikanten Unterschieden.

Zur Berechnung der Korrelation zweier Parameter wurde der Korrelationskoeffizient ermittelt. Von sehr hoher positiver Korrelation wurde ausgegangen, wenn der Korrelationskoeffizient r zwischen 0,9 und 1 lag. Von sehr hoher negativer Korrelation wurde hingegen bei Korrelationskoeffizienten r zwischen -0,9 und -1 ausgegangen.

3 Ergebnisse

3.1 Spezifitätskontrolle des LC3B Antikörpers

Die Reifung von Phagolysosomen in mit Leishmanien infizierten Makrophagen wurde bereits in früheren Experimenten unserer und anderer Arbeitsgruppen analysiert (Bogdan u. Röllinghoff 1998, Ritter et al. 2009). Nach der Infektion von Makrophagen mit promastigoten Leishmanien konnte man die Parasiten in LC3B positiven Kompartimenten mittels Antikörperfärbung nachweisen (Jäckel, unveröffentlichte Daten).

Diese Beobachtungen waren Ausgangspunkt dieser Arbeit und sollten näher analysiert werden. Deshalb wurde zunächst die Spezifität des verwendeten LC3B Antikörpers überprüft. Dafür wurden je 10^5 Makrophagen Typ I mit 10^6 *L. major* Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur für 3 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten nichtinfizierte Makrophagen Typ I. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildung 4).

Leishmania Parasiten wurden deutlich erkennbar durch die Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 4 A, D) während in Proben von nichtinfizierten Makrophagen Typ I kein Signal detektiert wurde. Im Durchlichtbild von infizierten Makrophagen Typ I (Abbildung 4 C, F) ist zu erkennen, dass die Parasiten wahrscheinlich intrazellulär zu liegen kommen, denn sie befinden sich innerhalb der Zellumrisse. Außerdem wurde mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung in mit *Leishmania* infizierten Makrophagen Typ I eine punktuelle Anfärbung erzielt (Abbildung 4 B). Diese ist vermutlich intrazellulär, wie im Durchlicht zu erkennen (Abbildung 4 C). Die Spezifität des LC3B Antikörpers konnte erfolgreich demonstriert werden, weil eine Kontrollfärbung mit Kaninchenserum und einem Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierten AK eine unspezifische, nicht punktuelle Färbung in infizierten Makrophagen Typ I zeigte (Abbildung 4 E). Des Weiteren wurden zur Kontrolle nicht mit *Leishmania* infizierte Makrophagen Typ I dem Färbeprotokoll unterzogen. Es konnte weder eine Färbung durch den Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierten Antikörper noch durch den Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierten Antikörper beobachtet werden. Das bedeutet, dass in diesem Experiment die Spezifität des LC3B Antikörpers zweifelsfrei demonstriert wurde und der Antikörper zur Darstellung des LC3B Kompartiments in Makrophagen Typ I benutzt werden kann.

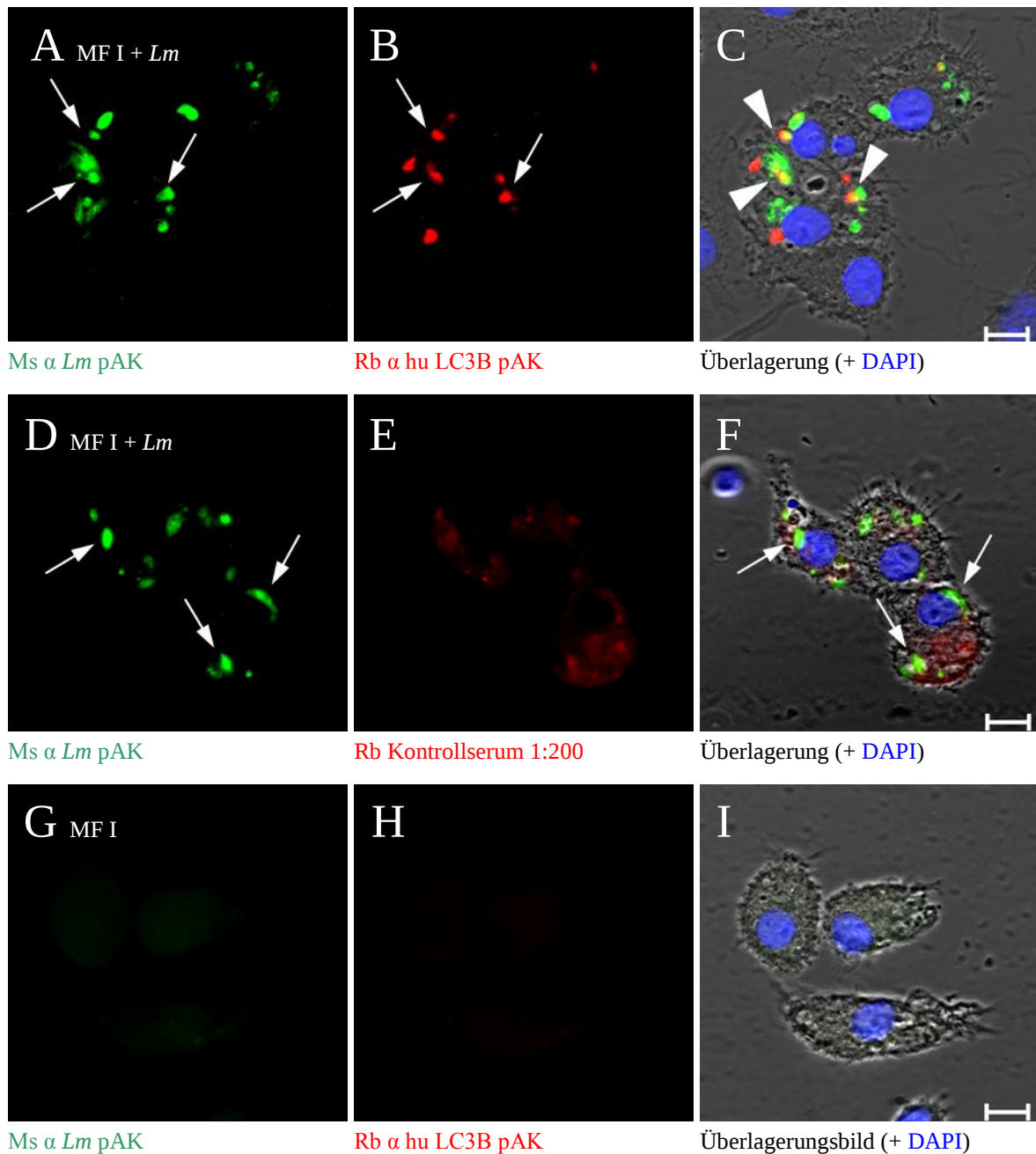


Abb. 4: Spezifitätskontrolle des LC3B Antikörpers.

Makrophagen Typ I wurden für 3 Stunden mit promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt. Als Positivkontrolle wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α *Lm* pAK (A) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (B). Die Überlagerung aus beiden Aufnahmen ist in (C) im Durchlichtkanal dargestellt.

Als Isotypkontrolle dienten infizierte Makrophagen Typ I, die zum einen mittels Ms α *Lm* pAK (D) und zum anderen statt Rb α hu LC3B pAK mit Kaninchenserum inkubiert wurden (E). Die Überlagerung aus beiden Aufnahmen ist in (F) im Durchlichtkanal dargestellt. Nicht infizierte Makrophagen Typ I dienten als Negativkontrolle. Diese wurden mittels Ms α *Lm* pAK (G) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (H). Die Überlagerung aus beiden Aufnahmen ist in (I) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper diente Ch α Ms Alexa Fluor® 488 konjugierter AK, Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kerns und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende *L. major* (A, D), bzw. auf LC3B positive Kompartimente (B). Leishmanien, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet (C), während intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, mit einem Pfeil dargestellt sind (F). *Lm*: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α: anti; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbalken: 10 µm; 630x Vergrößerung.

3.2 Abhängigkeit der LC3B Expression von der Zeit nach Infektionsbeginn

Aus dem vorangegangenen Experiment konnte sowohl die Spezifität des LC3B Antikörpers sichergestellt werden als auch aus der Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierten AK-Färbung Anhaltspunkte für ein mögliches intrazelluläres Vorliegen der damit visualisierten Strukturen gewonnen werden.

Das Auftreten und die zeitliche Entwicklung der sich in der Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierten AK-Färbung darstellenden Kompartimente wurde in diesem Versuchsteil analysiert. Dafür wurden je 10^5 Makrophagen Typ I und Typ II mit 10^6 promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur für 15 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden und 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildungen 5 und 6).

Leishmania Parasiten wurden deutlich erkennbar durch die Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 5 A, C, D, F, G, I, J, L). Bereits nach 15 Minuten Inkubationszeit waren Parasiten innerhalb der Zellgrenzen der Makrophagen nachweisbar (Abbildung 5 A). Mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung wurde in mit *Leishmania* infizierten Makrophagen Typ I eine punktuelle Anfärbung erzielt (Abbildung 5 B, E, H, K). Im Durchlichtbild ist zu erkennen, dass sowohl die Parasiten als auch LC3B positive Kompartimente innerhalb der Zellumrisse liegen (Abbildung 5 C, F, I, L).

Es konnte beobachtet werden, dass die mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung nachgewiesenen LC3B positiven Kompartimente an denselben Stellen zu liegen kommen wie manche der Parasiten (Abbildung 5 C, F, I, L). Vermutlich liegen jene Parasiten innerhalb der LC3B positiven Kompartimente.

Es ist erkennbar, dass nach 15-minütiger Inkubation der Makrophagen mit Parasiten LC3B positive Kompartimente sichtbar waren. 1 und 3 Stunden nach Infektionsbeginn waren mehr LC3B positive Kompartimente erkennbar, während nach 24 Stunden nur noch wenige LC3B positive Kompartimente sichtbar waren. Die Quantifizierung der Relation zwischen LC3B positiven Kompartimenten und intrazellulären Parasiten bestätigte die Beobachtungen und zeigte, dass sich nach 15 Minuten Inkubationszeit 25 %, nach 1 Stunde 61 %, nach 3 Stunden 55 % und nach 24 Stunden noch 19 % der intrazellulär liegenden Parasiten an denselben Stellen lagen wie LC3B positive Kompartimente (Abbildung 6 A). Für

Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 6 B). Zusammengefasst bedeutet das, dass 1 bis 3 Stunden nach Beginn der Inkubation LC3B positive Kompartimente am besten detektierbar sind. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente eine dreistündige Inkubationszeit gewählt.

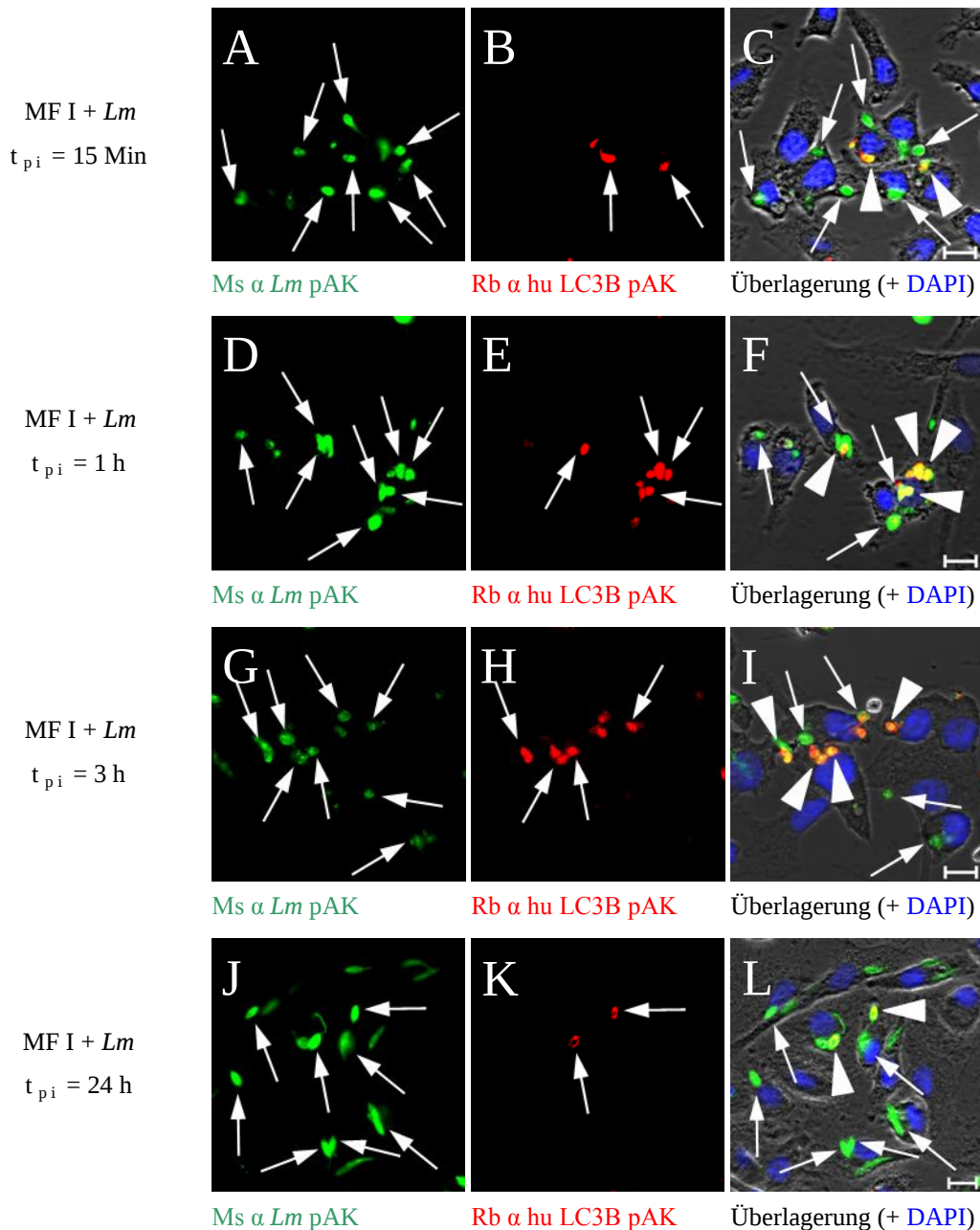


Abb. 5: Zeitabhängige Expression LC3B positiver Kompartimente.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 15 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden und 24 Stunden mit promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α *Lm* pAK (A, D, G, J) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (B, E, H, K). Die Überlagerung aus den jeweils beiden Aufnahmen ist in (C, F, I, L) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper dienten Ch α Ms Alexa Fluor® 488 konjugierter AK und Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kerns und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende *L. major* (A, D, G, J), bzw. auf LC3B positive Kompartimente (B, E, H, K). Leishmanien, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet (C, F, I, L), während intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, mit einem Pfeil dargestellt sind (C, F, I, L).

Lm: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; h: Stunde; Min: Minute; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; pAK: polyklonaler Antikörper; t_{pi} : Zeit nach Infektionsbeginn; Maßstabsbalken: 10 μm ; 630x Vergrößerung.

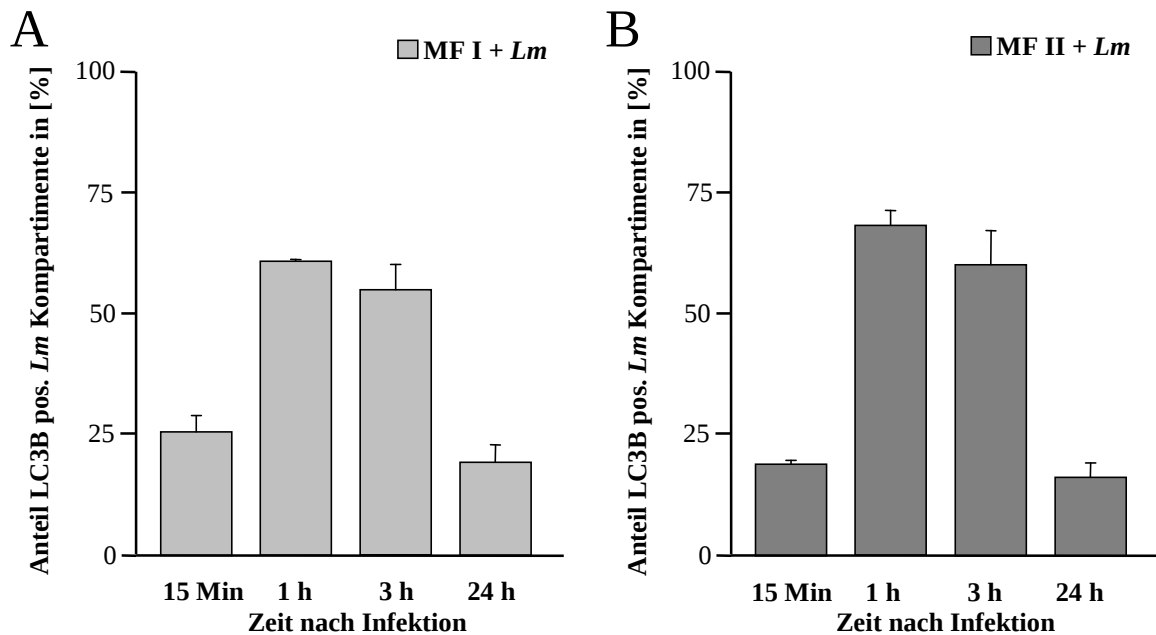


Abb. 6: Zeitabhängige Expression LC3B positiver Kompartimente.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 15 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden und 24 Stunden mit promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Die über unterschiedliche Zeiträume mit Promastigoten koinkubierten Makrophagen Typ I (□) bzw. Typ II (■) wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf alle intrazellulären Leishmanien analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus n = 4 unabhängigen Spendern (A, B).

Lm: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II; h: Stunde; Min: Minute.

3.3 Zusammenhang zwischen dem Alter der infizierenden Promastigoten und dem Anteil LC3B positiver Kompartimente

Nachdem das Auftreten von LC3B positiven Kompartimenten im zeitlichen Verlauf nach Beginn der Infektion analysiert und Maximalwerte im Auftreten 1 bis 3 Stunden nach Infektionsbeginn nachgewiesen worden waren, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter der infizierenden Promastigoten und dem Auftreten LC3B positiver Kompartimente bestand.

Promastigotenkulturen unterschiedlichen Alters wurden dazu mit Annexin V FLUOS angefärbt. Das Annexin bindet dabei an Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran apoptotischer Parasiten (Martin et al. 1995). Somit wurden die Promastigoten durchflusszytometrisch bzgl. ihrer Apoptoserate analysiert.

Je 10^5 Makrophagen Typ I und Typ II wurden mit 10^6 der promastigoten *L. major* aus unterschiedlich alten Kulturen für 3 Stunden inkubiert und der Anteil LC3B positiver Kompartimente licht- und fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Im Anschluss wurden die Zellen

einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen (Abbildung 7).

Die durchflusszytometrischen Daten zeigten, dass mit zunehmendem Alter der infizierenden Promastigotenkultur der Anteil apoptotischer, Annexin V FLUOS positiver Parasiten zunahm. Bei einer 4 Tage alten Promastigotenkultur betrug der Anteil Annexin V FLUOS positiver Promastigoten 28 % (Abbildung 7 A), bei einer 7 Tage alten Promastigotenkultur 53 % (Abbildung 7 B) und bei einer 11 Tage alten Promastigotenkultur 75 % (Abbildung 7 C).

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei infizierten Makrophagen Typ I ergab, dass der Anteil Parasiten, die an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente lagen, bei der 4 Tage alten Promastigotenkultur bei 33 % lag, bei der 7 Tage alten Promastigotenkultur betrug der Anteil 55 % und bei der 11 Tage alten Promastigotenkultur 76 % (Abbildung 7 D). Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 7 E).

Zusammengefasst bedeutet das, dass mit zunehmendem Alter der infizierenden Promastigotenkultur der Anteil Parasiten, die an derselben Stelle wie LC3B positive Kompartimente lagen, ansteigt. Der Anteil apoptotischer Promastigoten an der Gesamtheit der infizierenden Parasiten steht demnach in sehr hoher positiver Korrelation mit dem Anteil LC3B positiver Leishmanienkompartimente.

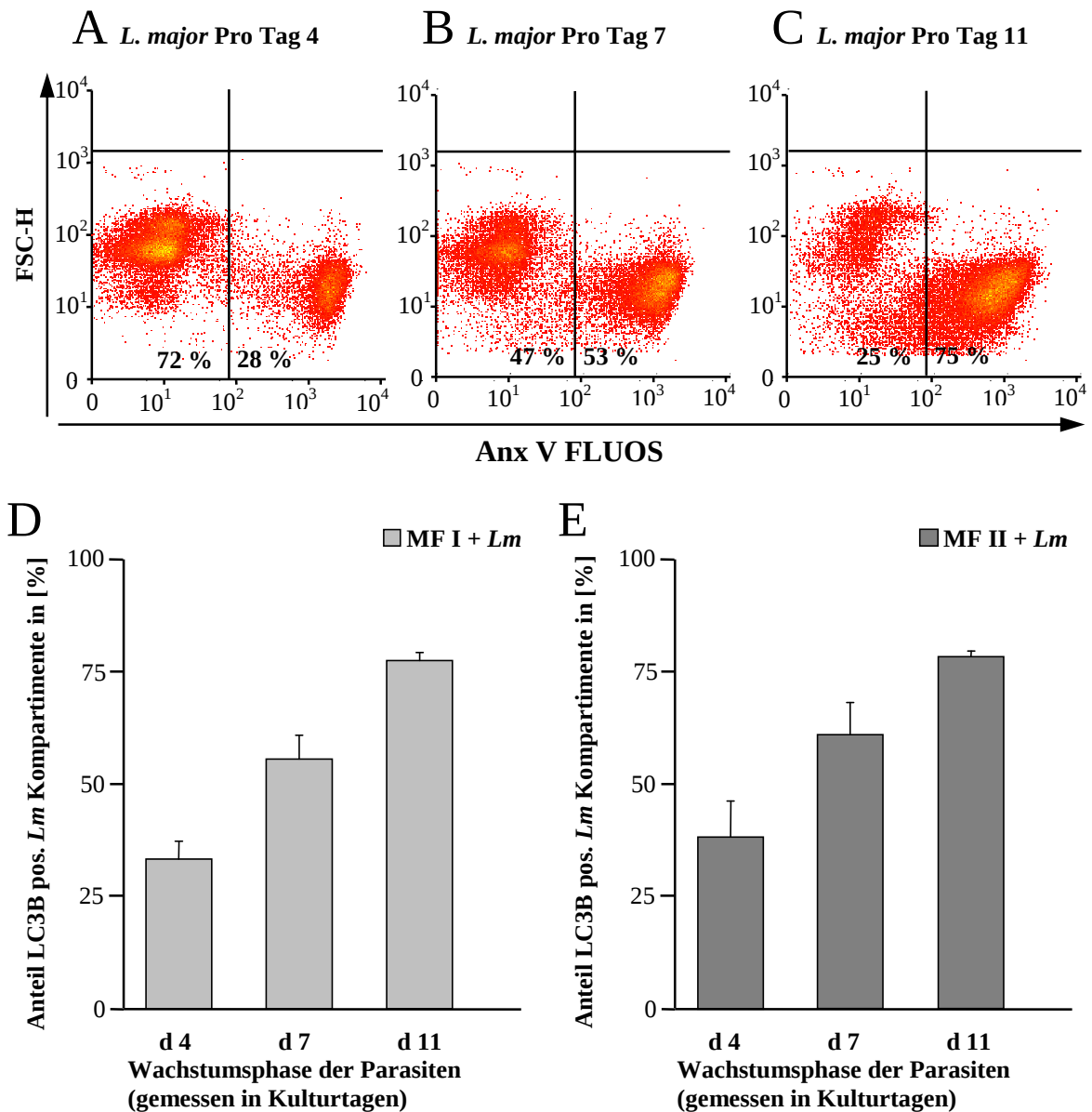


Abb. 7: Infektion von Makrophagen Typ I und Typ II mit promastigoten *L. major* unterschiedlichen Kulturalters.

