

**Etablierung eines *in vitro* Testsystems
zur Untersuchung von Naturstoffen
auf antileishmanielle Effekte**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dominic Andreas Kram

Berlin, 2008

1. Gutachter: Herr Professor Dr. H. Kolodziej, Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

2. Gutachter: Herr Professor Dr. R. Burger, Robert Koch-Institut Berlin

Disputation am 17.12.2008

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Herbert Kolodziej

Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie
im Projekt Zelluläre Infektabwehr (P22) unter der Mitbetreuung von Herrn
Dr. A.F. Kiderlen am Robert Koch-Institut, Berlin angefertigt.

ORIGINALARBEIT

Kram D, Thäle C, Kolodziej H, Kiderlen AF. Intracellular parasite kill: Flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between antileishmanial activity and macrophage activation. *Journal of Immunological Methods*. 2008; 333: 79-88

VORTRÄGE

Kram D, Thäle C, Kiderlen AF, Kolodziej H. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Falsch-positive Ergebnisse im MTT-Assay. Doktorandentagung Nürnberg-Heroldsberg 6.-8. September 2006

Kram D, Thäle C, Kiderlen AF, Kolodziej H. Cytotoxicities of some phenolic acids as assessed in the MTT-assay – a critical evaluation. International congress and 54th annual meeting of the Society for Medical Plant Research. Young researcher symposium, Helsinki 29. August – 2. September 2006

Kram D, Thäle C, Kiderlen AF, Kolodziej H. Falsch-positive Ergebnisse im MTT-Assay bei der Bestimmung von zytotoxischen und antileishmaniellen Eigenschaften von Phenolcarbonsäuren. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Landesgruppe Berlin Brandenburg, 14. Juli 2006

POSTER

Kram D, Kiderlen AF, Kolodziej H. Flow cytometry as tool for detecting intracellular killing of GFP-transfected *Leishmania major* parasites. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Landesgruppe Berlin Brandenburg, 4. Juli 2008

Kram D, Kiderlen AF, Kolodziej H. Assessment of antileishmanial and cytotoxic activities of some phenolic acids using the MTT assay – a critical evaluation. International congress and 54th annual meeting of the Society for Medical Plant Research. Helsinki 29. August – 2. September 2006

I DANKSAGUNG

Um klar zu sehen, genügt oft genug ein Wechsel der Blickrichtung
(Antoine de Saint-Exupéry).

Für das Gelingen meiner Doktorarbeit durfte ich auf sehr wertvolle Blickrichtungen zahlreicher mir zur Seite stehender Menschen zurückgreifen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. H. Kolodziej. Seine wissenschaftliche Betreuung und seine konstruktive Kritik, besonders auch bei der Ausarbeitung des Manuskriptes, waren überaus wertvoll. Danken möchte ich auch für sein nicht selbstverständliches persönliches Engagement und die Zeit, die er mir wann immer nötig, entgegenbrachte.

Ganz herzlich danke ich auch Herrn Dr. A. F. Kiderlen, der mir in seiner Arbeitsgruppe und in seinem Labor im Robert Koch-Institut ein wissenschaftliches Zuhause gab. Er nahm mich bei zellbiologischen Fragen an die Hand und gab mir wichtige Impulse an bedeutenden Punkten dieser Arbeit. Seine breite Unterstützung und seine Offenheit halfen mir, wissenschaftliches Arbeiten zu lernen.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Professor Dr. R. Burger für die Möglichkeit, als Hospitant die exzellenten Forschungsbedingungen im Robert Koch-Institut im Projekt Zelluläre Infektabwehr (P22) nutzen zu dürfen.

Herrn Dr. C. Thäle danke ich für seine freundschaftliche und professionelle Unterstützung bei der Lösung vieler laborspezifischer Probleme und die zahlreichen gemeinsamen, diskussionsreichen Stunden im Büro.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Ulrike Laube für ihre hervorragende Hilfe beim Anfertigen immunohistochemischer Färbungen und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen, sowie für ihre freundschaftliche Verbundenheit, besonders in privat turbulenten Zeiten.

Frau Petra Matzk danke ich für die Hilfestellungen im Tierbereich und ihre Gesellschaft beim „Energietanken“.

Für die freundschaftliche Unterstützung und Einweisung bei verschiedensten Laborarbeiten danke ich sehr herzlich Frau Elke Radam.

Danken möchte ich auch meinen Mitstreitern Frau Aneta Janecki, Frau Nicole Schünemann und Herrn Ahmad Ali für ihr kollegiales und freundschaftliches Verhalten, woraus ein außergewöhnlich harmonisches Arbeitsklima resultierte.

Der Arbeitsgruppe der klinischen Pharmazie danke ich für die unkomplizierte, nette Atmosphäre, was die Seminar-Arbeit zu einer willkommenen Bereicherung der Promotion werden ließ.

Meinen lieben Berliner Freunden danke ich für die erforderliche musikalische und künstlerische Abwechslung, die eine für mich unerschöpfliche Energiequelle darstellt.

Meinen längstjährigen Freunden Tom, Basti und Wolfgang danke ich, dass auch bei knapper Zeit ein ständiger menschlich sehr wertvoller Austausch bestanden hat.

Nicht zuletzt, sondern ganz besonders danke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern Bernadette, Katharina und Bernhard Kram, die in meinem Leben schon immer der sichere Trumpf in der Hinterhand sind.

II INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. EINLEITUNG	1
1.1. Infektionskrankheiten – Geißel der Menschheit	2
1.2. Leishmanien	4
1.3. Leishmaniosen und ihre Verbreitungsgebiete	6
1.4. Leishmaniosen	7
1.4.1. Viszerale Leishmaniose	7
1.4.2. Kutane Leishmaniose	8
1.4.3. Mukokutane Leishmaniose	9
1.5. Leishmanien-Arten, Krankheitsbilder und Chemotherapie	9
1.6. Naturstoffe als potentiell antileishmanielle Wirkstoffe	13
1.7. Mausmakrophagen-Leishmanien-Infektionsmodell	14
1.8. Tiermodell der kutanen Leishmaniose	16
1.9. Zielsetzung	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. Geräte	20
2.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Testsubstanzen	20
2.2.1. Test- und Referenzsubstanzen	21
2.3. Tiere, Zellen und Kulturmedien	21
2.3.1. C57BL/6 Wildtyp Mäuse und Balb/c Mäuse	21
2.3.2. Chinchilla Kaninchen	22
2.3.3. RAW 264.7-Zellen	22
2.3.4. L929(CSF)-Zellen	23
2.3.5. Aus Knochenmark differenzierte Makrophagen (BMM Φ)	23
2.3.6. Leishmanien	24
2.4. Wasser (H ₂ O)	25
2.5. <i>Phosphat Buffered Saline</i> (PBS)	25

2.6.	Auftauen von in Stickstoff kryokonservierten Zellen	25
2.7.	Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff	26
2.8.	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	27
2.9.	Infektion von Makrophagen mit Leishmanien im promastigoten Stadium	28
2.10.	MTT-Assay	28
2.10.1.	Bestimmung der Vitalität von RAW 264.7-Zellen und BMM Φ	28
2.10.2.	Geneticin-Empfindlichkeit von promastigoten Leishmanien	30
2.10.3.	Abhängigkeit des MTT-Umsatzes von der Anzahl vitaler Leishmanien	30
2.10.4.	Zytotoxische Effekten auf Leishmanien im amastigoten Stadium	30
2.11.	Durchflusszytometrie (FACS)	31
2.11.1.	Lebend- und tot- Diskriminierung von RAW 264.7-Zellen und BMM Φ	32
2.11.2.	Bestimmung der Vitalität von Leishmanien im promastigoten Stadium	32
2.11.3.	Bestimmung von <i>Leishmania major</i> GFP infizierten Makrophagen	33
2.12.	Bestimmung der Nitritkonzentration mittels Griess-Assay	34
2.13.	Hemmung der NO-Synthase mit L-NMMA	34
2.14.	Gewinnung von Antiserum	35
2.14.1.	Bestimmung des Proteingehaltes von <i>Leishmania major</i>	35
2.14.2.	Herstellung von Adjuvans-Antigen-Suspension	36
2.14.3.	Immunisierung eines Chinchilla Kaninchens	36
2.14.4.	Gewinnung von Serum aus Vollblut	36
2.15.	Infektion von BALB/c Mäusen mit <i>Leishmania major</i> Wildstamm	37
2.16.	Histologische/ zytologische Arbeitsmethoden	37
2.16.1.	Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd	37
2.16.2.	Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin	37
2.16.3.	Herstellen von Zytospin-Präparaten	38
2.16.4.	Färben von Zytospin-Präparaten	38
2.16.4.1.	Diff-Quik® Färbung	38
2.16.4.2.	Bisbenzimid-Färbung	39
2.16.4.3.	Färbung von promastigoten Leishmanien mit Kaninchen-Antiserum	39
2.16.4.4.	Intrazellulärer Nachweis von Leishmanien durch Färbung mit Kaninchen-Antiserum	40
2.16.5.	Herstellung von Paraffinschnitten	41

2.16.6.	Immunohistochemische Färbung von Paraffinschnitten	42
2.17.	Mikroskopie und fotografische Dokumentation der Zell- und Gewebepräparate.	43
3.	ERGEBNISSE.....	44
3.1.	MTT-Assay	45
3.1.1.	Untersuchung von Einflüssen auf den MTT-Assay	47
3.1.1.1.	Reduktion von MTT durch Polyphenole im zellfreien System	47
3.1.1.2.	Zugabezeitpunkt der Testsubstanzen und Schädigung der RAW 264.7-Zellen....	50
3.1.1.3.	Bestimmung der Toxizität von <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure und Gallussäuremethylester	51
3.1.1.4.	Die Lyse als kritischer Schritt bei der Bestimmung antileishmanieller Eigenschaften	52
3.2.	Verwendbarkeit eines Antiserums gegen <i>Leishmania major</i>	54
3.2.1.	Gewinnung des Antiserums	54
3.2.2.	Detektion von Leishmanien im extrazellulären, promastigoten Stadium	55
3.2.3.	Detektion von Leishmanien im intrazellulären, amastigoten Stadium	56
3.2.4.	Verwendbarkeit des Antiserums zum Nachweis antileishmanieller Effekte	59
3.2.5.	Einsatz des Antiserums zur Detektion von Leishmanien und deren Antigen in Gewebeproben	60
3.3.	Entwicklung eines FACS-basierten antileishmaniellen Assays	63
3.3.1.	Durchflusszytometrie	63
3.3.2.	GFP-transfizierte Leishmanien	65
3.3.3.	Verwendbarkeit des verfügbaren GFP-transfizierten Leishmanien-Stammes	65
3.3.3.1.	Intensität und Stabilität des GFP-Signals transfizierter Leishmanien	65
3.3.3.2.	Geneticin-Resistenz des Wildtyp- und des GFP-transfizierten Stammes	67
3.3.3.3.	GFP- und PI-Signal von promastigoten Leishmanien im FACS	68
3.3.4.	GFP-Signal und intrazelluläre Leishmanienlast: Diskriminierung zwischen direkten und indirekten antileishmaniellen Effekten	69
3.3.4.1.	Direkte Abtötung der Leishmanien durch Pentostam®-Behandlung	70
3.3.4.2.	GFP-Signalreduktion korreliert mit der Elimination der intrazellulären Leishmanienlast in den BMM Φ nach Behandlung mit rIFN- γ und LPS	72
3.3.4.3.	Verifizierung der am FACS-Gerät ermittelten Infektionsraten durch Mikroskopie	77

3.3.4.4.	Anteil infizierter Makrophagen in Korrelation zu NO-Werten nach Kreuztitration mit rIFN- γ , LPS und rTNF- α	78
3.3.5.	Antileishmanielle Aktivität von Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A	83
3.3.5.1.	Einfluss des NO-Synthase Inhibitors L-NMMA auf die antileishmanielle Wirkung von Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A	84
3.3.6.	Einsatz der RAW 264.7-Zelllinie als alternative Wirtszelle im FACS-Assay ..	86
3.3.7.	Vergleich der antileishmaniellen Effekte ausgewählter Verbindungen im FACS- bzw. MTT-basierten Assay	88
3.3.7.1.	FACS-basierte Testung der Gallussäure	88
3.3.7.2.	Abhängigkeit der zytotoxischen Effekte der Gallussäure von der Zellart im MTT-Assay	89
3.3.7.3.	Antileishmanielle Effekte der Gallussäure im MTT-Assay	92
3.3.7.4.	Einsatz der FACS-basierten Methode zur Testung antileishmanieller und zytotoxischer Eigenschaften verschiedener phenolischer Verbindungen....	93
3.3.7.5.	Die <i>trans</i> -Aconitsäure als nicht phenolische Substanz pflanzlichen Ursprungs im FACS- und MTT-basierten Assay	95
3.3.7.6.	Zytotoxische Effekte der <i>trans</i> -Aconitsäure im MTT-Assay	96
3.3.7.7.	Antileishmanielle Effekte der <i>trans</i> -Aconitsäure im MTT-Assay	97
4.	Diskussion.....	99
4.1.	MTT-basierte Assays	100
4.1.1.	Kritische Beurteilung des MTT-Vitalitäts-Assays	100
4.1.1.1.	Verfälschung der Ergebnisse des Vitalitäts-Assays durch Reduktion von MTT durch Testsubstanzen	101
4.1.1.2.	Vermeidung falscher Ergebnisse im MTT-Vitalitäts-Assay	101
4.1.1.3.	Einflussnahme des Zugabezeitpunktes der Testsubstanzen auf die Schädigung der RAW 264.7-Zellen	102
4.1.2.	Kritische Beurteilung des MTT-Assays zur Bestimmung antileishmanieller Eigenschaften gegen intrazelluläre, amastigote Leishmanien	103
4.2.	Alternativer Assay zur Bestimmung zytotoxischer und antileishmanieller Eigenschaften von Testsubstanzen	106
4.2.1.	Detektion von Leishmanien mit Kaninchen-Antiserum	106
4.2.2.	FACS-basierter antileishmanieller Assay	107
4.2.2.1.	GFP-Signal als Marker für die Vitalität von Leishmanien	108
4.2.2.2.	Geneticin-Resistenz des Wildtyp- und des GFP-transfizierten Stammes	110

4.2.2.3.	GFP-Signal promastigoter Leishmanien im FACS	110
4.2.2.4.	Detektion intrazellulärer, amastigoter Leishmanien über das GFP-Signal	111
4.2.2.5.	Aktivierung infizierter BMM Φ mit rIFN- γ und LPS zu antileishmaniellen Effektorzellen	112
4.2.2.6.	Verifizierung der FACS-basierten Infektionsraten durch Mikroskopie	113
4.2.2.7.	Aktivierung infizierter BMM Φ mit unterschiedlichen Kombinationen an rIFN- γ , LPS und rTNF- α	114
4.2.2.8.	Detektion der antileishmaniellen Wirkung von Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A im FACS-Assay	115
4.2.2.9.	Einsatz der RAW 264.7-Zelllinie als alternative Wirtszelle im FACS-Assay....	116
4.2.2.10.	Vergleich antileishmanieller und zytotoxischer Effekte der Gallussäure im FACS- und MTT-basierten Assay	117
4.2.2.11.	Antileishmanielle und zytotoxische Untersuchung verschiedener phenolischer Verbindungen im FACS-basierten Assay	118
4.2.2.12.	Vergleich antileishmanieller und zytotoxischer Effekte der <i>trans</i> -Aconitsäure im FACS- und MTT-basierten Assay	119
4.3.	Fazit und Ausblick	120
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	124
6.	SUMMARY.....	128
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	131
8.	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	142
9.	LEBENS LAUF.....	143

III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BALB	B: Halsey J. Bagg, alb: albino
BMMΦ	Bone marrow derived macrophages (Knochenmarkkulturmakrophagen)
C57Bl	C: Clarence C. Little, bl: black
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsmarker)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FKS	Fötale Kälberserum
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	hour (Stunde)
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC	Inhibitory concentration (Hemmstoffkonzentration)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNO	induzierbares Stickstoffmonoxid
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
L. major	Leishmania major
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min.	Minute
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
NK	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PI	Propidiumjodid
rIFN-γ	rekombinantes Interferon gamma
rTNF-α	rekombinanter Tumor Nekrose Faktor alpha
RKI	Robert Koch-Institut
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
T _c	zytotoxische T-Zellen
T _{H1}	T-Helfer Zellen vom Typ 1
T _{H2}	T-Helfer Zellen vom Typ 2
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U/ml	Units/Milliliter (Einheiten/Milliliter)

Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VL	viscerale Leishmaniose
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
ZVZ	Zentrale Versuchstierzucht

1 EINLEITUNG

1.1. Infektionskrankheiten - Geißel der Menschheit

Infektionskrankheiten sind seit jeher eine allgegenwärtige Bedrohung der Menschheit, wenn auch Ausmaß ihrer Verbreitung und Schweregrad ihrer Symptomatik über die Jahrhunderte schwankten. Trotz medizinischen Fortschrittes sind, global betrachtet, Infektionskrankheiten eine der häufigsten Todesursachen. Von geschätzten 57 Millionen Todesfällen pro Jahr weltweit werden mehr als 26% direkt von Infektionskrankheiten verursacht. Darüber hinaus leidet eine große Anzahl von Erkrankten unter den Folgen einer Infektion und ist auf ständige Hilfe im Alltag angewiesen. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO), gehen mehr als 90% der Infektionen zu Lasten von nur einer Handvoll von Krankheiten, wie Durchfallerkrankungen, respiratorische Infektionen, Malaria, Tuberkulose, AIDS und Masern (s. Abb.1-1.).

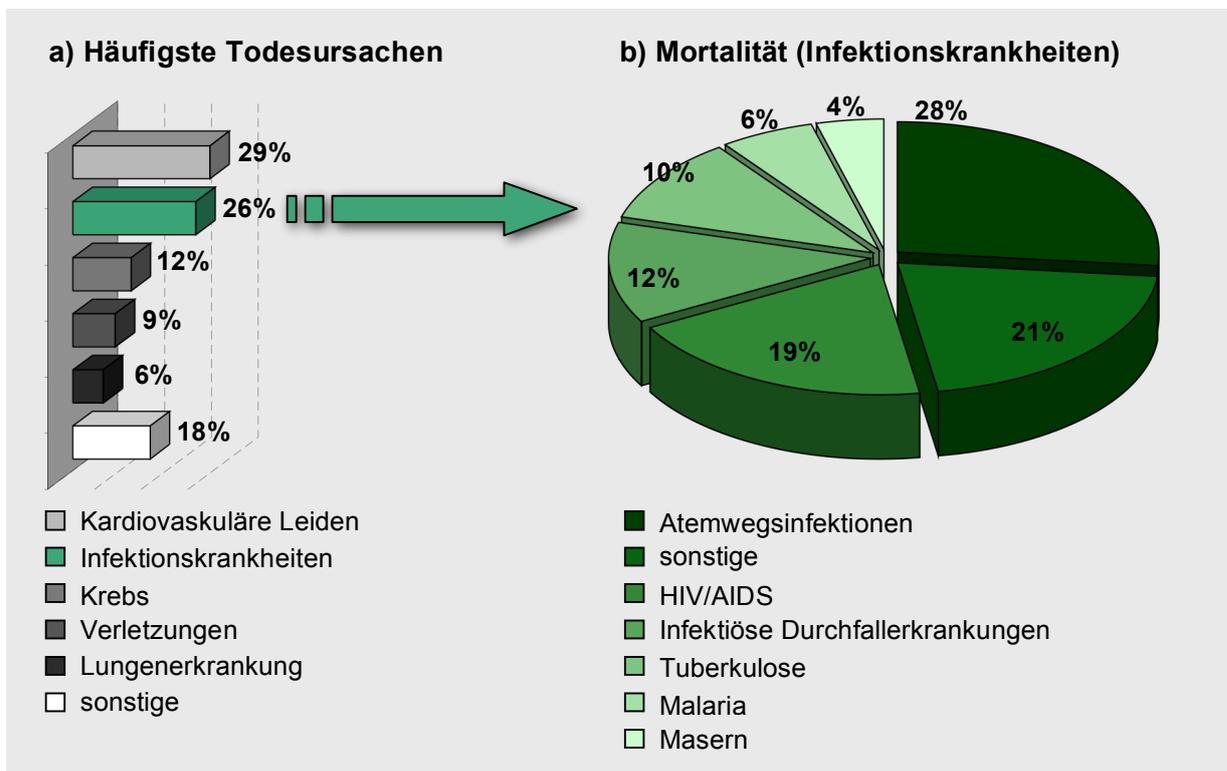


Abb. 1-1. Häufigste globale Todesursachen und Mortalitätsraten durch Infektionskrankheiten

Quelle: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/GGTSPU-vaccine-nu.rki.de-10346-185137-DAT/bodgbdeathdalyestimates.xls>, besucht am 20.08.2008.

Zahlreiche Ursachen sind für das zunehmende Auftreten alter Infektionskrankheiten und den Ausbruch neuer Infektionskrankheiten verantwortlich.

Vor allem in Entwicklungsländern, aber auch in den Industrienationen, sind Mängel in der öffentlichen Gesundheitsfürsorge, ökologische Veränderungen, weltweite Mobilität von Menschen, internationaler Güteraustausch, relative Sorglosigkeit im Umgang mit Medikamenten (wie am Beispiel von Antibiotika ersichtlich), sowie das Bevölkerungswachstum, die Slumbildung in Großstädten und freizügiges Sexualverhalten zu nennen. Über den weltweiten Ferntourismus kamen das zuvor unbekannte Ebola-Virus, das Marburg-Virus oder das Lassa-Virus auch nach Deutschland. Erschreckend ist zudem die Rückkehr der schon besiegt geglaubten Seuchen wie Tuberkulose und Malaria. Aber auch die jährlichen Warnungen vor Influenza-Pandemien verdeutlichen, dass viele Infektionskrankheiten ein globales Problem darstellen.

Selbst moderne Formen der klinischen Therapie und der Einsatz von verfügbaren Antiinfektiva sind heute nicht ausreichend, um viele Bakterien, Viren und Protozoen als Erreger von Infektionskrankheiten unter Kontrolle zu bringen, oder besser noch, zu eliminieren. Gegen viele Infektionskrankheiten gibt es bisher keine Impfstoffe, vor allem gibt es keine Impfungen gegen Parasiten. In den industrialisierten Ländern ließ der übermäßige Einsatz von Antibiotika die Zahl resistenter Bakterien kontinuierlich ansteigen. Erschwert wird zudem in vielen Ländern der Dritten Welt der Kampf gegen Infektionskrankheiten durch den aus Kostengründen bedingten Mangel effektiver Therapeutika.

Ferntourismus und flankierend der Faktor Klimaerwärmung begünstigen die Ausbreitung von Infektionskrankheiten aus tropischen Ländern und werden so zum Problem für Industrienationen. Ein Beispiel hierfür sind die Leishmaniosen. Ein Schwerpunkt in unserem Arbeitskreis ist die Suche nach neuartigen antileishmaniell wirksamen Naturstoffen, die Weiterentwicklung von bestehenden Testsystemen und die Etablierung von innovativen Infektionsmodellen. Gerade für Leishmaniosen ist seit Einführung antimonhaltiger Arzneistoffe als Mittel der ersten Wahl vor ca. 70 Jahren die Weiterentwicklung eher enttäuschend.

Da die vorliegende Arbeit die Testung von Pflanzeninhaltsstoffen auf antileishmanielle Aktivität und die Verfeinerung eines Leishmaniose-Modells zum Inhalt hat, soll zunächst der Parasit, sein Lebenszyklus und seine Verbreitung beschrieben werden. Zudem wird eine kurze allgemeine Übersicht der Parasiten-Spezies (s. Tab. 1-1a.), ihrer Krankheitsbilder (s. Tab. 1-1a.) und der Therapiemöglichkeiten (s. Tab. 1-1b.) gegeben.

1.2. Leishmanien

Die Gattung *Leishmania* gehört zur Familie Trypanosomatidae mit ausschließlich parasitisch lebenden Protozoen. Entdeckt wurden Leishmanien erstmals im Jahr 1885 von Cunningham, benannt wurden sie dann 1901 nach Leishman, der zusammen mit Donovan (1903) die Parasiten näher beschrieb (Handman, 2000).

Leishmania spp. sind Flagellaten und gehören zur Klasse der Kinetoplastea, welche sich durch einen Kinetoplasten, einen Bereich dicht gepackter DNS an der Basis ihres Flagellums, auszeichnen. Sie besitzen einen biphasischen heteroxenen Lebenszyklus, wobei sie im Insektenwirt extrazellulär im Darmlumen leben. Während dieser Entwicklungsphase befinden sie sich in ihrer begeißelten, promastigoten Form. In Wirbeltieren befinden sich Leishmanien obligat intrazellulär in Zellen des retikulohistiozytären Systems (bezeichnet die Gesamtheit aller Zellen des retikulären Bindegewebes), die zur Phagozytose von Mikroorganismen oder Partikeln befähigt sind. In diesem Stadium liegen sie in ihrer unbegeißelten amastigoten Form vor (Chan-Bacab und Peña-Rodríguez, 2001). In beiden Stadien erfolgt die Vermehrung durch Zweiteilung.

Die Vektoren der Leishmaniosen sind Schmetterlingsmücken (auch als Sandmücken bezeichnet) der Familie Psychodidae. Diese gehören in der Alten Welt der Gattung *Phlebotomus* und in der Neuen Welt der Gattung *Lutzomyia* an und übertragen den Parasiten auf Wirbeltiere. Die weibliche Schmetterlingsmücke nimmt bei einer Blutmahlzeit an einem infizierten Menschen oder Tier parasitierte Monozyten auf (s. Abb.1-2.). Im Mitteldarm der Mücke wird die Blutmahlzeit von einer sackähnlichen, vom Darmepithel sezernierten peritrophen Membran umschlossen (Schlein, 1993). Hier wandeln sich die amastigoten Parasiten innerhalb von etwa 24 h in ihre extrazelluläre prozyklische promastigote Form um. In dieser spindelartigen Gestalt bilden die Parasiten an ihrer Oberfläche eine dichte Glykokalix aus, die zum Großteil aus Lipophosphoglykanmolekülen besteht (Sacks et al., 1995). Diese Oberflächenmoleküle befähigen die Leishmanien, sich an das Mitteldarmepithel der Schmetterlingsmücken zu heften, schützen sie vor einer Hydrolyse im Darm und ermöglichen so die dortige Vermehrung (Schlein, 1993). Nach fünf bis sieben Tagen stellen die prozyklischen promastigoten Parasiten ihre Zweiteilung ein und wandeln sich in die hochinfektiöse, metazyklische promastigote Form um. Durch Modifikation der Kohlenhydratkette an den Oberflächenmolekülen geht die Bindung an das Darmepithel

verloren (Sacks et al., 1995). Darauf hin wandert der Parasit über den Vorderdarm in den Ösophagus und zum Pharynx.