Promastigote *L. major* aus Kulturen von d 4, d 7 und d 11 wurden nach Färbung mit Annexin V FLUOS durchflusszytometrisch bzgl. ihrer Apoptoserate untersucht. Bei den dargestellten exemplarischen Dotplots ist auf der y-Achse das Zellvolumen (Forward Scatter, FSC-H) und auf der x-Achse die durch Annexin V FLUOS hervorgerufene Grünfluoreszenz dargestellt. Die Werte im linken unteren Quadranten bezeichnen den Prozentsatz Annexin negativer Promastigoten, die Werte im rechten unteren Quadranten den Anteil Annexin positiver Promastigoten (A, B, C).

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 3 Stunden mit den durchflusszytometrisch untersuchten promastigoten *L. major* inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt. Infizierte Makrophagen Typ I und Typ II wurden mittels Ms α *Lm* pAK sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt.

Die über unterschiedliche Zeiträume mit Promastigoten koinkubierten Makrophagen Typ I (■) bzw. Typ II (■) wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf alle intrazellulären Leishmanien analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus n = 3 unabhängigen Spendern (D, E).

Pro: Promastigoten; Anx: Annexin; *Lm*: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II; Ms: Maus; Rb: Rabbit; hu: Human; d: Tag.

3.4 Apoptose-abhängige Entwicklung LC3B positiver Kompartimente

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Kulturdauer der infizierenden Promastigoten der Anteil LC3B positiver Kompartimente zunahm. Wie aus dem Vorversuch und aus der Literatur bekannt, nimmt mit zunehmender Kulturdauer der Promastigoten der Anteil apoptotischer Parasiten zu (van Zandbergen et al. 2006). Darum sollte in diesem Experiment überprüft werden, ob der im Vorversuch beobachtete Zusammenhang zwischen der zunehmenden Kulturdauer der Parasiten und dem vermehrten Auftreten LC3B positiver Kompartimente in dem vermehrten Vorliegen von apoptotischen Parasiten im infizierenden Inokulum begründet ist.

Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur wurden dazu mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) in apoptotische und vitale Promastigoten aufgetrennt. Die Reinheit des Trennverfahrens wurde nach Anfärbung der aufgetrennten Subpopulationen mit Annexin V FLUOS durchflusszytometrisch überprüft. Zur Überprüfung der Hypothese, dass die apoptotischen Parasiten zum Auftreten LC3B positiver Kompartimente führen, wurden je 10^5 Makrophagen Typ I bzw. Typ II mit 10^6 apoptotischen bzw. vitalen promastigoten *L. major* für 3 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden Makrophagen mit nicht aufgetrennten Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildungen 8 und 9).

Die Auswertung der mittels MACS durchgeführten Trennung der Promastigoten ergab, dass die Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur vor der Auftrennung zu 53 % apoptotisch (Annexin V FLUOS positiv) waren (Abbildung 8 A). Nach der Auftrennung befanden sich unter den apoptotischen Promastigoten nur noch 6 % vitale Parasiten (Abbildung 8 E) und unter den vitalen Promastigoten nur noch 16 % apoptotische Parasiten (Abbildung 8 I). Durch die Trennung konnte demzufolge eine hohe Reinheit erzielt werden.

Leishmania Parasiten wurden deutlich erkennbar durch die Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 8 B, F, J). Mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung wurde in mit *Leishmania*-infizierten Makrophagen eine punktuelle Anfärbung erzielt (Abbildung 8 C, G, K). Im Durchlichtbild ist zu erkennen, dass sowohl die Parasiten als auch LC3B positive Kompartimente innerhalb der Zellumrisse liegen (Abbildung 8 D, H, L). Im Durchlichtbild ist erkennbar, dass bei den mit apoptotischen Promastigoten infizierten Makrophagen Typ I die

meisten der intrazellulären Parasiten an denselben Stellen liegen wie LC3B positive Kompartimente (Abbildung 8 H). Bei den mit vitalen Promastigoten infizierten Makrophagen Typ I liegt keiner der intrazellulären Promastigoten in einem LC3B positiven Kompartiment (Abbildung 8 L).

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei infizierten Makrophagen Typ I ergab, dass der Anteil Parasiten, die sich an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente befanden, bei den Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur bei 65 % lag. Bei apoptotischen Promastigoten lag der Anteil bei 90 %, bei vitalen Promastigoten bei 8 % (Abbildung 9 A). Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 9 B).

Zusammengefasst bedeutet das, dass die im Vorversuch aufgestellte Vermutung bestätigt wurde und ein Zusammenhang zwischen dem Anteil apoptotischer Promastigoten im infizierenden Inokulum und dem Auftreten von LC3B positiver Kompartimente besteht.

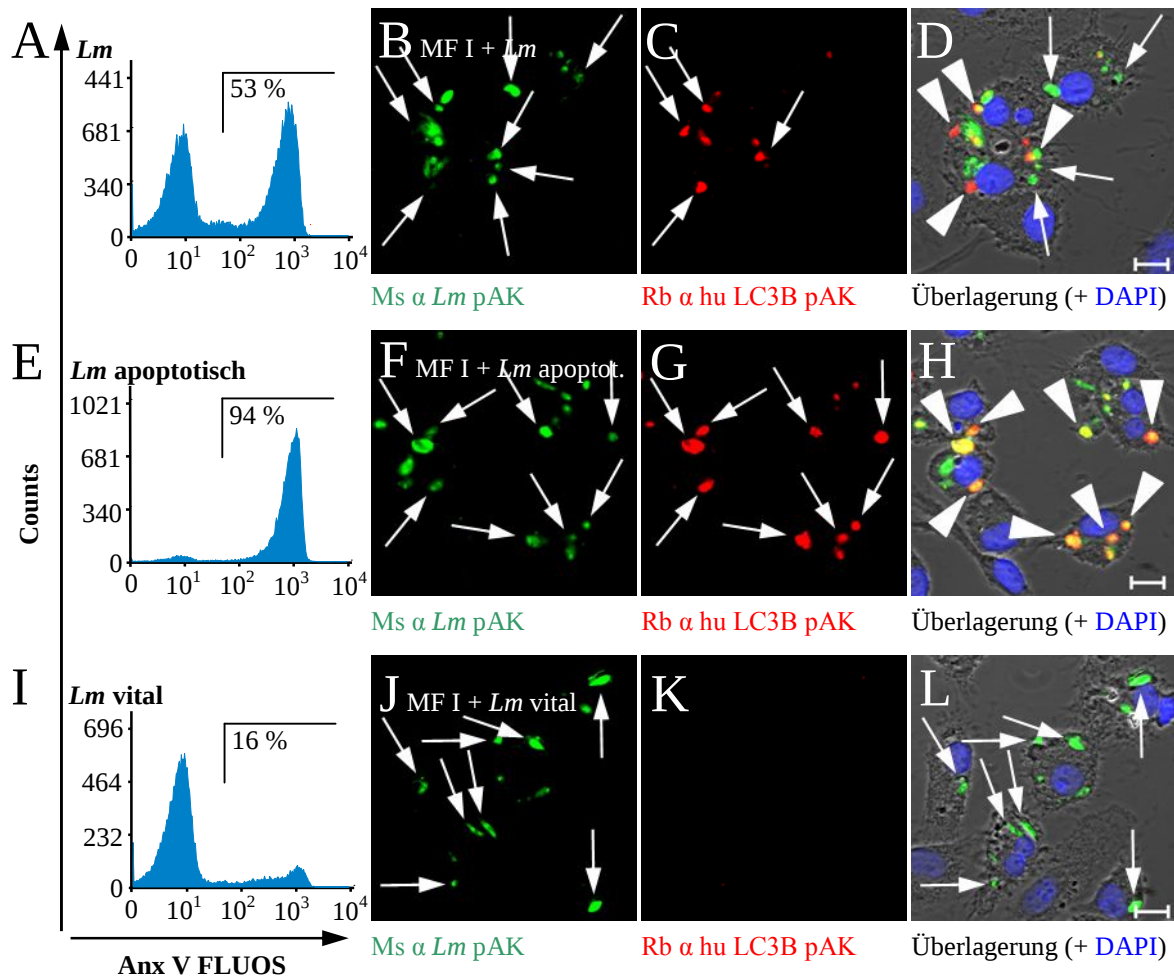


Abb. 8: Infektion von Makrophagen mit apoptotischen und vitalen promastigoten *L. major*.

Promastigote *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur wurden mittels MACS in apoptotische und vitale Promastigoten aufgetrennt und nach Färbung mit Annexin V FLUOS durchflusszytometrisch bzgl. ihrer Apoptoserate untersucht. Bei den dargestellten exemplarischen Histogrammen ist auf der y-Achse die Anzahl der Parasiten (Counts) und auf der x-Achse die durch Annexin V FLUOS hervorgerufene Grünfluoreszenz dargestellt. Die angegebenen Prozentwerte bezeichnen den Anteil Annexin positiver Promastigoten (A, E, I). Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 3 Stunden mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur sowie mit apoptotischen bzw. vitalen promastigoten *L. major* inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α *Lm* pAK (B, F, J) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (C, G, K). Die Überlagerung aus den jeweils beiden Aufnahmen ist in (D, H, L) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper dienten Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierter AK und Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kerns und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende *L. major* (B, F, J), bzw. auf LC3B positive Kompartimente (C, G). Leishmanien, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet (D, H), während intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, mit einem Pfeil dargestellt sind (D, L).

Lm: *Leishmania major*; apoptot.: apoptotisch; MF I: Makrophagen Typ I; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbalken: 10 μ m; 630x Vergrößerung.

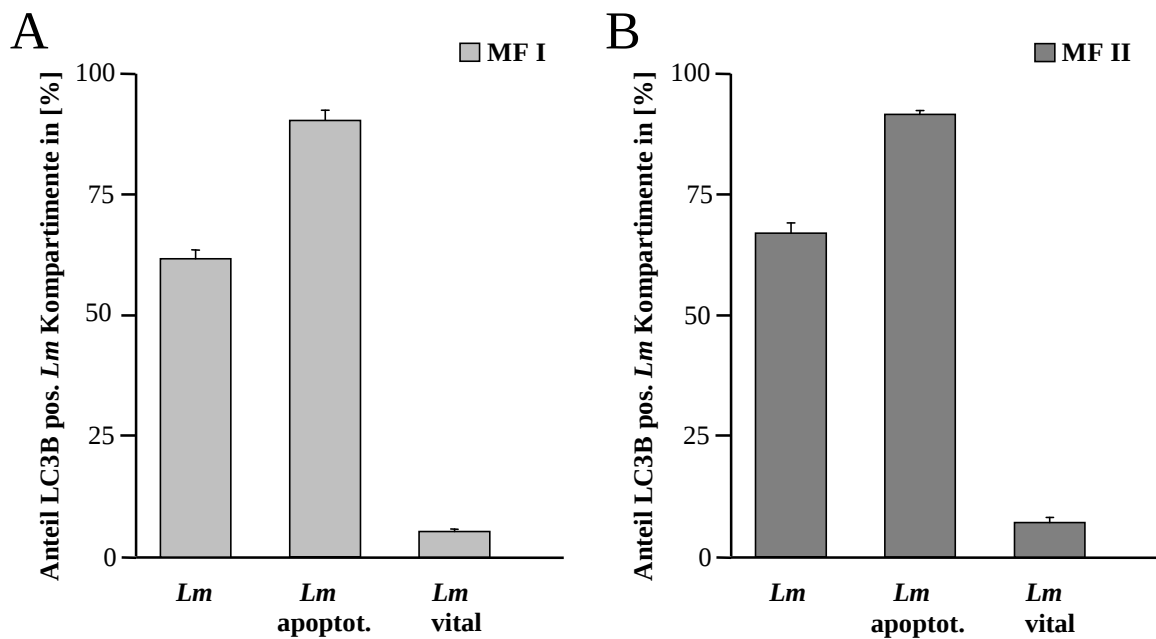


Abb. 9: Infektion von Makrophagen mit apoptotischen und vitalen promastigoten *L. major*.

Promastigote *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur wurden mittels MACS in apoptotische und vitale Promastigoten aufgetrennt. Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 3 Stunden mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur sowie mit apoptotischen bzw. vitalen promastigoten *L. major* inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Die mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur bzw. apoptotischen oder vitalen Promastigoten koinkubierten Makrophagen Typ I (□) bzw. Typ II (■) wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf alle intrazellulären Leishmanien analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus $n = 7$ unabhängigen Spendern (A, B).

Lm: *Leishmania major*; apoptot.: apoptotisch; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II.

3.5 Auftreten LC3B positiver Kompartimente nach Infektion mit Amastigoten

Nachdem ein Zusammenhang zwischen dem Anteil apoptotischer Promastigoten im infizierenden Inokulum und dem Auftreten von LC3B positiven Kompartimenten nachgewiesen war, wurde überprüft, ob es auch bei mit amastigoten *L. major* infizierten Makrophagen zum Auftreten von LC3B positiven Kompartimenten kommt.

Dazu wurden Amastigoten aus einer 15 Tage alten Kultur mittels MACS in apoptotische und vitale Amastigoten aufgetrennt. Die Reinheit des Trennverfahrens wurde nach Anfärbung der aufgetrennten Subpopulationen mit Annexin V FLUOS durchflusszytometrisch überprüft. Um zu überprüfen, ob es nach Infektion von Makrophagen mit Amastigoten zum Auftreten LC3B positiver Kompartimente kommt, wurden je 10^5 Makrophagen Typ I bzw. Typ II mit 10^6 apoptotischen bzw. vitalen amastigoten *L. major* für 3 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden Makrophagen mit nicht aufgetrennten Amastigoten der 15 Ta-

ge alten Kultur infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildungen 10 und 11).

Die Auswertung der mittels MACS durchgeführten Trennung der Amastigoten ergab, dass die Amastigoten der 15 Tage alten Kultur vor der Auftrennung zu 47 % apoptotisch (Annexin V FLUOS positiv) waren (Abbildung 10 A). Nach der Auftrennung befanden sich unter den apoptotischen Amastigoten noch 25 % vitale Parasiten (Abbildung 10 E) und unter den vitalen Amastigoten noch 34 % apoptotische Parasiten (Abbildung 10 I). Durch die Trennung konnte demzufolge eine Verbesserung der Reinheit erzielt werden.

Leishmania Parasiten wurden deutlich erkennbar durch die Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 10 B, F, J). Mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung konnte keine Anfärbung erzielt werden (Abbildung 10 C, G, K). Im Durchlichtbild ist zu erkennen, dass die Parasiten innerhalb der Zellumrisse liegen (Abbildung 10 D, H, L).

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei mit Amastigoten der verschiedenen Konditionen infizierten Makrophagen Typ I ergab, dass der Anteil Parasiten, die sich an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente befanden, bei unter 7 % lag (Abbildung 11 A). Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 11 B).

Zusammengefasst bedeutet das, dass es nach der Infektion von Makrophagen mit Amastigoten nur zu geringem Auftreten LC3B positiver Kompartimente kommt. Das Auftreten der LC3B positiven Kompartimente scheint ein auf Promastigoten beschränktes Phänomen zu sein.

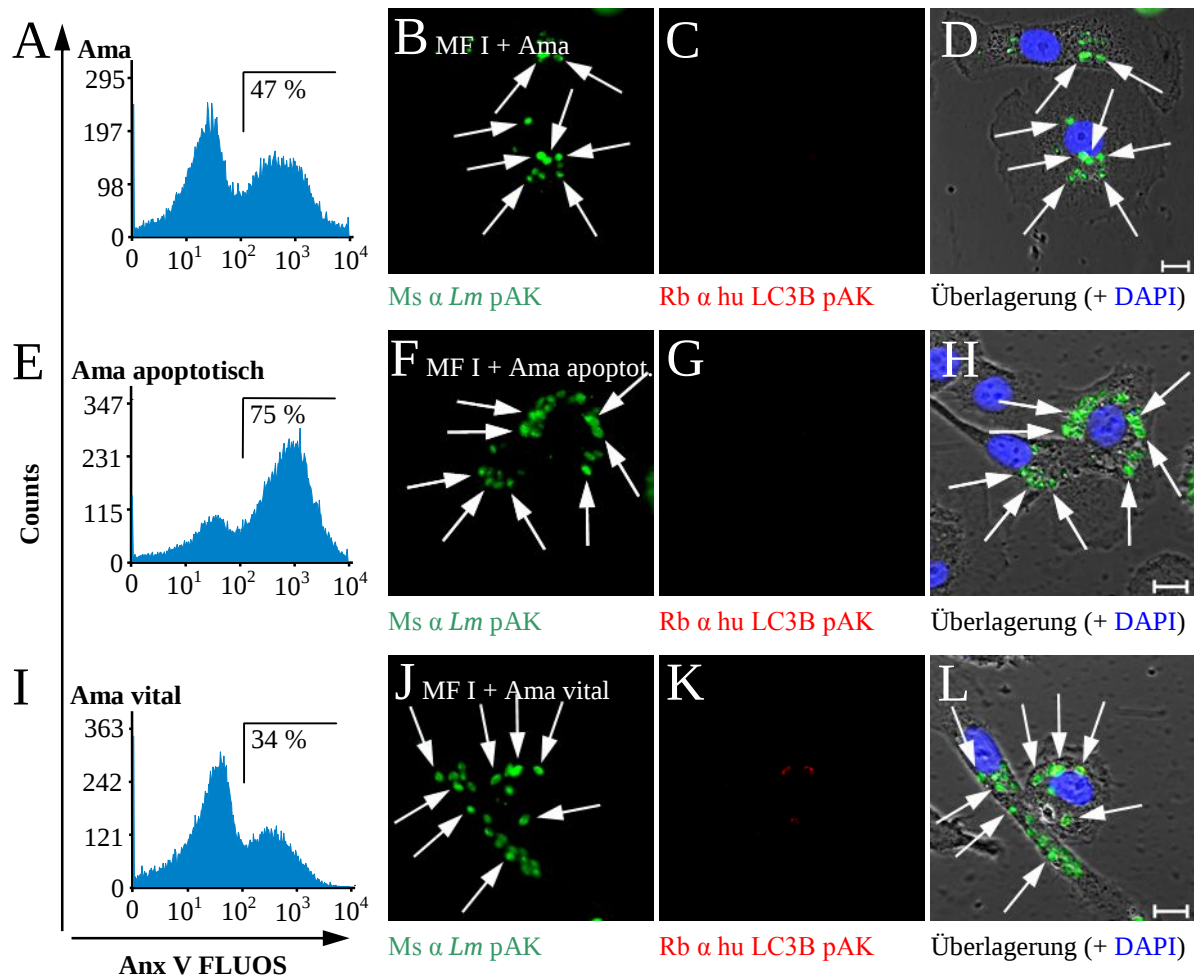


Abb. 10: Infektion von Makrophagen mit apoptotischen und vitalen amastigoten *L. major*.

Amastigote *L. major* aus einer 15 Tage alten Kultur wurden mittels MACS in apoptotische und vitale Amastigoten aufgetrennt und nach Färbung mit Annexin V FLUOS durchflusszytometrisch bzgl. ihrer Apoptoserate untersucht. Bei den dargestellten exemplarischen Histogrammen ist auf der y-Achse die Anzahl der Parasiten (Counts) und auf der x-Achse die durch Annexin V FLUOS hervorgerufene Grünfluoreszenz dargestellt. Die angegebenen Prozentwerte bezeichnen den Anteil Annexin positiver Amastigoten (A, E, I).

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 3 Stunden mit Amastigoten aus einer 15 Tage alten Kultur sowie mit apoptotischen bzw. vitalen amastigoten *L. major* inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der Inkubationszeit wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α *Lm* pAK (B, F, J) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (C, G, K). Die Überlagerung aus den jeweils beiden Aufnahmen ist in (D, H, L) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper dienten Ch α Ms Alexa Fluor® 488 konjugierter AK und Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kerns und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende *L. major* (B, F, J). Intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einem Pfeil dargestellt (D, H, L).

Ama: Amastigoten; apoptot.: apoptotisch; *Lm*: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbalken: 10 μ m; 630x Vergrößerung.

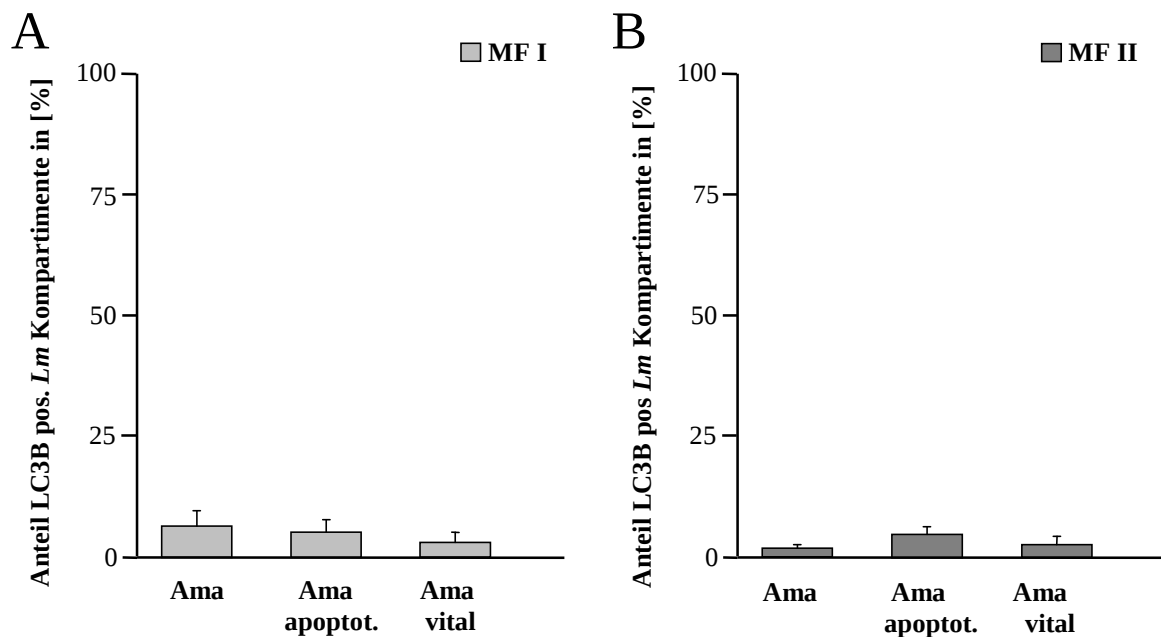


Abb. 11: Infektion von Makrophagen mit apoptotischen und vitalen amastigoten *L. major*.

Amastigote *L. major* aus einer 15 Tage alten Kultur wurden mittels MACS in apoptotische und vitale Amastigoten aufgetrennt. Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 3 Stunden mit Amastigoten aus einer 15 Tage alten Kultur sowie mit apoptotischen bzw. vitalen amastigoten *L. major* inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Die mit Amastigoten aus der 15 Tage alten Kultur bzw. apoptotischen oder vitalen Amastigoten koinkubierten Makrophagen Typ I (□) bzw. Typ II (■) wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf alle intrazellulären Leishmanien analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus $n = 4$ unabhängigen Spendern (A, B).

Ama: Amastigoten; apoptot.: apoptotisch; *Lm*: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II.

3.6 Entwicklung LC3B positiver Kompartimente nach Apoptoseinduktion bei Promastigoten

Nachdem im vorangegangenen Experiment das Auftreten von LC3B positiven Kompartimenten nach Infektion von Makrophagen mit Amastigoten nicht beobachtet werden konnte, wurde der Fokus wieder auf die Promastigoten gerichtet, da es nach Infektion von Makrophagen mit Promastigoten zum Auftreten LC3B positiver Kompartimente kam. Aus oben geschilderten Experimenten lag die Erkenntnis vor, dass mit zunehmender Kulturdauer der infizierenden Parasiten mehr LC3B positive Kompartimente in Makrophagen nachgewiesen werden konnten. Da mit zunehmendem Kulturdauer der Promastigoten der Anteil apoptotischer Parasiten zunimmt, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Anteil apoptotischer Parasiten am infizierenden Promastigotenkollektiv und dem Auftreten von LC3B positiven Kompartimenten weiter untersucht (van Zandbergen et al. 2006).

Um diese Korrelation zu prüfen, wurde Promastigoten für 18 Stunden mit antileishmaniös wirkenden Medikamenten behandelt um sie abzutöten. Dazu wurden sowohl 15 μ M Staurosporin als auch 25 μ M Miltefosin verwendet (Jha et al. 1999, Arnoult et al. 2002, Paris et al. 2004, Khademvatan et al. 2011).

Der Anteil apoptotischer Promastigoten wurde vor und nach der antileishmaniösen Behandlung nach Anfärbung mit Annexin V FLUOS durchflusszytometrisch überprüft. Um zu überprüfen, ob die Behandlung der Promastigoten mit 25 μ M Miltefosin einen Effekt auf das Auftreten LC3B positiver Kompartimente hatte, wurden je 10^5 Makrophagen Typ I bzw. Typ II mit 10^6 Miltefosin-vorbehandelten promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur für 3 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden Makrophagen mit nicht Miltefosin-vorbehandelten Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildungen 12 und 13).

Die Auswertung bzgl. des Effekts der Behandlung der Promastigoten mit Miltefosin und Staurosporin ergab, dass die Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur vor der antileishmaniösen Behandlung zu 53 % apoptotisch (Annexin V FLUOS positiv) waren (Abbildung 12 A). Die Behandlung der Promastigoten mit 25 μ M Miltefosin führte zu einer Steigerung des Anteils apoptotischer Promastigoten auf 81 % (Abbildung 12 B). Die Behandlung der Promastigoten mit 15 μ M Staurosporin führte lediglich zu einer Erhöhung des Anteils apoptotischer Promastigoten auf 65 % (Abbildung 12 F). Auf Grund des schwächeren Apoptose induzierenden Effekts wurde Staurosporin nicht weiter verwendet.

Bei der Infektion von Makrophagen mit Miltefosin-vorbehandelten Promastigoten waren *Leishmania* Parasiten deutlich erkennbar durch die Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 12 C). Mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung konnte eine punktuelle Anfärbung erzielt werden (Abbildung 12 D). Im Durchlichtbild ist erkennbar, dass die meisten der intrazellulären Parasiten an denselben Stellen liegen wie LC3B positive Kompartimente (Abbildung 12 E).

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei mit Miltefosin-vorbehandelten Promastigoten infizierten Makrophagen Typ I ergab, dass der Anteil Parasiten, die sich an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente befanden, bei 64 % lag. Für Makrophagen Typ I, die mit nicht vorbehandelten Promastigoten infiziert worden waren, lag der

Anteil bei 65 % (Abbildung 13 A) und war damit nicht signifikant unterschiedlich. Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 13 B).

Das bedeutet, dass der durch Miltefosin induzierte Anstieg des Anteils apoptotischer Promastigoten bei einer Infektion von Makrophagen nicht zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils LC3B positiver Kompartimente führte. Daraus folgt, dass die chemische Induktion von Apoptose nicht denselben Effekt auf das Auftreten LC3B positiver Kompartimente hat wie die bei zunehmendem Alter der Promastigotenkultur natürlich ansteigende Apoptose-rate der Promastigoten. Das auf apoptotischen Promastigoten vorkommende Phosphatidylserin scheint somit als Induktor für das Auftreten LC3B positiver Kompartimente unwahrscheinlich.

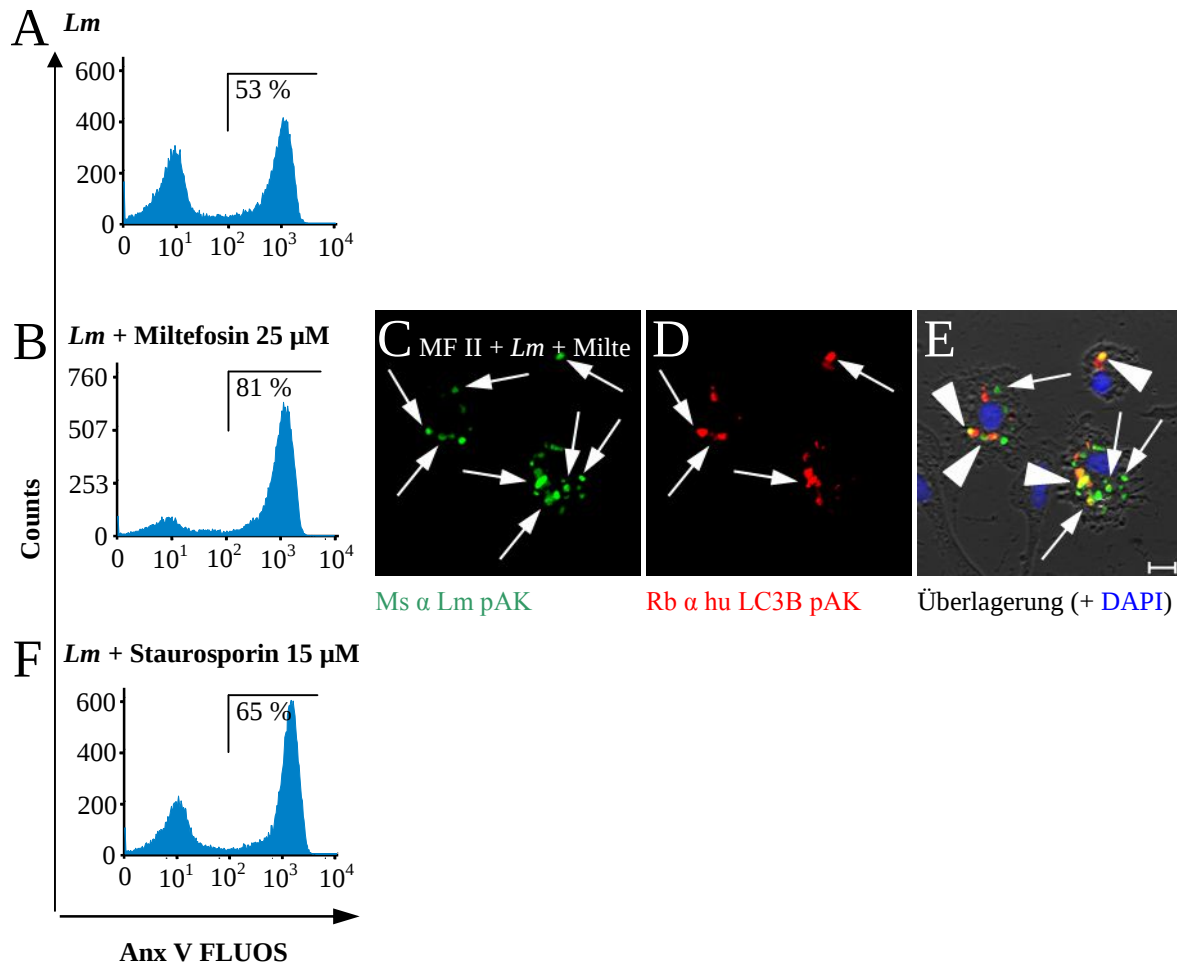


Abb. 12: Medikamentös induzierte Apoptose promastigoter *L. major* und die Auswirkungen auf das Auftreten von LC3B.

Promastigote *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur wurden für 18 Stunden mit 25 μ M Miltefosin bzw. 15 μ M Staurosporin inkubiert und nach Färbung mit Annexin V FLUOS durchflusszytometrisch bzgl. ihrer Apoptoserate untersucht. Bei den dargestellten exemplarischen Histogrammen ist auf der y-Achse die Anzahl der Parasiten (Counts) und auf der x-Achse die durch Annexin V FLUOS hervorgerufene Grünfluoreszenz dargestellt. Die angegebenen Prozentwerte bezeichnen den Anteil Annexin positiver Promastigoten (A, B, F). Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 3 Stunden mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur oder mit 25 μ M Miltefosin-vorbehandelten Promastigoten inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der Inkubationszeit wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α Lm pAK (C) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (D). Die Überlagerung aus den beiden Aufnahmen ist in (E) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper dienen Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierter AK und Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kernes und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende *L. major* (C), bzw. auf LC3B positive Kompartimente (D). Leishmanien, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet (E), während intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, mit einem Pfeil dargestellt sind (E).

Lm: *Leishmania major*; Milte: 25 μ M Miltefosin; Anx: Annexin; MF II: Makrophagen Typ II; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbalken: 10 μ m; 630x Vergrößerung.

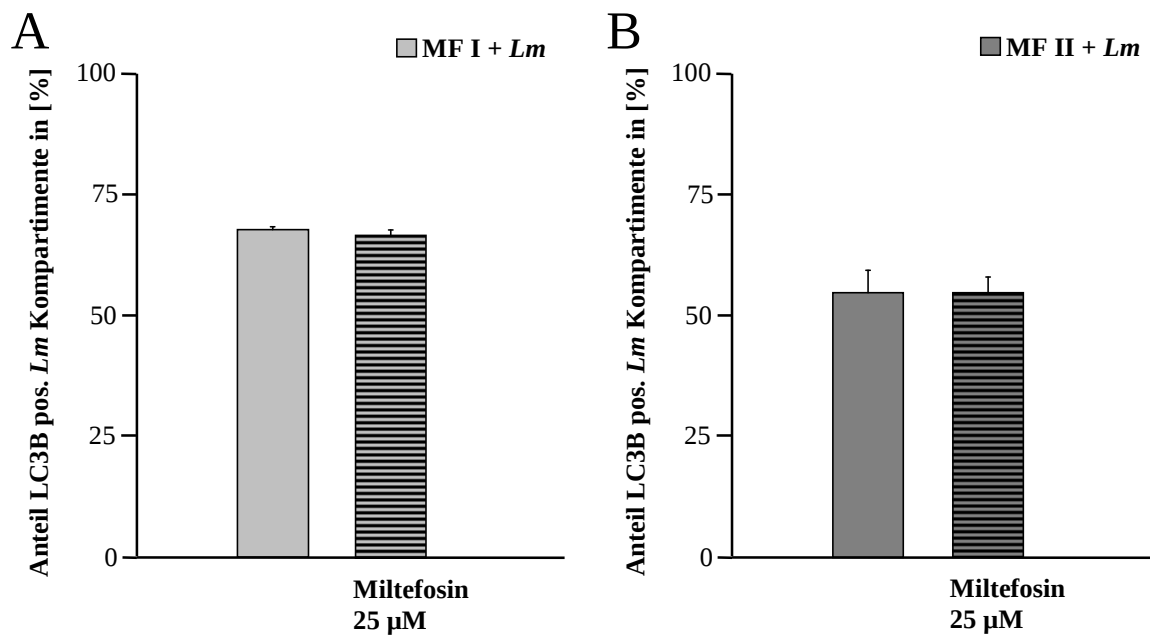


Abb. 13: Medikamentös induzierte Apoptose promastigoter *L. major* und die Auswirkungen auf das Auftreten von LC3B.

Promastigote *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur wurden für 18 Stunden mit 25 µM Miltefosin inkubiert. Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 3 Stunden mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur oder mit 25 µM Miltefosin-vorbehandelten Promastigoten inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Die mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur oder mit 25 µM Miltefosin-vorbehandelten Promastigoten koinkubierten Makrophagen Typ I (□, ▨) bzw. Typ II (■, ▩) wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf alle intrazellulären Leishmanien analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus n = 3 unabhängigen Spendern (A, B).

Lm: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II.

3.7 Die Rolle des Apoptosemarkers Phosphatidylserin bei der Entstehung LC3B positiver Kompartimente

Im vorangegangenen Experiment war herausgefunden worden, dass es durch Behandlung von Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur mit 25 µM Miltefosin zu einer Apoptoseinduktion kam. Diese führte aber bei Infektion von Makrophagen nicht zu vermehrtem Auftreten LC3B positiver Kompartimente. Phosphatidylserin war damit als Induktor für das Auftreten LC3B positiver Kompartimente unwahrscheinlich geworden. Um die Hypothese zu stützen, dass das Phosphatidylserin auf apoptotischen Promastigoten nicht der Induktor für das Auftreten LC3B positiver Kompartimente ist, wurde es in diesem Experiment mit Annexin blockiert.

Dazu wurden promastigote *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur für 15 Minuten in einer 38,5 mM CaCl₂dihydrat-Lösung mit Annexin A5 inkubiert. Je 10⁵ Makrophagen Typ I

bzw. Typ II wurden in 2,5 mM CaCl₂dihydrat-Lösung mit 10⁶ Annexin A5 vorbehandelten promastigoten *L. major* für 3 Stunden inkubiert.

Als Kontrolle wurden Makrophagen mit nicht Annexin A5 vorbehandelten Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildung 14).

Bei der Infektion von Makrophagen mit Annexin A5 vorbehandelten Promastigoten waren *Leishmania* Parasiten deutlich erkennbar durch die Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 14 B). Mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung konnte eine punktuelle Anfärbung erzielt werden (Abbildung 14 C). Im Durchlichtbild ist erkennbar, dass etwa die Hälfte der intrazellulären Parasiten an denselben Stellen liegt wie LC3B positive Kompartimente (Abbildung 14 D).

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei mit Annexin A5 vorbehandelten Promastigoten infizierten Makrophagen Typ I ergab, dass der Anteil Parasiten, die sich an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente befanden, bei 58 % lag. Für Makrophagen Typ I, die mit nicht vorbehandelten Promastigoten infiziert worden waren, lag der Anteil bei 61 % (Abbildung 14 E) und war damit nicht signifikant unterschiedlich. Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 14 F).

Zusammengefasst bedeutet das, dass es trotz Behandlung der Promastigoten mit Annexin A5 bei der Infektion von Makrophagen zu keiner signifikanten Reduktion im Auftreten LC3B positiver Kompartimente kam verglichen mit unbehandelten Promastigoten. Wie im vorangegangenen Experiment vermutet, konnte auch hier nicht bestätigt werden, dass Phosphatidylserin der Induktor für das Auftreten LC3B positiver Kompartimente ist.

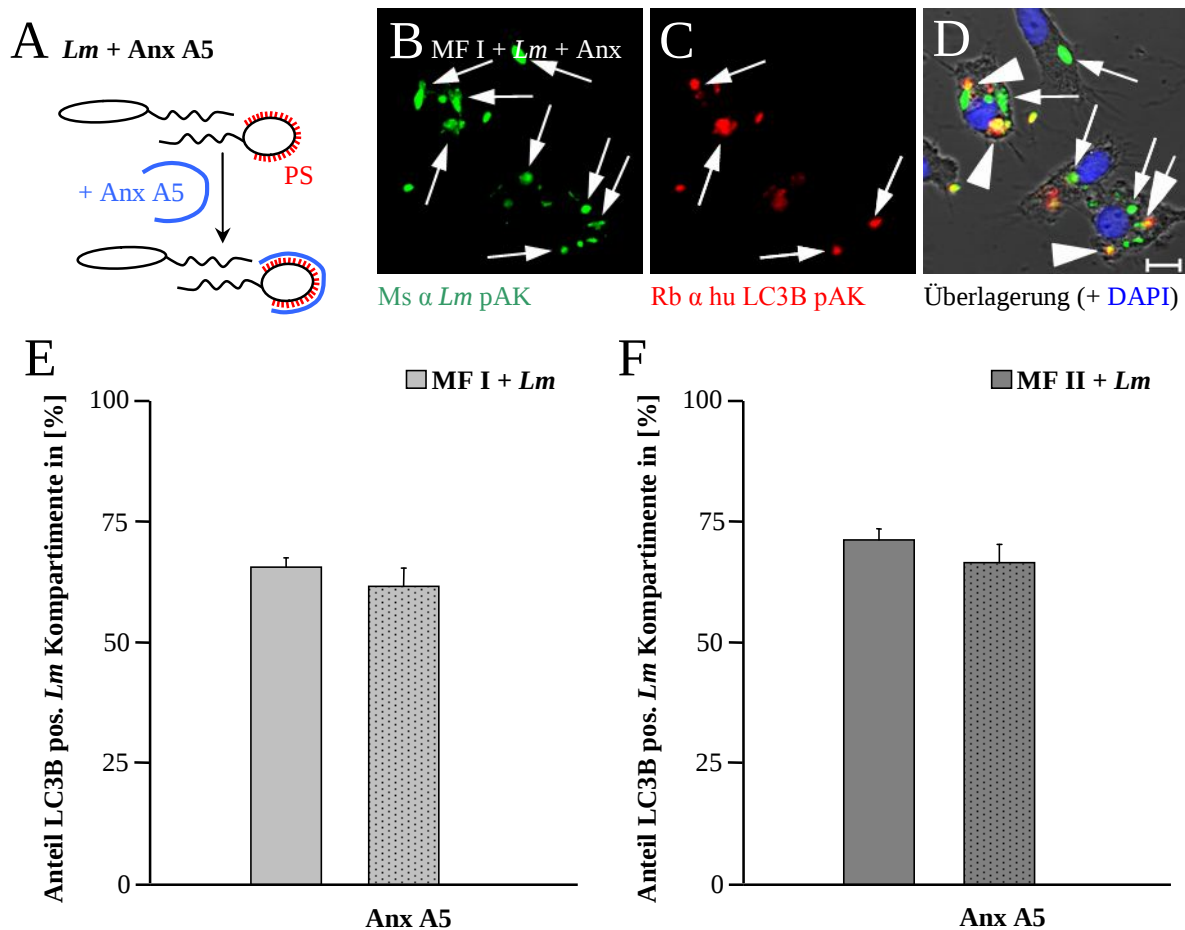


Abb. 14: Infektion von Makrophagen mit Annexin A5 vorbehandelten Promastigoten.

Promastigote *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur wurden für 15 Min in 38,5 mM CaCl_2 dihydrat Lösung mit Annexin A5 inkubiert (A).

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 3 Stunden mit Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur oder mit in 2,5 mM CaCl_2 dihydrat Lösung mit Annexin A5 vorbehandelten Promastigoten inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der Inkubationszeit wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α *Lm* pAK (B) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (C). Die Überlagerung aus den beiden Aufnahmen ist in (D) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper dienen Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierter AK und Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kerns und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende *L. major* (B), bzw. auf LC3B positive Kompartimente (C). Leishmanien, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet (D), während intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, mit einem Pfeil dargestellt sind (D).

Die mit Promastigoten einer 7 Tage alten Kultur bzw. mit Annexin A5 vorbehandelten Promastigoten koinkubierten Makrophagen Typ I (□, ▤) bzw. Typ II (■, ▨) wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf alle intrazellulären Leishmanien analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus n = 3 unabhängigen Spendern (E, F).

Lm: *Leishmania major*; PS: Phosphatidylserin; Anx (A5): Annexin A5; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbalken: 10 μm ; 630x Vergrößerung.

3.8 Die Rolle des Virulenzfaktors Lipophosphoglykan bei der Entstehung LC3B positiver Kompartimente

Nachdem im vorangegangenen Experiment das auf apoptotischen Promastigoten vorkommende Phosphatidylserin als möglicher Induktor LC3B positiver Kompartimente in Makrophagen erneut nicht bestätigt werden konnte, wurde in diesem Experiment weiter nach dem möglichen Induktor für das Auftreten LC3B positiver Kompartimente gesucht. Dafür wurde das auf der Oberfläche promastigoter Leishmanien vorkommende Lipophosphoglykan (LPG) untersucht. Neben weiteren Bestandteilen stellt LPG den Hauptanteil der die Promastigoten bedeckenden Glykokalix dar und hat dabei essentielle Funktion für die Virulenz der Parasiten (Turco u. Descoteaux 1992, Beverley u. Turco 1998, Späth et al. 2000, Kleczka et al. 2007).

Je 10^5 Makrophagen Typ I wurden mit 10^6 LPG defizienten (LPG -/-) Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur des Stammes 5 ASKH für 1 Stunde und 3 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden Makrophagen mit Wildtyp Promastigoten (LPG +/+) desselben Stammes und Kulturalters inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildungen 15 und 16).

Bei der Infektion von Makrophagen mit LPG +/+ und LPG -/- Promastigoten waren *Leishmania* Parasiten deutlich erkennbar durch die Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 15 B, F). Mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung konnte eine punktuelle Anfärbung erzielt werden (Abbildung 15 C, G). Im Durchlichtbild ist erkennbar, dass etwa die Hälfte der intrazellulären Parasiten an denselben Stellen liegen wie LC3B positive Kompartimente (Abbildung 15 D, H).

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei mit LPG +/+ Promastigoten infizierten Makrophagen Typ I ergab, dass der Anteil Parasiten, die sich nach 1 Stunde an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente befanden, bei 56 % lag. Für Makrophagen Typ I, die mit LPG -/- Promastigoten infiziert worden waren, lag der Anteil nach 1 Stunde bei 52 % (Abbildung 16 A) und war damit nicht signifikant unterschiedlich. Nach 3 Stunden lag der Anteil Parasiten, die sich an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente befanden bei 63 % bei LPG +/+ bzw. bei 54 % bei LPG -/- Promastigoten und

war erneut nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 16 A). Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 16 B).