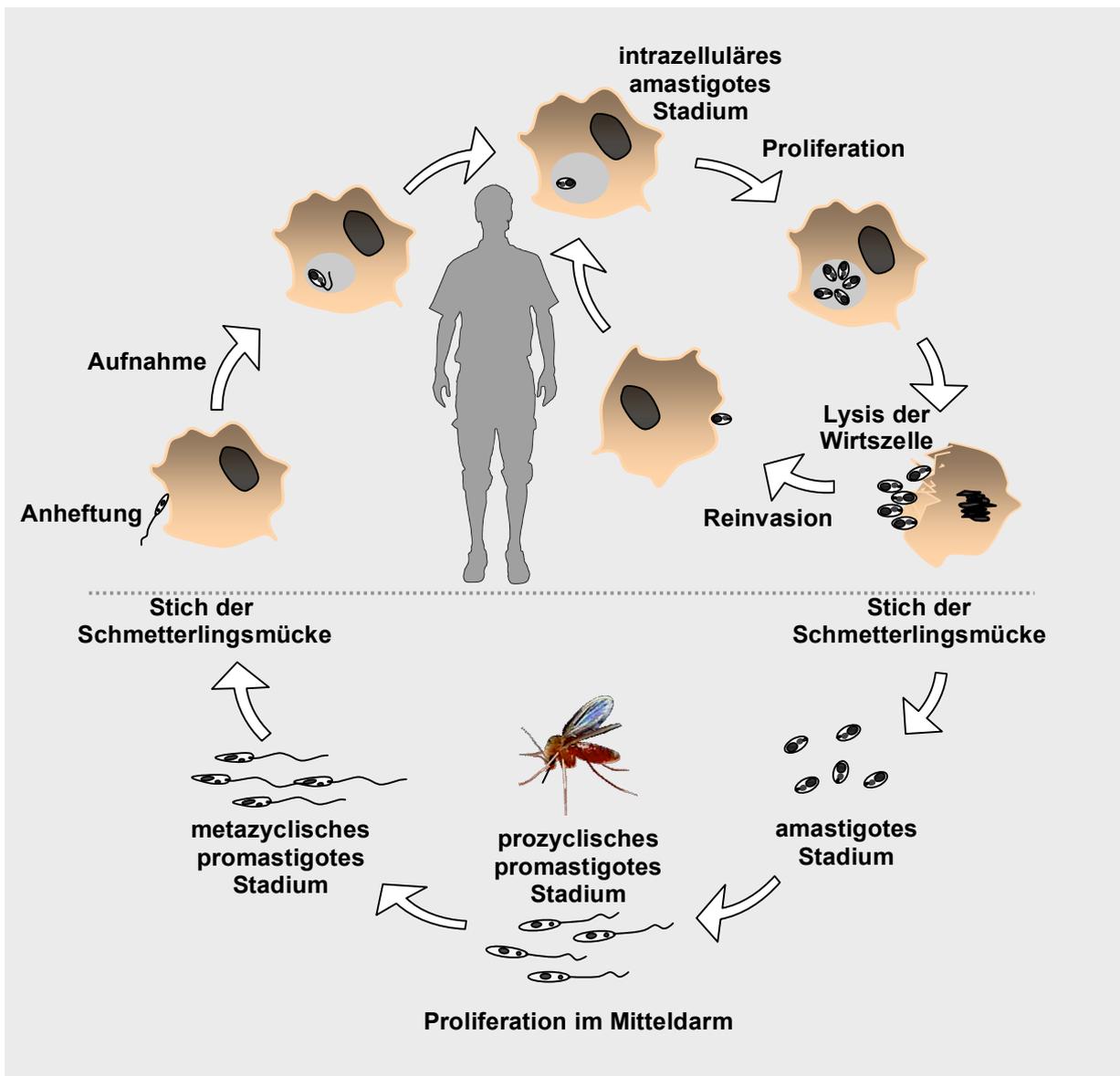


Abb. 1-2. Schematik des biphasischen Lebenszyklus der Leishmanien

Durch den Stich der Schmetterlingsmücke werden promastigote Leishmanien auf Wirbeltiere u. a. auch auf den Menschen übertragen. Im Wirt werden die Parasiten hauptsächlich von Makrophagen phagozytiert. Dort wandeln sie sich in der parasitophoren Vakuole in ihr amastigotes intrazelluläres Stadium um. Nach Vermehrung durch Zweiteilung kommt es zur Lyse der Wirtszelle, wodurch die freien Amastigoten weitere Zellen infizieren können. Bei einer erneuten Blutmahlzeit werden infizierte Makrophagen / Monozyten von der Schmetterlingsmücke aufgenommen und im Darm lysiert. Die freigesetzten amastigoten Leishmanien wandeln sich in ihr promastigotes Stadium um und vermehren sich in ihrem Vektor, bis sie im späten promastigoten Stadium bei erneutem Stich den nächsten Wirt infizieren können (modifiziert nach Handman, 2001).

Bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke wird er durch Regurgitation an seinen neuen Wirt (Mensch, bestimmte Tiere) übertragen. Im Wirt werden die promastigoten Parasiten über rezeptorvermittelte Phagozytose primär von Makrophagen aufgenommen (s. Abb. 1-2.). Einen besonderen Stellenwert besitzen hierbei die Komplementrezeptoren 1 und 3 auf der Makrophagenoberfläche (Handman und Bullen, 2002). Nach Aufnahme in Phagosomen fusionieren diese zusammen mit sekundären Lysosomen zu Phagolysosomen, die gemeinsam die parasitophore Vakuole ausbilden (Handman und Bullen, 2002). In dieser Umgebung, die reich an mikrobiziden Peptiden und hydrolytischen Enzymen ist und wo ein pH-Wert zwischen 4,5 und 5,0 herrscht (Roberts et al., 2000), transformieren die promastigoten Parasiten zu obligat intrazellulär lebenden Amastigoten. Das Flagellum wird dabei erheblich verkürzt und liegt in der Flagellartasche verborgen, so dass es lichtmikroskopisch nicht zu erkennen ist. Weiter ist diese Entwicklungsphase mit einer Hemmung der Lipophosphoglykan-Expression und im Gegenzug mit einem gesteigerten Glykoinositolphospholipid-Anteil auf der Oberfläche des Parasiten verbunden (Naderer und McConville, 2008).

1.3. Leishmaniosen und ihre Verbreitungsgebiete

Leishmaniosen sind durch verschiedene Protozoen-Spezies der Gattung *Leishmania* verursachte Erkrankungen mit kutaner, mukokutaner oder viszeraler klinischer Manifestation. Beim Aufenthalt in Endemiegebieten ist eine Übertragung durch Sandmücken von Reservoirtieren (v.a. kleine Nager und Hunde) auf den Menschen der häufigste Infektionsweg (Epidemiologisches Bulletin, 2003, Harms-Zwingenberger und Bienzle, 2007).

Das Verbreitungsgebiet der Leishmaniosen ist groß (s. Abb. 1-3.). Sie treten vor allem in Gebieten mit warmem tropischen, subtropischen oder mediterranem Klima auf. So sind 88 Länder betroffen, von denen 72 zu den Entwicklungsländern gehören. Der Großteil (90%) der Fälle von viszeraler Leishmaniose kommt in Indien, Nepal, Sudan und Brasilien vor, während der Großteil (90%) der kutanen Manifestationen vor allem in den Ländern Afghanistan, Algerien, Brasilien, Iran, Peru, Saudi Arabien und Syrien auftritt (Gramiccia und Gradoni, 2005). Jedes Jahr kommt es zu 1 - 1,5 Millionen neuen Fällen von kutaner und etwa 500.000 Fällen viszeraler Leishmaniose. Der Anstieg der Infektionen und die immer größere Verbreitung der Vektoren und damit auch des Parasiten stellen eine immer schwerwiegendere gesundheitliche Bedrohung dar.

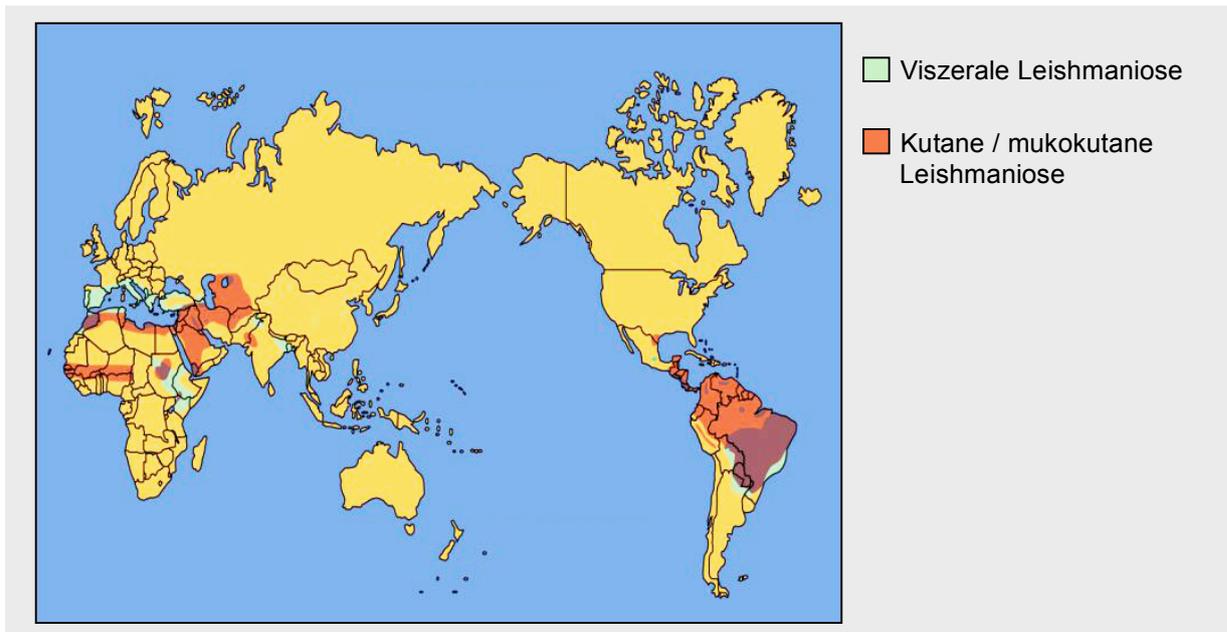


Abb. 1-3. Geographische Verbreitung der viszeralen und kutanen bzw. mukokutanen Leishmaniose.

(modifiziert nach <http://www.wehi.edu.au/research/divisions/inf/labs/handman/leishmaniasis.html>, 2008 besucht am 03.06.08)

Aber auch in Europa, hauptsächlich in den mediterranen Regionen Frankreichs, Italiens, Spaniens und Griechenlands, treten Leishmaniosen auf. In diesen Ländern infizieren viszeralisierende *L. infantum* Parasiten neben ihrem Hauptwirt dem Hund auch Kleinkinder oder treten als klassische Opportunisten bei Koinkidenz mit HIV auf (Lopez-Velez et al. 1998; Stark et al., 2005).

Fälle, die aus Deutschland gemeldet wurden, waren allerdings bis auf wenige Ausnahmen immer von Auslandsreisenden nach Deutschland importiert worden. Darüber hinaus ist jedoch im Zuge der globalen Erwärmung mit einer Ausdehnung der Lebensräume der Phlebotomen und damit auch der Leishmanien bis nach Deutschland zu rechnen (Epidemiologisches Bulletin, 2003).

1.4. Leishmaniosen

1.4.1. Viszerale Leishmaniose

Wichtige Erreger der viszeralen Leishmaniose (VL), *Kala azar* oder auch Dum-Dum-Fieber genannt, sind *L. donovani*, *L. infantum* und *L. chagasi* (s. Tab. 1-1a). Bei der VL kommt es

nach Infektion mit dem Parasiten zum Befall der inneren Organe. Besonders betroffen sind die Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten (Malla und Mahajan, 2006). Diese Form der Leishmaniose geht ohne Behandlung der Patienten fast immer tödlich aus und ist damit die schwerste Manifestation der Leishmaniose. Zu den Symptomen der VL gehören Splenomegalie und Hepatomegalie, unregelmäßige Fieberschübe, starker Gewichtsverlust, sowie Anämie (Roberts et al., 2000). Die Inkubationszeit bis zum Ausbruch dieser Symptomatik kann Monate bis mehrere Jahre dauern.

Eine weitere Ausprägungsform der VL ist das *Post-Kala-Azar* dermale Leishmanoid (Malla und Mahajan, 2006). Es tritt gelegentlich bei Infektionen mit *L. donovani* auf. Typisch für diese Form ist eine chronische kutane Leishmaniose, die als Spätkomplikation einer VL auftritt.

1.4.2. Kutane Leishmaniose

Die kutane Leishmaniose, auch Orientbeule oder Aleppobeule genannt, ist die häufigste Form dieser Erkrankung (s. Abb. 1-4). Sie wird von einer Vielzahl von Leishmanien Arten verursacht (s. Tab. 1-1a.). Typische Vertreter sind *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica* und *L. mexicana*. Am Ort des Insektenstiches kommt es nach wenigen Wochen bis hin zu Monaten zur Bildung juckender Papeln und/oder Knötchen, denen artspezifisch Läsionen und Ulzerationen der parasitierten und benachbarten Hautbereiche folgen können.

Bei der klassischen kutanen Leishmaniose handelt es sich meist um eine selbstlimitierende Infektion der Haut ohne Systembeteiligung, die unter Narbenbildung abheilt (Harms-Zwingenberger und Bienzle, 2000). Nur bei Patienten mit schlechtem Immunstatus, z.B. bei gleichzeitiger HIV-Infektion, entstehen ausgedehnte Läsionen.



Abb. 1-4. Typische Ulzeration als Folge der kutanen Leishmaniose

(Quelle: CDC/Dr. D.S. Martin
http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/09061998/00001/3MG0037_1ores.jpg, besucht am 16.08.08)

Bei Infektionen mit *L. tropica* kommt es in einigen Fällen zu Leishmaniose recidivans. Die Manifestation dieser kutanen Leishmaniose verläuft chronisch, wobei die Läsionen im Zentrum heilen, während sie sich am Rand ausbreiten.

Eine weitere Sonderform der kutanen Leishmaniose ist bei Infektion von immundefizienten Patienten mit *L. aethiopica* und *L. amazoniensis* (s. Tab. 1-1a) zu beobachten. In diesen Fällen kommt es zu einer diffus kutanen Leishmaniose unter Ausbildung knotenförmiger, nicht-ulzerierender Läsionen, die zunächst im Gesicht lokalisiert sind und sich dann über den ganzen Körper ausbreiten. Problem bei dieser Manifestation der kutanen Leishmaniose ist die fehlende Spontanheilung und eine nur geringe Aussicht auf Behandlungserfolg.

1.4.3. Mukokutane Leishmaniose

Als Folge der kutanen Leishmaniose treten vor allem in Mittel- und Südamerika die mukokutanen Leishmaniosen auf, auch "Espundia" genannt. Die Erreger dieser Krankheitsform gehören zum *L. brasiliensis* Komplex. Typisch für die mukokutane Leishmaniose sind neben kutanen Manifestationen auch Läsionen der Mund- und Nasenschleimhäute (s. Abb. 1-5). Im schlimmsten Fall führt sie zur Zerstörung der gesamten Nasenschleimhaut, des Nasenseptums und des Gaumens (Piscopo et al., 2006). Ohne intensive Behandlung führt diese Krankheitsform meist zusammen mit schweren Sekundärinfektionen zum Tod.



Abb. 1-5. Deformierender Prozess im Mund-Nasenbereich bei mukokutaner Leishmaniose

(Quelle: Prof. Wolfgang Bommer, www.mpibpc.gwdg.de/groups/pr/PR/00_01/abb05_s.jpg, besucht am 16.08.08)

1.5. Leishmanien-Arten, Krankheitsbilder und Chemotherapie

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind eine große Anzahl verschiedener Leishmanien-Spezies beschrieben worden. Die Tabellen 1-1a. und 1-1b. geben einen Überblick der wichtigen Leishmanien-Vertreter in der Alten und Neuen Welt, ihrem Verbreitungsgebiet, der

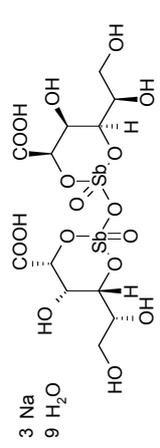
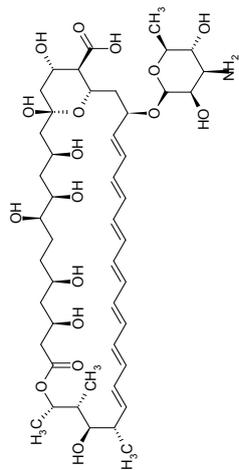
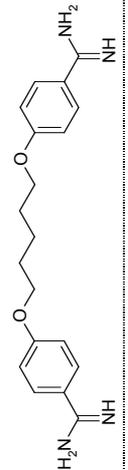
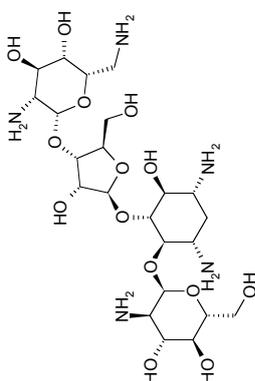
klinischen Manifestation sowie eine Übersicht der therapeutisch relevanten Arzneistoffe und deren Hauptwirkprinzipien.

Tab. 1-1a. Übersicht: Leishmanien-Spezies, Verbreitung, Krankheitsbild und Therapieoptionen

Spezies	Verbreitung	Krankheitsbild	Mögliche Therapieoptionen
Alte Welt			
<i>L. donovani</i>	Indien, Südostasien, Ostafrika	Viszerale Leishmaniose Post-Kala-Azar Lymphoid	5-wertige Antimonpräparate, Amphotericin B, Pentamidin, Paromomycin, Miltefosin Prinzipiell werden alle genannten Arzneistoffe zur Therapie der verschiedenen Krankheitsbilder eingesetzt.
<i>L. infantum</i>	Mittelmeerraum, Zentralasien	Viszerale Leishmaniose Kutane Leishmaniose	
<i>L. tropica</i>	Mittelmeerraum, Mittlerer Osten	Kutane Leishmaniose Leishmaniose recidivans	
<i>L. major</i>	Mittelmeerraum, Mittlerer Osten, Subsahara	Kutane Leishmaniose	
<i>L. aethiopica</i>	Äthiopien, Kenia, Sudan	Kutane Leishmaniose Diffuse kutane Leishmaniose	
Neue Welt			
<i>L. chagasi</i>	Süd- und Mittelamerika	Viszerale Leishmaniose	Zur Behandlung kutaner Leishmaniosen werden einige der Arzneistoffe zusätzlich zur systemischen Anwendung auch lokal angewandt.
<i>L. brasiliensis</i>	Süd- und Mittelamerika	Kutane Leishmaniose Mukokutane Leishmaniose	
<i>L. guyanensis</i>	Guyana, Brasilien	Kutane Leishmaniose Mukokutane Leishmaniose	
<i>L. panamanensis</i>	Panama und Nachbarländer	Kutane Leishmaniose Mukokutane Leishmaniose	
<i>L. mexicana</i>	Mittelamerika, Venezuela, Kolumbien	Kutane Leishmaniose Mukokutane Leishmaniose	
<i>L. amazoniensis</i>	Brasilianisches Amazonasgebiet, Venezuela	Kutane Leishmaniose Diffus kutane Leishmaniose	

(Modifiziert nach Harms-Zwingberger und Bienzle, 2000 und Gramiccia und Gradoni, 2005)

Tab. 1-1b. Übersicht wichtiger Arzneistoffe, ihrer chemischen Struktur und der Hauptwirkmechanismen

Arzneistoff	Chemische Struktur	Wirkmechanismus
Natrium-Stibogluconat (Pentostam®)	3 Na $9 \text{ H}_2\text{O}$ 	Diskutiert werden eine Inhibition der Glykolyse und der Fettsäure- β -Oxidation (Bergman et al., 1987) und die Externalisierung der Phosphatidylserine auf die äußere Zellmembran, wodurch unter DNA-Fragmentierung ein Apoptose ähnlicher Zelltod eintritt (Sudhandrian und Shaha, 2003) sowie eine Interaktion mit dem Trypanothion Metabolismus (Martyn et al., 2007)
Amphotericin B		Porenbildung in der Leishmanienmembran durch bevorzugte Komplexbildung mit dem Membranbestandteil Ergosterol. Durch die Poren gehen für den Parasiten essentielle Substanzen verloren, wodurch dieser zugrunde geht (Ramos et al., 1996).
Pentamidin		Beeinflussung des Polyamin-Biosyntheseweges und des Membranpotentials der Mitochondrien des Parasiten (Sundar und Chatterjee, 2006).
Paromomycin		Beeinträchtigt die Atmungskette und somit den Energiehaushalt der Leishmanien (Maarouf et al., 1997)
Hexadecylphosphocholin (Miltefosin)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Anstieg der Ceramidkonzentration infolge der reduzierten Synthese von Sphingomyelin \Rightarrow Zellschrumpfung und DNA-Fragmentierung \Rightarrow Zelltod (Paris et al., 2003, Soto und Soto, 2006).

1.6. Naturstoffe als potentiell antileishmanielle Wirkstoffe

Im vorherigen Kapitel wurde eine Übersicht der Arzneistoffe gegeben, die in der Therapie der verschiedenen Leishmanioseformen Anwendung finden. Doch immer häufiger versagen die klassisch eingesetzten Arzneimittel aufgrund von Resistenzentwicklung und häufig sind neben hohen Kosten nicht zu unterschätzende unerwünschte Arzneimittelwirkungen in Kauf zu nehmen. Aus diesem Grund wird nach immer neuen Wirkstoffen gesucht. Große Hoffnung wird dabei in die Erforschung von Naturstoffen gesetzt. Häufig wird auf der Suche nach geeigneten Arzneipflanzen auf die von Naturvölkern traditionell verwendeten Pflanzen zugegriffen (Fournet et al., 1994). Durch Verwendung moderner analytischer Methoden und biologischer Testsysteme erhofft man sich, Leitsubstanzen zu finden, die zur Entwicklung von Arzneistoffen beitragen. In der Vergangenheit wurden sehr unterschiedliche Naturstoffgruppen erfolgreich *in vitro* und *in vivo* getestet. Um nur einige Vertreter zu nennen: Aus der Gruppe der Triterpene zeigte die Ursolsäure (Tan et al., 2002) und Brucein A (Rocha et al., 2005), von den Iridoidglykosiden das Amarogentin und Amaroswerin (Ray et al., 1996) antileishmanielle Wirkung. Aber auch unter den Naphthochinonen und den Alkaloiden waren zahlreiche Vertreter mit antileishmanielltem Potential zu finden (Chan-Becab und Pena-Rodriguez, 1999; Mahiou et al., 2000; Rocha et al., 2005). Besonders hervorzuheben ist Miltefosin, eine Substanz die bereits zur topischen Behandlung von Hautkrebs und zur oralen Therapie der Leishmaniose Marktreife erreicht hat. Dieser Arzneistoff wurde aus Phospholipiden entwickelt, welche aus natürlichen Quellen z.B. durch Extraktion pflanzlicher und tierischer Zellen gewonnen werden können (Unger und Eibl, 2001). Um definierte, in der Struktur einheitliche Phospholipide auf einfache Art zu erhalten, wurden Synthesestrategien von Eibl und Engel ausgearbeitet (Eibl und Engel 1992). Doch auch gegen diesen neuen Arzneistoff sind schon Resistenzen bekannt (Choundhury et al., 2008).

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich insbesondere mit den im Pflanzenreich weit verbreiteten Polyphenolen. Viele dieser sekundären Pflanzenstoffe besitzen *in vitro* ein breites Spektrum biochemischer und pharmakologischer Aktivitäten. Ihnen werden antioxidative, antivirale, antimikrobielle, Enzyminhibierende und Radikalfänger-Eigenschaften zugesprochen (Kolodziej und Kiderlen, 2005). Aus diesem Grund unterzog unsere Arbeitsgruppe die Klasse der Polyphenole einer systematischen Testung. Die antileishmanielle Wirkung wurde für Reinsubstanzen von chemisch einfachen Phenolen (z.B.

Gallussäure und Derivate) bis hin zu komplexen hydrolysierbaren Gerbstoffen sowie Vertretern der Proanthocyanidine untersucht. Aber auch pflanzliche Extrakte (z.B. von *Pelargonium sidoides*, *Phylantus amarus*, *Salvia officinalis*) waren von großem Interesse, da hier häufig ein Zusammenspiel diverser Inhaltsstoffe für eine antileishmanielle Wirkung verantwortlich ist.

1.7. Mausmakrophagen-Leishmanien-Infektionsmodell

Generell kann eine gegen Leishmanien wirksame Substanz ihre Wirkung durch direkte Interaktion mit dem obligat intrazellulären Parasiten oder indirekt durch Aktivierung der Wirtszelle zur zytotoxischen Effektorzelle entfalten (Hoover et al. 1985; Kiderlen und Kaye, 1990). In dieser Arbeit verwendete bzw. etablierte Mausmakrophagen-Leishmanien-Infektionsmodelle (vgl. Kapitel 3.1.1.4. MTT-Assay, 3.3.4.2. FACS-Assay) sind in der Lage neben der Erfassung direkt antiparasitärer Effekte auch eine Simulation der immunologischen Abläufe darzustellen, welche zu einer Abtötung des intrazellulären Parasiten durch die Wirtszellen führen. Im Zentrum des Geschehens stehen dabei mit *L. major* infizierte Makrophagen (MΦ).

Im Zuge einer natürlichen Infektion präsentieren infizierte Makrophagen den CD4⁺ T-Helferzellen (T_{H1}- und T_{H2}-Zellen) über MHC-Klasse-II-Moleküle und den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (T_c) über MHC-Klasse-I-Moleküle Leishmanien-Antigen (s. Abb. 1-6). Die T_{H1}-Lymphozyten und T_c-Populationen reagieren auf den Zellkontakt vor allem mit IFN-γ-Produktion, welches hauptverantwortlich für die Aktivierung von Makrophagen zu Effektorzellen ist. Ein weiterer wichtiger IFN-γ-Produzent sind die NK-Zellen (Alexander et al., 1999; Thäele et al., 2005). Das von den verschiedenen Zellen sezernierte IFN-γ aktiviert die Makrophagen zur Produktion toxischer Metabolite. Für die Bekämpfung intrazellulärer Leishmania-Parasiten haben im Mausmodell induzierte Stickstoff-Intermediate (iNO) eine herausragende Bedeutung (Stenger et al., 1996).

Im Gegensatz dazu führt eine vorwiegend über T_{H2}-Lymphozyten ablaufende Immunantwort primär durch IL-10-Produktion zu einer Exazerbation der Leishmanien-Infektion (s. Abb.1-6) (Awasthi et al., 2004).

In *in vitro* Leishmaniose-Modellen kann die Rolle der T- und NK-Zellen durch Zugabe der Aktivatoren rIFN-γ und rTNF-α imitiert werden (Kiderlen und Kaye, 1990; Hammada et al.

1996). Als weiteres klassisches *in vitro* Stimulans für Makrophagen wird vielfach der bakterielle Zellwandbestandteil LPS eingesetzt (Roach et al., 1991). Aber auch die antileishmanische Wirkung potentieller Antiinfektiva, kann auf Aktivierung der Makrophagen zurückzuführen sein (Kiderlen et al., 2001). Ein Hinweis für eine stattgefundene Aktivierung behandelter Makrophagen sind vorhandene iNO-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen.