Zusammengefasst bedeutet das, dass es trotz des LPG Knockouts auf den infizierenden Promastigoten zur Induktion LC3B positiver Kompartimente in Makrophagen bei Infektion kam. Das heißt, dass LPG wahrscheinlich nicht für die Induktion LC3B positiver Kompartimente verantwortlich ist.

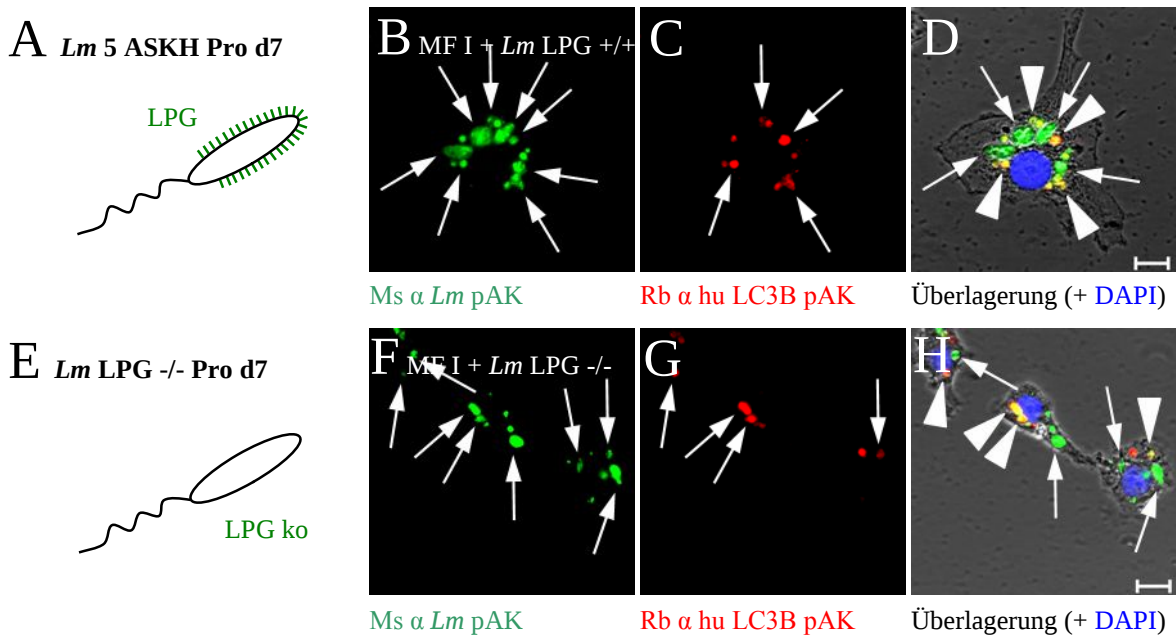


Abb. 15: Infektion von Makrophagen mit LPG knockout und Wildtyp Promastigoten.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 1 und 3 Stunden mit LPG +/+ bzw. LPG -/- Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der Inkubationszeit wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α Lm pAK (B, F) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (C, G). Die Überlagerung aus den beiden Aufnahmen ist in (D, H) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper dienten Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierter AK und Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kernels und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende *L. major* (B, F), bzw. auf LC3B positive Kompartimente (C, G). Leishmanien, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet (D, H), während intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, mit einem Pfeil dargestellt sind (D, H).

Lm: *Leishmania major*; Pro: Promastigoten; LPG: Lipophosphoglykan; ko: knockout; LPG +/+ : Lipophosphoglykan Wildtyp; LPG -/- : Lipophosphoglykan knockout; MF I: Makrophagen Typ I; d: Tag; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbal-
ken: 10 μ m; 630x Vergrößerung.

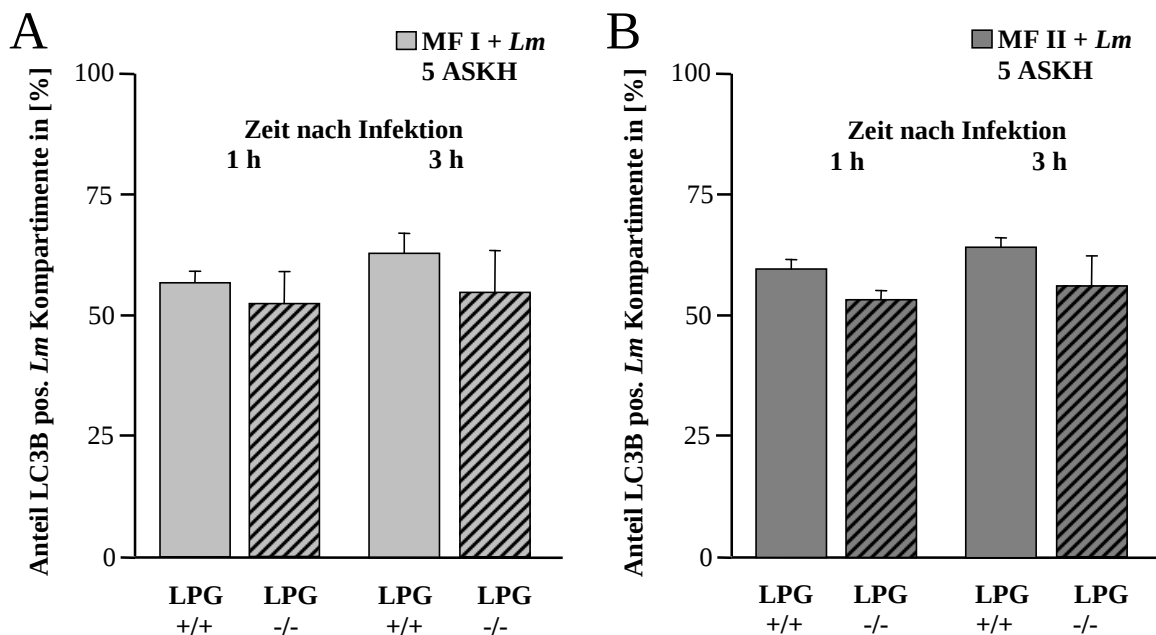


Abb. 16: Infektion von Makrophagen mit LPG knockout und Wildtyp Promastigoten.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 1 und 3 Stunden mit LPG +/+ bzw. LPG -/- Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Die mit LPG +/+ oder mit LPG -/- Promastigoten kokultivierten Makrophagen Typ I (□, ▨) bzw. Typ II (■, ▩) wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf alle intrazellulären Leishmanien analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus n = 4 unabhängigen Spendern (A, B).

Lm: *Leishmania major*; Pro: Promastigoten; LPG: Lipophosphoglykan; LPG +/+ : Lipophosphoglykan Wildtyp; LPG -/- : Lipophosphoglykan knockout; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II; h: Stunde.

3.9 Reifung LC3B positiver Kompartimente

In den Vorversuchen waren Phosphatidylserin und LPG als mögliche Induktoren für das Auftreten LC3B positiver Kompartimente bei der Infektion von Makrophagen mit promastigoten *L. major* untersucht worden. Beide erwiesen sich dabei nicht als Induktor. Der Fokus wurde deshalb wieder auf die Maturation des LC3B-positiven Autophagosoms gerichtet. Es wurde untersucht, ob es wie bei Autophagie üblich mit Lysosomen verschmilzt (Levine u. Kroemer 2008). Zur besseren Charakterisierung der Maturation des LC3B-positiven Autophagosoms wurde dazu das auf Lysosomen vorkommende lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2 = CD 107 b) betrachtet (Majeski u. Dice 2004, Dice 2007). Es wurde dabei nach gemeinsamem Vorkommen von LAMP2 und LC3B positiven Kompartimenten im zeitlichen Verlauf nach Infektionsbeginn gesucht.

Dafür wurden je 10^5 Makrophagen Typ I bzw. Typ II mit 10^6 Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur für 1 Stunde, 3 Stunden und 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden

die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen LAMP2 und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildungen 17 und 18).

Bei der Infektion von Makrophagen mit Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur waren Lysosomen als Umrisse erkennbar durch die Ms α hu LAMP2 mAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 17 A, D, G). Dabei waren nach 1 Stunde (Abbildung 17 A) wenige, nach 3 Stunden (Abbildung 17 D) viele und nach 24 Stunden (Abbildung 17 G) Inkubationszeit nur noch wenige Lysosomen erkennbar. Mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung konnte eine punktuelle Anfärbung erzielt werden (Abbildung 17 B, E). Diese war nach 1 Stunde und 3 Stunden stark ausgeprägt (Abbildung 17 B, E), nach 24 Stunden hingegen nicht mehr nachweisbar (Abbildung 17 H). Im Durchlichtbild von infizierten Makrophagen Typ I bzw. Typ II ist erkennbar, dass die Lysosomen wahrscheinlich intrazellulär liegen, denn diese befinden sich innerhalb der Zelumrisse (Abbildung 17 C, F, I). Im Durchlichtbild ist außerdem erkennbar, dass einige der LC3B positiven Kompartimente wahrscheinlich innerhalb der Lysosomen liegen, denn sie befinden sich innerhalb der Umrisse der LAMP2 positiven Kompartimente (Abbildung 17 C, F, I).

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei mit Promastigoten infizierten Makrophagen Typ I bzw. Typ II ergab, dass nach 1 Stunde 27 % der Makrophagen Typ I LAMP2 positive Kompartimente aufwiesen. Nach 3 Stunden zeigten 57 % der Makrophagen Typ I LAMP2 positive Kompartimente. 24 Stunden nach Infektionsbeginn wiesen noch 17 % der Makrophagen Typ I LAMP2 positive Kompartimente auf (Abbildung 18 A). Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 18 B).

Weiterhin ergab die Quantifizierung, dass bei Makrophagen Typ I nach 1 Stunde 37 % der LC3B positiven Kompartimente LAMP2 positiv waren (Abbildung 18 C). 3 Stunden nach Infektionsbeginn waren bei Makrophagen Typ I 86 % der LC3B positiven Kompartimente LAMP2 positiv (Abbildung 18 C). Nach 24 Stunden waren bei Makrophagen Typ I keine LC3B und LAMP2 doppelt positiven Kompartimente mehr detektierbar (Abbildung 18 C). Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 18 D).

Zusammengefasst bedeutet das, dass im zeitlichen Verlauf die meisten der LC3B positiven Kompartimente mit LAMP2 positiven Kompartimenten verschmelzen. Das bedeutet, dass die LC3B positiven Autophagosomen mit Lysosomen verschmelzen und der autophagische Pathway normal abläuft.

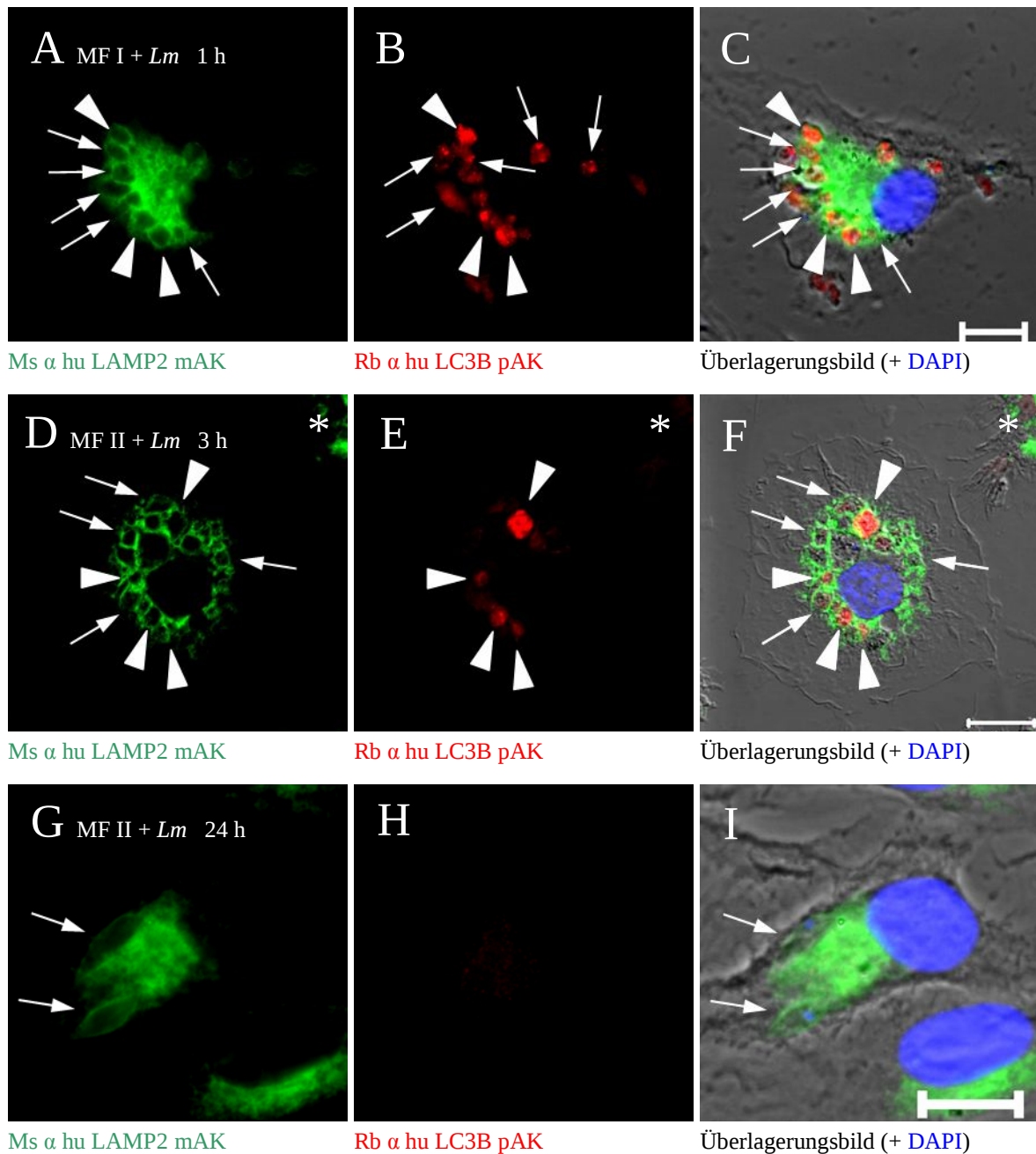


Abb. 17: LAMP2 und LC3B bei der Infektion von Makrophagen mit promastigoten *L. major*.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 1, 3 und 24 Stunden mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der Inkubationszeit wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α hu LAMP2 mAK (A, D, G) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (B, E, H). Die Überlagerung aus den beiden Aufnahmen ist in (C, F, I) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper dienten Ch α Ms Alexa Fluor® 488 konjugierter AK und Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kerns und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. In der Ms α hu LAMP2 Färbung deuten die Pfeile auf LAMP2 positive Kompartimente während die Pfeilspitzen auf LAMP2 positive Kompartimente deuten, die auch LC3B positiv waren (A, D, G). Bei der Rb α hu LC3B Färbung deuten die Pfeile auf LC3B positive Kompartimente, die auch LAMP2 positiv waren (B, E). Im Durchlichtbild deuten die Pfeile auf LAMP2 positive Kompartimente während die Pfeilspitzen auf LAMP2 positive Kompartimente deuten, die auch LC3B positiv waren (C, F, I).

*: Aufgenommen mit Konfokalmikroskop LSM 710, Software ZEN 2009 und 2010; *Lm*: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II; h: Stunde; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; mAK: monoklonaler Antikörper; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbalken: 10 μ m; 630x Vergrößerung.

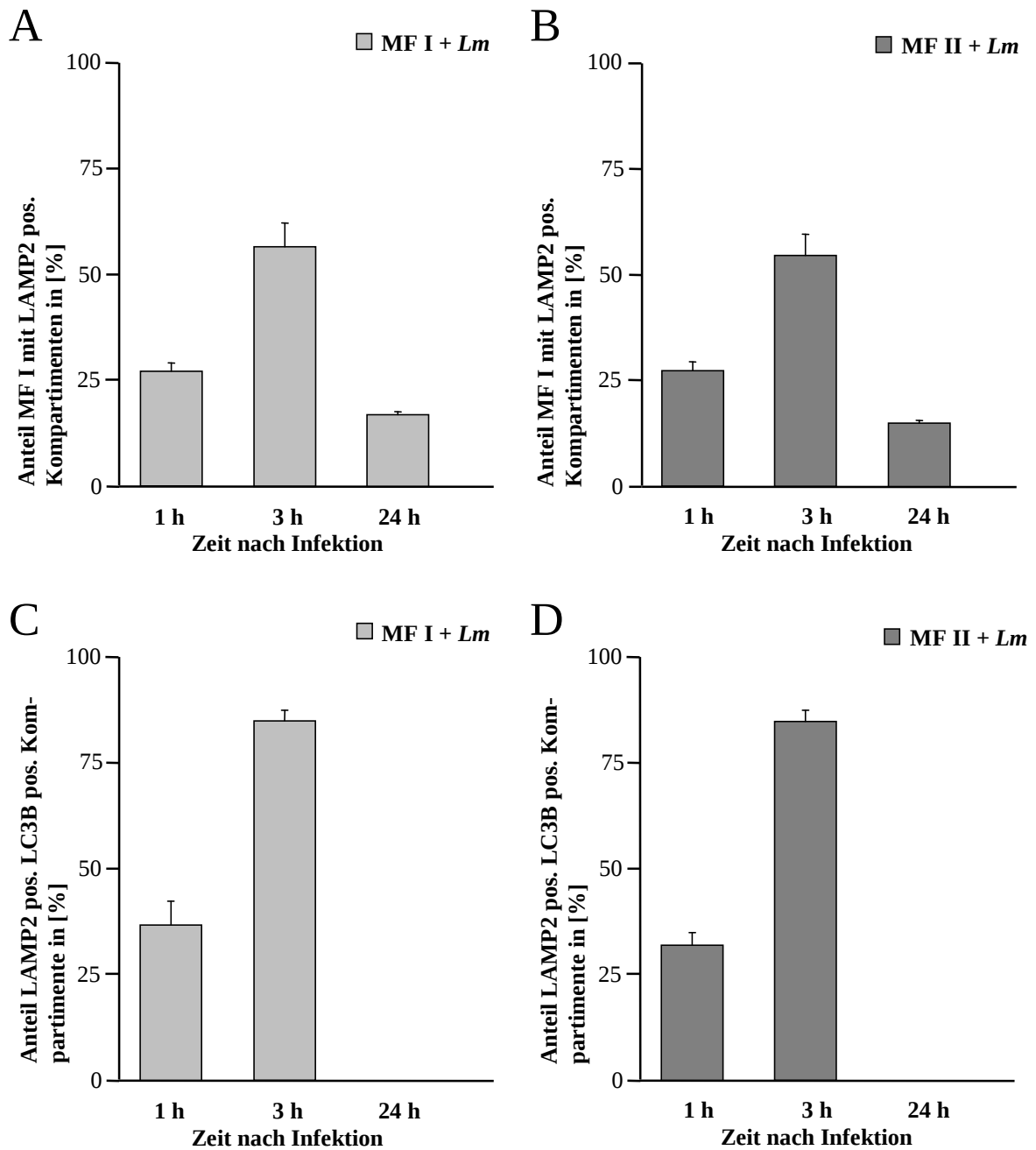


Abb. 18: LAMP2 und LC3B bei der Infektion von Makrophagen mit promastigoten *L. major*.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 1, 3 und 24 Stunden mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Die mit Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur infizierten Makrophagen Typ I (□) bzw. Typ II (■) wurden hinsichtlich des Auftretens LAMP2 positiver Kompartiment analysiert (A, B). Die infizierten Makrophagen Typ I (□) bzw. Typ II (■) wurden hinsichtlich des ortsgleichen Auftretens LAMP2 positiver und LC3B positiver Kompartimente bezogen auf alle LC3B positiven Kompartimente analysiert (C, D). Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus n = 3 unabhängigen Spendern (A, B, C, D).

Lm: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II; h: Stunde.

3.10 Einfluss des Autophagie-Inhibitors Wortmannin auf die Entwicklung LC3B positiver Kompartimente

In den vorangegangenen Versuchen war die Maturation der LC3B positiven Kompartimente untersucht worden. Es wurde entdeckt, dass die LC3B positiven Autophagosomen mit LAMP2 positiven Lysosomen fusionieren. In den beiden folgenden Experimenten wurde anhand von LC3B untersucht, welche Rolle Autophagie für das Überleben von *L. major* Promastigoten bei der Infektion von Makrophagen spielt.

Um der Bedeutung der Autophagie auf die Spur zu kommen, wurde deren Auftreten zunächst blockiert. In der Literatur ist Wortmannin als Inhibitor der PI-3 Kinase und damit des Initialschrittes der Autophagie vorbeschrieben (Blommaart et al. 1997).

Dazu wurden Makrophagen für 90 Minuten mit 100 nM Wortmannin inkubiert. Je 10^5 der zuvor mit Wortmannin inkubierten Makrophagen Typ I bzw. Typ II wurden mit 10^6 durch MACS gewonnenen apoptotischen promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur für 3 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht mit Wortmannin inkubierte Makrophagen, die mit promastigoten *L. major* aus der 7 Tage alten Kultur für 3 Stunden inkubiert wurden.

Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen *L. major* und LC3B sowie DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildungen 19 und 20).

Leishmania Parasiten wurden deutlich erkennbar durch die Ms α Lm pAK - Ch α Ms Alexa Fluor[®] 488 konjugierte AK-Färbung markiert (Abbildung 19 A, D). Mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor[®] 568 konjugierter AK-Färbung konnte eine punktuelle Anfärbung erzielt werden. Diese war bei infizierten nicht mit Wortmannin inkubierten Makrophagen deutlich stärker ausgeprägt als bei infizierten und mit Wortmannin inkubierten Makrophagen (Abbildung 19 B, E). Im Durchlichtbild ist erkennbar, dass bei nicht mit Wortmannin inkubierten Makrophagen die meisten der intrazellulären Parasiten an denselben Stellen liegen wie LC3B positive Kompartimente (Abbildung 19 C). Dagegen liegen bei mit Wortmannin inkubierten Makrophagen nur wenige der intrazellulären Parasiten an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente (Abbildung 19 F).

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei mit apoptotischen Promastigoten infizierten und nicht mit Wortmannin inkubierten Makrophagen Typ I ergab, dass der Anteil Parasiten, die sich an denselben Stellen wie LC3B positive Kompartimente befanden, bei 84 % lag. Bei mit Wortmannin inkubierten Makrophagen Typ I lag der Anteil bei nur

24 % und war damit statistisch hoch signifikant verschieden (Abbildung 20 A). Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 20 B).

Zusammengefasst bedeutet das, dass wenn man Makrophagen vor der Infektion mit promastigoten *L. major* mit 100 nM Wortmannin inkubiert, der Anteil Parasiten, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen hoch signifikant geringer ist als bei der Infektion von nicht mit Wortmannin inkubierten Makrophagen. Das zeigt, dass durch die Behandlung von Makrophagen mit 100 nM Wortmannin das Auftreten LC3B positiver Kompartimente und damit die Autophagie reduziert werden konnte.

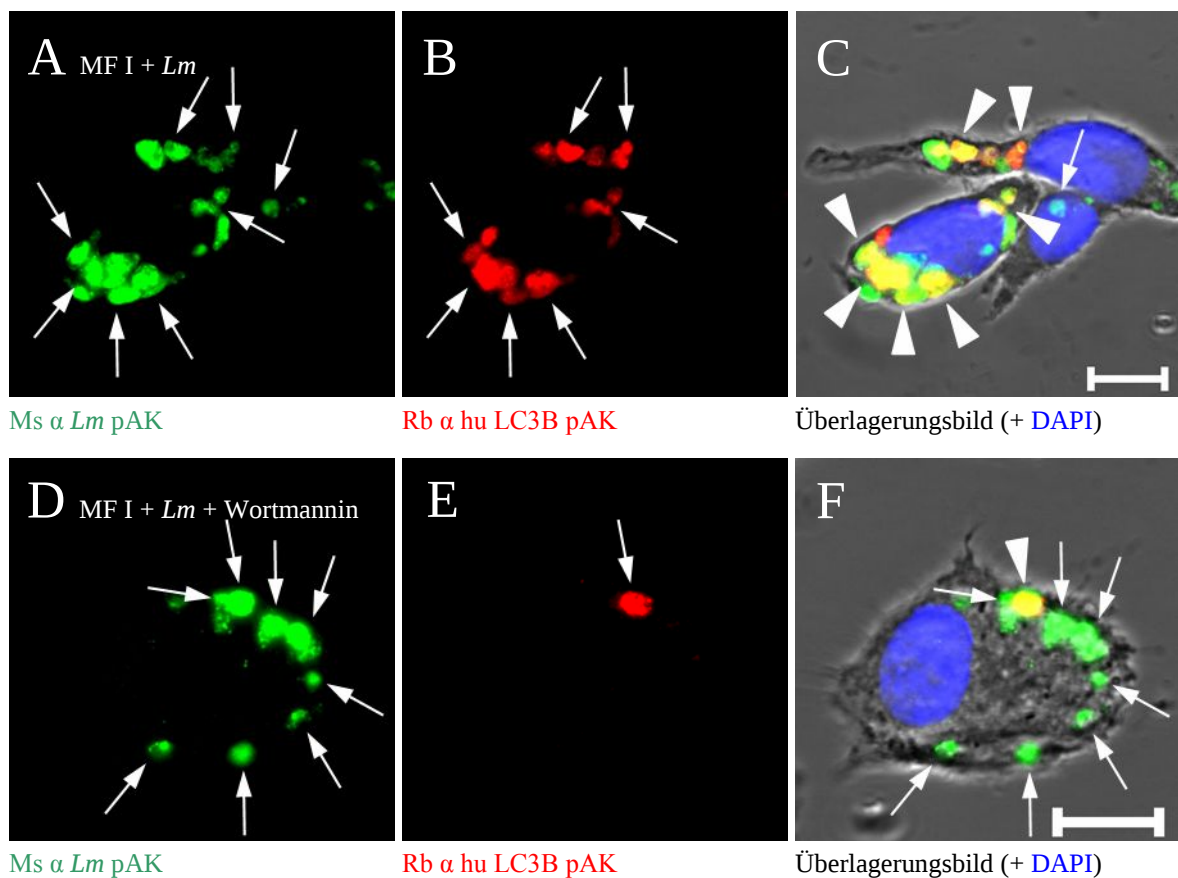


Abb. 19: Blockade der PI-3 Kinase durch Wortmannin und die Auswirkung auf das Auftreten LC3B positiver Kompartimente.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 90 Minuten mit 100 nM Wortmannin inkubiert. Freies Wortmannin wurde durch Waschen entfernt. Die Makrophagen wurden für 3 Stunden mit durch MACS gewonnenen apoptotischen promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht mit Wortmannin inkubierte und mit Promastigoten der 7 Tage alten Kultur infizierte Makrophagen. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der Inkubationszeit wurden infizierte Makrophagen Typ I mittels Ms α Lm pAK (A, D) sowie Rb α hu LC3B pAK gefärbt (B, E). Die Überlagerung aus den beiden Aufnahmen ist in (C, F) im Durchlichtkanal dargestellt. Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper dienten Ch α Ms Alexa Fluor® 488 konjugierter AK und Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK. Zusätzlich wurde DAPI zur Färbung des Zellkerns der Makrophagen sowie des Kerns und des Kinetoplasten der Leishmanien verwendet. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende *L. major* (A, D), bzw. auf LC3B positive Kompartimente (B, E). Leishmanien, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet (C, F), während intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, mit einem Pfeil dargestellt sind (C, F).

Lm: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; Ms: Maus; Rb: Rabbit; Ch: Chicken; Gt: Goat; hu: Human; α : anti; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbalken: 10 μ m; 630x Vergrößerung.

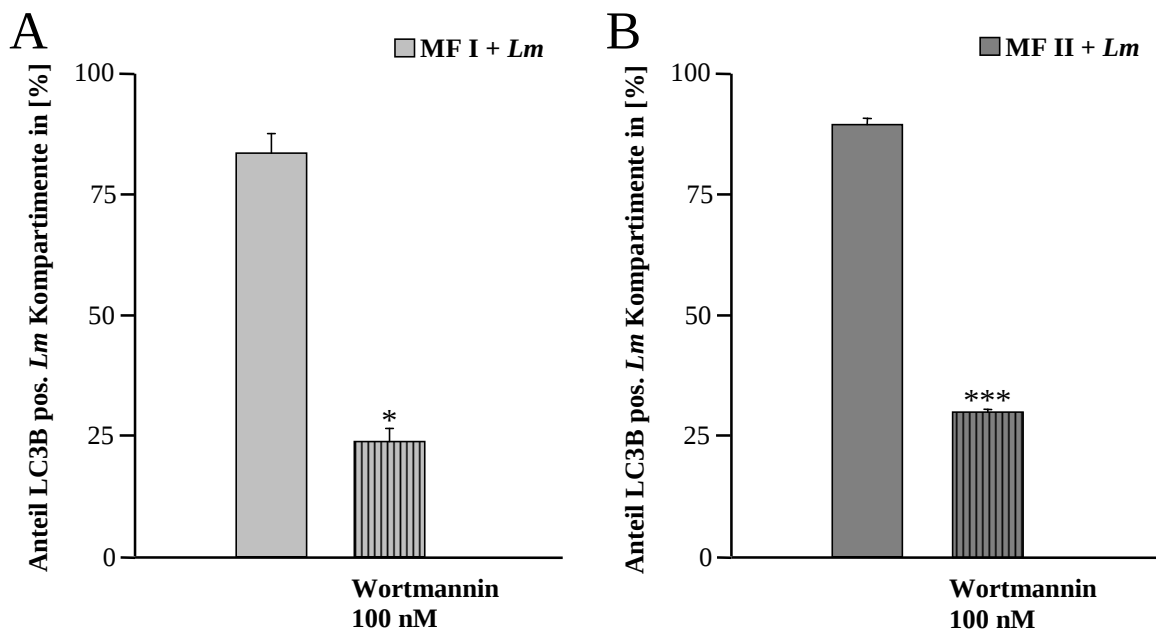


Abb. 20: Blockade der PI-3 Kinase durch Wortmannin und die Auswirkung auf das Auftreten LC3B positiver Kompartimente.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 90 Minuten mit 100 nM Wortmannin inkubiert. Freies Wortmannin wurde durch Waschen entfernt. Die Makrophagen wurden für 3 Stunden mit durch MACS gewonnenen apoptotischen promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht mit Wortmannin inkubierte und mit Promastigoten der 7 Tage alten Kultur infizierte Makrophagen. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Die mit apoptotischen Promastigoten der 7 Tage alten Kultur koinkubierten Makrophagen Typ I (□, ▨) bzw. Typ II (■, ▩) wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils der in einem LC3B positiven Kompartiment liegenden Leishmanien bezogen auf alle intrazellulären Leishmanien analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus n = 3 unabhängigen Spendern (A, B).

Lm: *Leishmania major*; MF I: Makrophagen Typ I; MF II: Makrophagen Typ II; *: signifikant p = 0,0122; ***: hoch signifikant p = 0,0008.

3.11 Einfluss der Inhibition von Autophagie auf die Infektionsrate

Im vorangegangenen Experiment war herausgefunden worden, dass die Inkubation von Makrophagen mit 100 nM Wortmannin vor der Infektion mit promastigoten *L. major* zu einem verminderten Auftreten LC3B positiver Kompartimente führte. Darauf aufbauend wurde in diesem Experiment die Auswirkung der Wortmannin-induzierten Hemmung von LC3B auf das intrazelluläre Überleben von promastigoten *L. major* in Makrophagen gerichtet.

Dazu wurden Makrophagen für 90 Minuten mit 100 nM Wortmannin inkubiert. Je 10^5 der zuvor mit Wortmannin inkubierten Makrophagen Typ I bzw. Typ II wurden mit 10^6 apoptotischen promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur für 24 Stunden, 42 Stunden und 66 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht mit Wortmannin inkubierte

Makrophagen, die mit promastigoten *L. major* der 7 Tage alten Kultur für 24 Stunden, 42 Stunden und 66 Stunden inkubiert wurden.

Im Anschluss wurden die Zellen einer Diff-Quik-Färbung unterzogen. Die qualitative und quantitative Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch (Abbildung 21).

Makrophagen wurden deutlich erkennbar durch die Diff-Quik-Färbung markiert. Intrazelluläre *Leishmania* Parasiten waren deutlich erkennbar.

Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung bei mit Promastigoten infizierten und nicht mit Wortmannin inkubierten Makrophagen Typ I ergab, dass nach 24 Stunden Inkubation 48 % der Zellen *Leishmania*-infiziert waren. Nach 42 Stunden lag der Anteil bei 51 %, nach 66 Stunden bei 50 %. Davon unterschieden sich die Infektionsraten bei mit Wortmannin inkubierten Makrophagen. Die Infektionsrate lag nach 24 Stunden bei 19 %, nach 42 Stunden bei 14 % und nach 66 Stunden bei 15 %. Die Unterschiede erwiesen sich als signifikant (24 Stunden, 42 Stunden) bzw. als sehr signifikant (66 Stunden) (Abbildung 21 A). Für Makrophagen Typ II ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 21 B).

Zusammengefasst bedeutet das, dass wenn man Makrophagen vor der Infektion mit promastigoten *L. major* mit 100 nM Wortmannin inkubiert, der Anteil Makrophagen, die mit Promastigoten infiziert waren, signifikant reduziert war.

Betrachtet man diesen und den Vorversuch zusammen, so zeigt sich zum einen, dass durch die Inkubation mit 100 nM Wortmannin das Auftreten LC3B positiver Kompartimente signifikant reduziert werden konnte. Zum anderen sieht man, dass nach Inkubation der Makrophagen mit Wortmannin die Infektionsrate im beobachteten Zeitraum signifikant erniedrigt war. Verbindet man die beiden Ergebnisse, so kann man folgern, dass Wortmannin das Auftreten LC3B positiver Kompartimente hemmt, was dazu führt, dass die Infektionsrate erniedrigt ist.

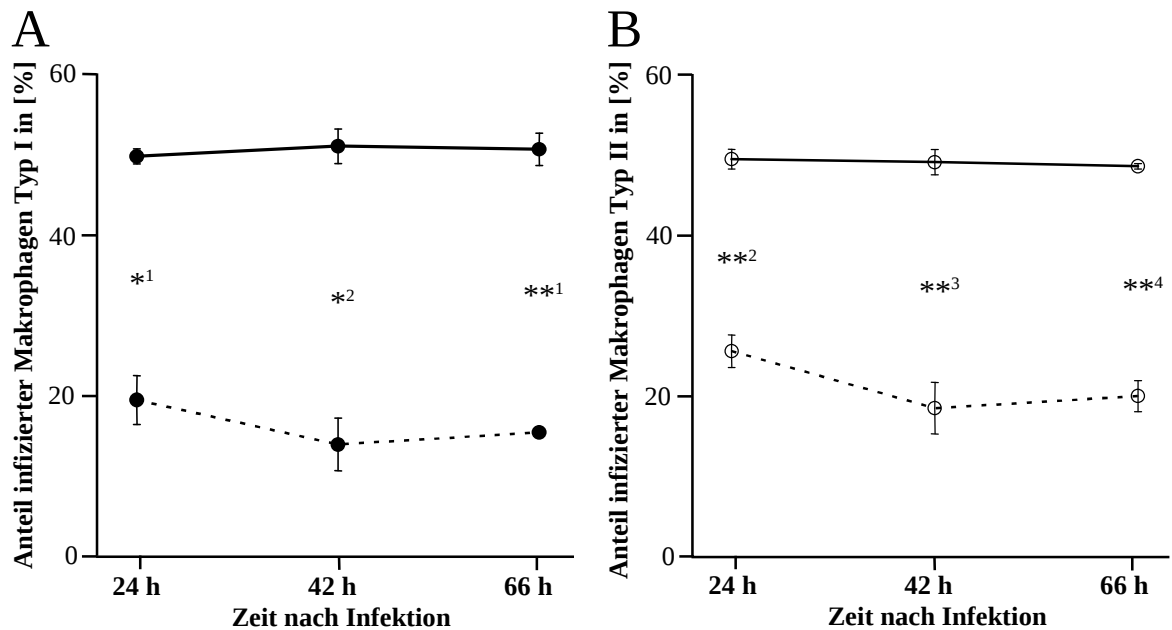


Abb. 21: Blockade der PI-3 Kinase durch Wortmannin und die Auswirkung auf die Infektionsrate von Makrophagen Typ I und Typ II.

Makrophagen Typ I und Typ II wurden für 90 Minuten mit 100 nM Wortmannin inkubiert. Freies Wortmannin wurde durch Waschen entfernt. Die Makrophagen wurden für 24 Stunden, 42 Stunden und 66 Stunden mit promastigoten *L. major* aus einer 7 Tage alten Kultur inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht mit Wortmannin inkubierte und mit Promastigoten der 7 Tage alten Kultur infizierte Makrophagen. Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt.

Nach der Inkubationszeit wurden Makrophagen Typ I und Typ II mittels Diff-Quik gefärbt. Die mit Promastigoten koinkubierten Makrophagen Typ I bzw. Typ II wurden hinsichtlich des prozentualen Anteils infizierter Makrophagen bezogen auf alle Makrophagen analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus $n = 3$ unabhängigen Spendern (A, B).

h: Stunde; *¹: signifikant $p = 0,0153$; *²: signifikant $p = 0,019$; **¹: sehr signifikant $p = 0,0023$; **²: sehr signifikant $p = 0,0011$; **³: sehr signifikant $p = 0,0067$; **⁴: sehr signifikant $p = 0,0035$.

3.12 Entwicklung eines Modells zur spezifischen Labelung apoptotischer vs. vitaler *L. major*

In den vorangegangenen Experimenten war entdeckt worden, dass mit Wortmannin sowohl das Auftreten LC3B positiver Kompartimente als auch die Infektionsrate bei einer Leishmanieninfektion von Makrophagen reduziert werden konnte. Das bedeutet, dass LC3B positive Kompartimente von Nutzen sind für die Etablierung einer Infektion mit promastigoten *L. major*. Auf Seiten der Leishmanien hatten sich in den vorangegangenen Experimenten Phosphatidylserin ebenso wie LPG nicht als Induktor der LC3B positiven Kompartimente erwiesen. Dennoch war in den durchgeführten Experimenten ein Zusammenhang zwischen dem Anteil apoptotischer Promastigoten im infizierenden Inokulum und dem Auftreten LC3B positiver Kompartimente nachgewiesen worden. Die Hinweise darauf,

dass apoptotische Promastigoten nach der Aufnahme in Makrophagen evtl. andere intrazelluläre Wege durchlaufen wie vitale Promastigoten wurden in diesem Versuch weiterverfolgt.

Dazu wurden Leishmanien vor der Infektion von Makrophagen farblich unterschiedlich gelabelt, um so eventuell unterschiedliche intrazelluläre Wege vitaler und apoptotischer Promastigoten in Makrophagen zu verfolgen.

3.12.1 Lipobiotin – Streptavidin zum Labeln apoptotischer *L. major*

Um apoptotische und vitale Promastigoten farblich unterschiedlich zu labeln, bedurfte es sich fluoreszenzmikroskopisch unterschiedlich darstellender Färbesysteme. Dazu wurde u.a. eine Doppelfärbung aus Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 gewählt. Damit konnten sowohl Pro- als auch Amastigoten gelabelt werden. Für diese auf Leishmanien neu etablierte Technik bedurfte es einer durchflusszytometrisch durchgeführten Konzentrationstestung des Lipobiotins (Abbildung 22).

Auf Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur wurde Lipobiotin dazu in absteigender Verdünnung 1:50, 1:100, 1:150 und 1:200 als Erstantikörper in einer Kombination mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 als Zweitantikörper verwendet. Zur Bestimmung der am besten geeigneten Lipobiotinkonzentration erfolgte der Vergleich gegenüber nur mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 behandelten Promastigoten. Zunächst zeigte sich durchflusszytometrisch eine deutlich gesteigerte Fluoreszenz von nur mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 behandelten Parasiten gegenüber unbehandelten Parasiten (Abbildung 22). Das durchflusszytometrisch durch die Doppelfärbung mit Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 gewonnene Plus an Intensität gegenüber der Einfachfärbung mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 betrug 52 % bei einer Lipobiotinverdünnung von 1:200, 66 % bei einer Verdünnung von 1:150, 72 % bei einer Verdünnung von 1:100 und 95 % bei einer Verdünnung von 1:50 (Abbildung 22).

Aus den Werten wurde abgeleitet, dass Lipobiotin am besten in einer Verdünnung von 1:100 oder 1:50 einzusetzen sei. Daher wurde für die folgenden Experimente eine Verdünnung von 1:75 gewählt.

Um das lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Verhalten der Parasiten gegenüber dem Labeling zu testen, wurden Promastigoten aus einer 3 Tage alten und einer 7 Tage alten Kultur sowie Amastigoten mit einer Kombination aus 1:75 verdünntem Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 behandelt. Zusätzlich wurde eine DAPI-Färbung

durchgeführt. Die Auswertung erfolgte sowohl durchflusszytometrisch als auch lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch (Abbildungen 23 A-L).

Durchflusszytometrisch zeigte sich wie erwartet, dass bei Parasiten aller Entwicklungsstadien die Kombination aus Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 der alleinigen Behandlung mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 überlegen war (Abbildung 23 A, E, I). Dabei fiel das Plus der Kombination aus Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 gegenüber der alleinigen Behandlung mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 bei Promastigoten aus der 3 Tage alten Kultur mit 11 % am geringsten aus (Abbildung 23 A). Bei Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur betrug das Plus der Kombination 79 % (Abbildung 23 E), bei Amastigoten 53 % (Abbildung 23 I). Durch die Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 Färbung wurde auf den *Leishmania* Parasiten eine punktförmige Anfärbung erzielt (Abbildung 23 B, F, J). Im Durchlichtbild ist zu erkennen, dass die Färbung sich nicht auf den kompletten Parasiten erstreckt, sondern punktförmig mit Präferenz der Pole vorliegt (Abbildung 23 D, H, L). Bei Amastigoten fiel auf, dass die Färbung sich auf die Pole konzentriert (Abbildung 23 L). Durch die DAPI-Färbung waren die Kerne und Kinetoplasten der Parasiten erkennbar (Abbildung 23 C, G, K). Morphologisch zeigte sich im Durchlichtbild die unterschiedliche Gestalt der Parasiten: Promastigoten aus der 3 Tage alten Kultur waren von langgezogener Gestalt (Abbildung 23 D), bei Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur war die Hälfte der Parasiten apoptotisch und damit abgerundet (Abbildung 23 H). Amastigoten dagegen waren rund bis spitz zulaufend und deutlich kleiner als Promastigoten (Abbildung 23 L).

Das bedeutet, dass in diesem Experiment gezeigt werden konnte, dass eine Färbung mit Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 auf *Leishmania* Parasiten möglich ist und lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann.

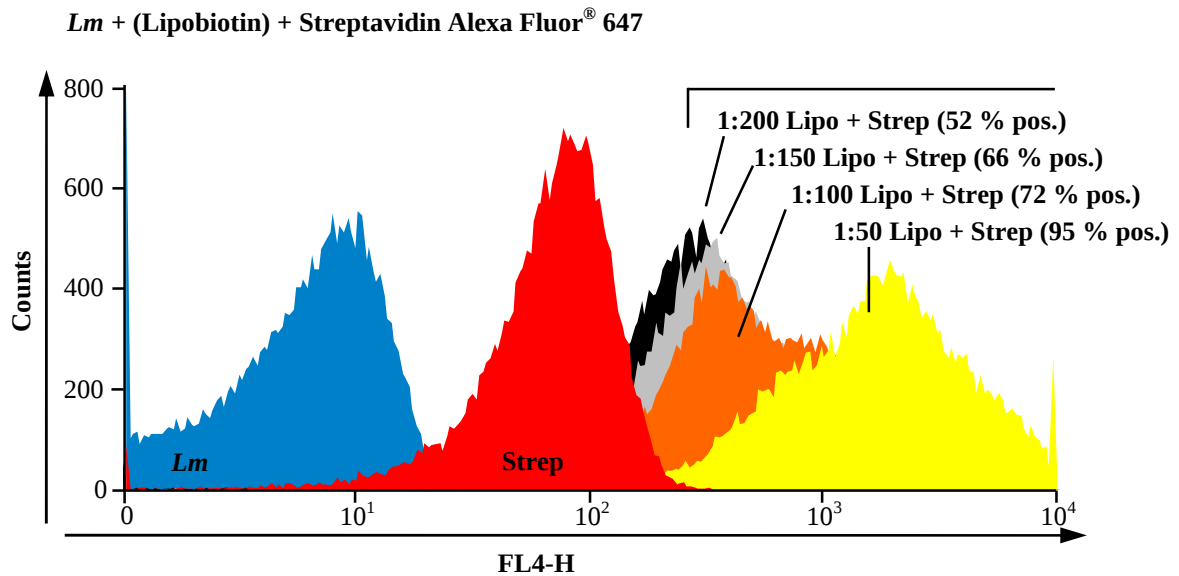


Abb. 22: Labeling promastigoter Leishmanien mit Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647.

Zur Testung der Konzentration des Lipobiotins wurden Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur mit 1:200, 1:150, 1:100 und 1:50 in RPMI verdünntem Lipobiotin inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 1:100 in RPMI verdünntem Streptavidin Alexa Fluor® 647. Als Kontrolle dienten unbehandelte und nur mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 inkubierte Promastigoten. Die Promastigoten wurden durchflusszytometrisch analysiert. Auf der x-Achse ist die durch Alexa Fluor® 647 hervorgerufene Fluoreszenz im FL4-H Kanal dargestellt. Das durch die Kombination von Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 hervorgerufene Plus an Fluoreszenz gegenüber nur mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 behandelten Parasiten ist in % dargestellt (A).