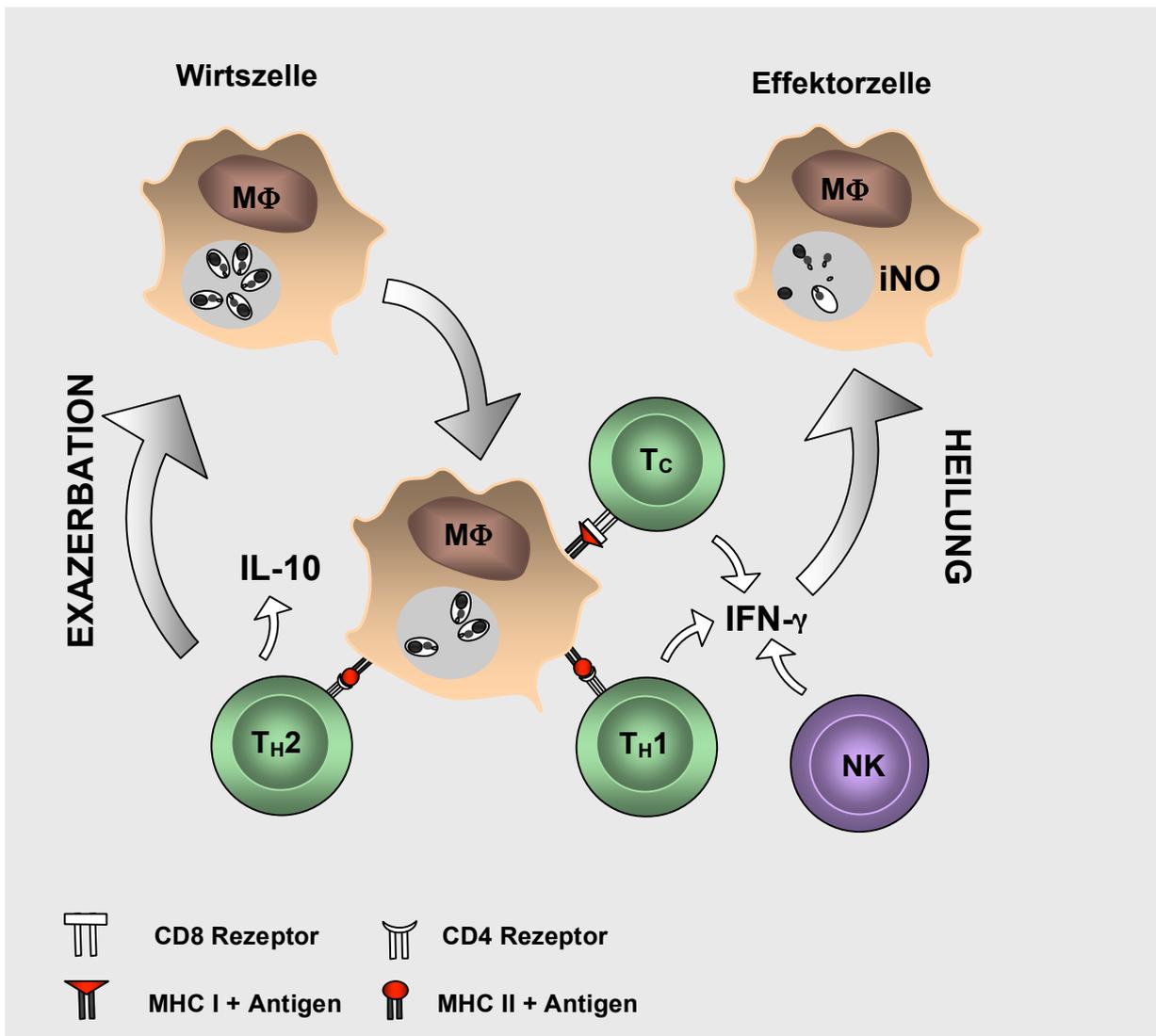


Abb. 1-6. Schematische Darstellung der Makrophagen-Funktion bei Leishmania-Infektionen im Wirtsorganismus

Mit Leishmanien infizierte Makrophagen sind als antigenpräsentierende Zellen in der Lage, durch Präsentation von Leishmanien-Antigen T_H1- und T_C-Zellen zur IFN- γ -Produktion anzuregen. IFN- γ der T-Zellen und NK-Zellen führt zur Aktivierung der Makrophagen zu Effektorzellen. Als Effektorzelle ist die Makrophage in der Lage durch Produktion leishmanizider Metabolite, insbesondere induzierter Stickoxide, die intrazellulären Parasiten abzutöten. Überwiegt allerdings eine T_H2-Immunantwort, kommt es hauptsächlich durch Sezernierung von IL-10 zur Exazerbation der Infektion.

Um eine direkte antileishmanische Wirkung auf infizierte Makrophagen entfalten zu können, müssen Testsubstanzen, wie beim therapeutischem Einsatz, sowohl in die Makrophage als auch in die parasitophore Vakuole gelangen. Ein Indiz für einen direkten leishmaniziden Effekt ist die Abtötung der intrazellulären Parasiten, ohne einhergehende iNO-Produktion. Infektionsmodelle, welche sowohl eine direkte als auch indirekte Wirkung von Testsubstanzen darstellen können sind vor dem Hintergrund wichtig, dass viele der in unserer Arbeitsgruppe getesteten Substanzen (Kolodziej und Kiderlen, 2005), ähnlich wie rIFN- γ in der Kombinationstherapie (Jha, 2006), die Sezernierung von antimikrobiell wirksamen Substanzen (z.B. reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies) induzieren und so die Abtötung intrazellulärer Leishmanien herbeiführen.

1.8. Tiermodelle der kutanen Leishmaniosen

Neben dem von unserer Arbeitsgruppe für *in vitro* Untersuchungen verwendeten Mausmakrophagen-Leishmaniose-Modell werden für *in vivo* Untersuchungen Mausinzuchtstämme verwendet. Diese eignen sich besonders, weil mit ihnen eine Vielzahl der klinischen Manifestationen, die vom Menschen bekannt sind, gut reproduziert werden können. Der prominenteste Vertreter der resistenten Maus-Inzuchtstämme ist der C57BL/6 Stamm. Mit *L. major* infizierte Mäuse dieses Stammes entwickeln zwar lokale kutane Läsionen, welche aber wieder spontan abheilen. Bei einer Zweitinfektion entfallen selbst diese lokalen Läsionen. Deshalb wird dieses Modell auch verwendet, um die Situation insbesondere der kutanen Leishmaniose des immunkompetenten Menschen nachzuahmen. Die Ursache für die Resistenz gegenüber diesen Parasiten ist in einer favorisierten CD4⁺ T_H1-Zell Immunantwort begründet. Dabei spielen vor allem die Zytokine IFN- γ , IL-12 und TNF- α tragende Rollen. IFN- γ , hauptsächlich produziert von T_H1-, T_c- und NK-Zellen, scheint dabei die IL-12 Produktion in Makrophagen und dendritischen Zellen effektiv zu steigern und die Empfindlichkeit von CD4⁺ T-Zellen für IL-12 zu erhöhen (Afkarian et al., 2002). IL-12 wiederum führt zu einer gesteigerten IFN- γ Produktion. Damit ist es nicht nur für die Induktion, sondern auch für die Aufrechterhaltung einer T_H1-Antwort verantwortlich (Park und Scott, 2001). Wichtig für die Kontrolle einer Leishmanien-Infektion ist zudem das Zytokin TNF- α , weil es in synergistischer Weise mit IFN- γ zu einer gesteigerten iNO-Produktion führt (Liew et al., 1990). Die beschriebenen immunologischen Abläufe einer überwiegenden T_H1-Zell Immunantwort münden in einer Aktivierung der infizierten

Makrophagen, welche durch Bildung verschiedener lysosomaler Enzyme und durch Produktion von reaktiven Sauerstoff- (O_2^- , H_2O_2 , HO^*) und Stickoxidintermediaten (NO^* , $OONO^-$, $RSNO$, NO_2^*) (Assreuy et al., 1994; Fang, 1997) die Leishmanien abtöten.

Im Unterschied dazu heilt eine Infektion von Mäusen des BALB/c Inzuchtstamms mit *L. major* weder aus, noch entwickeln diese Mäuse eine Resistenz. Durch die Infektion bilden sich nicht heilende Läsionen mit systemischer Ausbreitung, die zum Tod des Tieres führen. Aus diesem Grund dient dieses Modell der Simulation einer humanen visceralen Leishmaniose. Die Ursache dieses dramatischen Verlaufs der Infektion ist in der vorwiegend ausgebildeten $CD4^+$ T_{H2} -Zell Immunantwort des BALB/c Stammes zu finden. Der immunologischen Verlauf der Infektion wird dabei insbesondere durch das Zytokin IL-10 verursacht, da es gezielt die Zytokinproduktion von T_{H1} -Zellen hemmt (Noben-Trauth et al., 2003). Die folglich überwiegende T_{H2} -Zellantwort führt weiter zur Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13. Von diesen Zytokinen teilen sich IL-4 und IL-13 biologische Funktionen (Besma et al., 2004), welche vor allem zur Sezernierung von Antikörpern durch aktivierte B-Zellen führen. Diese Antikörper bieten primär Schutz vor extrazellulären Erregern (Alberts et al., 2004). Leishmanien, die als obligat intrazelluläre Parasiten in Makrophagen persistieren, sind von einer Immunreaktion mit Antikörpern kaum betroffen und können so auch nicht eliminiert werden (Ronet et al., 2008).

1.9. Zielsetzung

Als zentrale Aufgabe dieser Arbeit soll ein *in vitro* Leishmaniose-Modell etabliert werden, welches geeignet ist, Naturstoffe auf antileishmanielle Eigenschaften zu überprüfen. Dieses Modell soll die Wirkung von Testsubstanzen gegenüber den klinisch relevanten intrazellulären, amastigoten Leishmanien in der Durchflusszytometrie darstellen. Parallel dazu soll eine Beurteilung der zytotoxischen Effekte auf Makrophagen als Wirtszellen möglich sein. Zudem soll das Testsystem eine Differenzierung zwischen direkter und indirekter antileishmanieller Wirkung (durch Aktivierung der Wirtszelle) zulassen.

In einem ersten Schritt gilt es, das bisher genutzte MTT-basierte Testsystem kritisch zu hinterfragen. Hinweise aus der Literatur, die von möglichen Interaktionen der Testsubstanzen mit MTT berichten sind Anlass, zu überprüfen inwieweit dies auch auf phenolische Verbindungen zutrifft. Bei Bedarf sollen Lösungsansätze gebracht werden, die eine weitere Verwendung des Assays zulassen. Zudem soll der im MTT-basierten Testsystem nötige Arbeitsschritt der Makrophagenlyse im neuen Assay umgangen werden, da er schwer zu standardisieren ist und eine weitere Untersuchung der Wirtszelle dadurch nicht möglich ist.

Um die Lyse der Makrophage zu umgehen, soll ermittelt werden, wie der intrazelluläre Parasit markiert werden kann, um ihn später in einem *in vitro* Testsystem in der intakten Wirtszelle detektieren zu können. Dazu soll Leishmanien-spezifisches Antiserum gewonnen werden und überprüft werden, ob es zur intrazellulären Färbung des Parasiten geeignet ist und so als Instrument für die Etablierung eines neuen Testsystems dienen kann.

Alternativ soll der Einsatz eines gentechnisch veränderten Leishmanien Stamms, welcher konstitutiv ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert, überprüft werden. Das GFP-Signal erspart eine zusätzliche Markierung des Parasiten. Geklärt werden muss, ob das Signal des transfizierten Organismus für eine mikroskopische und durchflusszytometrische Detektion des intrazellulären Parasiten geeignet ist.

Abschließend sollen sowohl bewährte antileishmanielle Arzneistoffe, als auch durch den Arbeitskreis beschriebene Polyphenole parallel in dem neu etablierten Testsystem und in dem bisher verwendeten MTT-basierten System untersucht werden. Daraus soll ein Vergleich der Aussagekraft beider Assays gezogen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Tab. 2-1. Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Firma, Ort
Analysenwaage (A200S)	Sartorius, Kreuzburg
Axio Cam	Carl Zeiss, Göttingen
Begasungsbrutschrank (Typ 450 E)	NuAir, Illinois, USA
Digitalkamera (Power Shot A95)	Canon Deutschland, Krefeld
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
E.L.I.S.A. reader (SpectraFluor)	Tecan, Frankfurt am Main
Feinwaage (MC1)	Sartorius, Kreuzburg
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2)	Carl Zeiss, Göttingen
Freezing Container (Cryo 1°C)	Nalge Nunc, Rochester, New York, USA
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Works Werke, Staufen
Kühlzentrifugen (Varifuge3.OR, Multifuge1S-R)	Heraeus Instruments, München
Lichtmikroskop (Axiovert 25, AxioStar plus)	Carl Zeiss, Göttingen
Paraffinausgießstation (EG 1160)	Leica, Wetzlar
pH-Meter CG 825	Schott, Hofheim
Rotationsmikrotom (RM2135)	Leica, Wetzlar
Schüttler MTS 4	IKA Works Werke, Staufen
Sterilwerkbank (Klasse II) Type A/B3	NuAir, Illinois, USA
Spektrophotometer (Nano-DropND-1000)	Nano Drop Technologies, Wilmington, USA
Vortexer (Minishake KMS1)	IKA Works Werke, Staufen
Wasserbad	Dinkelberg-Labortechnik, Ulm

2.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Testsubstanzen

Die Bezugsquellen für Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind direkt in den experimentellen Versuchsbeschreibungen erwähnt.

2.2.1. Test- und Referenzsubstanzen

Tab. 2-2. Auflistung der verwendeten Test und Referenzsubstanzen

Substanz	Firma, Ort
Amphotericin B	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Benzoessäure	Carl Roth, Karlsruhe
Buparvaquon	Innova-Specialities, Missouri, USA
Carpinusin ✧	✧ Für die Überlassung der Ellagitannine danke ich sehr herzlich Herrn Professor Takashi Yoshida, Okayama University, Japan.
Casuarinin ✧	
Corilagin ✧	
Geraniin ✧	
Epicatechin-3-O-gallat *	* Mein Dank gilt Herrn Professor Daneel Ferreira, University of Mississippi, USA, für die Überlassung der Flavan-3-olderivate.
Epigallocatechin *	
Epigallocatechin-3-O-gallat *	
Gallussäure	Carl Roth, Karlsruhe
Gallussäureethylester	Carl Roth, Karlsruhe
Gallussäuremethylester	Fluka Chemie Buchs, Sui
Genitacin	Gibco, Paisley, Schottland
Kaffeensäure	Carl Roth, Karlsruhe
Licochalcon A	Calbiochem, Darmstadt
m-Hydroxyzimtsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Pentostam®	Glaxo Wellcome, London, UK
p-Hydroxybenzoessäure	Carl Roth, Karlsruhe
p-OH-Zimtsäure	Merck, Darmstadt
Zimtsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Zimtsäuremethylester	Carl Roth, Karlsruhe

2.3. Tiere, Zellen und Kulturmedien

2.3.1. C57BL/6 Wildtyp Mäuse und Balb/c Mäuse

Sechs bis zwölf Wochen alte, syngene immunkompetente C57Bl/6 (C: Clarence C. Little, bl: black) und BALB/c (B: Halsey J. Bagg, ALB: albino) Mausinzuchtstämme wurden von der Zentralen Versuchstierzucht (ZVZ, Bundesinstitut für Risikobewertung) bezogen. Die Tiere wurden in offener Käfighaltung bis zur weiteren Verwendung gehalten.

2.3.2. Chinchilla Kaninchen

Zur Gewinnung von Antiserum wurde ein weibliches, 27 Wochen altes Chinchilla Kaninchen von der Zentralen Versuchstierzucht bezogen und in offener Käfighaltung gehalten.

2.3.3. RAW 264.7-Zellen

Bei den RAW 264.7-Zellen handelt es sich um eine murine adhärenente Makrophagen-ähnliche Zelllinie. Ursprünglich wurde sie aus Tumoren von BALB/c Mäusen gewonnen, die durch das Abelson Leukämie Virus induziert wurden (Raschke et al., 1987). Die Zelllinie wurde von Herrn Dr. M. Masihi, Robert Koch-Institut, Berlin, zur Verfügung gestellt und in Polystyrol Zellkultur Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) maximal 8 Wochen im Brutschrank unter 5% CO₂ Atmosphäre bei 37 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit gezogen. Nach dieser Zeit wurden die Zellen verworfen und ein neues, in Stickstoff kryokonserviertes Aliquot aufgetaut (vgl. Abschnitt 2.6.). Damit wurde vermieden, dass die Zellen sich durch zu lange Kultivierung genetisch verändern.

Die mit L-Glutamin versetzte Medium-Grundlage RPMI 1640 wird am Haus hergestellt und ist Grundlage aller hier aufgeführten Medien. Das Kulturmedium für die RAW 264.7-Zellen setzte sich aus RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK), supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) (Bio Whittaker, Versiers, Belgien), Natriumpyruvat-Lösung (10 mM, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim), Streptomycin (100 µg/ml, PAA Laboratories, Cölbel) und Penicillin G (100 U/ml, PAA) zusammen. Zur Inaktivierung der Komplementkomponenten des FKS wurde dieses mindestens 30 min bei 56 °C im Wasserbad erwärmt.

Für die Ernte der adhärenenten Zellen bzw. um ein Überwachsen der Kultur zu vermeiden, wurde das Medium gegen kaltes PBS (*Phosphate buffered saline*) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ Zusatz (vgl. Abschnitt 2.5.) ausgetauscht, welches ebenfalls sofort verworfen und gegen frisches, eiskaltes PBS ersetzt wurde. Nach 30 min. Inkubation im Kühlschrank konnten die Zellen schonend mit einer 5 ml Pipette von den Kulturschalen abgespült werden. Die abgespülten Zellen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Heidelberg) gesammelt und zentrifugiert (4 °C, 250 x g, 10 min.). Nach weiterem zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt (vgl. Abschnitt 2.8.) und in den Experimenten verwendet oder nur mit frischem Medium verdünnt und frisch ausgesät.

2.3.4. L929(CSF)-Zellen

L929(CSF)-Zellen gehören zu den murinen Fibroblastenzelllinien und sind Produzenten von Makrophagen-Kolonie-Stimulierendem-Faktor, der für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu BMM Φ eingesetzt wird. Die L929-Zellen wurden von Frau Professor M.L. Lohmann-Matthes, Fraunhofer-Institut für Toxikologie, Hannover, zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung von L929-konditioniertem Medium wurden in Stickstoff kryokonservierte Zellen aufgetaut (vgl. Abschnitt 2.6.), in RPMI 1640 versetzt, mit 10% FKS (R10) (Bio Whittaker), Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) und Penicillin G (100 U/ml) aufgenommen und in 250 ml Polystyrol Kulturflaschen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, USA) ausgesät. Nach zwei bis drei Tagen Kultivierung bei 37 °C im Brutschrank bei 5% CO₂ Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit wurde das alte Medium gegen neues mit 5% FKS ausgetauscht. Um ein Überwachsen der Zellen zu vermeiden, wurden diese alle drei bis vier Tage passagiert. Hierzu wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst (Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco), mit PBS (vgl. Abschnitt 2.5.) Ca²⁺ und Mg²⁺ frei gewaschen, dann in R5 Medium ca. 1 : 4 verdünnt und in frische Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden so bis zu maximal zwei Monate kultiviert. Alle anfallenden Überstände wurden gesammelt, steril filtriert (0,22 μM , Schleicher & Schuell, Dassel) und bei -20 °C eingefroren. Mit Ende der Kultivierung wurden alle Überstände vereint, gemischt und anschließend wieder auf 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Vor Einsatz einer neuen Charge wurde diese gegen eine bereits bewährte auf ihre Makrophagen ausdifferenzierende Funktion überprüft.

2.3.5. Aus Knochenmark differenzierte Makrophagen (BMM Φ)

Um aus Knochenmark Makrophagen zu differenzieren, wurden zunächst 4 – 6 Wochen alte C57BL/6 Mäuse (vgl. Abschnitt 2.3.1.) durch zervikale Dislokation getötet. Den Tieren wurden unter sterilen Verhältnissen Oberschenkel- und Unterschenkelknochen entnommen und diese von umgebendem Muskelgewebe frei präpariert. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Gelenkköpfe abgetrennt und das Knochenmark mit kaltem, sterilem PBS unter Einsatz einer 20 ml Einmalspritze mit Einmalkanüle (26 Gauge, Braun, Melsungen) aus den Röhrenknochen herausgespült. Die stets auf Eis gehaltenen Zellen wurden im Anschluss abzentrifugiert (4 °C, 250 x g 10 min.) und in Makrophagen-Differenzierungs-Medium [RPMI 1640, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FKS (Bio Whittaker), 5%

hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Gibco), 15% L929-konditioniertem Medium (vgl. Abschnitt 2.3.4.), D-Glucose (20 mM, Sigma-Aldrich Chemie), Natriumpyruvat-Lösung (10mM), HEPES (25 mM), Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin G (100 U/ml)] aufgenommen und pro ausgespültem Bein auf 6 Polystyrol Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) mit jeweils 15 ml Medium ausgesät. Nach 6-8 Tagen Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ wurde der Überstand abgenommen, steril filtriert (0,22 µM) und bei -20 °C eingefroren. Der Überstand wurde als wachstumsförderndes Additivum für das Leishmanien-Medium aufbewahrt. Die voll ausdifferenzierten BMMΦ wurden mit kaltem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ Zusatz von den Zellkulturschalen abgelöst (vgl. auch Abschnitt 2.3.3.) und für entsprechende Versuche eingesetzt.

2.3.6. Leishmanien

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene *Leishmania major* Stämme verwendet. Zum einen der Wildstamm LV 39 (MRHO/SU/59/P), der von Herrn Professor Mauël, Universität Lausanne stammt, zum anderen der Klon *Leishmania major* GFP LT 52 CC-1pXG-GFP der von Herrn Professor Beverley, Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA, zur Verfügung gestellt wurde.

Eingesetzt wurden in beiden Fällen Aliquots, die in großer Anzahl vor Beginn der Versuche in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (vgl. Abschnitt 2.7.) wurden. Nach dem Auftauen (vgl. Abschnitt 2.6.) wurden die Parasiten in Leishmania Wachstumsmedium bestehend aus RPMI 1640, 5% hitzeinaktiviertem FKS (PAA Laboratories, Cölbel), Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin (100 U/ml), 15% BMMΦ-konditioniertem Überstand (vgl. Abschnitt 2.3.5.), Natriumpyruvat-Lösung (1%), HEPES (1%) und Hemin (0,25% v/v Lösung B des Hosmem II Mediums, Berens and Marr, 1978) überführt. Dem Wachstumsmedium des *L. major* GFP Klons wurde zusätzlich zur Selektion das Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (25 µg/ml, G418, Gibco) zugegeben. Der ständige „Selektionsdruck“ verhinderte, dass das Plasmid, welches die Information für die Produktion des grün fluoreszierenden Proteins und die Geneticin-Resistenz trägt, verloren geht.

Nach spätestens zweimonatiger Kultivierung der Leishmanien, im Brutschrank bei 25 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ wurden diese durch Gevisol®-Behandlung (Schülke & Mayr, Norderstedt) inaktiviert, entsorgt und ein neues Aliquot aufgetaut. Damit wurde eine vergleichbare genetische „Ausstattung“ für alle Versuche gewährleistet. Um ein Überwachsen

der Kultur zu vermeiden, wurde alle 7 bis 8 Tage der Großteil (3/4) der Zellsuspension verworfen und das Volumen durch frisches Medium ersetzt. Zur Ernte der Leishmanien für den Einsatz in Versuchen wurde Leishmanien-Suspension in der post-logarithmischen Wachstumsphase entnommen und die Parasiten in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Abzentrifugieren (4 °C, 700 x g, 10 min.) wurden die Zellen noch dreimal in ca. 20 ml PBS gewaschen und durch Entnahme eines Aliquots die Anzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8.).

2.4. Wasser (H₂O)

Sofern Wasser verwendet wurde, handelte es sich um durch Umkehrosmose und Ionenaustausch aufgereinigtes und autoklaviertes Wasser, dessen Leitfähigkeit der doppelt destillierten Wassers entsprach. Im Folgenden wird es als H₂O bezeichnet.

2.5. Phosphate Buffered Saline (PBS)

Der Puffer wurde im Haus angefertigt und steril zur Verfügung gestellt. Sein pH-Wert liegt bei 7,2. Im Folgenden wird er nur noch als PBS bezeichnet.

Tab. 2-3. Zusammensetzung des PBS-Puffers

PBS	
NaCl	137,0 mM
KCl	27,0 mM
KH ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,8 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,0 mM
gelöst in H ₂ O	

2.6. Auftauen von in Stickstoff kryokonservierten Zellen

Die in flüssigem Stickstoff kryokonservierten Zellen (Leishmanien, RAW 264.7-Zellen, L929(CSF)-Zellen) wurden schnell bis 4 °C aufgetaut und die folgenden Arbeitsschritte unter Kühlung im Eisbad durchgeführt. Damit wurden Temperaturen über 4 °C verhindert, bei denen das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt) toxisch auf die Zellen wirken würde. Die Zellsuspension wurde nach dem Auftauen in 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen und mit ca. 4 ml 4 °C kaltem Kulturmedium tropfenweise

unter ständigem Durchmischen versehen. Durch die langsame Zugabe wurde den Zellen ein optimales Angleichen an den im Kulturmedium herrschenden osmotischen Druck ermöglicht und der DMSO-Anteil aus dem Einfriermedium verdünnt. Anschließend wurden weitere 8 ml 4 °C kaltes Kulturmedium direkt zugegeben und die Zellen abzentrifugiert (Leishmanien bei 700 x g, RAW 264.7 und L929(CSF)-Zellen bei 250 x g, 4 °C, 10 min.). Danach wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und nach den jeweiligen Erfordernissen in Petrischalen oder Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.

2.7. Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff

Zur längeren Lagerung wurden die Zellen (Leishmanien, RAW 264.7-Zellen, L929(CSF)-Zellen) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden sie in der logarithmischen Wachstumsphase aus der Zellkultur in sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert [Leishmanien bei 700 x g, RAW 264.7 und L929(CSF)-Zellen bei 250 x g, 4 °C, 10 min.] und in 10 ml 4 °C kaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen [RAW 264.7- und L929(CSF)-Zellen] mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung (0,4 % (w/v), Gibco Invitrogen, Eggenstein) gezählt (vgl. Abschnitt 2.8.). Durch Trypanblaufärbung wurden die toten Zellen blau angefärbt, wodurch die Möglichkeit bestand, nur die lebenden Zellen in die Zählung mit einzubeziehen. Bei den Leishmanien wurde anstelle der Trypanblau-Zugabe Formaldehydlösung (1% in PBS) zur Immobilisierung dazu gegeben. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben abzentrifugiert, in einem Verhältnis von $1,0 \times 10^6$ lebenden Zellen / 0,5 ml in kaltem Einfriermedium I bestehend aus Natriumpyruvat (1mM), Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin G (100 U/ml), FKS (40%) [PAA für Leishmanien und BioW für RAW 264.7-Zellen, L929(CSF)-Zellen] in RPMI 1640 resuspendiert und in Einfrierröhrchen (NeoLab, Berlin) portioniert. Zu den 0,5 ml Zellsuspension pro Röhrchen wurden 0,5 ml kaltes Einfriermedium II bestehend aus Natriumpyruvat-Lösung (1 mM), Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin (100 U/ml), DMSO (20%) in RPMI 1640 hinzupipettiert und gut durchmischt. Danach wurden die Einfrierröhrchen sofort in einen Nalgene® Nunc Cryo 1 °C Freezing Container überführt und bei -70 °C langsam eingefroren. Das langsame Einfrieren der Zellen in einem Einfriermedium mit hohem Proteinanteil verhinderte die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen verletzen könnten. Nach zwei Tagen bei -70 °C wurden die Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -170 °C eingelagert.

2.8. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Zur gezielten Verdünnung von Zellkulturen sowie zur Verwendung der Zellen in Versuchen wurde mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und dann die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Bei der Zählung von BMMΦ-, L929(CSF)- und RAW 264.7-Zellen wurden die toten Zellen durch Mischen von 40 µl der zu bestimmenden Zellsuspension mit 40 µl Farbstoff Trypanblau Fertiglösung [0,4% (w/v), Gibco] blau angefärbt. Trypanblau dringt zwar passiv in alle Zellen ein, wird aber ausschließlich von Lebenden wieder aktiv aus dem Zytoplasma entfernt. Dadurch konnte der Anteil der toten Zellen von der Zählung ausgeschlossen und die im Versuch eingesetzte Zellzahl anhand der lebenden Zellen definiert werden.

Bei der Bestimmung der Zahl der Leishmanien wurde auf die Diskriminierung der toten Parasiten verzichtet. Zum einen war die Anzahl der toten Parasiten bei sorgfältiger Kultur sehr gering, zum anderen wurde bei der Infektion mit einem hohen Leishmanien Überschuss gearbeitet (vgl. Abschnitt 2.9.). Da es sich bei den Leishmanien Zuchtkulturen um die promastigote, begeißelte Form des Parasiten handelte, war allerdings eine Immobilisierung mit Formaldehydlösung (Merck) notwendig. Dazu wurden 40 µl der zu bestimmenden Leishmanien-Suspension mit 40 µl Formaldehydlösung (1% in PBS) gemischt. Nach dem Auszählen der Zellen pro Großquadrat wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter über folgende Formel berechnet (s.Abb. 2-1.):

$$\text{Zellzahl/ ml in der Ausgangsprobe} = Z^{(1)} \times 10.000^{(2)} \times 2^{(3)} \times f^{(4)}$$

- 1) Zellzahl/ Großquadrat (Mittelwert aus 3 Zählungen)
- 2) 10.000 ergibt sich aus den Abmessungen der Zählkammer
- 3) Verdünnungsfaktor durch Trypanblau- bzw. Formaldehyd-Zugabe
- 4) Verdünnungsfaktor der Vorverdünnung (bei hoher Ausgangsdichte)

Abb. 2-1. Formel und Erklärungen zur Bestimmung der Zellzahl

2.9. Infektion von Makrophagen mit Leishmanien im promastigoten Stadium

BMM Φ oder RAW 264.7-Zellen wurden mit promastigoten Leishmanien im metacyclischen, infektiösen Stadium der post-logarithmischen Wachstumsphase (Saraiva et al., 2005) als Suspension vorliegend (Nacy and Diggs, 1981) infiziert. Dazu wurden 1×10^7 Makrophagen/ml R10 und 8×10^7 Leishmanien in 5 ml Polypropylen Rundboden-Röhrchen (Falcon) zusammengegeben. Das Endvolumen pro Infektionsröhrchen betrug zwischen 1,5 – 2 ml und wurde so gewählt, dass eine optimale Versorgung mit Medium bei gutem Gasaustausch garantiert war. Die Zellsuspension wurde bei 250 x g fünf Minuten zentrifugiert, um den Parasiten-Makrophagen Kontakt zu maximieren. Die gesamte Infektionsdauer betrug 120 Minuten, wobei die Zellen alle 30 Minuten mit einer 1 ml Pipette vorsichtig resuspendiert wurden, um die Nährstoff- und Gasverteilung im Medium homogen zu halten. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (200 x g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt (Falcon), worin sie zweimal mit 50 ml PBS gewaschen wurden. Durch die Waschschriffe wurde der Großteil der noch extrazellulären Parasiten entfernt. Das entstandene Pellet wurde je nach weiter verwendeter Methode (MTT-Assay oder FACS-Assay) durch Zugabe von R10 Medium auf das gewünschte Zell-Volumen-Verhältnis eingestellt.

2.10. MTT-Assay

2.10.1. Bestimmung der Vitalität von RAW 264.7-Zellen und BMM Φ

Zur Ermittlung des zytotoxischen Effektes von Testsubstanzen wurden RAW 264.7-Zellen oder BMM Φ von ihren Kulturschalen mit kaltem PBS abgelöst, ihre Zellzahl bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8.) und 1×10^5 Zellen in 100 μ l R10 Medium pro Kavität in 96-Well Mikrotiterplatten (BioRad, München) ausgesät. Dabei wurde der MTT-Vitalitäts-Assay auf zweierlei Art und Weise durchgeführt. In einem Fall wurde der Zelllinie erlaubt, während einer 24-stündigen Ruhephase im Brutschrank den für diese Zellart typischen Monolayer auszubilden. Erst dann wurden die Zellen mit Testsubstanzen behandelt. Im anderen Fall wurden zuerst Verdünnungsreihen der Testsubstanzen angefertigt und unmittelbar danach die Zellsuspension zu den Verdünnungen gegeben. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Behandlungsarten war demnach, dass zum Zeitpunkt der Zugabe der Testsubstanzen die

Zellen entweder noch als Zellsuspension vorlagen oder bereits einen Monolayer ausgebildet hatten.

Von den Testsubstanzen wurden Stammlösungen (20 mg/ml in DMSO) angefertigt und davon Verdünnungen in R10 Medium (400, 200, 100, 50, 25, 12,5 und 6,23 µg/ml) hergestellt. Diese Konzentrationen wurden durch Zugabe von 100 µl R10 Medium auf die Endkonzentration halbiert.

Nach Behandlung mit den Substanzen wurden die Zellen 48 h im Brutschrank inkubiert, anschließend der Überstand vorsichtig abgenommen und durch frisches, 37 °C warmes Medium (200 µl/Well) mit 10%iger steriler MTT-Lösung [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma-Aldrich, 5mg/1ml PBS] ausgetauscht. Der Überstandswechsel war notwendig, da bei Durchführung des Versuches ohne Zellen eine Reduktion des Tetrazoliumsalzes durch einige Testsubstanzen beobachtet wurde. Nach 6-stündiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 20%iger Sodiumdodecylsulfat-Lösung (SDS-Lösung Roth, gelöst in H₂O) gestoppt und die Farbkristalle über Nacht im Brutschrank bei 37 °C gelöst. Die Absorptionen wurden mit einem ELISA-Reader (SpectraFluor) bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen und mit Hilfe der Easywin basic und Microsoft Excel 2004 Software ausgewertet und dargestellt. Für die Darstellung der Daten wurde der MTT-Umsatz unbehandelter RAW 264.7 bzw. BMMΦ -Zellkontrollen als 100% definiert und die Messwerte der Proben behandelter Zellen dazu in Relation gesetzt.

Die Ergebnisse aus den MTT-Assays wurden exemplarisch für den Gallussäuremethylester und die *p*-Hydroxybenzoesäure mit Messwerten aus der Durchflusszytometrie bezüglich ihrer Zytotoxizität verglichen. Dazu wurden beide Methoden parallel verwendet und in größeren 24-Well Mikrotiterplatten gearbeitet. Die Zellzahl wurde auf 5 x 10⁵ pro ml pro Well eingestellt. Für die Lyse wurden 250 µl SDS-Lösung (0,02%) pro Kavität zugegeben. Die Konzentration der getesteten Polyphenole lag bei 40 µg/ml. Wie oben beschrieben, wurde auch hier einmal ein über 24 Stunden ausgebildeter Zellmonolayer oder die frisch zugegebene Zellsuspension mit den Substanzen behandelt. Der zytotoxische Einfluss der Substanzen wurde nach verschiedenen Behandlungszeiten (6, 24, 48, 72 h) ermittelt, entweder durch Messung des MTT-Umsatzes über den Anteil vitaler Zellen oder durch Bestimmung des Anteils toter Zellen nach PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie (vgl. Abschnitt 2.11.1.). Für jeden Behandlungszeitpunkt wurden unbehandelte Zellkontrollen mitgeführt, die bei der Auswertung gleich 100% gesetzt wurden.

2.10.2. Geneticin-Empfindlichkeit von promastigoten Leishmanien

Eine 7 - 8 Tage alte Kultur promastigoter Leishmanien wurde dreimal in PBS gewaschen und ihre Zellzahl mittels Neubauer-Kammer (vgl. Abschnitt 2.8.) bestimmt. Zur Überprüfung der Geneticin-Empfindlichkeit bzw. -Resistenz wurden anschließend 2×10^4 Leishmanien vom *L. major* GFP-Stamm bzw. Wildstamm in 100 μ l Kulturmedium pro Well einer 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden beide Leishmanien-Spezies bis auf die unbehandelten Kontrollproben mit Geneticin in der Konzentrationen [25 μ g/ml (36 μ M)] behandelt. Nach sieben Tagen Inkubation im Brutschrank bei 25 °C wurden 20 μ l MTT-Stammlösung (5 mg/1 ml PBS) pro Well zugegeben und weitere 6 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das gelbe Tetrazoliumsalz von den vitalen Leishmanien zu blauen Formazan-Kristallen umgewandelt, die durch Zugabe von 50 μ l SDS-Lösung (20%) über Nacht solubilisiert wurden.

2.10.3. Abhängigkeit des MTT-Umsatzes von der Anzahl vitaler Leishmanien

Zur Überprüfung der Abhängigkeit des MTT-Umsatzes von der Anzahl unbehandelter, vitaler Leishmanien wurde in 96-Well Mikrotiterplatten gearbeitet. Über eine Verdünnungsreihe wurden Leishmanien in verschiedenen Konzentrationen (5×10^6 , $2,5 \times 10^6$, $1,25 \times 10^6$, $6,25 \times 10^5$, $3,13 \times 10^5$, $1,56 \times 10^5$, $0,78 \times 10^5$ in je 100 μ l Leishmanien Kulturmedium pro Well) eingesät (vgl. Abschnitt 2.3.6.). Unmittelbar nach dem Ausplattieren der Leishmanien wurden 20 μ l MTT-Stammlösung / Well zugegeben, 6 h bei 25 °C inkubiert und anschließend die entstandenen blauen Formazan-Kristalle mit 50 μ l SDS-Lösung (20%) über Nacht gelöst. Im Anschluss erfolgte die Messung der Absorption im Mikroplattenphotometer bei 570 nm.

2.10.4. Zytotoxische Effekte auf Leishmanien im amastigoten Stadium

Zur Bestimmung von zytotoxischen Effekten der Testsubstanzen auf das amastigote Stadium der Leishmanien wurden RAW 264.7-Zellen oder BMM Φ mit *L. major* Wildstamm nach dem unter 2.9. beschriebenen Prozedere infiziert. Die infizierten RAW 264.7-Zellen bzw. BMM Φ (1×10^5 / 100 μ l R10 pro Well) wurden in 96-Well Mikrotiterplatten ausplattiert und diesen in einer anschließenden 24-stündigen Ruhephase im Brutschrank bei 37 °C ermöglicht, einen Monolayer auszubilden bzw. den Leishmanien die Internalisierung abzuschließen. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen, wobei das Endvolumen nach Behandlung für alle Wells auf

200 µl R10 Medium eingestellt wurde. Als Kontrollen wurden infizierte, unbehandelte RAW 264.7-Zellen bzw. BMMΦ sowie infizierte mit a) murinem rIFN-γ (100 U/ml, Gentech, San Francisco, CA, USA) alleine, b) in Kombination mit Lipopolysaccharid (LPS) (10 ng/ml, (*Salmonella abortusequi*), O. Holst, Forschungsinstitut Borstel), c) LPS (10 ng/ml) oder d) Pentostam® (100 µg Sb⁵⁺/ml, Dr. Goldbach, Glaxo Wellcome) behandelt. Die Inkubation mit den Substanzen erfolgte weitere 48 h im Brutschrank bei 37 °C. Nach dieser Behandlungszeit wurden die Überstände ohne den Monolayer zu schädigen vorsichtig abgenommen und durch 100 µl frisches 37 °C warmes Lysis-Medium (RPMI 1640 versetzt mit 0,02% SDS) ersetzt, welches sofort wieder abgenommen wurde, um durch weitere 50 µl Lysis-Medium ausgetauscht zu werden. Durch die erste Zugabe des Lysis-Mediums wurden die Lyse störendes FKS und Zelltrümmer gewegewaschen. Die eigentliche Lyse und damit die selektive Zerstörung der RAW 264.7-Zellen bzw. BMMΦ wurde durch die nachfolgende Behandlung mit Lysis-Medium erreicht. Der Endpunkt der Lyse wurde mikroskopisch bestimmt und durch Zugabe von 150 µl Post-Lysis-Medium / Well terminiert. Das Post-Lysis-Medium bestand aus RPMI 1640 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FKS (PAA), Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin G (100 U/ml), BMMΦ-konditioniertem Überstand (15%) (vgl. Abschnitt 2.3.5.), Natriumpyruvatlösung (2%), HEPES-Lösung (2%) und Hemin (0,5% v/v Lösung B des Hosmem II Mediums, Berens and Marr, 1978). Die relativ hohe FKS Konzentration im Post-Lysis-Medium war für die Neutralisation des SDS erforderlich und erlaubte den jetzt wieder extrazellulär vorliegenden Leishmanien, sich in einer Inkubationszeit von 5 - 10 Tagen im Brutschrank bei 25 °C zu einer promastigoten Kultur umzuwandeln und zu vermehren. Nachdem die unbehandelten Kontroll-Wells wieder deutlich mit Promastigoten gefüllt waren, wurden pro Well 20 µl MTT-Lösung zugegeben. Nach weiteren 6 h Inkubation wurde wie unter Kapitel 2.10.1. beschrieben die entstandenen Formazan-Kristalle gelöst und die Absorption vermessen. Die ermittelten Messdaten wurden in prozentualer Relation zu den unbehandelten infizierten Zellen gesetzt.

2.11. Durchflusszytometrie (FACS)

Das in dieser Arbeit eingesetzte Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson) war in der Lage, über zwei Laser mit den Wellenlängen 488 nm und 635 nm maximal vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen. Durch verschiedene Filter wurde von den Detektoren nur Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich erfasst. Die „grüne“ Fluoreszenzemission (FL-1, 515 nm - 545 nm, GFP), die „gelbe“ Fluoreszenzemission (FL-2:

564 nm - 606 nm) und die „rote“ Fluoreszenzemission (FL-3: > 670 nm; Propidiumjodid) wurden durch die Anregung mit dem 488 nm Laser erzeugt (Shapiro, 2003). Die Photoelektronenvervielfacher verstärkten elektronisch das einfallende Licht und gaben die gemessenen Signale an einen Computer weiter, der mit der CellQuest Pro Software (Becton Dickinson) ausgestattet war.

Verwendete Einstellungen am FACSCalibur: FSC (E-1, linear), SSC (346 V, linear), FL-1 (548 V, logarithmisch), FL-3 (581 V, logarithmisch).

Die gemessenen Parameter wurden über die Software WEASELv2.5 (The Walter and Eliza Hall Institut of Medical Research, Victoria, Australien) statistisch ausgewertet und dann als zweidimensionale Contour-Plot-Abbildung und als Histogramme dargestellt. Für die Darstellung der Daten als Säulendiagramme wurde die Software Microsoft Excel 2004 verwendet.

2.11.1. Lebend- tot- Diskriminierung von RAW 264.7-Zellen und BMM Φ

Um eine Aussage über die Zytotoxizität einer Testsubstanz sowie über die Anzahl der durch die Arbeitsschritte (Ablösen, Waschen, Zentrifugieren) geschädigten Zellen (RAW 264.7 oder BMM Φ) zu bekommen, wurde den Zellen 30 Sekunden vor der Messung am FACS Propidiumjodid-Lösung (Endkonzentration: 0,33 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben. Die Lösung wurde aus FKS (Bio Whittaker) (2,5%), NaN_3 (10%-ige Stocklösung, Merck) (0,1%), EDTA (Ethylendiamintetraacetat, 372,24 mol, Merck) (2mM) und Propidiumjodid (Sigma-Aldrich) 1 $\mu\text{g/ml}$ in PBS angefertigt. Propidiumjodid (PI) ist ein Farbstoff, der mit der DNA von Zellen mit gestörter Membranintegrität interagiert (Sasaki et al., 1987). Damit wurden nur tote und absterbende Zellen durch Propidiumjodid-Lösung angefärbt und in dem Fluoreszenz-3-Kanal bestimmt. Je Probe wurden wenigstens 30.000 Ereignisse vermessen und mit der Software WEASELv2.5 ausgewertet.

2.11.2. Bestimmung der Vitalität von Leishmanien im promastigoten Stadium

Promastigote vom *L. major* GFP- und *L. major* Wildtyp-Stamm wurden wie im Abschnitt 2.3.6. aufgeführt geerntet und gewaschen. Nach dem Auszählen der Leishmanien (vgl. Abschnitt 2.8.) wurde die Zellkonzentration so eingestellt, dass je 1×10^6 Zellen in 1,5 ml Leishmanien-Wachstumsmedium (ohne Geneticin-Zusatz) in Polystyrol Rundbodenröhrchen (5 ml) mit Deckel (Falcon, Becton Dickinson) aufgeteilt werden konnten. Die Parasiten

wurden mit Amphotericin B (Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 1 μM 24 bis 48 h im Brutschrank bei 25 °C inkubiert. Nach der Behandlungszeit wurden die Parasiten abzentrifugiert (4 °C, 700 x g, 10 min.), der Überstand verworfen und die Leishmanien anschließend in 2 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 300 μl PBS aufgenommen und die Zellen bis zur Messung am FACS auf Eis gelagert. Unmittelbar vor der Messung wurden 150 μl PI-Lösung (vgl. Abschnitt 2.11.1.) zur Bestimmung des Anteils toter Zellen zugegeben. Insgesamt wurden pro Probe 50.000 Ereignisse vermessen. Die Messdaten wurden unter Verwendung der Software WEASELv2.5 ausgewertet. Dabei wurde das GFP-Signal in der Fluoreszenz-1, das PI-Signal in der Fluoreszenz-3 ausgewertet.

2.11.3. Bestimmung von *Leishmania major* GFP in infizierten Makrophagen

Nach Infektion und Waschen von BMM Φ - bzw. RAW 264.7-Zellen nach dem unter Kapitel 2.9. beschriebenen Verfahren wurden die infizierten Zellen mit R10 Medium auf eine Konzentration von 5×10^5 BMM Φ - bzw. RAW 264.7-Zellen pro Milliliter Kulturmedium eingestellt. Je ein Milliliter dieser Zellsuspension wurde pro Polystyrol (5 ml) Rundbodenröhrchen mit Deckel (Falcon) aufgeteilt. Nach einer Ruhephase von 24 h im Brutschrank bei 37 °C, während der sich die intrazellulären Leishmanien in ihr amastigotes, unbegeißeltes Stadium umwandelten, wurden die Zellen mit den zu testenden Substanzen behandelt und das Endvolumen pro Röhrchen mit R10 Medium auf 1,5 ml erhöht. Damit wurde garantiert, dass den Zellen genügend frisches Medium für die anschließende maximal 48 h lange Inkubation zur Verfügung stand. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen bei 4 °C abzentrifugiert (200 x g, 10 min., 4 °C) und mit 2 ml 4 °C kaltem PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und die Zellen in 300 μl kaltem PBS aufgenommen und bis zur Messung am FACS-Gerät auf Eis gelagert. Um den Anteil toter Wirtszellen zu detektieren, wurde 30 Sekunden vor der Messung 150 μl PI-Lösung zugegeben (vgl. Abschnitt 2.11.1.). Pro Messung wurden insgesamt 30.000 Ereignisse vermessen. Die Infektionsrate wurde anhand des Anteils GFP-positiver Wirtszellen im grünen Fluoreszenzkanal (FL-1) ermittelt. Als Kontrollen wurden immer nicht infizierte und infizierte, unbehandelte Zellen mitgeführt.

2.12. Bestimmung der Nitritkonzentration mittels Griess-Assay

Zum Nachweis des instabilen Nitrosyl-Radikals (NO^{\cdot}) wird die Konzentration des daraus unter anderem entstehenden Nitrits (NO_2^-) in den Überständen bestimmt.

Für die Analyse der Proben wurden jeweils 50 μl des Überstandes in 96-Well-Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Greiner, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) überführt. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Verdünnungsreihe (100 - 2,5 μM) aus einer 10 mM NaNO_2 Stammlösung (NaNO_2 , Sigma-Aldrich gelöst in R10 Medium) angefertigt und davon auch je 50 μl pro Well aufgetragen. Das Griess-Reagenz, bestehend aus Lösung A [0,1% N-(1-Naphthyl)Ethylendiamindichlorid (Sigma-Aldrich) in H_2O] und Lösung B [1%, Sulfanylamid (Sigma-Aldrich) in 5,0%iger ortho-Phosphorsäure], wurde unmittelbar vor Gebrauch durch Mischen dieser beiden Lösungen im Verhältnis 1 + 1 hergestellt und je 50 μl davon auf die vorgelegten Proben zugegeben. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten eine Minute auf dem Schüttler (700 Upm) gemischt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte innerhalb von 15 Minuten, nach Zugabe des Griess-Reagenz am ELISA-Reader bei 550 nm. Frisches R10 Medium diente zur Ermittlung des Leerwerts.

2.13. Hemmung der iNO-Synthase mit L-NMMA

Zur Hemmung der iNO-Synthase wurden infizierte, unbehandelte und infizierte, behandelte BMM Φ mit dem unspezifischen iNO-Synthase-Inhibitor N^{G} -Monomethyl-L-Arginin [L-NMMA, (Sigma-Aldrich)] behandelt.

Von den Substanzen D- und L-NMMA wurden im Vorfeld der Versuche Stammlösungen (10 mM in H_2O) angefertigt, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die zur Hemmung der iNO-Synthase eingesetzte Konzentration lag bei 300 μM . Als Kontrollen wurden Proben mitgeführt, die mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) entweder in Kombination mit der stereochemisch aktiven Form des iNO-Synthase Inhibitors (L-NMMA, 300 μM) oder seiner inaktiven Form (D-NMMA, 300 μM) behandelt wurden. Gearbeitet wurde nach dem in Kapitel 2.11.3. beschriebenen Protokoll in Polystyrol (5 ml) Rundbodenröhrchen mit Deckel. Die Auswertung des Effekts der L-NMMA Zugabe erfolgte über Vermessung der Infektionsrate am FACS-Gerät (s. Kapitel 2.11.3.) und mittels Griess-Assay (s. Kapitel 2.12.)

2.14. Gewinnung von Antiserum

2.14.1. Bestimmung des Proteingehaltes von *Leishmania major*

Vor Herstellung der Adjuvans-Antigen-Emulsion wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay Kits 5000-0006 (Bio-Rad, München) der Proteingehalt von *L. major* in der stationären Phase ermittelt.

Dazu wurden 3×10^8 Leishmanien ausgezählt (vgl. Abschnitt 2.8.), diese dreimal in PBS gewaschen (4 °C, 700 x g, 10 min.), das Zellpellet in 430 µl 1 N NaOH (Merck, Darmstadt) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Parasitensuspension eine Stunde bei 40 °C im Thermoblock inkubiert und anschließend mit 430 µl 1 N Salzsäure (Merck) neutralisiert. Dabei auftretende pH-Abweichungen wurden durch Zugabe von 2 M TRIS/HCl Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) (pH 7,1) ausgeglichen; der endgültige pH-Bereich lag zwischen 6,5 - 7,5. Nach dem Zellaufschluss wurde die Probe gründlich gemischt, zentrifugiert (4 °C, 13000 x g, 10 min.) und der verbleibende proteinhaltige Überstand im Bio-Rad-Assay eingesetzt.

Der Assay beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G-250 mit Protein. Dabei verschiebt sich proportional zur Proteinkonzentration das Absorptionsmaximum (465 nm ohne Komplexbildung, 595 nm bei Komplexbildung). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm dient als Maß für die Proteinkonzentration der eingesetzten Lösung. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgt über eine Standard-Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin.

Das Bradford-Reagenz wurde vor Einsatz durch einen Faltenfilter aus Zellstoff 595 ½, 150 mm (Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert und 1:5 mit H₂O verdünnt. Eine Standardverdünnungsreihe (500, 400, 300, 200, 100, 50 µg/ml) wurde aus Rinderserumalbumin, gelöst in H₂O angefertigt. 10 µl der jeweiligen Standardverdünnung bzw. der zu bestimmenden Proben wurden in eine 96-Well Flachboden Mikrotiterplatte (Greiner) vorgelegt, mit 200 µl Reagenz versetzt und gemischt. Die Messung der Absorption wurde innerhalb der folgenden 10 - 15 Minuten am ELISA-Reader bei 595 nm durchgeführt. Als Leerwert wurde der Reagenzienleerwert (10 µl H₂O + 200 µl Reagenz) verwendet.

2.14.2. Herstellung der Adjuvans-Antigen-Suspension

Zur Herstellung der Adjuvans-Antigen-Suspension wurden *L. major* Parasiten in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 1×10^7 Organismen/ml PBS eingestellt. Je 10 ml dieser Parasiten-Suspension wurden auf Petrischalen aufgebracht. Die unbedeckten Petrischalen wurden 40 Sekunden mit UV-Licht (15 Watt) im Abstand von 20 cm bestrahlt und so die Leishmanien attenuiert. Im Anschluss wurden die Parasiten zweimal in PBS gewaschen. Die über Bradford ermittelte Proteinkonzentration (vgl. Abschnitt 2.14.1.) der Leishmanien wurde herangezogen, um genau die Anzahl Parasiten in 250 μ l PBS aufzunehmen ($3,85 \times 10^7$ der Organismen), die 250 μ g Protein enthalten. Die 250 μ l Leishmanien-Suspension und 250 μ l TiterMax[®]Gold Adjuvant (Sigma) wurden luftblasenfrei in je eine 1 ml Spritze aufgenommen. Beide Spritzen wurden fest an einen Dreiwegehahn (Stopcock, 3way Luer Lock, Sigma) angeschlossen und beide Volumina drei Minuten bei Raumtemperatur gemischt, so dass eine Wasser in Öl Emulsion entstand.

2.14.3. Immunisierung eines Chinchilla Kaninchens

Vor der Immunisierung wurde dem Tier durch Punktion der Ohrvene Blut entnommen. Das daraus gewonnene Serum (im Folgenden Kaninchen-Normalserum genannt) wurde für den späteren Einsatz als Negativkontrolle zum Vergleich mit dem Antiserum verwendet.