Lm: *Leishmania major*; Lipo: Lipobiotin; Strep: Streptavidin Alexa Fluor® (647).

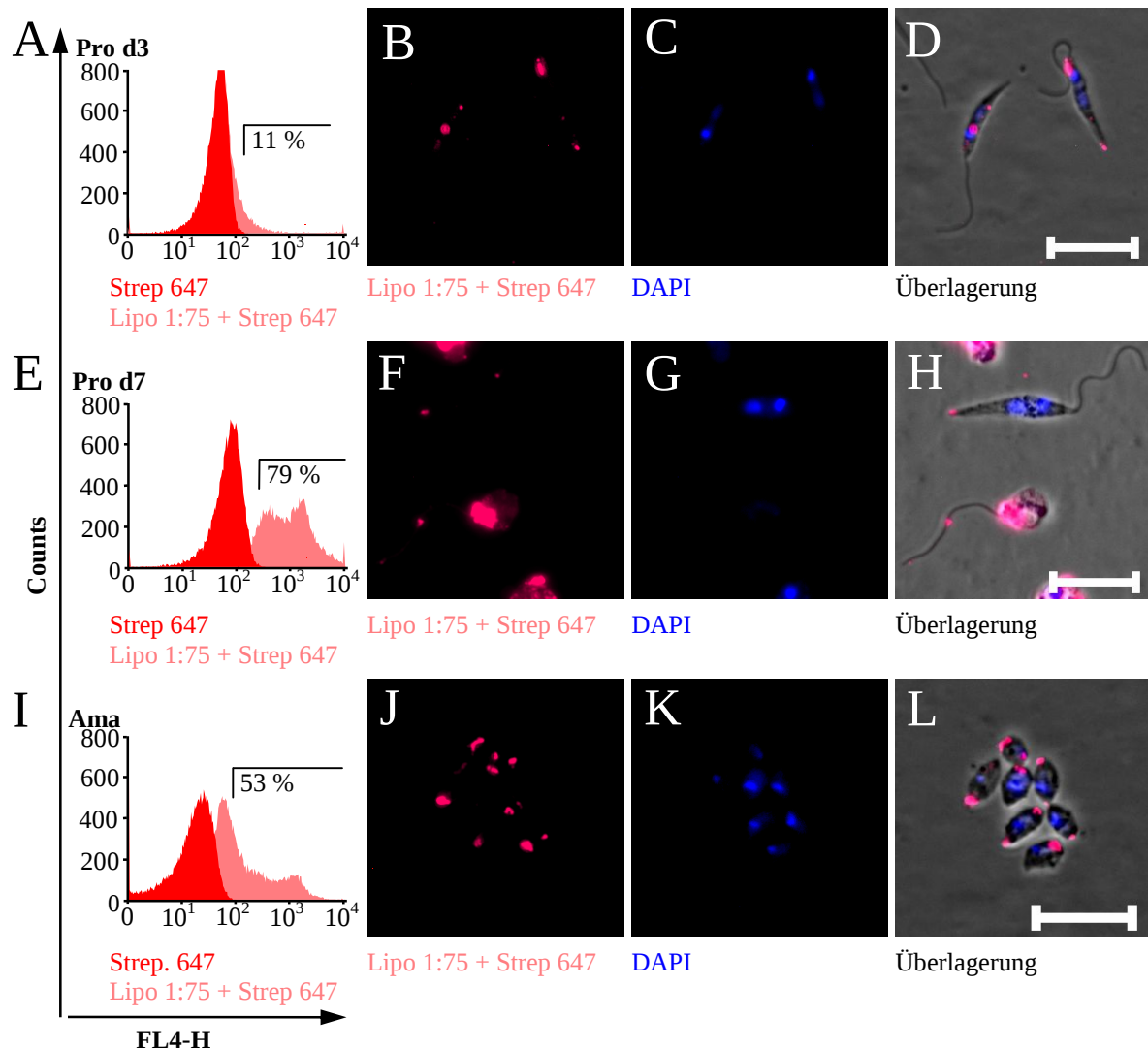


Abb. 23: Labeling pro- und amastigoter Leishmanien mit Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647.

Promastigoten aus einer 3 Tage alten und 7 Tage alten Kultur sowie Amastigoten wurden mit Lipobiotin in 1:75 Verdünnung in RPMI und Streptavidin Alexa Fluor® 647 behandelt und durchflusszytometrisch gegenüber nur mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 behandelten Parasiten analysiert. Auf der x-Achse ist die durch Alexa Fluor® 647 hervorgerufene Fluoreszenz im FL4-H Kanal dargestellt. Das durch die Kombination von Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 hervorgerufene Plus an Fluoreszenz gegenüber nur mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 behandelten Parasiten ist in % dargestellt (A, E, I). Die Parasiten wurden neben Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 (B, F, J) mit DAPI zur Färbung des Kerns und des Kinetoplasten der Leishmanien behandelt (C, G, K). Die Überlagerung aus beiden Aufnahmen ist in (D, H, L) im Durchlichtkanal dargestellt.

Die verwendeten Antikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern.

Pro: Promastigoten; Ama: Amastigoten; Lipo: Lipobiotin; Strep: Streptavidin Alexa Fluor® (647); d: Tag; Maßstabsbalken: 10 µm; 630x Vergrößerung.

3.12.2 Infektion von Makrophagen mit unterschiedlich gelabelten apoptotischen und vitalen *L. major*

Im vorangegangenen Versuch war das Labeling mit Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 auf Pro- und Amastigoten etabliert worden. Damit war die Voraussetzung gegeben, um den unterschiedlichen intrazellulären Weg von vitalen und apoptotischen Promastigoten innerhalb von Makrophagen zu verfolgen. Im Raum stand dabei die oben aufgeworfene Frage nach dem nachgewiesenermaßen bestehenden Zusammenhang zwischen dem Anteil apoptotischer Promastigoten und dem Auftreten LC3B positiver Kompartimente bei der Infektion von Makrophagen.

Dafür wurden Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur mittels MACS in vitale und apoptotische Promastigoten aufgetrennt. Die vitalen Promastigoten wurden dem im vorangegangenen Versuch etablierten Färbeprotokoll für Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 unterzogen. Die apoptotischen Promastigoten wurden mit Succinimidyl Ester Alexa Fluor® 350 behandelt.

10^5 Makrophagen Typ II wurden mit 10^6 in unterschiedlichen Farben gelabelten apoptotischen und vitalen *L. major* Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur für 3 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch (Abbildung 24).

Auf vitalen Promastigoten (Abbildung 24 A) führte die Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 Färbung zu einer punktförmigen Anfärbung (Abbildung 24 B), die wie im Überlagerungsbild zu sehen, die Pole betont (Abbildung 24 C). Apoptotische Promastigoten (Abbildung 24 D) wurden durch die Behandlung mit Succinimidyl Ester Alexa Fluor® 350 flächig gefärbt (Abbildung 24 E). Dabei wurde wie im Überlagerungsbild zu sehen der gesamte Zellkörper von der Färbung erfasst (Abbildung 24 F).

Bei der Inkubation der Makrophagen Typ II waren die vitalen Promastigoten durch die Lipobiotin und Streptavidin Alexa Fluor® 647 Färbung deutlich erkennbar (Abbildung 24 G). Auch die apoptotischen Promastigoten waren durch die Succinimidyl Ester Alexa Fluor® 350 Färbung deutlich erkennbar (Abbildung 24 H). Außerdem wurde mittels Rb α hu LC3B pAK - Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK-Färbung in mit *Leishmania*-infizierten Makrophagen Typ II eine punktuelle Anfärbung erzielt (Abbildung 24 I). Die Signale für LC3B liegen vermutlich an denjenigen Stellen, wo apoptotische Promastigoten liegen, wie im Durchlicht zu erkennen ist (Abbildung 24 J). Das bedeutet, dass apoptoti-

sche Promastigoten aus der 7 Tage alten Kultur im Gegensatz zu vitalen Promastigoten vermutlich in den LC3B positiven Kompartimenten zu liegen kommen.

Damit konnte erfolgreich demonstriert werden, dass bei der Infektion von Makrophagen mit Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur die apoptotischen und vitalen Parasiten unterschiedliche intrazelluläre Wege gehen. Die apoptotischen Promastigoten gelangen in LC3B positive Kompartimente, die wie in den Experimenten mit Wortmannin gezeigt, von Nöten sind um das intrazelluläre Überleben der Promastigoten bei einer Infektion von Makrophagen zu gewährleisten.

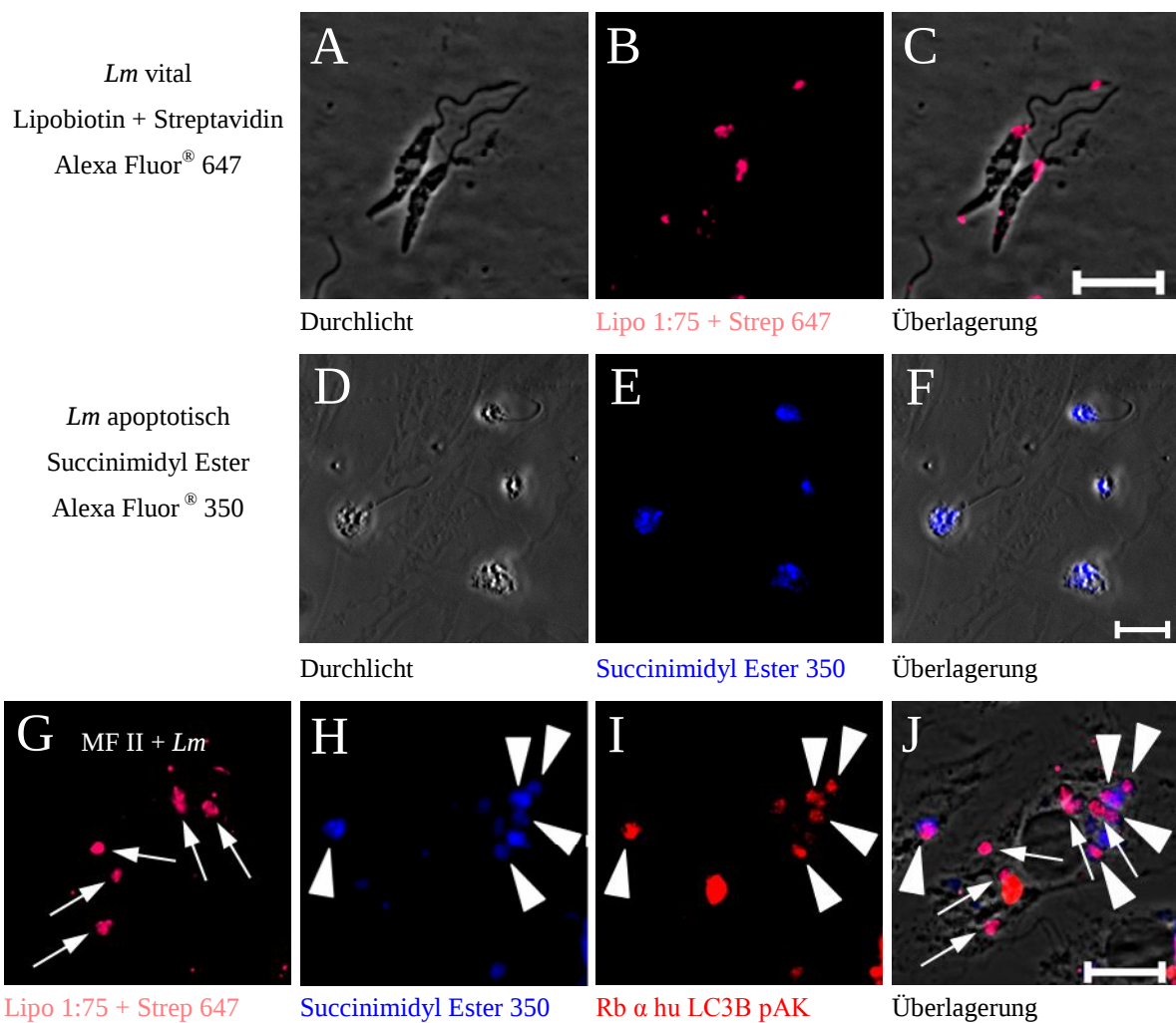


Abb. 24: Infektion von Makrophagen mit unterschiedlich gelabelten apoptotischen und vitalen Promastigoten.

Promastigoten aus einer 7 Tage alten Kultur wurde mittels MACS in vital und apoptotisch aufgetrennt. Vitale Promastigoten (A) wurden mit Lipobiotin in 1:75 Verdünnung in RPMI und Streptavidin Alexa Fluor® 647 behandelt (B). Die Überlagerung aus beiden Aufnahmen ist in (C) im Durchlichtkanal dargestellt. Apoptotische Promastigoten (D) wurden mit 1:30 in *Lm*-Medium verdünntem Succinimidyl Ester Alexa Fluor® 350 behandelt (E). Die Überlagerung aus beiden Aufnahmen ist in (F) im Durchlichtkanal dargestellt.

Makrophagen Typ II wurden für 3 Stunden mit den unterschiedlich gelabelten promastigoten *L. major* inkubiert (G, H). Nicht aufgenommene Parasiten wurden durch Waschen entfernt. Die Makrophagen wurden mit Rb α hu LC3B pAK gefärbt (I). Die Überlagerung aus den Aufnahmen ist in (J) im Durchlichtkanal dargestellt.

Die verwendeten Erstantikörper finden sich unter den jeweiligen Bildern. Als Zweitantikörper diente Gt α Rb Alexa Fluor® 568 konjugierter AK. Die Pfeile deuten auf intrazellulär liegende vitale *L. major* (G). Die Pfeilspitzen deuten auf intrazellulär liegende apoptotische *L. major* (H). Pfeilspitzen deuten auf LC3B positive Kompartimente (I). Leishmanien, die in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet (H, I, J), während intrazelluläre Leishmanien, die nicht in einem LC3B positiven Kompartiment liegen, mit einem Pfeil dargestellt sind (G, J).

Lm: *L. major*; MF II: Makrophagen Typ II; Lipo: Lipobiotin; Strep: Streptavidin Alexa Fluor® (647); Rb: Rabbit; Gt: Goat; hu: human; α : anti; pAK: polyklonaler Antikörper; Maßstabsbalken: 10 μ m; 630x Vergrößerung.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* die Interaktion zwischen *Leishmania major* und humanen Makrophagen untersucht. Das Augenmerk wurde dabei auf die bei der Infektion mit *Leishmania* in Makrophagen ablaufende Autophagie gerichtet.

Dazu wurde LC3B als autophagischer Marker genutzt. Zunächst wurde die bis dato unbeleuchtete Kinetik der *Leishmania*-abhängig ablaufenden Autophagie untersucht. Bereits 15 Minuten nach der Infektion mit promastigoten *L. major* war LC3B detektierbar und erreichte seine maximale Ausprägung 1 bis 3 Stunden nach Infektionsbeginn.

Promastigoten führten bei zunehmendem Anteil apoptotischer Parasiten zu gesteigertem Auftreten LC3B positiver Kompartimente. Vitale Promastigoten führten nicht zur Induktion von LC3B.

Es konnte gezeigt werden, dass Autophagie ein nur durch apoptotische Promastigoten hervorgerufenen Phänomen war, wobei medikamentös induzierte Apoptose promastigoter *L. major* zu keiner Steigerung im Auftreten von LC3B positiven Kompartimenten führte.

Versuche mit Amastigoten deuteten darauf hin, dass Autophagie Promastigoten-spezifisch ist. Um den Induktor der Autophagie zu ermitteln, wurden Versuche mit Knockouts des auf der Oberfläche von Promastigoten anwesenden Virulenzfaktors LPG durchgeführt. Auch das auf apoptotischen Promastigoten vorkommende Phosphatidylserin (PS) wurde auf die Fähigkeit zur Induktion von Autophagie untersucht. Doch keiner der beiden Oberflächenmarker LPG und PS stand in einem erkennbaren kausalen Zusammenhang mit Autophagie.

Mit der Analyse von LAMP2 auf LC3B positiven Kompartimenten wurde untersucht, ob der autophagische Pathway komplett bis zur Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom durchlaufen wird. Es wurde entdeckt, dass 3 Stunden nach der Infektion mehr als 85 % der LC3B-positiven Kompartimente mit Lysosomen fusioniert hatten (Abbildung 12).

Um die Bedeutung der Autophagie zu eruieren, wurden Makrophagen vor der Infektion mit dem PI-3 Kinase Inhibitor Wortmannin behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass Wortmannin das Auftreten von LC3B positiven Kompartimenten effektiv unterdrückte. Vergleiche von Infektionsraten von Wortmannin-präinkubierten gegenüber nicht Wortmannin-präinkubierten infizierten Makrophagen zeigten deutlich erniedrigte Infektionsraten bei Autophagie-negativen (Wortmannin-präinkubierten) Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen. Das deutete auf die wichtige, hier untersuchte Rolle der Autophagie beim Überleben von promastigoten Leishmanien in Makrophagen hin.

Durch eine neu etablierte Färbemethode mit einem Succinimidylester bzw. einer Kombination aus Lipobiotin und Streptavidin konnten apoptotische und vitale Promastigoten unterschiedlich gelabelt werden. Infektionsversuche belegten, dass sich in den infizierten Makrophagen die apoptotischen im Gegensatz zu den vitalen Promastigoten in LC3B positiven Leishmanienkompartimenten wiederfanden.

4.1 Stellenwert der Autophagie

Lange Zeit war Autophagie in der Literatur allein mit katabolen Prozessen assoziiert. Autophagie galt als wichtig für die Degradation und das Recycling gealterter zellulärer Strukturen und damit für die zelluläre Homöostase (Levine u. Klionsky 2004).

Die Bedeutung des autophagischen Pathways in der Genese verschiedener Pathologien wie kardialer und muskulärer Erkrankungen, Neurodegeneration oder bei der Malignomentstehung wurde in den letzten 10 Jahren erforscht (Levine u. Kroemer 2008).

In der näheren Vergangenheit wurde herausgefunden, dass eine Reihe von Pathogenen mit der Autophagie der Wirtszelle in Kontakt tritt. Für manche Pathogene hat dies vernichtende Folgen, andere profitieren davon und sind auf diese Interaktion angewiesen (Colombo 2007).

Bis heute existiert nach meinem Wissen keine Literatur hinsichtlich des Verhaltens von *L. major* bzgl. Autophagie in humanen Makrophagen. Wohl aber wurde gezeigt, dass Induktion von Autophagie in murinen Makrophagen bei Infektion mit *L. amazonensis* zu höheren Infektionsraten führt (Pinheiro et al. 2009). So konnte auch in den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass promastigote *L. major* mit dem autophagischen Pathway in Makrophagen bei Infektion interagierten und von dieser Interaktion profitierten.

Auch andere Parasiten wie *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) oder *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) profitieren von der in ihren Wirtszellen ablaufenden Autophagie (Romano et al. 2009, Wang et al. 2009).

Es wäre möglich, dass es, wie von Pinheiro et al. vorgeschlagen, durch die Induktion von Autophagie in Makrophagen zu verminderter Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) kommt (Pinheiro et al. 2009). Bei fehlender iNOS Aktivierung wurden in Mäusen stark erhöhte Infektionsraten mit *L. major* beschrieben (Wei et al. 1995). Das bedeutet, dass die überlebensfördernde Wirkung der Autophagie in Makrophagen für *L. major* in der Inhibition der iNOS begründet sein könnte.

4.2 Die Kinetik der *Leishmania* induzierten Autophagie in Makrophagen

Um herauszufinden, wie sich die Kinetik der Autophagie verhält, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion von Makrophagen mit promastigoten *L. major* Autophagie anhand von LC3B detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass bereits 15 Minuten nach der Infektion LC3B nachweisbar war. Der Anteil LC3B positiver Leishmanienkompartimente stieg im zeitlichen Verlauf an und erreichte 1 bis 3 Stunden nach Beginn der Infektion sein Maximum. 24 Stunden nach Infektionsbeginn war nur noch wenig LC3B nachweisbar.

Ähnliche Beobachtungen haben Romano et al. bei *T. cruzi* infizierten CHO-Zellen gemacht: Auch sie konnten zeigen, dass 1 bis 6 Stunden nach Infektionsbeginn am meisten LC3 nachweisbar war. Des Weiteren konnten sie ebenfalls einen Abfall nach 24 bis 48 Stunden verzeichnen. Diesen Abfall erklärten sie sich anhand der Tatsache, dass *T. cruzi* sich zu Zeitpunkten früher Autophagie (1 bis 6 Stunden nach Infektionsbeginn) in parasitophoren Vakuolen befindet, diese aber nach 6 Stunden in Richtung Zytosol der Zielzelle verlässt um sich dort in Amastigoten zu differenzieren (Romano et al. 2009).

Auch promastigote *L. major* befinden sich nach Aufnahme in Makrophagen in parasitophoren Vakuolen, in denen sie sich später in Amastigoten differenzieren (Bogdan u. Röllinghoff 1998, Ritter et al. 2009).

Man könnte schlussfolgern, dass es im Rahmen der Differenzierung von promastigoten Leishmanien zu Amastigoten zum Verlust von LC3B kommt.

Eine von promastigoten *L. major* abweichende Kinetik von LC3 ist für *Legionella pneumophila* und *Coxiella burnetti* beschrieben. Bereits kurz nach Infektionsbeginn ist wie bei *L. major* LC3 detektierbar. Im Gegensatz zu dem bei *L. major* beobachteten Abfall nach 24 Stunden bleibt LC3 bei *Legionella pneumophila* und *Coxiella burnetti* auch 24 bis 48 Stunden nach Infektionsbeginn auf hohem Niveau nachweisbar. Hier besteht also ein bedeutender Unterschied zwischen *Legionella pneumophila* und *L. major*. Vitale *Legionella pneumophila* führten durch Freisetzung löslicher Faktoren zu Induktion von Autophagie in Makrophagen. Im Gegensatz zu einer Infektion von Makrophagen mit promastigoten *L. major*, wo der autophagische Pathway komplett durchlaufen wird (s.u.), führt die Infektion mit *Legionella pneumophila* zu einer Verzögerung der Fusion mit Lysosomen und damit zu einer Verzögerung der Maturation des Autophagosoms. *Legionella pneumophila* ist demzufolge nur in der Lage in unreifen Autophagosomen zu replizieren; die Fusion der *Legionella pneumophila* enthaltenden Autophagosomen mit Lysosomen führt zur Degrada-

tion von *Legionella pneumophila* (Amer u. Swanson 2005, Romano et al. 2007). Anders verhalten sich promastigote *L. major*: Hier finden sich nur apoptotische Promastigoten in LC3B positiven Kompartimenten. Die apoptotischen Promastigoten sind nicht in der Lage zu replizieren, ermöglichen aber dennoch das Überleben der vitalen Promastigoten. Es handelt sich demzufolge um eine indirekt, die Infektion fördernde, Wirkung der Autophagie in Makrophagen.