Zur Immunisierung wurden 200 μ l der Adjuvans-Antigen-Suspension (100 μ g Protein/ 200 μ l, vgl. Abschnitt 2.14.2.) so aufgeteilt, dass jeweils 50 μ l intramuskulär pro Hinterlauf und je 50 μ l subkutan pro Vorderlauf appliziert werden konnten. 21 Tage nach der Immunisierung wurden dem Tier zur Verstärkung der Immunreaktion weitere 200 μ l der Adjuvans-Antigen-Suspension auf gleiche Art verabreicht. Nach 10 weiteren Tagen wurde das Tier durch Injektion von Ketamin (40 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (5 mg/ kg Körpergewicht) tief narkotisiert und anschließend aus den großen Halsvenen entblutet.

2.14.4. Gewinnung von Serum aus Vollblut

Zur Gewinnung von Serum aus Vollblut wurde das gesammelte Blut eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen, der Blutkuchen gelöst und zur vollständigen Gerinnung anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag folgte eine Zentrifugation (4 °C, 200 x g, 15 min.) und anschließende Abnahme des Serums aus dem Überstand. Zur

Komplementinaktivierung wurde der Überstand auf 56 °C, 30 Minuten lang erhitzt. Das so gewonnene Serum wurde aliquotiert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

2.15. Infektion von BALB/c Mäusen mit *Leishmania major* Wildstamm

Zur Infektion von Mäusen vom BALB/c Stamm wurden Leishmanien aus der post-logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Diese wurden in PBS gewaschen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (vgl. Abschnitt 2.8.) auf 2×10^7 Parasiten pro 200 µl PBS eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden pro Maus ca. 50 µl in einen der beiden hinteren Fußballen subkutan appliziert. Nach drei bis vier Wochen waren die Infektionen soweit fortgeschritten, dass die Tiere durch cerebrale Dislokation getötet werden konnten, um Proben für die histologische Aufarbeitung und anschließende Anfertigung von Paraffinschnitten zu entnehmen.

2.16. Histologische/ zytologische Arbeitsmethoden

2.16.1. Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd

Falls für die Herstellung mikroskopischer Präparate nicht direkt die lebenden Zellen verwendet wurden, mussten sie zur Konservierung mit Paraformaldehydlösung fixiert werden.

Dafür wurden die Zellen in PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 4%iger Paraformaldehydlösung (Paraformaldehyd, Sigma, gelöst in PBS) versetzt. Die Zellen wurden 30 min. auf Eis fixiert, danach in PBS gewaschen und darin bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.16.2. Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin

Um das Haftungsvermögen fixierter Zellen auf Objektträgern (Roth, Carl Roth, Karlsruhe) zu steigern, wurden diese vor Verwendung mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden die Objektträger zunächst mit Aceton (Roth, Carl Roth) gereinigt und anschließend getrocknet. Um die Oberfläche der Objektträger gleichmäßig zu beschichten, wurden 100 µl Poly-L-Lysin Lösung (0,1 %, Sigma) auf einen Objektträger aufgetragen und dann ein zweiter luftblasenfrei darauf gelegt. Nach 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur in einem Behältnis

mit gesättigter Luftfeuchtigkeit wurden die Objektträger vorsichtig voneinander getrennt, kurz in H₂O getaucht und ca. 2 h bei 60 °C getrocknet. Bis zu Verwendung wurden sie bei -20°C gelagert.

2.16.3. Herstellen von Zytospin-Präparaten

Zur Kontrolle der Infektionsrate von mit Leishmanien infizierten Makrophagen und zur Austestung des gewonnenen Antiserums wurden sowohl von Makrophagen als auch von promastigoten Leishmanien Zytospin-Präparate angefertigt.

Zur Herstellung von Zytospin-Präparaten wurden die Zellen in PBS gewaschen und die Zellzahl pro Probe auf etwa $1 - 5 \times 10^5$ Zellen / 200 µl PBS eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden je 150 - 200 µl in die Trichter der Zytospin-Probenkammer (Zyto-Container Nr. 3416 Heraeus, München) pipettiert. Je nach Zellart wurde die Zentrifugalkraft angepasst. Leishmanien wurden bei 700 x g, BMMΦ bei 250 x g und mit Leishmanien infizierte BMMΦ bei 200 x g 10 Minuten auf Objektträger zentrifugiert. Für in Formalinlösung fixierte Zellen wurden Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger, für native Zellen SuperFrost®GELB Objektträger (Roth) gewählt. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Präparate bei Raumtemperatur getrocknet, je nach Aufgabenstellung gefärbt und eingedeckt.

2.16.4. Färben von Zytospin-Präparaten

2.16.4.1. Diff-Quik® Färbung

Die Dade Diff-Quik®-Färbemethode ist eine Schnellfärbemethode, angelehnt an die Pappenheim-Färbung und auch bekannt als May-Grünwald-Giemsa Färbung. Das Färbeset (Baxter Dade, Unterschleissheim) enthält drei fertige Lösungen: Die Fixierlösung, bestehend aus Fast Green (0,002 g/l) in Methanol, welche Nukleinsäuren grünlich färbt, die Färbelösung I, die Eosin G (1,22 g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6) enthält und Plasma rosa bis hellrot färbt, und die Färbelösung II, die durch den Thiazingehalt (1,1 g/l) der Kernfärbung dient. Zur Färbung werden die Objektträger fünfmal eine Sekunde in die Fixierlösung eingetaucht, zwischendurch kurz abtropfen gelassen, um dann die Arbeitsschritte in gleicher Art mit der Färbelösung I und II anzuschließen. Abschließend wurden die Objektträger mit PBS gespült, um überschüssige Färbelösungen zu entfernen, an der Luft getrocknet und mit Entellan

(Merck) eingedeckt.

Die vollständige Färbung färbt die Zellkerne rötlich-violett, das Zytoplasma lymphoider Zellen lichtblau. Neutrophile Granula erscheinen bläulich-rosa, eosinophile Granula bräunlich-orange bis ziegelrot, basophile Granula ultramarin und Erythrozyten stellen sich rosa dar.

2.16.4.2. Bisbenzimid-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) lagert sich an die Adenosin-Thymin reichen Regionen der DNA an und diskriminiert so die Kerne im Fluoreszenzmikroskop unter dem UV-Filter (300 – 400 nm).

Für die Färbung wurden 80 µl Bisbenzimid-Lösung (0,25 µg/ml in PBS) auf die Zytospinpräparate (vgl. Abschnitt 2.16.3.) aufgebracht und diese, um ein Austrocknen zu vermeiden, 30 min. in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Färbung wurden die Präparate dreimal jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen, anschließend bei Raumtemperatur leicht angetrocknet und mit Glycerol eingedeckt. Die Präparate wurden bis zur Mikroskopie im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

2.16.4.3. Färbung von promastigoten Leishmanien mit Kaninchen-Antiserum

Zytospinpräparate (vgl. Abschnitt 2.16.3.) mit *L. major* WT Parasiten im begeißelten extrazellulären Stadium wurden dreimal je fünf Minuten in PBS gewaschen und danach, um während der Färbeschritte ein Austrocknen zu vermeiden, in eine feuchte Kammer überführt. Dort wurden unspezifische Bindungsstellen der Präparate durch Zugabe von 100 µl Blocklösung (1,5% Ziegennormalserum, ZVZ, in PBS) für 60 min. bei Raumtemperatur geblockt. Genauer versteht man darunter das Absättigen von elektrostatischen Ladungen der Proteine im Untersuchungsgut, infolge dessen der nachfolgende Primärantikörper nur noch spezifische Bindungen eingehen kann. Nachdem die Blocklösung vorsichtig ohne die Objektträger zu waschen, entfernt worden war, wurden die Proben mit Kaninchen-Antiserum [(1:200 in Blocklösung (PBS + 1,5% Ziegen-Normalserum))] bzw. Kontrollen mit Kaninchen-Normalserum (vgl. Abschnitt 2.14.) 45 min. behandelt. Anschließend wurden die Präparate dreimal fünf Minuten mit PBS-Lösung gewaschen, um dann mit 100 µl Zweitantikörper (Invitrogen/Molecular Probes, Ziege-anti-Kaninchen IgG 1:200 in Blockpuffer markiert mit R-Phycoerythrin, 564 nm) 45 min. inkubiert zu werden. Abschließend wurden die

Objektträger dreimal je fünf Minuten mit PBS gewaschen, getrocknet und mit Citifluor (Science Services, München) eingedeckt. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Präparate lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.16.4.4. Intrazellulärer Nachweis von Leishmanien durch Färbung mit Kaninchen-Antiserum

Zum intrazellulären Nachweis von *L. major* WT in infizierten BMM Φ wurden zunächst die Zytospin-Präparate (vgl. Abschnitt 2.16.3.) dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellregionen mit einem „Zytostift“ (Pap Pen, Kisker, Steinfurt) umrandet, was eine punktuelle Behandlung der Zellen ermöglichte. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um die Zellmembran der BMM Φ für die Färbe-Agentien permeabel zu machen, wurden pro Zellregion 100 μ l Saponinlösung (Saponin von Quillajarinde, Sigma-Aldrich, 0,5% in PBS) aufgetragen und die Präparate 30 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Abnahme der Saponinlösung wurden zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen 60 min. bei RT je 100 μ l Saponinblocklösung (1,5% Ziegennormalserum, 0,5% Saponin in PBS) pro Zellregion aufgebracht. Im Anschluss wurde vorsichtig die Blocklösung entfernt und durch 100 μ l Kaninchen-Antiserum (1:400 in Saponinblocklösung) bzw. als Kontrolle, um unspezifisches Binden auszuschließen, durch Kaninchen-Normalserum (1:200 in Saponinblocklösung) (vgl. Abschnitt 2.14.) ersetzt und 45 min. bei RT inkubiert. Nach der Behandlung mit Serum wurden die Präparate dreimal je drei Minuten mit Saponinlösung gewaschen, anschließend je 100 μ l Zweitantikörper (Invitrogen/Molecular Probes, Ziege-anti-Kaninchen IgG 1:200 in PBS markiert mit Alexa, 488 nm) zugegeben und mit diesem weitere 45 min. bei RT inkubiert. Bei einem Kontrollpräparat wurde auf den Zweitantikörper verzichtet, um zu zeigen, dass die alleinige Behandlung mit Kaninchen-Antiserum zu keinen unspezifischen Signalen führt. Weitere Kontrollen dienten zur Ermittlung der Autofluoreszenz und Überprüfung der Spezifität des Zweitantikörpers. Die Autofluoreszenz wurde durch das Mitführen eines Präparats durch alle Arbeitsschritte, wie Waschen, Saponin-Behandlung und Blocken mit Ziegennormalserum, unter Verzicht auf Antiserum- und Zweitantikörper-Behandlung dokumentiert. Die Spezifität des Zweitantikörpers wurde durch seine Zugabe ohne vorherige Behandlung mit Kaninchen-Antiserum überprüft. Nachdem alle Färbeschritte durchgeführt waren, wurden die Objektträger dreimal drei Minuten in Saponinlösung und danach zum Schließen der Zellmembranen dreimal drei min. in PBS-Lösung gewaschen. Die

trockenen Präparate wurden mit Citifluor (Science services, München) eingedeckt und bis zur Mikroskopie bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.16.5. Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Organe zur Vermeidung der Autolyse möglichst rasch aus dem Tier entnommen bzw. zu untersuchende Gliedmaßen abgetrennt. Dann wurden die Präparate einmal in PBS gespült und mit Paraformaldehydlösung 4% (in PBS) mindestens 24 h fixiert. Nach der Fixierung wurden im Falle von Gliedmaßen diese vor der weiteren Behandlung entkalkt. Dazu wurden sie zum Entfernen des Paraformaldehyds dreimal mit PBS für 8 h gewaschen, in Ameisensäure 8% (Merck, in PBS) vier bis sechs Tage eingelegt, bis sie eine Radiergummi-artige Konsistenz aufwiesen und danach wieder in PBS überführt. Dieses wurde nach einer Stunde gegen frisches PBS ausgetauscht, welches nach einer weiteren Stunde nochmals durch frisches PBS ersetzt wurde. Dann wurden die Präparate 24 h in diesem Puffer inkubiert, um danach mit H₂O auf die gleiche Art und Weise gewaschen und in Plastikkassetten (Roth, Karlsruhe) überführt zu werden. Wenn die Organe nicht entkalkt werden mussten, konnten sie direkt in Plastikkassetten gegeben werden, dreimal 8 h in jeweils frischem PBS gewaschen und danach 12 h gewässert werden. Die anschließende Dehydrierung der Organe erfolgte durch das Überführen in ethanolische Lösungen für jeweils 24 h in aufsteigenden Konzentrationen (50, 70, 90, 96, 100 % Ethanol in H₂O).

Für die Herstellung der Paraffinblöcke wurde das Ethanol zunächst durch das Intermedium Xylol ersetzt, welches nach 24 h gegen frisches Xylol für weitere 24 h ausgetauscht wurde. Nach Inkubation im Intermedium wurden die Organe 12 h in ein 60 °C warmes Xylol-Paraffin-Gemisch (1:1) überführt, anschließend zweimal für jeweils 24 h in 60 °C reinem Paraffin inkubiert und dann mit der Paraffinausgießstation in Paraffinblöcke eingebettet. Die Blöcke wurden zum völligen Durchhärten für 12 h bei -20 °C eingefroren und mit einem Rotationsmikrotom daraus Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt. Diese wurden um sich komplett entfalten zu können, in ein 50 °C warmes Wasserbad überführt und dann auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht (vgl. Abschnitt 2.16.2.). Nachdem die Präparate getrocknet waren, wurden die Objektträger in einer schräg gelagerten Kassette für 12 h bei 60 °C aufbewahrt. Durch diesen Arbeitsschritt konnte überschüssiges Paraffin ablaufen. Bis zur Färbung der Präparate erfolgte die Lagerung bei RT.

Für die immunohistochemische Färbung der Schnitte mussten diese durch einstündige Inkubation in Xylol und durch Waschschrte in Alkohollösungen in absteigenden Konzentrationen (100, 96, 90, 70, 50 % Ethanol in H₂O, je 10 min.) rehydriert werden. Anschließend wurden die Objektträger in eine Küvette überführt, die mit Zitratpuffer (1:100 in H₂O) gefüllt war. Der Zitratpuffer bestand aus zwei wässrigen Stammlösungen. Die eine enthielt Zitronensäure (0,1 M, Merck) die andere Natriumcitrat (0,1 M, Merck). Beide wurden in einem Verhältnis gemischt, bei dem sich ein pH-Wert von ca. 6 einstellte.

Danach wurden die Objektträger 20 min. bei 56 °C inkubiert. Diese Arbeitsschritte dienen der Demaskierung durch PFA-Fixierung maskierter Antigene und machte diese so einer immunohistochemischen Färbung zugänglich. Abschließend wurden die Objektträger dreimal jeweils fünf Minuten in H₂O und danach in PBS gewaschen und bis zur Färbung in PBS belassen.

2.16.6. Immunohistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Zur Färbung der Paraffinschnitte wurden diese aus dem PBS entnommen und, um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden, sofort in eine feuchte Kammer überführt. Dort wurden die Schnitte zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen 60 min. mit Blocklösung (PBS + 1,5% Ziegen-Normalserum) behandelt. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Schnitte 40 min. mit Kaninchen-Antiserum (1:300 in Blocklösung) behandelt. Anschließend wurde dreimal je fünf Minuten in PBS gewaschen, um dann mit dem gegen Kaninchen IgG gerichteten Zweitantikörper (Ziege-anti-Kaninchen, IgG, Alexa Fluor® 488, Invitrogen) das gebundene Antiserum zu diskriminieren. Bei dem verwendeten Zweitantikörper handelte es sich um einen aus der Ziege gewonnenen gegen Kaninchen gerichteten und mit Alexa 488 markierten Antikörper der vor Einsatz 1:200 in Blockpuffer verdünnt worden war. Dieser Schritt dauerte 30 min. und wurde im Dunkeln in der feuchten Kammer durchgeführt, um ein Ausbleichen der Alexa-Markierung zu vermeiden. Nach weiterem dreimaligen Waschen in PBS wurden die Schnitte mit dem roten Farbstoff Alexa Fluor® 546 Phalloidin, welches Aktin anfärbt (Invitrogen, Einsatzkonzentration 0,5 U/ml in PBS) und dem DNA färbenden Farbstoff Bisbenzimid Hoechst 33258 (Einsatzkonzentration 0,25 µg/ml in PBS) 30 min. gegengefärbt. Abschließend wurden die Präparate dreimal in PBS gewaschen.

Zur Kontrolle wurden Schnitte entweder nur mit Blockpuffer und mit dem Zweitantikörper behandelt und mit Alexa Fluor® 546 Phalloidin und Bisbenzimid gegengefärbt oder mit Kaninchen-Normalserum (1:200 in Blockpuffer verdünnt), welches dem Kaninchen vor Immunisierung entnommen wurde, in Verbindung mit dem Zweitantikörper gefärbt. So konnte ein eventuell unspezifisches Binden des Zweitantikörpers und des Kaninchen-Normalserums erfasst werden.

2.17. Mikroskopie und fotografische Dokumentation der Zell- und Gewebepräparate

Zur Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurde das Lichtmikroskop Axiostar plus (Zeiss) verwendet. Die Analyse und Dokumentation der angefertigten Zytospinpräparate, sowie der Paraffinschnitte erfolgte mit dem Mikroskop Axioscop 2. Durch Verwendung der Fluoreszenzoption konnte neben der Morphologie der Zellen auch GFP-, Bisbenzimid- oder Signale durch markierte Antikörper analysiert werden. Zur Dokumentation der Präparate wurde die Digitalkamera AxioCam eingesetzt. Eine nachträgliche Überarbeitung der Bilder erfolgte mit der Software Image J (Toronto Western Research Institute, USA).

3 ERGEBNISSE

3.1. MTT-Assay

Die metabolische Reduktion von wasserlöslichen Tetrazoliumsalzen zu unlöslichen Formazan-Farbstoffen ist eine wohl etablierte Methode zur Bestimmung der Vitalität, der relativen Zellzahl, der Zell-Aktivierung und der Proliferation von Zellen (Gerlier et al., 1986; Mosmann, 1983). In den eigenen Untersuchungen wurden die zytotoxischen Eigenschaften der Testsubstanzen mit Hilfe des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) untersucht. Der MTT-Vitalitätstest beruht auf der Tatsache, dass lebende, nicht jedoch tote Zellen in der Lage sind, wasserlösliches gelbes MTT aufzunehmen und z. B. mittels mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem blau gefärbten Formazan-Farbstoff umzusetzen (s. Abb. 3-1.). Dabei korreliert die Intensität der entstehenden Blaufärbung mit der Anzahl lebender Zellen.

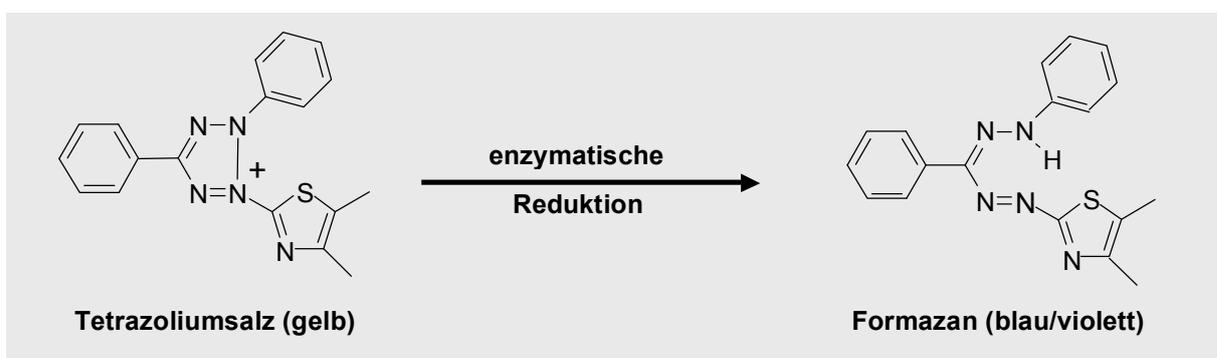


Abb. 3-1. Prinzip des MTT-Assays

MTT ist ein wasserlösliches gelbes Tetrazoliumsalz. Metabolisch aktive Zellen sind in der Lage, durch reduktive Öffnung des Tetrazolium-Rings den gelben Farbstoff in ein wasserunlösliches blaues Formazan umzusetzen.

In unserem Arbeitskreis wird der MTT-Assay routinemäßig sowohl zur Bestimmung genereller zytotoxischer Eigenschaften als auch bei der Suche nach Naturstoffen mit antileishmaniellen Potential eingesetzt. Der MTT-Assay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt und mit einem Mikroplattenphotometer ausgewertet. Von Bedeutung ist, dass das MTT und seine reduzierte Form, das MTT-Formazan, bei unterschiedlichen Wellenlängen Licht absorbieren und die photometrische Messung damit direkt nach dem Auflösen der Formazankristalle mit Natriumdodecylsulfatlösung (SDS-Lösung) durchgeführt werden kann.

Auftretende Probleme bei der Testung von phenolischen Verbindungen auf zytotoxische und antileishmanielle Eigenschaften, welche auf eine direkte Interaktion der Substanzen mit MTT schließen ließen, sowie vergleichbare Berichte in der Literatur für Flavonoide und andere

phenolische Naturstoffe (Brugisser et al., 2002; Liang Peng., et al. 2005; Rollino et al., 1995) veranlassten eine kritische Überprüfung des MTT-Assays. Hierzu wurden unterschiedlich hydroxylierte Benzoe- und Zimtsäurederivate (s. Abb. 3-2. und 3-3.) sowie Vertreter der Catechine (s. Abb. 3-4.) und Ellagitannine (s. Abb. 3-5.) einer systematischen Überprüfung unterzogen. Damit sollte der Einfluss von Strukturelementen und Hydroxylierungsmustern in dieser Stoffgruppe auf die MTT-Umsetzung evaluiert werden.

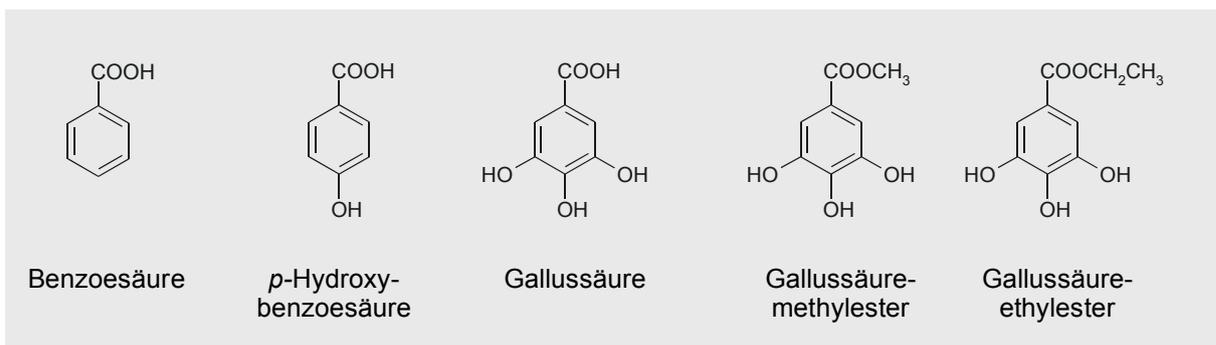


Abb. 3-2. Benzoensäurederivate

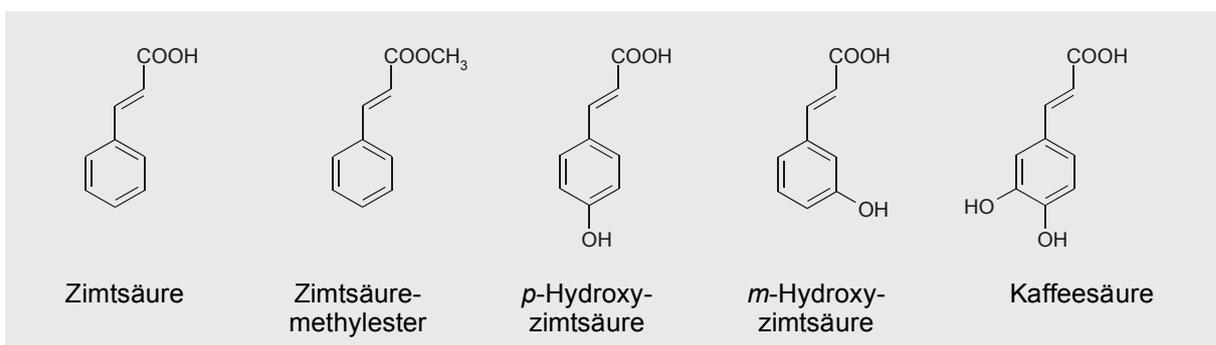


Abb. 3-3. Zimtsäuresäurederivate

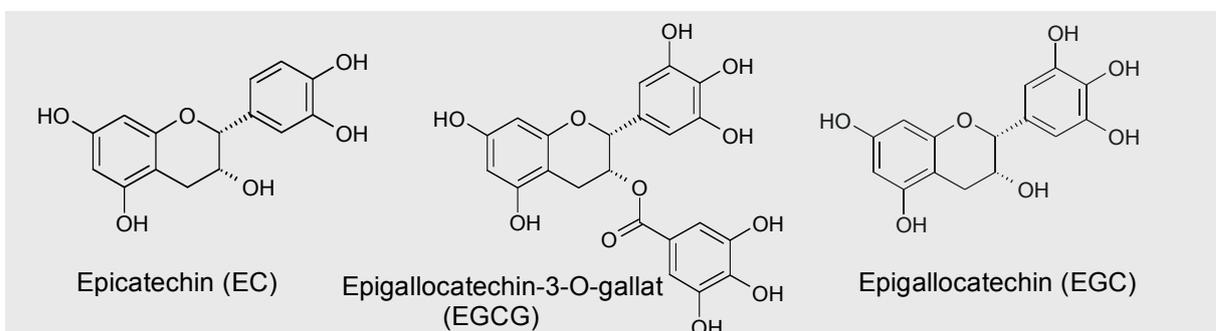


Abb. 3-4. Catechine

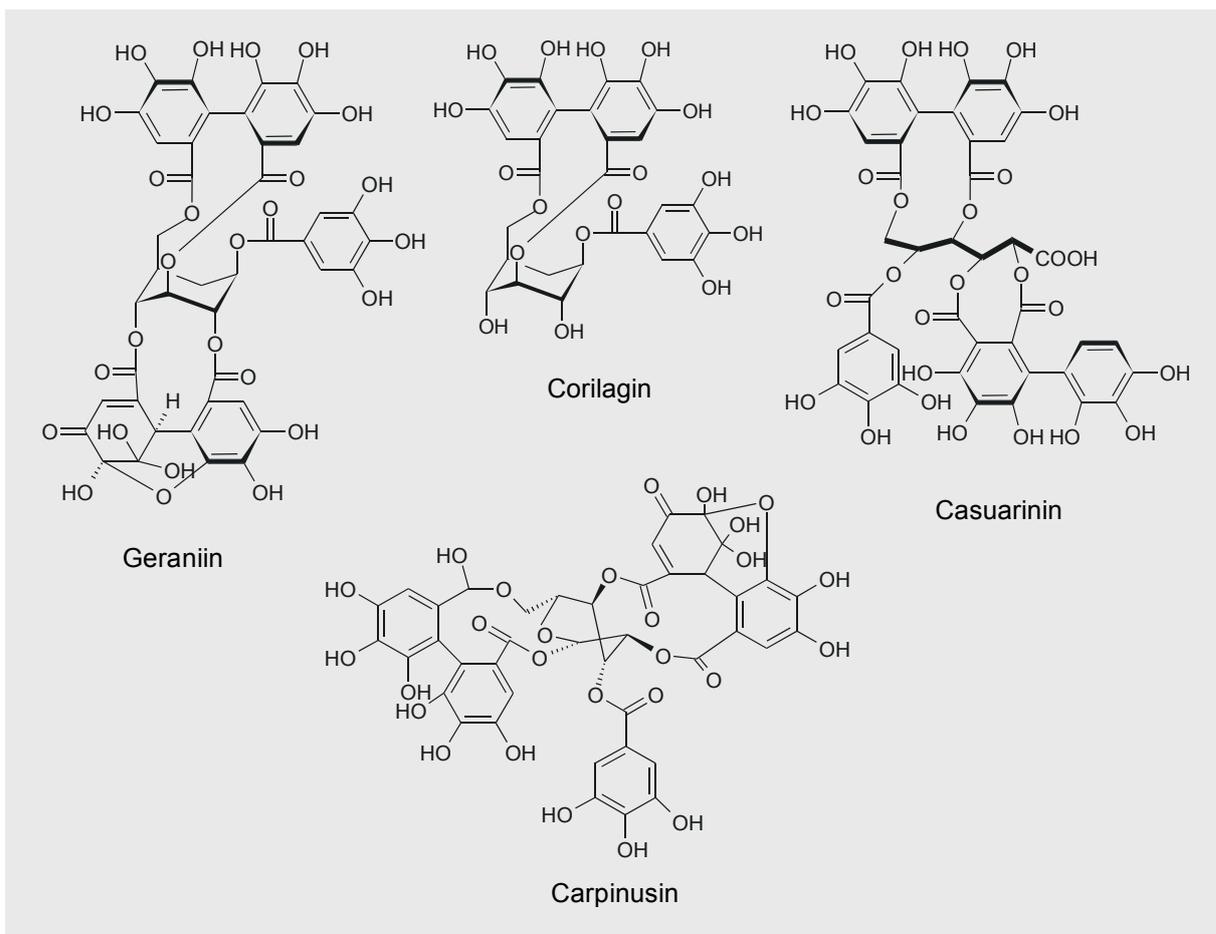


Abb. 3-5. Ellagitannine

3.1.1. Untersuchung von Einflüssen auf den MTT-Assay

3.1.1.1. Reduktion von MTT durch Polyphenole im zellfreien System

Bei der Bestimmung der Zell-Vitalität mittels MTT-Assay muss eine direkte Reduktion des Tetrazoliumsalzes durch die Testsubstanzen ausgeschlossen sein bzw. bei der Auswertung berücksichtigt werden. Gerade phenolische Verbindungen sind für ihr Reduktionsvermögen bekannt. Um dies für die phenolischen Testsubstanzen zu überprüfen, wurde der MTT-Assay in Abwesenheit von Zellen durchgeführt (Brugisser et al., 2002). Dazu wurden Verdünnungsreihen der in den Abb. 3-2. - 3-5. strukturell dargestellten Verbindungen in R10 Medium angefertigt und 6 h mit MTT-Lösung bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Solubilisierung der blauen Formazankristalle mit SDS-Lösung (20%) wurde die Absorption der Messlösungen bei 570 nm ermittelt.