Im Gegensatz zu *L. major* und auch *T. cruzi* verändert sich also die Morphologie von *Legionella pneumophila* und *Coxiella burnetti* nicht, sondern beide replizieren ausschließlich im Autophagosom. Daraus kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass morphologische Veränderungen der Leishmanien im Rahmen der Differenzierung zu Amastigoten mit dem Abfall von LC3B in Zusammenhang stehen.

4.3 Lysosomen fusionieren mit *Leishmania*-beladenen Autophagosomen

Im weiteren Verlauf des autophagischen Pathways kommt es zur Fusion des Autophagosoms mit Endosomen und Lysosomen. Als Marker für Lysosomen gilt das sich auf der lysosomalen Membran befindliche Protein LAMP2. In dem entstehenden Autolysosom kommen es durch lysosomale Proteasen (Cathepsine) und durch eine Ansäuerung des pH-Werts zur Degradation des Inhalts (Levine u. Klionsky 2004). Anders bei mit promastigoten *L. major* infizierten Makrophagen: Die Promastigoten verändern im sauren Milieu ihre Gestalt und wandeln sich in Amastigoten um (Bogdan u. Röllinghoff 1998).

In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass bereits 1 Stunde nach Beginn der Infektion mit promastigoten *L. major* 25 % der Makrophagen LAMP2 positive Kompartimente auswiesen. Im weiteren Verlauf zeigten 3 Stunden nach Infektionsbeginn mehr als 50 % der Makrophagen LAMP2 positive Kompartimente. 24 Stunden nach Infektionsbeginn war der Anteil auf unter 20 % abgesunken. Dies zeigte, dass es nach einer Infektion mit promastigoten *L. major* zur Rekrutierung von Lysosomen kommt.

Die Ergebnisse ergaben darüber hinaus, dass bereits 1 Stunde nach Infektionsbeginn mehr als 30 % der LC3B positiven Kompartimente LAMP2 positiv waren. Im Verlauf stieg dieser Anteil weiter an und lag 3 Stunden nach Infektionsbeginn bei über 80 %. Nach 24 Stunden waren keine doppelt positiven Kompartimente mehr detektierbar. Das bedeutet, dass mit leichter zeitlicher Verzögerung zum Auftreten von LC3B die autophagischen Kompartimente mit Lysosomen fusionieren und so den autophagischen Pathway bis zum Ende durchlaufen.

Das deckt sich mit den Ergebnissen von Courret et al., die zeigen, dass der Anteil LAMP positiver, leishmanienhaltiger Kompartimente nach Infektion von murinen Makrophagen rasch ansteigt. Der Anstieg vollzog sich aber rascher und LAMP persistierte länger als bei den von mir durchgeführten Experimenten (Courret et al. 2002).

Auch bei *T. cruzi* ist beschrieben, dass LAMP eine ähnliche Kinetik wie LC3 aufweist, was die Autoren als transiente Interaktion des Parasiten mit der Autophagie der Wirtszelle deuten (Romano et al. 2009).

4.4 Nur apoptotische Promastigoten liegen in LC3B positiven Kompartimenten

Aus der Literatur ist bekannt, dass es bei *Leishmania* im Verlauf der Metazyklogenese zur Apoptose kommt. Als Zeichen der Apoptose gilt das auf der äußeren Membran apoptotischer Zellen exprimierte Phosphatidylserin (PS). Zum Zeitpunkt der höchsten Virulenz sind 50 % der infizierenden Promastigoten apoptotisch, 50 % sind vital (van Zandbergen et al. 2006). Auf Grund des „eat me signals“ PS ist die Aufnahme der Parasiten in Phagozyten erleichtert (Fadok et al. 1998).

Van Zandbergen et al. haben herausgefunden, dass PS positive apoptotische promastigote *L. major* zur Etablierung einer Infektion essentiell sind. Nach Depletion der apoptotischen Promastigoten sind die verbliebenen vitalen Promastigoten nicht mehr in der Lage in Phagozyten zu überleben und verlieren ihre Virulenz. Apoptotische Promastigoten helfen damit vitalen Promastigoten in altruistischer Weise in der Wirtszelle zu überleben (van Zandbergen et al. 2006).

In den durchgeführten Experimenten wurde entdeckt, dass es bei der Infektion von Makrophagen mit promastigoten *L. major* unterschiedlichen Alters zu unterschiedlich hohen Raten LC3B positiver Leishmanienkompartimente kam. Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter der Promastigoten im Verlauf der Metazyklogenese der Anteil apoptotischer Parasiten am Gesamtkollektiv zunimmt und gleichzeitig die Virulenz proportional zum Anteil der metazyklischen Promastigoten steigt (Da Silva u. Sacks 1987, van Zandbergen et al. 2006).

Die Experimente zeigten, dass mit zunehmendem Alter der infizierenden Promastigoten der Anteil LC3B positiver Leishmanienkompartimente zunahm. Anhand durchflusszytometrischer Analysen war der Anteil apoptotischer Promastigoten vor der Infektion ermittelt worden. Es ergab sich, dass eine strikte Korrelation zwischen der Apoptoserate des infizie-

renden Promastigotenkollektivs und dem Auftreten LC3B positiver Kompartimente bestand. Aus den Daten konnte geschlussfolgert werden, dass apoptotische Promastigoten für das Auftreten von Autophagie eine Rolle spielen. Versuche mit durch MACS in vital und apoptotisch separierten metazyklischen Promastigoten bestätigten die Beobachtung des Vorversuchs. Es konnte daraus abgeleitet werden, dass apoptotische Promastigoten in der Lage waren, in humanen Makrophagen Autophagie zu induzieren. Vitale Promastigoten dagegen waren nicht in der Lage, Autophagie zu induzieren.

Es kann eine Verbindung zu der oben beschriebenen Tatsache hergestellt werden, dass apoptotische Promastigoten vitalen Promastigoten helfen, Makrophagen effizient zu infizieren. Dabei ist es neben den Immunsystem-bremsenden Effekten durch Herunterregulation der Bildung von Stickoxiden in Makrophagen durch apoptotische Leishmanien möglich, dass der Autophagie eine wichtige Rolle zukommt (van Zandbergen et al. 2006, Wandlerley et al. 2009).

Um zu belegen, dass apoptotische Promastigoten in autophagischen Kompartimenten zu liegen kommen, wurden metazyklische Promastigoten mittels MACS in vital und apoptotisch aufgetrennt und mit unterschiedlich fluoreszenten Farbstoffen gelabelt. Das System aus Biotin und Streptavidin ist weit verbreitet (Diamandis u. Christopoulos 1991). Das in unserem Fall genutzte Lipobiotin integriert sich mit dem Lipidanteil in der Membran vitaler Promastigoten und wurde mit Streptavidin Alexa Fluor® 647 sichtbar gemacht. Auch Succinimidyl Ester sind verbreitet zum Nachweis zellulärer Strukturen. Dabei bindet die Succinimidylgruppe an intrazelluläre Strukturen (Mintern et al. 1999, Parish 1999). Auf apoptotischen Promastigoten wurden ein mit Alexa Fluor® 350 gekoppelter Succinimidyl Ester angewandt. Nach Infektion von Makrophagen konnte gezeigt werden, dass nur farblich als apoptotisch markierte Promastigoten in LC3B positiven Kompartimenten lagen, während das für vitale Promastigoten nicht der Fall war.

Anhand der Ergebnisse konnte belegt werden, dass nur apoptotische promastigote *L. major* nach Infektion von Makrophagen in Autophagosomen zu liegen kommen. Welcher Zusammenhang mit der Tatsache besteht, dass apoptotische Promastigoten für die Etablierung einer Infektion essentiell sind, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht (van Zandbergen et al. 2006, van Zandbergen et al. 2007).

Was auf Seiten der apoptotischen Leishmanien auf den autophagischen Pathway induzierend wirkt, ist jedoch unklar. Die Autophagie-auslösenden apoptotischen promastigoten *Leishmania* Parasiten unterscheiden sich von den vitalen Promastigoten durch DNA-

Fragmentierung und morphologische Veränderungen, hauptsächlich aber durch die Exposition von PS auf der Zelloberfläche (van Zandbergen et al. 2006).

Es ist naheliegend, dass PS als für die Makrophagen gut zugängliches Signal Autophagie-induzierend wirkt. Dies wurde im weiteren Verlauf untersucht. Aus der Literatur ist bisher nichts Vergleichbares bekannt.

4.5 Miltefosin-induzierte Apoptose promastigoter Leishmanien hat keinen Einfluss auf das Auftreten von Autophagie

Aus Vorversuchen wurde abgeleitet, dass apoptotische promastigote *L. major* in der Lage sind, Autophagie zu induzieren. Im Rahmen der Metazyklogenese wird ein Teil der Promastigotenpopulation apoptotisch und die Population erreicht die höchste Virulenz zu dem Zeitpunkt, an dem 50 % apoptotisch sind (van Zandbergen et al. 2006). Zeichen des ablaufenden programmierten Zelltodes sind eine erhöhte Permeabilität der Plasmamembran, die Fragmentierung des Zellkerns und neben weiteren charakteristischen Merkmalen die Translokation von PS auf die Außenseite der Zellmembran (Lee et al. 2002, Jimenez-Ruiz et al. 2010).

Um diesen natürlich ablaufenden Prozess der PS-Externalisierung zu simulieren, wurden Promastigoten einer 7 Tage alten Kultur mit 25 μ M Miltefosin bzw. 15 μ M Staurosporin für 8 Stunden inkubiert. Für beide Agenzien ist antileishmaniöses Potential nachgewiesen (Kuhlencord et al. 1992, Arnoult et al. 2002). Nach Behandlung mit Miltefosin stieg die mittels Annexin V FLUOS nachgewiesene Apoptoserate von 53 % auf 81 % an. Dagegen stieg nach Staurosporin-Behandlung die Apoptoserate lediglich auf 65 %. Auf Grund des deutlicheren Unterschiedes wurden nur Miltefosin-behandelte Promastigoten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Promastigoten und mit Miltefosin behandelten Promastigoten bzgl. des Auftretens von LC3B in Makrophagen bestand.

Miltefosin induzierte eine deutlich erhöhte Apoptoserate, was anhand von PS auf der äußeren Membran der apoptotischen Promastigoten gemessen werden konnte. Der Apoptose-fördernde Effekt von Miltefosin und eine daraus resultierende Erhöhung des PS-Gehalts ist auch in der Literatur vorbeschrieben (Khademvatan et al. 2011).

Daraus konnte abgeleitet werden, dass trotz der Tatsache, dass es durch Behandlung mit Miltefosin zur Erhöhung der Apoptoserate kam, dies keine Auswirkungen auf das Auftreten von LC3B hatte.

Es kann gefolgert werden, dass Miltefosin zwar eine erhöhte Apoptoserate induzierte und damit den Gehalt PS-positiver promastigoter *L. major* erhöhte, dass diese Erhöhung aber nicht zum vermehrten Auftreten LC3B positiver Leishmanienkompartimente führte. Dies bedeutet, dass PS nicht der Auslöser des autophagischen Pathways in Makrophagen sein kann. Der Faktor, der zum Auftreten von Autophagie führt, muss die Behandlung mit Miltefosin in unveränderter Weise überstanden haben und von PS unabhängig sein. Im nachfolgenden Abschnitt werden Ergebnisse eines Versuches diskutiert, der diese Behauptung belegen soll.

4.6 Phosphatidylserin wirkt nicht Autophagie induzierend

Als wichtigster Marker der Apoptose dient das sich auf der Außenseite der Zellmembran apoptotischer Zellen befindliche PS. Wie bei anderen Eukaryoten kommt es auch bei promastigoten *L. major* im Rahmen des programmierten Zelltodes zur Externalisierung des normalerweise auf der Innenseite der Plasmamembran gelegenen PS auf die Außenseite (Martin et al. 1995, van Zandbergen et al. 2006).

Das Vorhandensein PS positiver apoptotischer promastigoter *L. major* ist für die Infektion von Phagozyten von großer Bedeutung. Nach Depletion der apoptotischen Promastigoten sind die verbleibenden vitalen Promastigoten nicht mehr in der Lage, effektiv eine Infektion zu etablieren (van Zandbergen et al. 2006).

Aus der Literatur ist bekannt, dass promastigote *L. major* in der Lage sind, die PI-3 Kinase, die unter anderem als Initiatorenzym des autophagischen Pathways fungiert, zu induzieren (Ruhland et al. 2007). Aus Vorversuchen konnte abgeleitet werden, dass apoptotische Promastigoten den autophagischen Pathway induzieren. Es wurde entdeckt, dass Miltefosin-induzierte Apoptose nicht zu einer Steigerung des Auftretens LC3B positiver Leishmanienkompartimente führte. Zur weiteren Verifizierung der Hypothese, dass PS doch nicht der Induktor der Autophagie ist, wurde PS mit Annexin A5 blockiert. Dieses Verfahren ist in der Literatur als Methode bereits vorbeschrieben (Yang et al. 2010). Die Ergebnisse aus den erhobenen Daten zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied im Auftreten von LC3B positiven Leishmanienkompartimenten vor und nach Behandlung der infizierenden promastigoten Leishmanien mit Annexin A5. Hintergedanke war, durch die Maskierung des PS apoptotischer Promastigoten mit Annexin A5 eine Population scheinbar rein „vitaler“ Promastigoten zu simulieren. Wäre PS der Induktor der Autophagie in Makrophagen gewesen, so hätte nach Behandlung mit Annexin A5 kein LC3B mehr detektierbar sein

dürfen. Die Ergebnisse belegten jedoch, dass PS nicht Induktor der Autophagie sein kann. Möglich wäre aber auch ein Versagen in der Behandlung der apoptotischen Promastigoten mit Annexin dahingehend, dass Annexin A5 nicht oder nur unzureichend an PS gebunden hat, was aber vor dem Hintergrund, dass Färbungen mit Annexin V FLUOS für durchflusszytometrische Analysen nach demselben Schema erfolgreich durchgeführt worden waren, unwahrscheinlich erscheint.

Nimmt man die Ergebnisse, dass Miltefosin-induzierte Apoptose nicht zu einer Steigerung des Anteils LC3B positiver Kompartimente führte und dass die Blockade von PS mit Annexin A5 keine Auswirkungen auf die Autophagie hatte, zusammen, kann mit großer Wahrscheinlichkeit gesagt werden, dass die Induktion des autophagischen Pathways PS-unabhängig verläuft.

4.7 Amastigote *L. major* induzieren keine Autophagie

Im Rahmen der Infektion von Makrophagen kommt es zur Umwandlung der metazyklischen Promastigoten in Amastigoten. Diese unterscheiden sich morphologisch von den Promastigoten durch ihre verminderte Größe, das Fehlen des Flagellums und die eher kugelförmige Gestalt (Bogdan u. Röllinghoff 1998, Ritter et al. 2009). Im Rahmen dieser Transformation kommt es in den Parasiten zu Autophagie (Besteiro et al. 2006). Es ist beschrieben, dass axenische Amastigoten im Vergleich zu Promastigoten eine höhere Infektiosität bzgl. Makrophagen aufweisen. Dies ist sowohl für *L. donovani* als auch im Labor von PD Dr. van Zandbergen für *L. major* nachgewiesen worden (Debrabant et al. 2004).

Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass Amastigoten nicht Autophagie-induzierend wirken. Vor dem Hintergrund, dass apoptotische Promastigoten LC3B hervorrufen, wurde geprüft, ob dieser Zusammenhang auch für apoptotische Amastigoten besteht. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass PS-Exposition und Auftreten von LC3B nicht korrelieren, Amastigoten also 3 Stunden nach Infektionsbeginn keine Autophagie induzierten. Amastigoten exprimieren konstant PS auf ihrer Zellaußenseite und imitieren so Apoptose. In der Literatur wird dies als „apoptotic mimicry“ bezeichnet. Sie dient dazu, die Immunreaktion der infizierten Zelle zu bremsen (Wanderley et al. 2005).

Die Tatsache, dass Amastigoten trotz PS-Exposition keine Autophagie induzierten, belegt oben aufgestellte Behauptung, dass die Autophagieinduktion PS-unabhängig verläuft. Die Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass die Induktion von Autophagie durch promastigote *L. major* für das Überleben der Parasiten bei Infektion wichtig ist. Aus

den Promastigoten entwickeln sich in parasitophoren Vakuolen Amastigoten, die an das saure Milieu dieser Vakuolen angepasst sind (Zilberstein u. Shapira 1994, Bogdan u. Röllinghoff 1998).

Es wäre denkbar, dass die durch promastigote *L. major* induzierte Autophagie die Bedingung in Form angesäuerter parasitophorer Vakuolen schafft, in denen die Amastigoten dann proliferieren und die Infektion etablieren können.

4.8 Promastigote *L. major* induzieren Autophagie in Makrophagen LPG-unabhängig

Nachdem PS auf Seiten der Leishmanien als möglicher Induktor der Autophagie ausgeschlossen worden war, rückte der Fokus auf andere Oberflächenmerkmale. Promastigote *L. major* exprimieren als Bestandteile der Oberfläche-bedeckenden Glykokalix neben der Protease Glykoprotein 63 (gp63) und weiteren Molekülen Lipophosphoglykan (LPG) (Turco u. Descoteaux 1992, Turco 1988).

Aus den erhobenen Daten ging hervor, dass mit zunehmendem Alter der Parasiten der Anteil LC3B positiver Leishmanienkompartimente zunahm. In der Literatur ist beschrieben, dass LPG im Rahmen der Metazyklogenese der Promastigoten molekular differenziert wird und danach elongiert vorliegt (Sacks et al. 1995). Zudem konnte bei den durchgeführten Versuchen beobachtet werden, dass Amastigoten keine Autophagie induzieren. Für Amastigoten gilt, dass sie im Vergleich zu Promastigoten wesentlich weniger LPG exprimieren (Schneider et al. 1993). Die hier geschilderten Ergebnisse führten im Zusammenhang mit der zitierten Literatur zu der Hypothese, dass LPG möglicher Induktor der Autophagie sein könnte.

Die Infektion von Makrophagen mit LPG-defizienten metazyklischen Promastigoten zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu LPG-positiven Promastigoten unter sonst gleichen Bedingungen. Sowohl 1 als auch 3 Stunden nach Beginn der Infektion war der Anteil LC3B positiver Leishmanienkompartimente bei LPG-positiven und LPG-defizienten Leishmanien auf vergleichbarem Niveau. Das bedeutet, dass der autophagische Pathway LPG-unabhängig induziert wird.

Für *L. major* ist im Falle eines LPG-Knockouts eine verminderte Virulenz beschrieben (Späth et al. 2000, Kleczka et al. 2007). Die Virulenzminderung ist demzufolge nicht in der An- oder Abwesenheit von Autophagie in Makrophagen begründet, sondern hat andere Ursachen.

Es kann festgehalten werden, dass apoptotische Promastigoten Autophagie in Makrophagen induzieren und dass diese Induktion sowohl PS- als auch LPG-unabhängig von staten geht. Demzufolge kann über den Induktor der Autophagie nur spekuliert werden. Es ist bekannt, dass die Fusion von Endosomen und Autophagosomen calciumabhängig abläuft (Fader et al. 2008). Nachdem *Leishmania* an Makrophagen gebunden haben, kommt es durch die Bindung der auf der Leishmanienoberfläche exprimierten Protease gp63 an den Protease activated Rezeptor 1 (PAR 1) zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Makrophagen (Rana et al. 2011).

Auch nach Infektion von Makrophagen mit *T. cruzi* kommt es zu erhöhten zytoplasmatischen Calciumkonzentrationen in der Wirtszelle (Yoshida 2006). Wie auch für *T. cruzi* diskutiert, wäre es möglich, dass bei Infektion von Makrophagen mit *Leishmania* eine erhöhte zytoplasmatische Calciumkonzentration Induktor der Autophagie ist (Romano et al. 2009).

Die Frage nach dem Nutzen der Autophagie in Makrophagen für Leishmanien gilt es aber noch zu klären.

4.9 Autophagie in Makrophagen ist essentiell für das Überleben promastigoter Leishmanien

Nachdem die Kinetik der Autophagie sowie das unterschiedliche Verhalten von pro- und amastigoten *L. major* bzgl. Autophagie untersucht worden war, sowie PS und LPG als Induktoren des autophagischen Pathways ausgeschlossen worden waren, wurde die Frage nach dem Nutzen der Autophagie für promastigote *L. major* untersucht.

Um dies zu klären, wurde der autophagische Pathway medikamentös auf Höhe des Initiatorzyms, der PI-3 Kinase, blockiert. Dafür sind 3-Methyladenin, LY294002 und Wortmannin als Inhibitoren vorbeschrieben (Blommaart et al. 1997). Für *L. donovani* infizierte Dendritische Zellen und *L. amazonensis* infizierte murine Makrophagen ist Wortmannin als Inhibitor der PI-3 Kinase in den jeweiligen Zielzellen beschrieben (Pinheiro et al. 2009, Neves et al. 2010).

Aus den durchgeführten Experimenten konnte abgeleitet werden, dass die Präinkubation von Makrophagen mit Wortmannin zu einer signifikanten Reduktion im Auftreten von LC3B positiver Leishmanienkompartimente führte. Das bedeutet, dass Wortmannin als Inhibitor der PI-3 Kinase und damit der Leishmanien-induzierten Autophagie in Makrophagen geeignet war, um den Einfluss von Autophagie auf das Überleben der infi-

zierenden Promastigoten zu untersuchen. Es konnte demzufolge in Übereinstimmung mit bestehender Literatur ein Autophagie-inhibierender Effekt von Wortmannin in humanen Makrophagen nachgewiesen werden (Blommaart et al. 1997, Pinheiro et al. 2009, Neves et al. 2010).

Auf dieser Erkenntnis aufbauend, wurde die Bedeutung der bei Infektion mit apoptotischen Promastigoten in Makrophagen induzierten Autophagie untersucht.

In der Regel spielt Autophagie eine wichtige Rolle bei der Elimination intrazellulärer Pathogene wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* oder *Streptokokkus pyogenes* (Armstrong u. D'Arcy Hart 1971, Gutierrez et al. 2004, Kirkegaard et al. 2004, Nakagawa et al. 2004, Yoshimori 2006, Deretic et al. 2009). Andere Pathogene wie *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri* entkommen der Autophagie während eine dritte Gruppe, zu der u.a. *Toxoplasma gondii* und *Trypanosoma brucei* zählen, auf Autophagie in der Wirtszelle angewiesen ist um zu replizieren (Ogawa et al. 2005, Ogawa 2006, Birmingham et al. 2007, Birmingham et al. 2008). Auch *Leishmania* gehört zu dieser dritten Gruppe (Pinheiro et al. 2009, Neves et al. 2010).