Die Auswertung zeigte, dass Gallussäure und ihr Methyl- und Ethylester sowie die Kaffeesäure MTT in Abwesenheit von Zellen reduzierten. Der direkte Umsatz von MTT durch diese Testsubstanzen setzte ab einer Konzentration von 6 μM in ähnlicher Stärke ein. Im Gegensatz dazu beeinflussten Benzoesäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Zimtsäure sowie *para*- und *meta*-Hydroxyzimtsäure den MTT-Assay nicht; ihre gemessenen Absorptionen entsprachen den Medium-Leerwerten (s. Abb. 3-6.). Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass aromatische Verbindungen mit mindestens zwei benachbarten Hydroxygruppen imstande sind, MTT in das entsprechende Formazanderivat zu überführen.

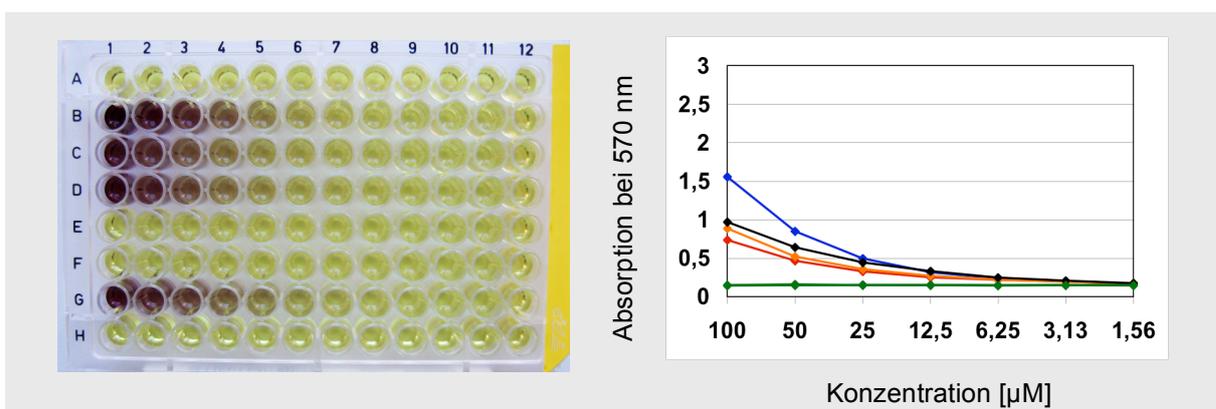


Abb. 3-6. MTT-Umsatz durch Phenolcarbonsäuren

Für eine Reihe verschiedener Phenolcarbonsäuren wurden Verdünnungsreihen (200-1,56 μM) angefertigt, die 6 h mit MTT-Lösung inkubiert wurden. Anschließend wurden die Formazan-Kristalle mit 20% SDS-Lösung solubilisiert und die Absorptionen bei 570 nm gemessen. Die erste Spalte wurde von der Auswertung ausgeschlossen, da hier das messbare Absorptionsmaximum überschritten wurde. **Reihe A** ■ *p*-Hydroxybenzoesäure, **Reihe B** ■ Gallussäure, **Reihe C** ■ Gallussäuremethylester, **Reihe D** ■ Gallussäureethylester, **Reihe E** ■ Zimtsäure, **Reihe F** ■ *p*-Hydroxyzimtsäure, **Reihe G** ■ Kaffeesäure, **Reihe H** ■ R10 Medium.

Eine Testung von Polyphenolen aus der Gruppe der Catechine sowie der Ellagitannine sollte die Beobachtung, die bei der Überprüfung der einfachen Phenolcarbonsäuren gemacht wurde, ergänzen. Diese Testreihe wurde insbesondere aufgegriffen, da Polyphenole in unserem Arbeitskreis schwerpunktmäßig auf immunmodulierende Eigenschaften untersucht werden. Kaffeesäure wurde als Referenzsubstanz bei dieser Testung mitgeführt.

Die MTT-Reduktion durch die Catechine Epicatechin-3-O-gallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechin-3-O-gallat (EGCG) war ähnlich ausgeprägt wie die des Gallussäuremethyl- bzw. -ethylesters. Deutlich intensiver war der MTT-Umsatz durch die Vertreter der Ellagitannine (s. Abb. 3-7.). Die Reduktion des Tetrazoliumsalzes setzte zwar auch bei vergleichbaren Substanzkonzentrationen von ca. 6 μM ein, war aber ab etwa 25 μM

deutlich stärker ausgeprägt als bei den weiteren getesteten Verbindungen. Eine Erklärung für das höhere Reduktionsvermögen dieser Substanzen ist in der Anzahl an Pyrogallolteilstrukturen begründet, welche für eine solche Reaktion prädestiniert sind.

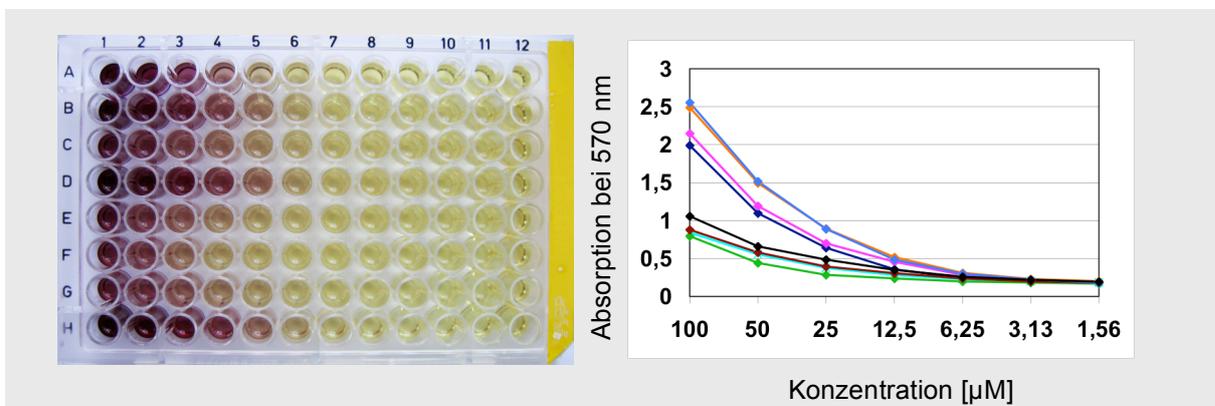


Abb. 3-7. MTT-Umsatz durch Catechine und Ellagitannine

Für Vertreter der Catechine und Ellagitannine wurden Verdünnungsreihen (200-1,56 μM) angefertigt, die 6 h mit MTT-Lösung inkubiert wurden. Anschließend wurden die Formazan-Kristalle mit 20% SDS-Lösung solubilisiert und die Absorptionen bei 570 nm gemessen. Die erste Spalte wurde von der Auswertung ausgeschlossen. **Reihe A** ■ Geraniin, **Reihe B** ■ Corilagin, **Reihe C** ■ Kaffeesäure, **Reihe D** ■ Carpinusin, **Reihe E** ■ EGCG, **Reihe F** ■ ECG, **Reihe G** ■ EGC, **Reihe H** ■ Casuarinin

Allen Substanzen, die MTT reduzierten, ist gemein, dass sie aromatische Verbindungen mit vicinaler Di- bzw. Trihydroxylierungen sind. Benzoe- und Zimtsäurederivate ohne oder mit nur einer Hydroxygruppe führten, unabhängig von der Stellung der funktionellen Gruppe, zu keiner Reduktion des Tetrazoliumsalzes. Dieser Befund zeigt, dass phenolische Verbindungen mit ausgeprägtem intrinsischem Reduktionspotential MTT bereits im zellfreien System umsetzen. Um falsch positive Ergebnisse bei der Testung von Verbindungen auf zytotoxische Eigenschaften zu vermeiden, sind adäquate, zellfreie Kontrollen unerlässlich. Alternativ wurde gefunden, dass durch einen generellen Mediumwechsel vor MTT-Zugabe die Phenole im Zellkulturüberstand entfernt und so eine Reduktion von MTT vermieden werden konnte. Bei Verwendung adhärenter Zellen (RAW 264.7 und BMM Φ) war ein Überstandswechsel auch problemlos durchzuführen. Mit dieser Erkenntnis und bei entsprechender Handhabung konnte der Zytotoxizitäts-Assay weiter verwendet werden.

3.1.1.2. Zugabezeitpunkt der Testsubstanzen und Schädigung der RAW 264.7-Zellen

Die Zytotoxizität einiger Phenole war überraschender Weise um ein vielfaches höher, wenn die Zelllinie RAW 264.7 frühzeitig, also noch vor Ausbildung eines typischen Zellmonolayers, mit den Testsubstanzen behandelt wurde. Zu diesem Zeitpunkt lagen die Zellen noch in suspensierter Form vor, so dass ihre gesamte Oberfläche mit den Testsubstanzen interagieren konnte. Die Auswirkung der Zelladhärenz auf die Zytotoxizität wird nachfolgend exemplarisch für Gallussäure, Gallussäuremethylester, Gallussäureethylester sowie die *p*-Hydroxybenzoesäure aufgezeigt.

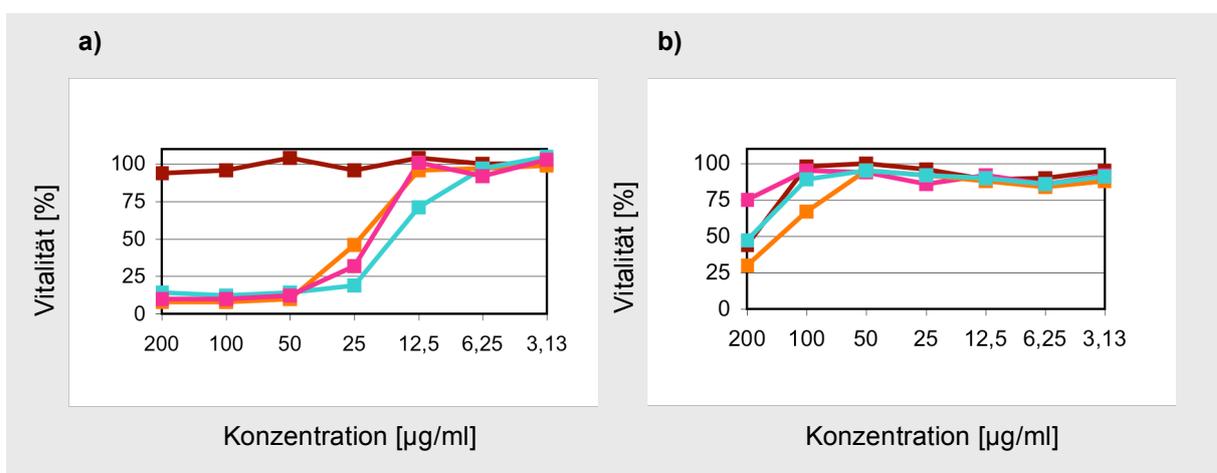


Abb. 3-8. Zytotoxizität gegenüber RAW 264.7 Zellen a) in suspensierter Form, b) als Monolayer

■ *p*-Hydroxybenzoesäure, ■ Gallussäure, ■ Gallussäuremethylester, ■ Gallussäureethylester
Abbildung **a** zeigt die Zytotoxizität verschiedener Benzoesäurederivate nach 48 Stunden auf RAW-Zellen, die unmittelbar nach dem Aussäen behandelt wurden und so anfangs als Suspension vorlagen. Abbildung **b** zeigt die Zytotoxizität der Substanzen nach 48 h auf einen Zellmonolayer, der sich innerhalb einer 24-stündigen Ruhephase ausgebildet hat.

Für Gallussäure und ihren Methyl- bzw. Ethylester wurden 48 h nach Behandlung der Zellsuspension IC_{50} -Werte von 15-25 $\mu\text{g/ml}$ (76-147 μM) ermittelt (s. Abb. 3-8. a). Die Behandlung des innerhalb von 24 h ausgebildeten Zellmonolayers hingegen führte nach 48 h für diese Substanzen zu IC_{50} -Werten deutlich über 150 $\mu\text{g/ml}$ (760 μM) (s. Abb. 3-8. b). Im Gegensatz dazu führte die *p*-Hydroxybenzoesäure in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 3-200 $\mu\text{g/ml}$ (22-1448 μM) bei beiden Behandlungsarten zu ähnlichen Ergebnissen.

3.1.1.3. Bestimmung der Toxizität von *p*-Hydroxybenzoesäure und Gallussäuremethylester

Um festzustellen, ob es sich bei den stark unterschiedlichen Zytotoxizitätswerten im MTT-Assay bei „Suspensions-“ und „Monolayer-Behandlung“ um ein Assay-typisches Phänomen handelt, wurde die Diskriminierung der toten Zellen mittels durchflusszytometrischer Messung nach Färbung mit Propidiumjodid (PI) als weitere Methode hinzugezogen. Im Unterschied zum MTT-Vitalitätstest interkaliert PI in die DNA von Zellen deren Membranintegrität verloren gegangen ist und markiert so die toten Zellen (Sasaki et al., 1987). Es wurden exemplarisch aus der Reihe der Benzoesäurederivate die *p*-Hydroxybenzoesäure und der Gallussäuremethylester verwendet, um eine Zeitkinetik der Zellschädigung zu erstellen.

Die eingesetzte Endkonzentration der Substanzen betrug 40 µg/ml. Bei dieser Konzentration zeigte die *p*-Hydroxybenzoesäure (289,6 µM) sowohl für suspendierte Zellen als auch für den Monolayer keine Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu führte der Gallussäuremethylester (218,4 µM) bei suspendierten Zellen zu einer deutlichen Schädigung der RAW 264.7-Zellen, nicht aber nach Ausbildung eines Zellmonolayers (s. Abb. 3-8). Aus der Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Methoden nach 6, 24, 48 und 72 h sowohl für die Behandlung des Monolayers als auch für die der Zell-Suspension wird deutlich (s. Abb. 3-9.): Eine zellschädigende Wirkung des Gallussäuremethylesters war nach 6 h sowohl im MTT-Assay als auch mittels PI-Assay mit Hilfe der Durchflusszytometrie nicht zu beobachten. Nach 24 Stunden zeigten beide Methoden eindeutig einen toxischen Effekt, wobei bei Verwendung der PI-Methode die Unterschiede zwischen den Behandlungsarten zu allen Messzeitpunkten (6, 24, 48, 72 h) nur geringfügig waren. Eine deutliche Differenz hingegen trat bei der MTT-Methode auf. So war die gemessene Toxizität nach 24, 48 und 72 h bei Behandlung der Zellsuspension immer um das zwei- bis dreifache höher als bei Behandlung eines ausgebildeten Zell-Monolayers (s. Abb. 3-9. a). Die mittels Durchflusszytometrie ermittelten Toxizitäten befanden sich im Mittel zwischen denen für die MTT-Suspension- und den MTT-Monolayer-Daten. Beiden Methoden ist gemeinsam, dass sie für den Gallussäuremethylester eine mit der Zeit zunehmende Zellschädigung nachwiesen (s. Abb. 3-9. a, c). Die *p*-Hydroxybenzoesäure zeigte sowohl zu allen gemessenen Zeitpunkten als auch nach beiden Behandlungsarten keine toxischen Effekte (s. Abb. 3-9. b, d).

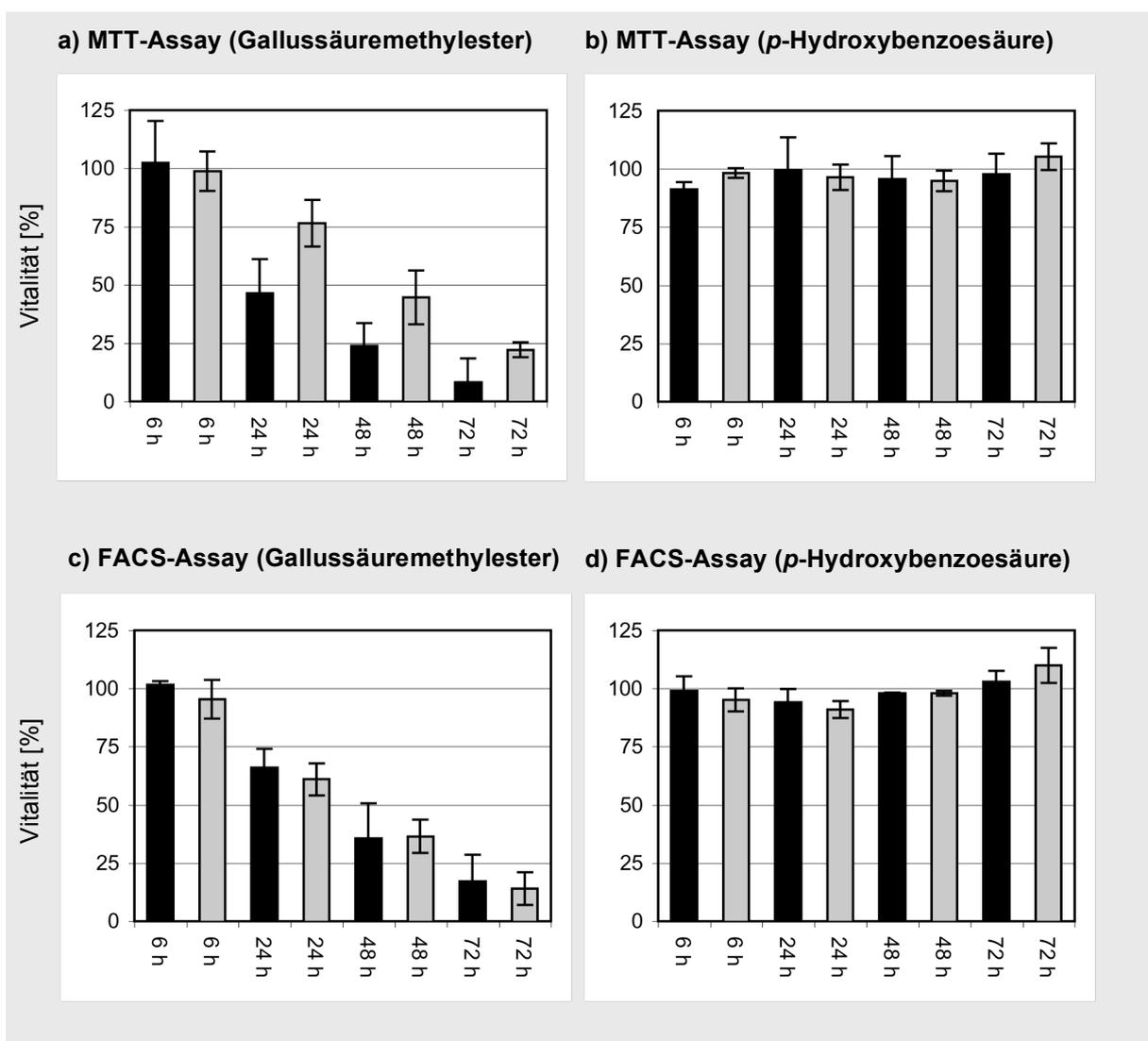


Abb. 3-9. Vergleich der ermittelten Toxizität für den Gallussäuremethylester (40 µg/ml) und die p-Hydroxybenzoesäure (40 µg/ml) im MTT- und FACS-Assay

Abbildungen a - d zeigen die Vitalität von RAW 264.7-Zellen 6, 24, 48, und 72 h nach Behandlung der Zellsuspension ■ bzw. des Zellmonolayers ■: **a)** mit Gallussäuremethylester (40 µg/ml bzw. 218,4 µM) im MTT-Assay, **b)** mit p-Hydroxybenzoesäure (40 µg/ml bzw. 289,6 µM) im MTT-Assay **c)** mit Gallussäuremethylester im FACS- mittels PI-Färbung, **d)** mit p-Hydroxybenzoesäure im FACS-Assay mittels PI-Färbung. Alle Werte wurden auf die Vitalität un behandelter Zellen bezogen. Die Mittelwerte wurden aus drei Versuchen bestimmt und die Standardabweichung aus der Grundgesamtheit berechnet.

3.1.1.4. Die Lyse als kritischer Schritt bei der Bestimmung antileishmanieller

Eigenschaften

Um den Einfluss von Substanzen auf das intrazelluläre Stadium von Leishmanien testen zu können, wurden RAW 264.7-Zellen mit *L. major* Promastigoten infiziert. Nach einer 24-stündigen Ruhephase wurden die Zellen mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen 48 h lang inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die

Wirtszellen mit SDS-Lösung (0,02%) lysiert. Durch Zugabe des Post-Lysis-Mediums wurde die Lyse gestoppt und so verhindert, dass die jetzt frei vorliegenden amastigoten Leishmanien geschädigt wurden. Nach deren Umwandlung in das promastigote Stadium und Vermehrung wurde die relative Anzahl vitaler Leishmanien pro Well durch MTT-Zugabe bestimmt und somit auf die Wirkung der Testsubstanzen geschlossen werden.

In der praktischen Anwendung traten allerdings Probleme auf, die eine Reproduktion erster gewonnener Daten nur schwer ermöglichten. Das Hauptproblem bei der Durchführung stellte die selektive Lyse der Wirtszellen dar. Wurde die Lyse zu lange durchgeführt, wurden die Leishmanien zusammen mit der Wirtszelle geschädigt bzw. abgetötet. Bei Schädigung eines Großteils der Parasiten musste die Zeit der Vermehrung von drei auf 5 - 10 Tage verlängert werden bis ihre Zahl ausreichte, um MTT merklich umzusetzen. Eine längere Dauer des Tests hatte wiederum stärkere Schwankungen der Vermehrungsrate / Kavität zur Folge und führte so zu ungenauen Messergebnissen. Eine Titration verschiedener Konzentrationen promastigoter Leishmanien mit MTT zeigte, dass wenigstens 3×10^5 Parasiten/Well für den Umsatz des Tetrazolium-Salzes innerhalb der üblichen 6 h Inkubationszeit mit MTT notwendig sind (s. Abb. 3-10.) (vgl. Kapitel. 2.10.3.).

Wurde hingegen die Lyse zu früh abgebrochen, proliferierte die Zelllinie weiter und führte so zu einer Verfälschung des MTT-Umsatzes. Der Endpunkt der Lyse wird mikroskopisch bestimmt, erfordert damit viel Erfahrung und ist schwer standardisierbar. Die Dauer der Lyse schwankt zudem noch je nach Versuch zwischen 7 und 20 Minuten (Kolodziej et al., 2001). Nachteilig ist auch, dass mit der Lyse eine Untersuchung der Wirtszelle zum Beispiel auf ihre Vitalität oder Oberflächenbeschaffenheit nicht mehr möglich ist. Zwar können parallel zu den infizierten Zellen auch nicht infizierte Zellen, wie beim MTT-Vitalitäts-Test geschehen, ausgesät und mit den Teststoffen versehen werden, um die Toxizität auf die Wirtszelle beurteilen zu können. Eine direkte Aussage, wie sich eine infizierte Zelle verhält, kann damit aber nicht getroffen werden.

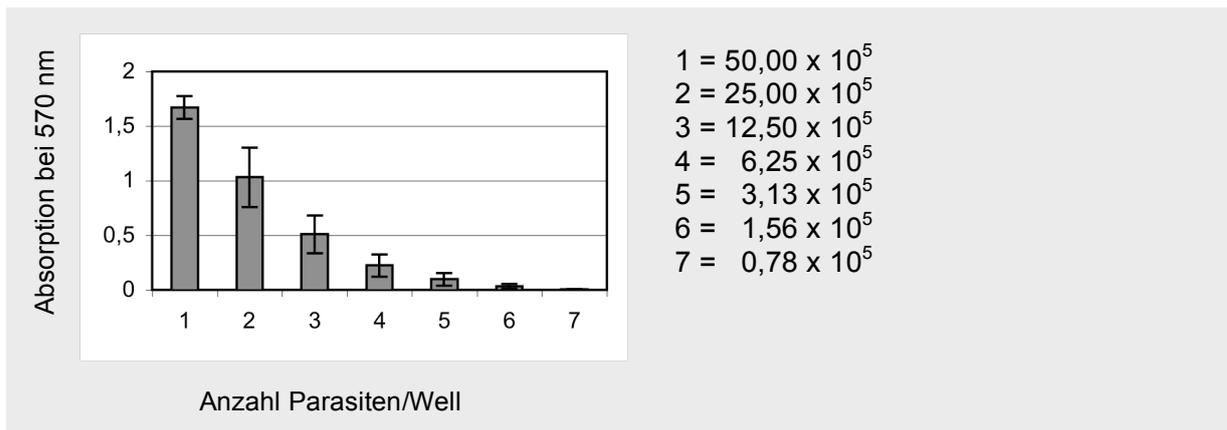


Abb. 3-10. MTT-Umsatz in Abhängigkeit von der eingesetzten Anzahl promastigoter Leishmanien

Die Abbildung beschreibt die Reduktion von MTT ($50 \mu\text{g}/\text{Well}$) innerhalb von 6 h durch promastigote *L. major* in der logarithmischen Wachstumsphase in abnehmender Anzahl bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Mediumleerwert wurde von den Messwerten abgezogen. Es wurden die Mittelwerte aus vier Versuchen mit der Standardabweichung aus der Grundgesamtheit verwendet.

3.2. Verwendbarkeit eines Antiserums gegen *Leishmania major*

Ziel war es, einen alternativen lysefreien Assay zu entwickeln. Um dies zu realisieren, sollten die intrazellulären Leishmanien so gefärbt werden, dass sie in den intakten Makrophagen detektiert werden können. Für die intrazelluläre Markierung sollte ein Antiserum mit Leishmanien spezifischen Antikörpern im Kaninchen generiert und auf seine Verwendbarkeit geprüft werden. Bei erfolgreichem mikroskopischem Einsatz sollte es auch auf den Einsatz in der Durchflusszytometrie getestet werden.

3.2.1. Gewinnung des Antiserums

Dazu wurden einem Chinchilla-Kaninchen pro Hinter- und Vorderlauf je $50 \mu\text{l}$ eines 1:1 Gemisches aus Adjuvans (Titer Max® Gold, Hauptbestandteile: Blockcopolymer, metabolisierbares Öl vom Squalentyp, Sorbitanfettsäureester) und Leishmanien-Protein ($25 \mu\text{g}$ Protein/ $50 \mu\text{l}$) appliziert. Nach vier Wochen wurden zur Verstärkung der Immunreaktion weitere $200 \mu\text{l}$ appliziert, um dann nach weiteren 10 Tagen das Tier zu entbluten. Aus der Vollblutmenge von 90 ml konnten 40 ml Serum gewonnen werden, welches vor Verwendung, zur Einstellung der optimalen Konzentration, noch mal 1:200 – 1:400 mit PBS verdünnt wurde.

3.2.2. Detektion von Leishmanien im extrazellulären, promastigoten Stadium

Vor Einsatz des Antiserums für die Färbung intrazellulärer Leishmanien wurde dieses auf seine Bindung an das extrazelluläre Stadium von *L. major* Wildtyp ausgetestet. Hierfür wurden Zytospin-Präparate mit Leishmanien im promastigoten Stadium angefertigt. Um die Spezifität des Antiserums zu überprüfen, wurden als Negativkontrollen die promastigoten Parasiten entweder mit Kaninchen-Normalserum 1:25 (dies wurde dem Kaninchen vor Immunisierung abgenommen) und mit dem R-Phycoerythrin, (546 nm, Ziege-anti-Kaninchen, 1:200) markierten Zweitantikörper (s. Abb. 3-11. a) oder nur mit dem gewonnenen Antiserum ohne Zweitantikörper behandelt (s. Abb. 3-11. b). Bei beiden Kontrollen wurden keine unspezifischen Signale beobachtet. Damit konnte eine unspezifische Bindung des Kaninchen-Normalserums bzw. eine störende Autofluoreszenz des Antiserums ausgeschlossen werden. Wichtig war auch zu zeigen, dass die Parasiten quantitativ mit dem Antiserum reagieren. Dazu wurde gezielt ein Ausschnitt des Präparates gewählt, der sowohl einzelne als auch ein Agglomerat aus mehreren Leishmanien beinhaltet und dieses mit Antiserum (1:200) und Zweitantikörper (1:200) behandelt, sowie mit Bisbenzimid gegengefärbt. Bisbenzimid wird dabei eingesetzt, um die DNA-haltigen Areale, insbesondere den Kinetoplasten und den Kern der Leishmanien zu markieren. Die Aufnahmen (s. Abb. 3.11. c und 3.11. d) zeigen ein und dasselbe Präparat bei verschiedenen Wellenlängen. Im UV Filter (300 - 400 nm) (s. Abb. 3-11. c), im Phasenkontrastkanal sind die durch Bisbenzimid markierten DNA-haltigen Areale (Anregung bei 352 nm) zu sehen, im Bandpassfilter bei 564 nm (s. Abb. 3-11. d) ist die Markierung durch den Zweitantikörper dargestellt. Die Gegenüberstellung der Signale durch Bisbenzimid-Färbung mit denen durch Antiserum und Zweitantikörper zeigte, dass alle Leishmanien zuverlässig mit dem gewonnenen Antiserum detektiert werden konnten.

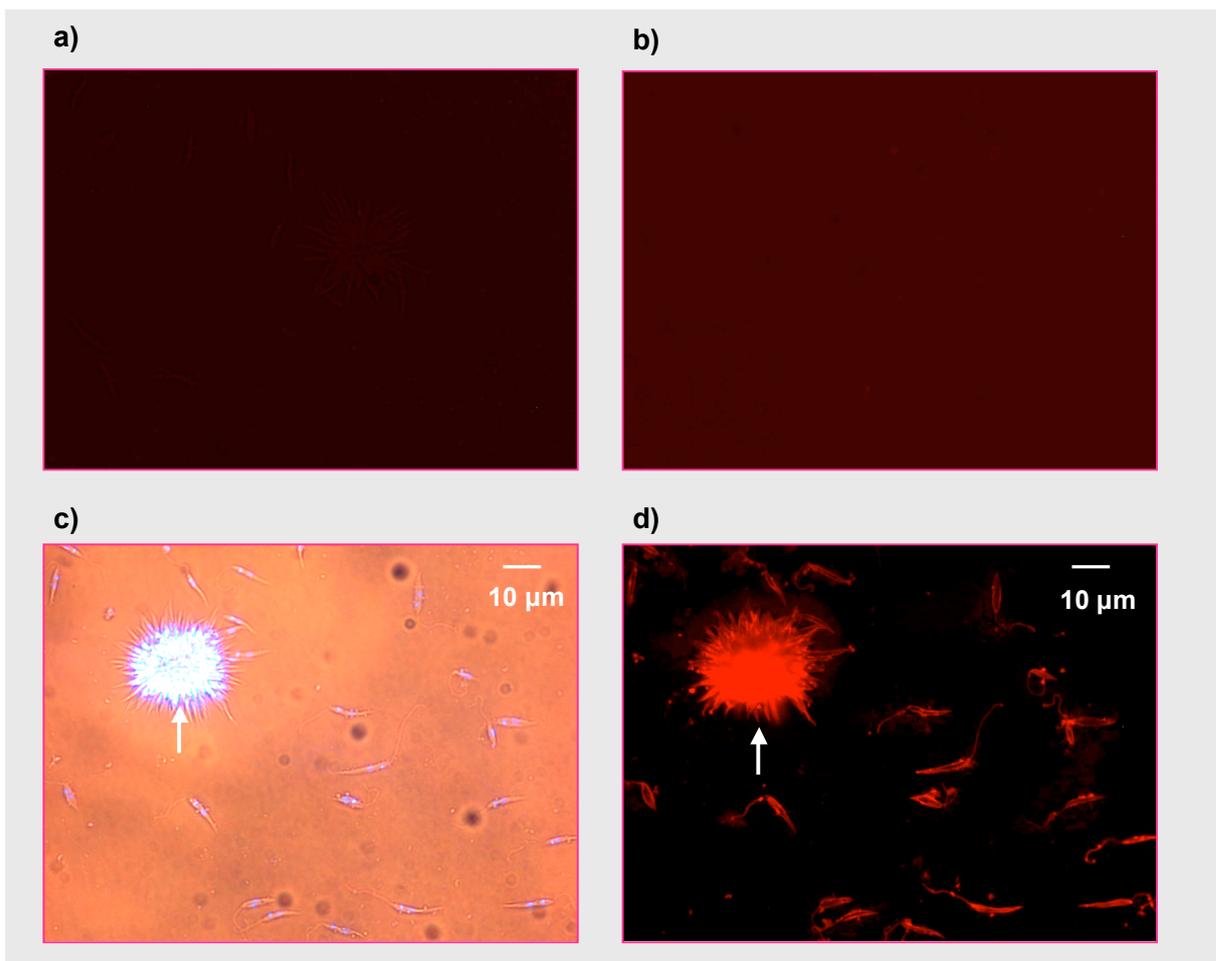


Abb. 3-11. Testung des Antiserums auf promastigoten Leishmanien

Die Abbildungen zeigen *L. major* Wildtyp Zytospin-Präparate nach Behandlung mit **a)** Kaninchen-Normalserum (1:25) und Zweit-Antikörper (R-Phycoerythrin-Ziege-anti-Kaninchen, 1:200). **b)** Kaninchen-Antiserum (1:200). **c)** Antiserum (1:200) und Zweitantikörper (1:200) angefärbt mit Bisbenzimid unter dem UV-Filter (300-400 nm) im Phasenkontrastkanal, **d)** Antiserum (1:200) und Zweitantikörper (1:200) angefärbt mit Bisbenzimid, wie bei Abbildung c allerdings im Bandpassfilter bei 546 nm. Der Pfeil in den Abbildung c und d markiert ein Leishmanien Agglomerat.

3.2.3. Detektion von Leishmanien im intrazellulären, amastigoten Stadium

Nachdem das Antiserum erfolgreich für das extrazelluläre Stadium getestet worden war, folgte der Einsatz zur Markierung des intrazellulären amastigoten Stadiums. Dem Antiserum sollte dabei durch Permeabilisierung der Makrophagenmembran mit Saponin aus Quillaja Rinde ermöglicht werden, mit den intrazellulären Leishmanien zu reagieren. Dazu wurden aus Knochenmarkstammzellen Makrophagen differenziert (BMM Φ) und ein Teil mit *L. major* nach dem Protokoll des MTT-Assays zur Bestimmung antileishmanieller Eigenschaften infiziert (vgl. Kapitel 2.9.), der andere Teil blieb unbehandelt. Nach 72 h wurden die

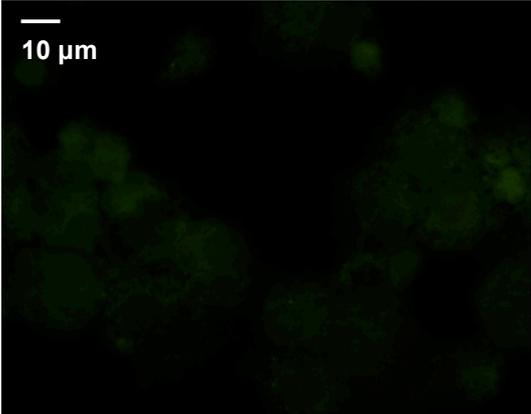
infizierten und nicht infizierten Zellen mit PBS gewaschen und Zytospin-Präparate angefertigt.

Um die Autofluoreszenz der Präparate zu ermitteln, wurden infizierte Zellen parallel zur eigentlichen Färbung mitgeführt (Waschen, Saponin Behandlung und Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit Ziegen-Normalserum). Bei diesen Kontrollen wurde weder Kaninchen-Antiserum noch Zweitantikörper (Alexa-Ziege-anti-Kaninchen IgG 1:200) eingesetzt. Wie aus der Abbildung 3-12. a zu entnehmen ist, zeigten die Zellen die für Makrophagen typische Autofluoreszenz in dem verwendeten Wellenlängenbereich von 450-490 nm. Als weitere Kontrollen wurden Zytospinpräparate infizierter und nicht infizierter Zellen nach dem Färbeprotokoll (vgl. Abschnitt 2.16.4.4.) behandelt. Allerdings wurde hierbei auf den Zweitantikörper verzichtet und einmal Kaninchen-Normalserum (1:200), das andere Mal Kaninchen-Antiserum (1:400) verwendet. Die Aufnahmen für infizierte Zellen (s. Abb. 3-12. b, c) zeigen, dass es weder zu falsch positiven Ergebnissen durch Behandlung mit Normalserum oder Antiserum, noch zu einem gesteigerten „Hintergrundfärbung“ bei 450-490 nm gekommen war. Es spielte auch keine Rolle, ob die Makrophagen infiziert oder nicht infiziert waren (ohne Abbildungen). Die Abbildung 3-12. d dokumentiert, dass der Zweitantikörper [(Ziege-anti-Kaninchen IgG 1:200 Alexa gekoppelt (488 nm)] ohne Antiserum nicht zu unspezifischen Signalen führte.

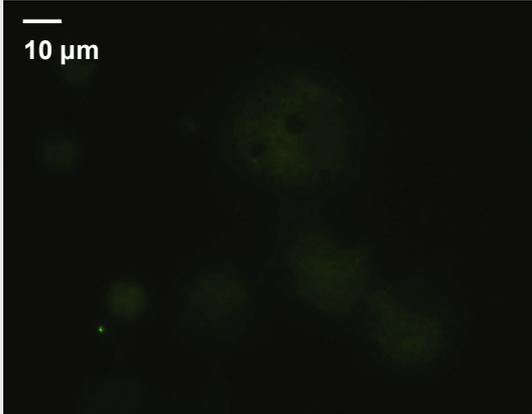
Eine weitere wichtige Kontrolle war die Behandlung mit Kaninchen-Normalserum und dem Zweitantikörper (s. Abb. 3-12. e). Die Aufnahme belegt, dass die Behandlung mit Normalserum zu keinen unspezifische Reaktionen mit den Makrophagen oder Leishmanien führte. Die Abbildung 3-12. f zeigt die erwünschte Markierung intrazellulärer Leishmanien nach Behandlung mit Kaninchen-Antiserum und dem Zweitantikörper.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Antiserum für die Markierung intra- und extrazellulärer Leishmanien geeignet ist. Die Autofluoreszenz der Makrophagen ist nicht so stark, dass sie das Signal der markierten Leishmanien überdeckt.

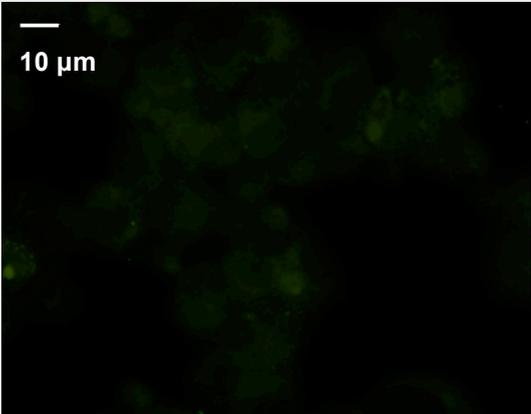
a) BMMΦ infiziert, Autofluoreszenz



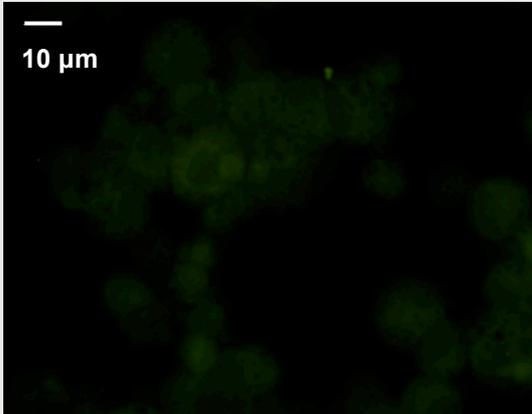
b) BMMΦ infiziert + Normalserum



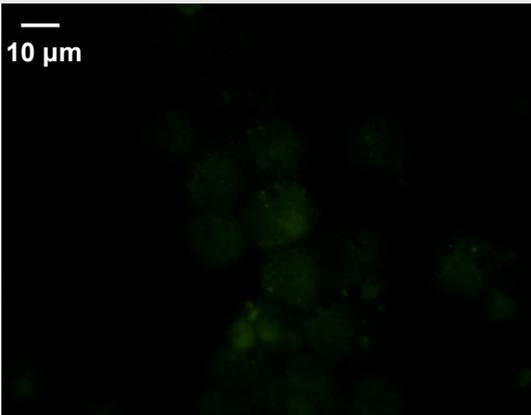
c) BMMΦ infiziert + Antiserum



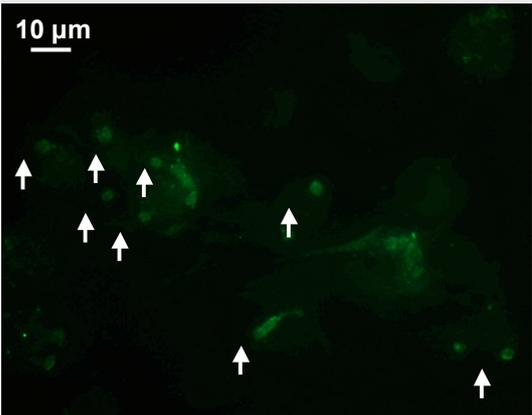
d) BMMΦ infiziert + 2. Antikörper



e) BMMΦ infiziert + Normalserum + 2. Antikörper



f) BMMΦ infiziert + Antiserum + 2. Antikörper



(Legende siehe Seite 59)

Abb. 3-12. Testung des Antiserums auf das intrazelluläre Leishmanienstadium

Zytospin-Präparate von BMM Φ 72 h nach Infektion mit *L. major* im Bandpassfilter bei 450-490 nm. **a)** Autofluoreszenzkontrolle, es wurden nur die Arbeitsschritte der Färbung (Waschen, Saponin-Behandlung und Blocken mit Ziegennormalserum) durchgeführt. **b)** Behandelt mit Kaninchen-Normalserum (1:200). **c)** Behandelt mit Kaninchen-Antiserum (1:400). **d)** Behandelt mit dem Zweit-Antikörper Alexa (488 nm) Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:200). **e)** Behandlung mit Kaninchen-Normalserum (1:200) und dem Zweitantikörper (1:200). **f)** gewünschte Diskriminierung der Leishmanien (exemplarisch mit weißen Pfeilen gekennzeichnet) mit Antiserum und dem Alexa-Farbstoff gekoppelten Zweitantikörper.

3.2.4. Verwendbarkeit des Antiserums zum Nachweis antileishmanieller

Effekte

Um beurteilen zu können, ob das Antiserum auch geeignet ist antileishmanielle Effekte zu detektieren, wurden BMM Φ infiziert und mit Testsubstanzen inkubiert. Exemplarisch wurde als Kontrolle für eine direkte antileishmanielle Wirkung das Arzneimittel Pentostam[®] verwendet. Für eine indirekte, durch Makrophagenaktivierung hervorgerufene Wirkung wurden 100 U/ml IFN- γ in Kombination mit 10 ng/ml LPS eingesetzt. 48 h nach der Behandlung wurden die Zellen gewaschen und Zytospin-Präparate angefertigt, die mit Antiserum und dem Zweitantikörper (Alexa-Ziege vs. Kaninchen 1:200) behandelt wurden.

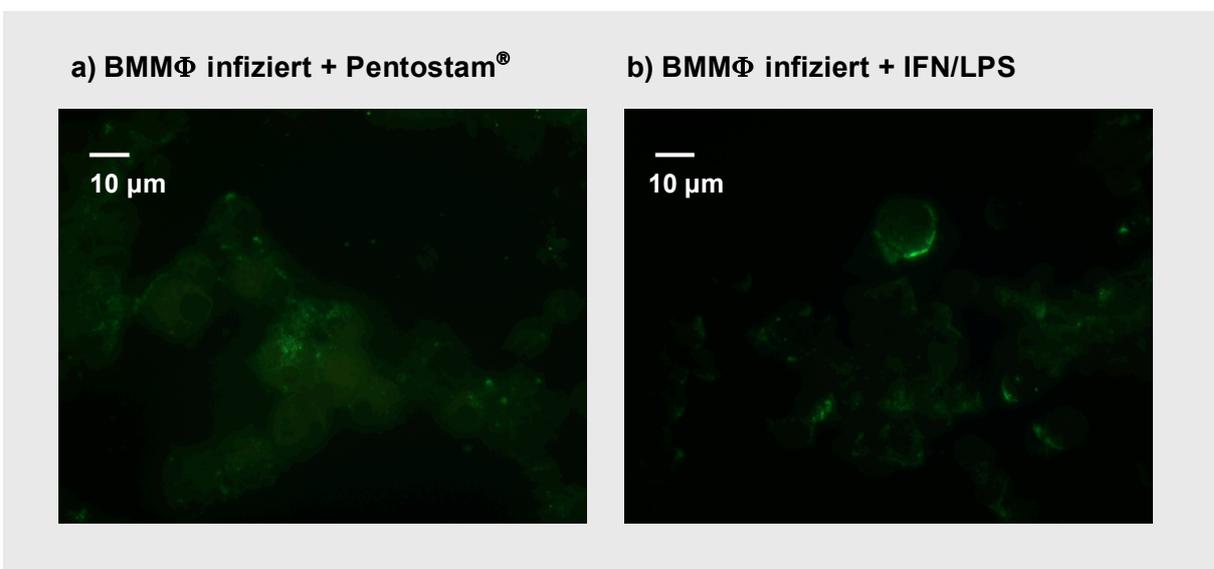


Abb. 3-13. Verwendung des Antiserums zum Nachweis antileishmanieller Effekte

a) BMM Φ infiziert mit *L. major* als Zytospinpräparat 48 h nach Behandlung mit Pentostam[®] gefärbt mit Kaninchen-Antiserum (1:400) und Zweitantikörper [Alexa (488 nm) Ziege-anti-Kaninchen, 1:200]. **b)** Infizierte Makrophagen, 48 h nach Behandlung mit IFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) gefärbt mit Kaninchen-Serum (1:400) und Zweitantikörper [Alexa (488 nm) Ziege-anti-Kaninchen, 1:200].

Den Abbildungen 3-13. a und 3-14. b ist zu entnehmen, dass die Anzahl der nach ihrer Morphologie eindeutig erkennbaren Leishmanien abgenommen hat, im Gegenzug aber die Membranen der Makrophagen verstärkt gefärbt wurde. Da die Färbung nur indifferent wurde, aber nicht verschwand, war ein eindeutiger Nachweis einer antileishmaniellen Wirkung mit diesem Verfahren nur schwierig möglich.

Die Konsequenz der mikroskopischen Untersuchungen war, dass von dem geplanten Einsatz des Antiserums in der Durchflusszytometrie Abstand genommen wurde. Die Abnahme des Signals mit Pentostam[®] bzw. rIFN- γ + LPS behandelte Leishmanien war dafür nicht deutlich genug.

3.2.5. Einsatz des Antiserums zur Detektion von Leishmanien und deren Antigen in Gewebeproben

Selbst wenn das Antiserum zur Ermittlung antileishmanieller Effekte im Makrophagen *in-vitro* Modell nicht besonders gut geeignet war, könnte es, wie unlängst in unserer Arbeitsgruppe für die Amöbe *Balamuthia mandrillaris* beschrieben (Kiderlen et al. 2004), seinen Einsatz zum analogen Färben von Gewebeproben Leishmanien-infizierter Mäuse finden.

Um diese Verwendungsmöglichkeit auszutesten, wurden einer Maus vom BALB/c Inzuchtstamm 5×10^6 *L. major* WT Parasiten aus der postlogarithmischen, infektiösen Wachstumsphase subkutan in die rechte hintere Fußsohle injiziert. Es wurde der BALB/c Mäusestamm verwendet, da dieser aufgrund seiner bevorzugt eingeleiteten T_H2 Immunantwort besonders sensitiv für eine klinisch manifeste Leishmanien-Infektion ist (Alexander et al., 2005). Nach vier Wochen war die Infektion so weit fortgeschritten, dass der Fuß eine deutliche Schwellung an der Injektionsstelle zeigte. Anschließend wurde das Tier durch cerebrale Dislokation getötet. Zur Vermeidung einer Autolyse wurde der Fuß sofort nach der Tötung abgetrennt, einmal in PBS gespült und dann in Paraformaldehydlösung 4% über Nacht fixiert. Anschließend wurde der Fuß mit Ameisensäure entkalkt und durch das Überführen in ethanolische Lösungen in aufsteigenden Konzentrationen dehydriert. Nach Ersetzen des Ethanols mit dem Intermedium Xylol wurde der Fuß in ein Xylol-Paraffin-Gemisch (1:1) überführt und anschließend in reinem Paraffin eingebettet.



Abb. 3-14. BALB/c Maus vier Wochen nach Infektion mit *L. major* Wildtyp Parasiten

Der rechte Fuß zeigt eine deutliche Schwellung, die auf eine vorangeschrittene Infektion hindeutet.

Nachdem das Paraffin ausgehärtet war, konnten Paraffinschnitte am Rotationsmikrotom angefertigt werden. Diese wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht, getrocknet und überschüssiges Paraffin durch Erwärmen entfernt. Für die immunohistochemische Färbung der Schnitte wurden diese durch einstündige Inkubation in Xylol und durch Waschschrte in Alkohollösungen in absteigenden Konzentrationen rehydriert. Anschließend wurden die Präparate in eine Küvette mit Zitratpuffer überführt und 20 Minuten auf 56 °C erwärmt, um durch Paraformaldehyd-Fixierung maskierte Antigene zu demaskieren. Nachdem die Objektträger in Wasser und danach in PBS gewaschen worden waren, wurden unspezifische Bindungsstellen durch Blocklösung abgesättigt.

Zunächst wurden Kontrollen angefertigt, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. So wurden Schnitte eines infizierten Fußes nur mit Blockpuffer und mit dem Zweitantikörper behandelt sowie mit Alex Fluor 546 Phalloidin und Bisbenzimid gegengefärbt. Hierbei zeigte der Zweitantikörper, der gegen Kaninchen IgG gerichtet ist und somit an Mausgewebe nicht binden darf, kein unspezifisches Signal im Mikroskop (s. Abb. 3-15. a).

Als weitere Kontrolle wurden Schnitte eines infizierten Fußes mit Kaninchen-Normalserum (1:200) und dem Zweitantikörper behandelt. Dieses Vorgehen dokumentierte, dass das Kaninchen-Normalserum per se nicht mit den Präparaten reagierte und demzufolge der gegen Kaninchen gerichtete Zweitantikörper nicht zu binden vermochte (s. Abb. 3-15. b). Um sicher zu gehen, dass die Signale auf Leishmanien bzw. auf vorhandenes Leishmanienantigen zurückzuführen sind, wurden außerdem Schnitte eines nicht infizierten Fußes angefertigt und parallel zu den Proben mitgeführt (s. Abb. 3-16. a).