Aus den erhobenen Daten ging hervor, dass der Anteil Leishmanien-infizierter Makrophagen bei Wortmannin-präinkubierten Makrophagen im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach Infektionsbeginn signifikant geringer war als bei nicht Wortmannin-vorbehandelten infizierten Makrophagen. Daraus wurde abgeleitet, dass die Präinkubation von Makrophagen mit Wortmannin Einfluss auf die Infektion und das Überleben von promastigoten Leishmanien in Makrophagen hatte. Zuvor konnte gezeigt werden, dass der Anteil LC3B positiver Leishmanienkompartimente nach Präinkubation der Makrophagen mit Wortmannin signifikant geringer war.

Wenn man beide Ergebnisse verknüpft, kann man daraus folgern, dass durch die Inhibition des autophagischen Pathways mit Wortmannin die Infektionsrate verringert war. Das deckt sich mit den Ergebnissen von Pinheiro et al., die besagen, dass mit promastigoten *L. amazonensis* infizierte murine Makrophagen auf Autophagieinduktion mit erhöhten Infektionsraten reagieren. Nach Präinkubation der Makrophagen mit Wortmannin fiel die Infektionsrate wie in den von mir durchgeführten Experimenten geringer aus (Pinheiro et al. 2009). Für mit *L. donovani* infizierte Dendritische Zellen ist ähnliches beschrieben: Auch hier führt die Präinkubation der Dendritischen Zellen mit Wortmannin zu erniedrigten Infektionsraten (Neves et al. 2010).

Van Zandbergen et al. haben gezeigt, dass für die erfolgreiche Etablierung einer Infektion mit promastigoten *L. major* apoptotische Promastigoten notwendig sind (van Zandbergen

et al. 2006). In den durchgeführten Experimenten konnte ich zeigen, dass nur eben diese apoptotischen Promastigoten in Autophagosomen zu liegen kommen und dass nur in Gegenwart von Autophagie das Überleben der infizierenden Population möglich ist.

Nimmt man die erhobenen Daten und die bestehende Literatur zusammen, bedeutet dies, dass promastigote Leishmanien bei der Infektion von Makrophagen auf Autophagie angewiesen sind um zu überleben. Da es in Hungersituationen zum vermehrten Auftreten von Autophagie kommt, würde dies zu höheren Infektionsraten und schwereren Infektionsverläufen führen.

5 Zusammenfassung

Bei *Leishmania major* (*L. major*) handelt es sich um obligat intrazelluläre Parasiten deren Virulenz abhängig ist von der Präsenz apoptotischer Promastigoten im infizierenden Inokulum. Humane Makrophagen können sowohl Promastigoten als auch Amastigoten im Rahmen einer Infektion aufnehmen. Apoptotische Promastigoten führen auf Grund des auf ihrer Oberfläche exprimierten Phosphatidylserins zu einer antiinflammatorischen Immunantwort in Form einer erhöhten Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Produktion. Dies ermöglicht das intrazelluläre Überleben und die Replikation der infizierenden vitalen Promastigoten.

Für *L. amazonensis* und *L. donovani* ist darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen der in der Wirtszelle ablaufenden Autophagie und der Infektionsrate beschrieben.

Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass ein Zusammenhang zwischen Autophagie und dem altruistischen Verhalten apoptotischer Parasiten besteht, vitalen Promastigoten dabei zu helfen, in Makrophagen zu überleben.

Den Fokus auf die, die Infektion triggernden, apoptotischen Promastigoten gerichtet, konnte gezeigt werden, dass diese in ein Kompartiment eintraten, das positiv ist für den autophagischen Marker LC3B (Leichte Kette 3, Isoform B, des Mikrotubuli assoziierten Proteins 1). Es wurde entdeckt, dass das Auftreten LC3B positiver Kompartimente mit dem Anteil apoptotischer Promastigoten im infizierenden Inokulum korreliert. Analysen der Kinetik der beobachteten Autophagie ergaben, dass LC3B positive Kompartimente nach 15 Minuten sichtbar waren, im Zeitraum von 1 Stunde bis 3 Stunden nach Infektionsbeginn die maximale Ausprägung erreichten und nach 24 Stunden nahezu vollständig verschwunden waren. Dass der autophagische Pathway vollständig bis zur Fusion des Autophagosoms mit Lysosomen durchlaufen wird, konnte anhand des auf Lysosomen vorkommenden Lysosomalen Membranproteins 2 (LAMP2) gezeigt werden.

Vitale Promastigoten hingegen waren wie Amastigoten nicht in der Lage, LC3B positive Kompartimente zu induzieren.

Die medikamentöse Induktion von Apoptose führte nicht zu verstärktem Auftreten LC3B positiver Kompartimente. Das und die Tatsache, dass die Maskierung des auf apoptotischen Promastigoten vorkommenden Phosphatidylserins keinen Effekt auf die Induktion von Autophagie hatte, zeigten, dass Autophagie Phosphatidylserin-unabhängig induziert wird. Auch Lipophosphoglykan (LPG), Hauptvirulenzfaktor promastigoter *L. major*, erwies sich nicht als Induktor der Autophagie.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass nach Blockade von Autophagie mit Wortmannin deutlich weniger LC3B detektiert werden konnte und dass das intrazelluläre Überleben der Parasiten deutlich beeinträchtigt war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Arbeit sich der Rolle der im Rahmen einer Leishmanieninfektion in der Wirtszelle ablaufenden Autophagie widmet. Es konnte gezeigt werden, dass es nur in Gegenwart apoptotischer Promastigoten zur Induktion von Autophagie kommt. Weiterhin ergaben sich Hinweise darauf, dass ohne die bei der Infektion ablaufende Autophagie Promastigoten intrazellulär schlecht überleben. Das heißt, dass Autophagie eine wichtige Rolle beim intrazellulären Überleben promastigoter Leishmanien bei der Infektion von Makrophagen spielt.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo J J, Turk B:** Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of biological chemistry 283: 3454-3464 (2008) (a)
- 2 **Alvarez, V E, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo, J J, Turk B:** Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: A possible new strategy for fighting parasitic infections? Autophagy 4: 361-363 (2008) (b)
- 3 **Alves C R, Corte-Real S, Bourguignon S C, Chaves C S, Saraiva E M B:** *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. Experimental Parasitology 109: 38-48 (2005)
- 4 **Amer A O, Swanson M S:** Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. Cellular microbiology 7: 765-778 (2005)
- 5 **Armstrong J A, D'Arcy Hart P:** Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. The Journal of Experimental Medicine 134: 713-740 (1971)
- 6 **Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit P X, Estaquier J, Ameisen J C:** 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)
- 7 **Axe E L, Walker S A, Manifava M, Chandra P, Roderick H L, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis N T:** Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. The Journal of cell biology 182: 685-701 (2008)
- 8 **Bates P A:** Housekeeping by *Leishmania*. Trends in parasitology 266: 447-448 (2006)

- 9 **Berman J D:** Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical infectious diseases* 24: 684-703 (1997)
- 10 **Besteiro S, Williams R A M, 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)
- 11 **Beverley S M, Turco S J:** Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends in microbiology* 6: 35-40 (1998)
- 12 **Birmingham C L, Canadien V, Gouin E, Troy E B, Yoshimori T, Cossart P, Higgins D E, Brumell J H:** *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy* 3: 442-451 (2007)
- 13 **Birmingham C L, Higgins D E, Brumell J H:** Avoiding death by autophagy: interactions of *Listeria monocytogenes* with the macrophage autophagy system. *Autophagy* 4: 368-371 (2008)
- 14 **Blommaart E F, Krause U, Schellens J P, Vreeling-Sindelárová H, Meijer A J:** The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European journal of biochemistry* 243: 240-246 (1997)
- 15 **Bogdan C, Röllinghoff M:** The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology* 28: 121-134 (1998)
- 16 **Bourreau E, Gardon J, Pradinaud R:** Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1. *Infection and immunity* 71: 2244-2246 (2003)

- 17 **Brittingham A, Morrison C J, McMaster W R, McGwire B S, Chang K P, Mosser D M:** Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of immunology* 155: 3102-3111 (1995)
- 18 **Bryant P, Ploegh H:** Class II MHC peptide loading by the professionals. *Current Opinion in Immunology* 16: 96-102 (2004)
- 19 **Carrera L, Gazzinelli R T, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks D L:** *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *The Journal of experimental medicine* 183: 515-526 (1996)
- 20 **Cassol E, Cassetta L, Alfano M, Poli G:** Macrophage polarization and HIV-1 infection. *Journal of leukocyte biology* 87: 599-608 (2010)
- 21 **Colombo M I:** Autophagy: a pathogen driven process. *IUBMB life* 59: 238-242 (2007)
- 22 **Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, Antoine J C:** Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of cell science* 115: 2303-2316 (2002)
- 23 **Cresswell P, Ackerman A L, Giodini A, Peaper D R, Wearsch P A:** Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunological reviews* 207: 145-157 (2005)
- 24 **Cuervo A M, Dice J F:** A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273: 501-503 (1996)
- 25 **Debrabant A, Joshi M B, Pimenta P F, Dwyer D M:** Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *International journal for parasitology* 34: 205-217 (2004)

- 26 **Deretic V, Delgado M, Vergne I, Master S, Haro S D:** Autophagy in Infection and Immunity Against *Mycobacterium tuberculosis*: a Model System to Dissect Immunological Roles of Autophagy. *Curr Top Microbial Immunol* 335: 169-188 (2009)
- 27 **Diamandis E P, Christopoulos T K:** The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical chemistry* 37: 625-636 (1991)
- 28 **Dice J F:** Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy* 3: 295-299 (2007)
- 29 **Dorn B R, Dunn W A J, Progulske-Fox A:** Microreview Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cellular Microbiology* 4: 1-10 (2002)
- 30 **Dunn W A J:** Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *The Journal of cell biology* 110: 1935-1945 (1990)
- 31 **Elmore S:** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathology* 35: 495–516 (2007)
- 32 **Fader C M, Sánchez D, Furlán M, Colombo M I:** Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* 9: 230-250 (2008)
- 33 **Fadok V A, Bratton D L, Frasch S C, Warner M L, Henson P M:** The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation* 5: 551-562 (1998)
- 34 **Giannini M S:** Effects of Promastigote Growth Phase, Frequency of Subculture, and Host Age on Promastigote-initiated Infections with *Leishmania donovani* in the Golden Hamster. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 21: 521-527 (1974)
- 35 **Gutierrez M G, Master S S, Singh S B, Taylor G A, Colombo M I, Deretic V:** Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119: 753-766 (2004)

- 36 **Gutierrez M G, Vázquez C L, Munafó D B, Zoppino F C M, Berón W, Rabino-vitch M, Colombo M I:** Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cellular microbiology* 7: 981-993 (2005)
- 37 **Hailey D W, Kim P K, Satpute-Krishnan P, Rambold A S, Sougrat R, Lippin-cott-Schwartz J:** Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141: 656-667 (2010)
- 38 **Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizu-shima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y:** A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408:488-492 (2000)
- 39 **Jäckel, F:** (Med Dissertation in Vorbereitung). Med Dissertation, Universität Ulm
- 40 **Jha T K, Sundar S, Thakur C P, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Bermann J:** Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishma-niasis. *The New England Journal of Medicine* 341: 1795-1800 (1999)
- 41 **Jimenez-Ruiz A, Alzate J F, MacLeod E T, Luder C G K, Fasel N, Hurd H:** Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasites & Vectors* 3: 104 (2010)
- 42 **Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto a, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T:** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is lo-calized in autophagosome membranes after processing. *The European Molecular Biology Organization Journal* 19: 5720-5728 (2000)
- 43 **Kaczanowski S, Sajid M, Reece S E:** Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites & Vectors* 4: 44 (2011)
- 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 para-sitology* 49: 17-23 (2011)

- 45 **Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y:** The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of cell biology* 151: 263-276 (2000)
- 46 **Kirkegaard K, Taylor M P, Jackson W T:** Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nature reviews Microbiology* 2: 301-314 (2004)
- 47 **Kleczka B, Lamerz A C, Zandbergen G V, Wenzel A, Gerardy-Schahn R, Wiese M, Routier F H:** Targeted gene deletion of *Leishmania major* UDP-galactopyranose mutase leads to attenuated virulence. *The Journal of biological chemistry* 282: 10498-10505 (2007)
- 48 **Kourtis N, Tavernarakis N:** Autophagy and cell death in model organisms. *Cell death and differentiation* 16: 21-30 (2009)
- 49 **Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C:** Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 36: 1630-1634 (1992)
- 50 **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)
- 51 **Levine B:** Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120: 159-162 (2005)
- 52 **Levine B, Klionsky D J:** Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Developmental Cell* 6: 463-477 (2004)
- 53 **Levine B, Kroemer G:** Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27-42 (2008)

- 54 **Li P, Gregg J L, Wang N, Zhou D, O'Donnell P, Blum J S, Crotzer V L:** Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing. *Immunological reviews* 207: 206-217 (2005)

- 55 **Liang X H, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B:** Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 402: 672-676 (1999)

- 56 **Lindmo K, Stenmark H:** Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *Journal of cell science* 119: 605-614 (2006)

- 57 **Lohuis P J, Lipovsky M M, Hoepelman A I, Hordijk G J, Huizing E H:** *Leishmania braziliensis* presenting as a granulomatous lesion of the nasal septum mucosa. *Journal of laryngology and otology* 111: 973-975 (1997)

- 58 **Lum J J, DeBerardinis R J, Thompson C B:** Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews, Molecular cell biology* 6: 439-448 (2005)

- 59 **Machado P R, Ampuero J, Guimarães L H, Villasboas L, Rocha A T, Schriefer A, Sousa R S, Talhari A, Penna G, Carvalho E M:** Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS neglected tropical diseases* 4: e912 (2010)

- 60 **Majeski A E, Dice F J:** Mechanisms of chaperone-mediated autophagy *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2435–2444 (2004)

- 61 **Martin S J, Reutelingsperger C P M, McGahon A J, Rader J A, Schie R C A A V, 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)

- 62 **Mintern J, Li M, Davey G M, Blanas E, Kurts C, Carbone F R, Heath W R:** The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester to determine the site, duration and cell type responsible for antigen presentation in vivo. *Immunology and cell biology* 77: 539-543 (1999)
- 63 **Mitroulis I, Kourtzelis I, Papadopoulos V P, Mimidis K, Speletas M, Ritis K:** In vivo induction of the autophagic machinery in human bone marrow cells during *Leishmania donovani* complex infection. *Parasitology international* 58: 475-477 (2009)
- 64 **Mizushima N:** Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science* 116: 1679-1688 (2003)
- 65 **Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y:** A new protein conjugation system in human. *Journal of Biological Chemistry* 273: 33889-33892 (1998)
- 66 **Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T:** Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* 152: 657-668 (2001)
- 67 **Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T:** Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306: 1037-1040 (2004)
- 68 **Neves B M, Silvestre R, Resende M, Ouaisi A, Cunha J, Tavares J, Loureiro I, Santarém N, Silva A M, Lopes M C, Cruz M T, da Silva A C:** Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and impairment of nuclear factor-kappaB: molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of *Leishmania infantum*-infected dendritic cells. *The American journal of pathology* 177: 2898-2911 (2010)

- 69 **Ogawa M, Sasakawa C:** *Shigella* and autophagy. *Autophagy* 2: 171-174 (2006)
- 70 **Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C:** Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307: 727-731 (2005)
- 71 **Ohsumi Y:** Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 2: 211-216 (2001)
- 72 **Paris C, Loiseau P M, Bories C:** Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 852-859 (2004)
- 73 **Parish C R:** Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and cell biology* 77: 499-508 (1999)
- 74 **Pearson R D, Sousa A D Q:** State-of-the-art clinical article Clinical Spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 22: 1-13 (1996)
- 75 **Pimenta P F, Turco S J, McConville M J, Lawyer P G, Perkins P V, Sacks D L:** Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256: 1812-1815 (1992)
- 76 **Pinheiro R O, Nunes M P, Pinheiro C S, D'Avila H, Bozza P T, Takiya C M, Côrte-Real S, Freire-de-Lima C G, DosReis G A:** Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes and Infection* 11: 181–190 (2009)
- 77 **Puentes S M, Da Silva R P, Sacks D L, Hammer C H, Joiner K A:** Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9: *Journal of immunology* 145: 4311-4316 (1990)
- 78 **Ralton J E, Naderer T, Piraino H L, Bashtannyk T A, Callaghan J M, McConville M J:** Evidence that intracellular beta1-2 mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites. *The Journal of biological chemistry* 278: 40757-40763 (2003)

- 79 **Rana T, Misra S, Mittal M K, Farrow A L, Wilson K T, Linton M F, Fazio S, Willis I M, Chaudhuri G:** Mechanism of down-regulation of RNA polymerase III-transcribed non-coding RNA genes in macrophages by *Leishmania*. The Journal of biological chemistry 286: 6614-6626 (2011)
- 80 **Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein D C:** Plasma membrane contributes to the formation of pre- autophagosomal structures. Nat Cell Biology 12: 747-757 (2010)
- 81 **Reithinger R, Dujardin J C:** Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. Journal of clinical microbiology 45: 21-25 (2007)
- 82 **Ritter U, Frischknecht F, Zandbergen G V:** Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? Trends in parasitology 25: 505-510 (2009)
- 83 **Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O'Toole E, Winey M, Goldfarb D S:** Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology of the Cell 14: 129-141 (2003)
- 84 **Romano P S, Arboit M A, Vázquez C L, Colombo M I:** The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. Autophagy 5: 6-18 (2009)
- 85 **Romano P S, Gutierrez M G, Berón W, Rabinovitch M, Colombo M I:** The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. Cellular microbiology 9: 891-909 (2007)
- 86 **Ruhland A, Leal N, Kima P E:** *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. Cellular microbiology 9: 84-96 (2007)
- 87 **Sacks D L, Perkins P V:** Identification of an Infective Stage of *Leishmania* Promastigotes. Science 223: 1417-1419 (1984)

- 88 Sacks D L, Pimenta P F P, McConville M J, Schneider P, Turcog S J:** Stage-specific Binding of *Leishmania donovani* to the Sand Fly Vector Midgut Is Regulated by Conformational Changes in the Abundant Surface Lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine* 181: 685-697 (1995)
- 89 Sattler T, Mayer A:** Cell-free Reconstitution of Microautophagic Vacuole Invagination and Vesicle Formation. *The Journal of Cell Biology* 151: 529-538 (2000)
- 90 Schmid D, Münz C:** Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*. 27: 11-21 (2007)
- 91 Schmid D, Pypart M, Münz C:** MHC class II antigen loading compartments continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 22: 79-92 (2007)
- 92 Schneider P, Rosat J P, Ransijn A, Ferguson M A, McConville M J:** Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania major*. *The Biochemical journal* 295: 555-564 (1993)
- 93 Silva R da, Sacks D:** Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and immunity* 55: 2802-2806 (1987)
- 94 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)
- 95 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)
- 96 Stebut E V:** Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *European journal of dermatology* 17: 115-122 (2007)

- 97 **Sturgill-Koszycki S, Swanson M S:** *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *The Journal of experimental medicine* 192: 1261-1272 (2000)
- 98 **Tanida I, Sou Y S, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E:** HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *The Journal of biological chemistry* 279: 36268-36276 (2004)
- 99 **Terlecky S R, Chiang H L, Olson T S, Dice J F:** Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. *The Journal of biological chemistry* 267: 9202-9209 (1992)
- 100 **Titus R G, Ribeiro J M:** Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306-1308 (1998)
- 101 **Turco S J:** The lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Parasitology Today* 4: 255-257 (1988)
- 102 **Turco S J, Descoteaux A:** The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual review of microbiology* 46: 65-94 (1992)
- 103 **Verreck F A W, Boer T D, Langenberg D M L, Hoeve M A, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, Waal-Malefyt R A, Ottenhoff T H M:** Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4560-4565 (2004)
- 104 **Voll R E, Herrmann M, Roth E A, Stach C, Kalden J R:** Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350-351 (1997)

- 105 **Wanderley J L M, Benjamin A, Real F, Bonomo A, Moreira M E C, Barcinski M A:** Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. Brazilian journal of Medical and Biological Research 38: 807-812 (2005)
- 106 **Wanderley J L M, Silva L H P da, Deolindo P, Soong L, Borges V M, Prates D B, Souza A P A de, Barral A, Freitas Balanco J M de, Nascimento M T C do, Saraiva E M, Barcinski M A:** Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America one 4: e5733 (2009)
- 107 **Wang Y, Weiss L M, Orlofsky A:** Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii* and contributes to parasite growth. The Journal of biological chemistry. 284: 1694-1701 (2009)
- 108 **Wei X, Charles I G, Smith A, Ure J, Feng G, Huang F, Xu D, Mullers W, Moncada S, Liew F Y:** Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Nature 375: 408-411 (1995)
- 109 **WHO:** Leishmaniasis. Unter: <http://www.who.int/leishmaniasis/en>, Stand 18.06.2011 (2011)
- 110 **Williams R A, Tetley L, Mottram J C, Coombs G H:** Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. Molecular microbiology 61: 655-674 (2006)
- 111 **Wilson M E, Pearson R D:** Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Infection and immunity 56: 363-369 (1988)
- 112 **Xu W, Roos A, Schlagwein N, Woltman A M, Daha M R, Kooten C V:** IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. Blood 107: 4930-4937 (2006)

- 113 **Xu W, Schlagwein N, Roos A, Berg T K V D, Daha M R, Kooten C V:** Human peritoneal macrophages show functional characteristics of M-CSF-driven anti-inflammatory type 2 macrophages. *European journal of immunology* 37: 1594-1599 (2007)

- 114 **Yang Y, Koo S, Lin C S, Neu B:** Specific binding of red blood cells to endothelial cells is regulated by nonadsorbing macromolecules. *The Journal of biological chemistry* 285: 40489-40495 (2010)

- 115 **Yoshida N:** Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78: 87-111 (2006)

- 116 **Yoshimori T:** Autophagy vs. Group A *Streptococcus*. *Autophagy* 2: 154-155 (2006)

- 117 **Zandbergen G V, 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)

- 118 **Zandbergen G V, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T:** *Leishmania* Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Neutrophil Granulocytes. *Infection and Immunity* 70: 4177-4184 (2002)

- 119 **Zandbergen G V, 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)

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

- 121 **Zilberstein D, Shapira M:** The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annual review of microbiology* 48: 449-470 (1994)

Danksagung

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

Ich möchte mich für die Vergabe des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die vielen Anregungen und Diskussionen sowie die persönliche Unterstützung in allen Phasen der Dissertation bei Herrn PD Dr. Ger van Zandbergen bedanken.

Mein Dank gilt zudem allen Kollegen aus den wissenschaftlichen Arbeitsgruppen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, insbesondere den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe TvL, für die vielen Anregungen und die nette Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich mich für die im Rahmen des Promotionsprogrammes „Experimentelle Medizin“ erhaltene Förderung bedanken.

Darüberhinaus möchte ich meinen Eltern für die allzeit erfahrene Unterstützung und Förderung danken.

Mein abschließender Dank gebührt meiner Lebensgefährtin Tabea für die stetige moralische Unterstützung, den Austausch über inhaltliche Aspekte sowie für die unermüdliche Begleitung in allen Phasen.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.