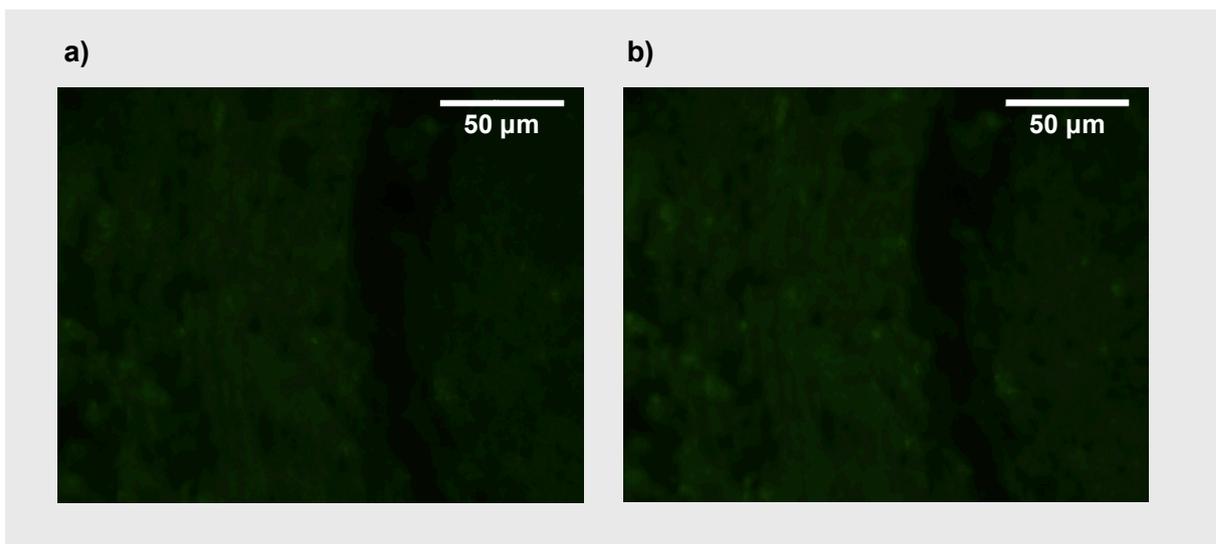


Abb. 3-15. Paraffinschnitte aus mit *L. major* WT infiziertem BALB/c Mäuse Fuß

a) Das Präparat wurde mit dem Alexa markierten Zweitantikörper behandelt (488 nm, Ziege-anti-Kaninchen, 1:200). **b)** Präparat wurde mit Kaninchen-Normalserum (1:200) und dem Zweitantikörper [Alexa (488nm) Ziege-anti-Kaninchen, 1:200] gefärbt.

Für eine spezifische Anfärbung von Leishmanien bzw. des Leishmanien-Antigens in Schnitten wurden die Präparate nach dem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit Kaninchen-Antiserum (1:300 in Blockpuffer verdünnt) behandelt. Anschließend wurde mit PBS gewaschen, und das gebundene Antiserum mit dem Zweitantikörper [Alexa (488nm) Ziege vs. Kaninchen, 1:200] markiert. Zusätzlich wurden die Schnitte mit dem roten Farbstoff Alex Fluor 546 Phalloidin, welches Aktin anfärbt, und dem DNA bindenden Fluorochrom Bisbenzimid gegengefärbt.

Den mikroskopischen Aufnahmen (s. Abb. 3-16. a und Abb. 3-16. b) ist zu entnehmen, dass das hergestellte Antiserum spezifisch mit Leishmanien und deren Antigen reagiert und so zur Beurteilung von infizierten Geweben geeignet ist. Deutlich sind Leishmanien als intensiv grün gefärbte Punkte und ihr Antigen als diffus grüne Bereiche zu erkennen (s. Abb. 3-16. b).

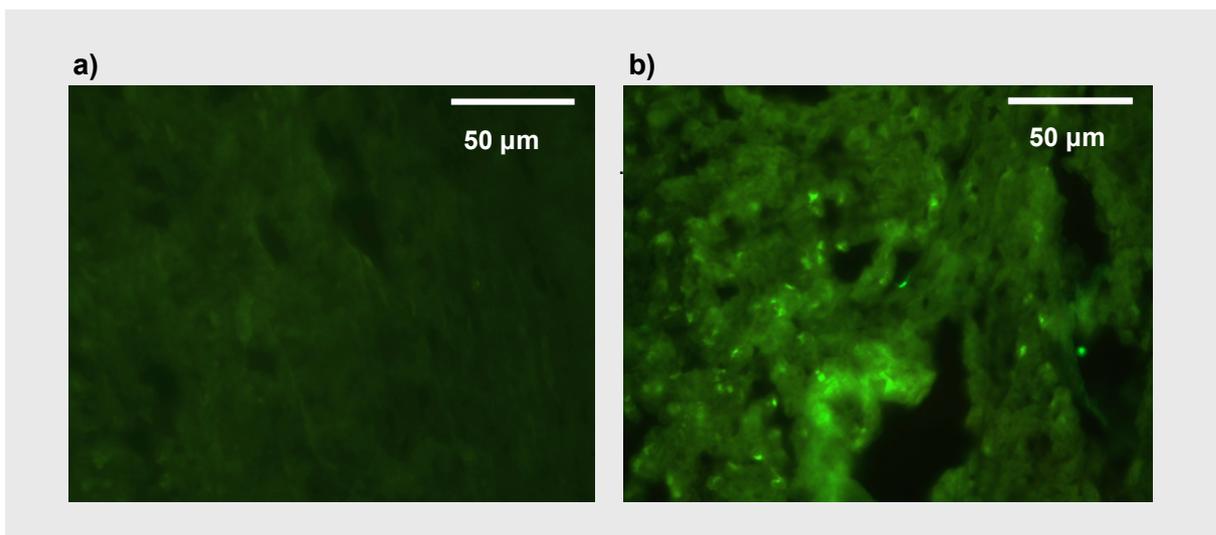


Abb. 3-16. Paraffinschnitt eines BALB/c Mäuse Fußes infiziert *L. major WT*

Präparate wurde mit Kaninchen Antiserum (1:300) und dem Zweitantikörper [Alexa (488nm) Ziege-anti-Kaninchen IgG, 1:200] gefärbt. **a)** Nicht infizierte Probe, **b)** infizierte Probe.

3.3. Entwicklung eines FACS- basierten antileishmaniellen Assays

Der Versuch, die Lyse der Wirtszelle durch intrazelluläre Markierung der Leishmanien mit Antiserum gegen Oberflächenantigene in Kombination mit einem Zweitantikörper zu umgehen, erschloss zusätzliche Einsatzmöglichkeiten für die mikroskopische Analyse von Gewebeproben. Eine *in vitro* Überprüfung von Substanzen auf ihre antileishmaniellen Eigenschaften war auf diese Weise allerdings nur ansatzweise möglich (s. Kapitel 3.2.). Eine alternative Methode wurde im Einsatz GFP-transfizierter Leishmanien und der Durchflusszytometrie gesehen zumal der Gebrauch der Durchflusszytometrie auch zur Bestimmung zytotoxischer Effekte Eingang in biochemische und medizinische Labors gefunden hat (Ellwart et al., 1988; Wing et al., 1998; King, 2000).

3.3.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht die simultane Erfassung diverser physikalischer Parameter wie die Granularität, die relative Größe der Zellen und des Weiteren bei markierten Zellen ihre relativen Fluoreszenzintensitäten. Fluorophore, wie das in dieser Arbeit verwendete Propidiumjodid oder die grün fluoreszierenden Proteine (GFP) der transfizierten Leishmanien, werden durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Bei Rückfall in den Normalzustand wird Licht in einer für das Molekül charakteristischen Wellenlänge emittiert.

Auf diese Weise wurden die Eigenschaften der mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Zellen gleichzeitig erfasst und analysiert.

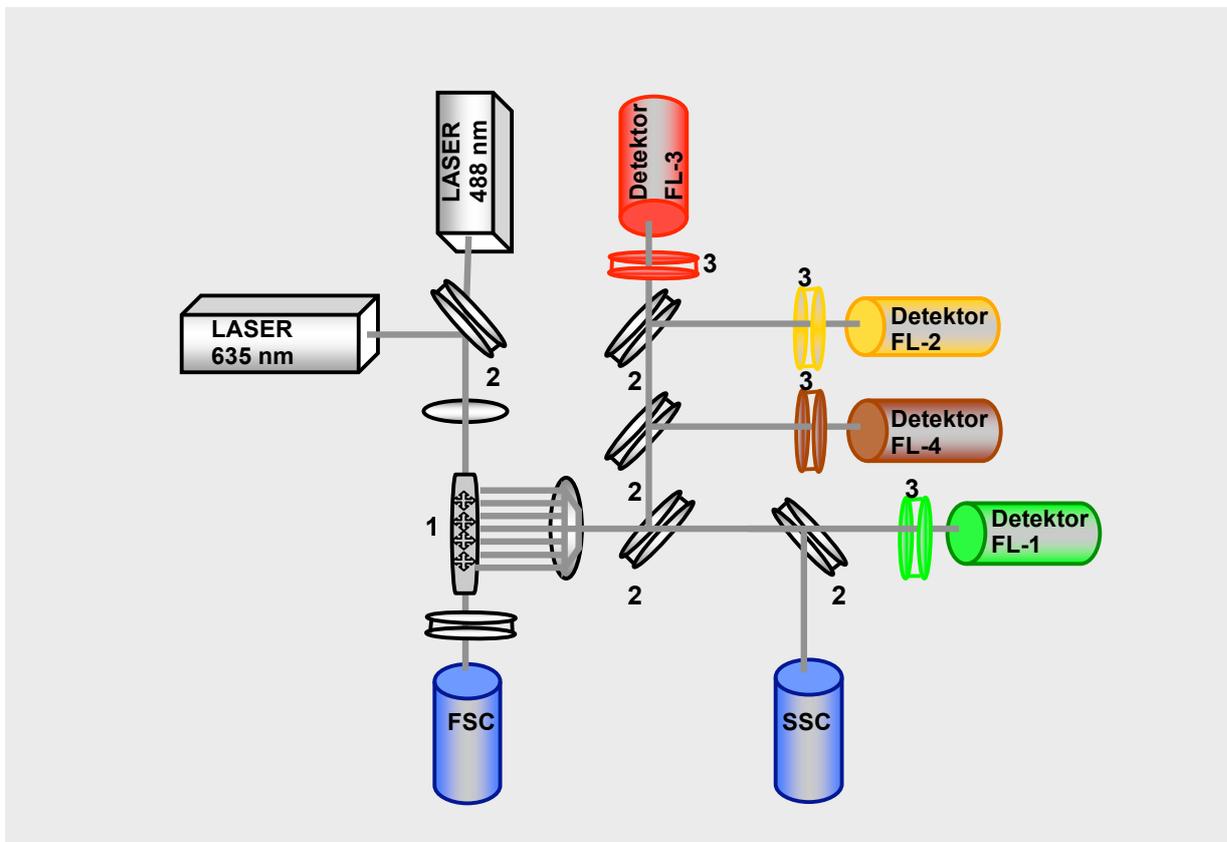


Abb. 3-17. Schematische Darstellung des Messprinzips des FACSCalibur

In der Messkammer (1) wurden markierte Zellen durch die Laser mit den Wellenlängen 488 nm und 635 nm bestrahlt und dadurch die Fluorophore angeregt. Nach Aufnahme der Energie wurde diese in Form von Licht charakteristischer Wellenlänge wieder emittiert. Weiter wurde das eingestrahlte Licht in Abhängigkeit von der Zellgröße und Granularität der an der Messzelle vorbei geführten Zellen gestreut. Das reflektierte und emittierte Licht wurde über durchlässige Spiegel (2) und verschiedene Filter (3) in separate Wellenlängenbereiche aufgeteilt und von Photoelektronenvervielfachern (Detektor FL1 – FL-4) erfasst. (Darstellung nach Katalog Becton Dickinson, 2004).

Die markierten Zellen wurden bei der Analyse im Durchflusszytometer über eine dünne Kanüle in einem laminaren Probenstrom vereinzelt, so dass pro Zeiteinheit nur eine Zelle an der Messkammer vorbeigeführt wurde. Das von den markierten Zellen gestreute Licht und die Emissionen der PI-Färbung oder des GFP wurden von speziellen Filtern in verschiedene Wellenlängen zerlegt und durch Detektoren (Photoelektronenvervielfacher) analysiert.

3.3.2. GFP-transfizierte Leishmanien

In der Literatur wurde bereits 1996 von Ha et al. der mögliche Einsatz von Leishmanien, die durch Transfektion ein grünes fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren, zur Erweiterung zellbiologischer Methoden diskutiert. Diese Eigenschaft erspart eine indirekte Markierung des Parasiten und könnte in unserer Arbeitsgruppe genutzt werden, um ein geeignetes FACS-basiertes Testsystem aufzubauen, mit dem sowohl eine durch Makrophagenaktivierung hervorgerufene als auch eine direkte Wirkung gegen Leishmanien gezeigt werden kann. Weiter sollte der Assay einfach in der Durchführung und Auswertung sein und damit einen hohen Probendurchsatz erlauben.

3.3.3. Verwendbarkeit des verfügbaren GFP-transfizierten Leishmanien-Stammes

3.3.3.1 Intensität und Stabilität des GFP-Signals transfizierter Leishmanien

Der hier verwendete Stamm *L. major* GFP wurde freundlicherweise von Herrn Professor Beverley, Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA, zur Verfügung gestellt. Um sich ein Bild von der Intensität und Stabilität des grün fluoreszierenden Proteins zu machen, wurden Zytospinpräparate mit promastigoten, extrazellulären Leishmanien und amastigoten, intrazellulären Leishmanien (72 h nach Infektion von BMM Φ) angefertigt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die promastigoten Leishmanien zeigten ein klares GFP-Signal im Fluoreszenzkanal (450 – 490 nm), welches allerdings bei längerer Lichtexposition durch das Mikroskop schnell verblasste. Nach zwei Minuten Bestrahlung waren die GFP-Signale der promastigoten Leishmanien nahezu komplett verblasst (s. Abb. 3-18. b).

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei den mit Leishmanien infizierten BMM Φ gemacht. So zeigten infizierte Makrophagen, je nach Infektionsgrad bzw. Lage der Leishmanien in der Wirtszelle ein mehr oder weniger intensives GFP-Signal (s. Abb. 3-18. c), welches in Abhängigkeit von der Dauer der Bestrahlung bis zum fast völligen Verschwinden nach ca. 5 Minuten kontinuierlich abnahm (s. Abb. 3-18. d).

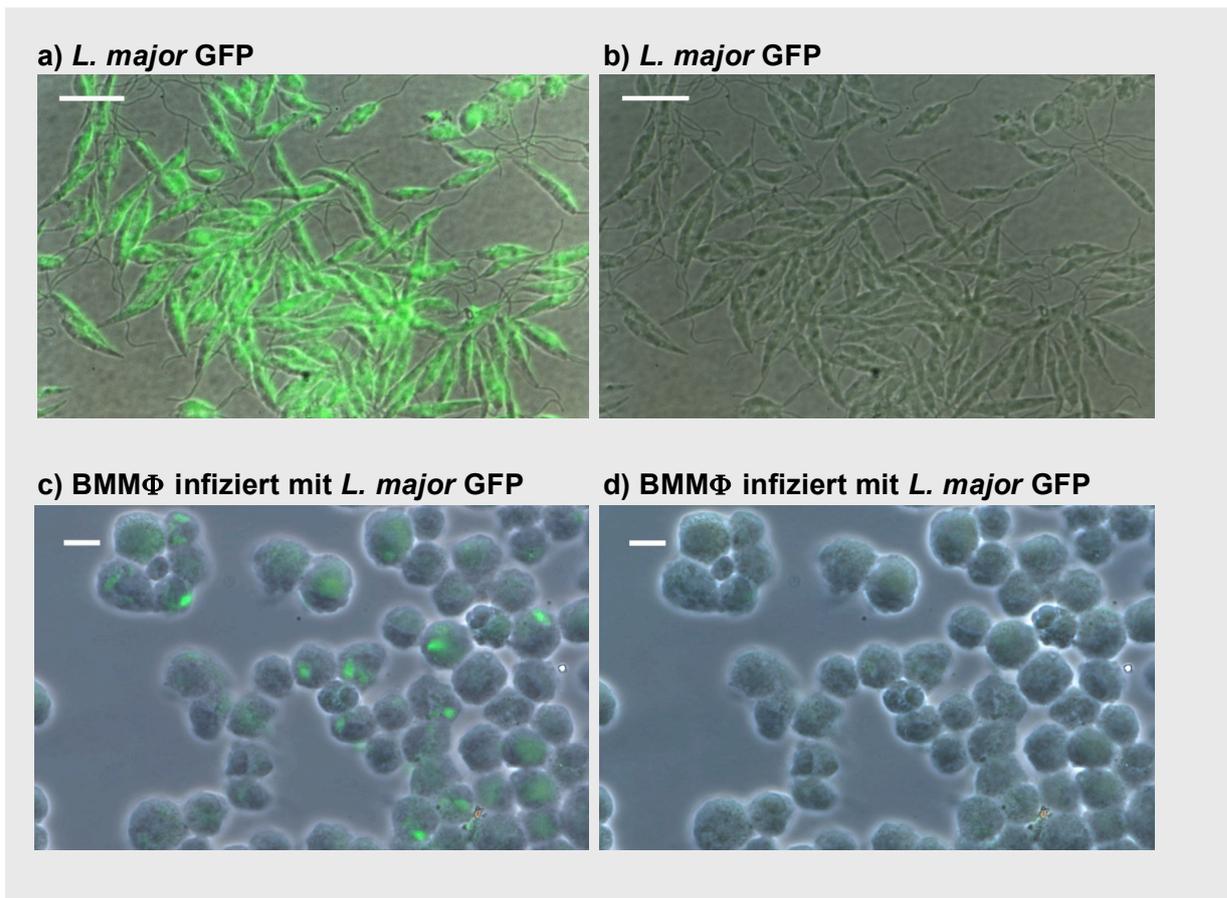


Abb. 3-18. Zytospinpräparate von promastigoten und intrazellulären amastigoten GFP-transfizierten Leishmanien

L. major GFP im promastigoten, begeißelten Stadium oder in BMMΦ 72 h nach Infektion mit *L. major* GFP wurden in PBS gewaschen, mit PFA-Lösung 4% fixiert und davon Zytospinpräparate angefertigt. Alle Bilder zeigen Aufnahmen im Fluoreszenzkanal (450-490 nm) unter Phasenkontrast **a)** *L. major* GFP (promastigot), **b)** *L. major* GFP (promastigot) nach ca. 2 min Lichtexposition im Fluoreszenzkanal, **c)** BMMΦ 72 h nach Infektion mit *L. major* GFP, **d)** BMMΦ 72 h nach Infektion mit *L. major* GFP nach ca. 5 min. Lichtexposition im Fluoreszenzkanal. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass das GFP-Signal nicht ausreichend stabil ist, um Infektionsraten durch Auszählen am Mikroskop zu bestimmen. Auch wäre das Signal nicht prägnant genug, um die Anzahl der Leishmanien pro infizierte BMMΦ eindeutig zu ermitteln. Dagegen sollte der Einsatz GFP-transfizierter Parasiten in der Durchflusszytometrie durch den „Bleicheffekt“ nicht beeinträchtigt sein, da hier die Zellen nur sehr kurz einer Anregungsenergie ausgesetzt sind.

3.3.3.2. Geneticin-Resistenz des Wildtyp- und des GFP-transfizierten Stammes

Der verwendete transfizierte Leishmanien-Stamm trägt auf ein und demselben Plasmid neben dem Gen für das grün-fluoreszierende Protein auch ein Resistenzgen für Geneticin. Dieses Aminoglykosidantibiotikum wird von *Micromonospora rhodorangea* produziert und besitzt ein breites antibiotisches Spektrum gegen Bakterien, Protozoen und Helminthen (Wagman et al., 1974). Durch die Zugabe von Geneticin in das Kulturmedium für promastigote Leishmanien wird der Parasit einem andauernden „Selektionsdruck“ ausgesetzt, infolge dessen das GFP-Signal auch bei längerer Kultivierung nicht verloren geht.

Um zu überprüfen, ob die dem Dauerkulturmedium zugegebene Geneticin-Konzentration ausreicht, um nicht transfizierte Leishmanien vom Wildtypstamm abzutöten wurde die Geneticin-Toleranz des transfizierten Stammes der Empfindlichkeit des Wildstammes gegenübergestellt. Dazu wurden der Wildtyp- und GFP-Stamm sieben Tage mit Geneticin in der Konzentration von 25 µg/ml (36 µM) inkubiert und danach durch MTT-Zugabe seine Vitalität überprüft. Die Behandlungsdauer von 7 Tagen wurde gewählt, da dies dem Zeitraum entspricht nach dem die Leishmanienkultur verdünnt wird oder aber für Infektionen eingesetzt wird (vgl. Kapitel 2.3.6.).

Die Auswertung ergab, dass die Vitalität der Geneticin-Behandelten transfizierten *L. major* GFP Leishmanien im Vergleich zu den unbehandelten Parasiten (100%) geringfügig auf 83% reduziert wurde (s. Abb. 3-19. a). Im Gegensatz dazu wurde der Wildstamm nach sieben Tagen Kultivierung in Geneticin-haltigem Medium abgetötet (99% tot) (s. Abb. 3-19. b). Mit diesem Versuch konnte die Geneticin-Resistenz des gentechnisch veränderten Stammes und die Empfindlichkeit des Wildstamms bestätigt werden. Die Verwendung von 25 µg Geneticin pro ml Kulturmedium für den transfizierten Stamm konnte daher als ausreichend beurteilt werden.

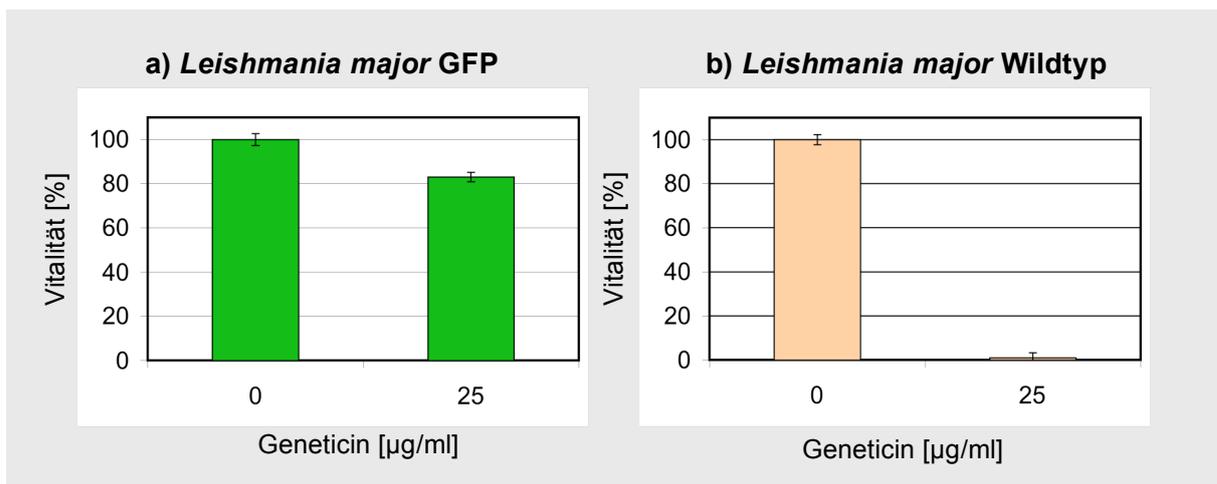


Abb. 3-19. Geneticin-Empfindlichkeit des *L. major* GFP- und Wildtyp-Stammes im MTT-Assay

a) Vitalität des *Leishmania major* GFP Stammes unbehandelt (links) bzw. nach 7 Tagen in Dauerkulturmedium versetzt mit 25 $\mu\text{g/ml}$ (36 μM) Geneticin (rechts). **b)** Vitalität des Wildstammes nach 7 Tagen in Dauerkulturmedium versetzt mit 25 $\mu\text{g/ml}$ (36 μM) Geneticin (rechts) in Relation zu unbehandelten Parasiten (links). Es wurden die Mittelwerte aus den Triplikaten eines repräsentativen Versuchs mit Standardabweichung aus der Grundgesamtheit angegeben.

3.3.3.3. GFP- und PI-Signal von promastigoten Leishmanien im FACS

Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz der transfizierten Leishmanien ist das rasche Verschwinden des GFP-Signals mit dem Tod des Parasiten. Nur bei einer direkten Korrelation des GFP-Signals mit der Vitalität des Parasiten besteht die Möglichkeit, die antileishmanielle Wirkung von Substanzen sowohl auf das extrazelluläre als auch auf das intrazelluläre Stadium zu testen.

Um dies zu überprüfen, wurden Promastigote vom Wildtyp- und GFP-Stamm mit dem antileishmaniell wirksamen Arzneistoff Amphotericin B behandelt. Nach 24 h wurden die Leishmanien mit PI gefärbt und am Durchflusszytometer vermessen. PI markiert Zellen mit gestörter Membranintegrität (tote Zellen) durch Interaktion mit der DNA (Sasaki et al., 1987; King, 2000).

Die unbehandelten transfizierten Leishmanien zeigten aufgrund ihres grün fluoreszierenden Proteins im Unterschied zum unbehandelten Wildtyp ein deutliches GFP-Signal im Kanal-1 (grüne Fluoreszenz, 515 nm - 545 nm) (s. Abb. 3-20. a oben). Sowohl der Wildtyp- als auch der GFP-Stamm zeigten keine Verschiebung in den Kanal-3 (rote Fluoreszenz, > 670 nm) und waren damit Propidiumjodid negativ, also vital (s. Abb. 3-20. a unten).

Die 24-stündige Behandlung mit Amphotericin B führte zur Abnahme der Fluoreszenzintensität des GFP-Signals des transfizierten Stammes (s. Abb. 3-20. b oben). Verglichen mit dem des Wildstammes war das Signal zwar intensiver in der Fluoreszenz-1, aber doch von den unbehandelten lebenden Leishmanien klar zu unterscheiden (s. Abb. 3-20. a oben, 3-20. b oben). Beide Stämme wurden durch die Amphotericin B - Behandlung abgetötet und waren deshalb in ähnlichem Maße Propidiumiodid positiv (s. Abb. 3-20. b unten). Außerdem war noch zu beobachten, dass es durch die Behandlung mit Amphotericin B beim Wildtyp zu einer leichten Rechtsverschiebung der Signale in der Fluoreszenz-1 kam (s. Abb. 3-20. a oben und 3-20. b oben), was wahrscheinlich auf die Autofluoreszenz des Antibiotikums zurückzuführen ist. Entscheidend aber ist, dass in diesen Experimenten lebende von toten *L. major* GFP Promastigoten sowohl durch die PI-Diskriminierung als auch durch die starke Abnahme in der Intensität des GFP-Signals deutlich unterschieden werden konnten.

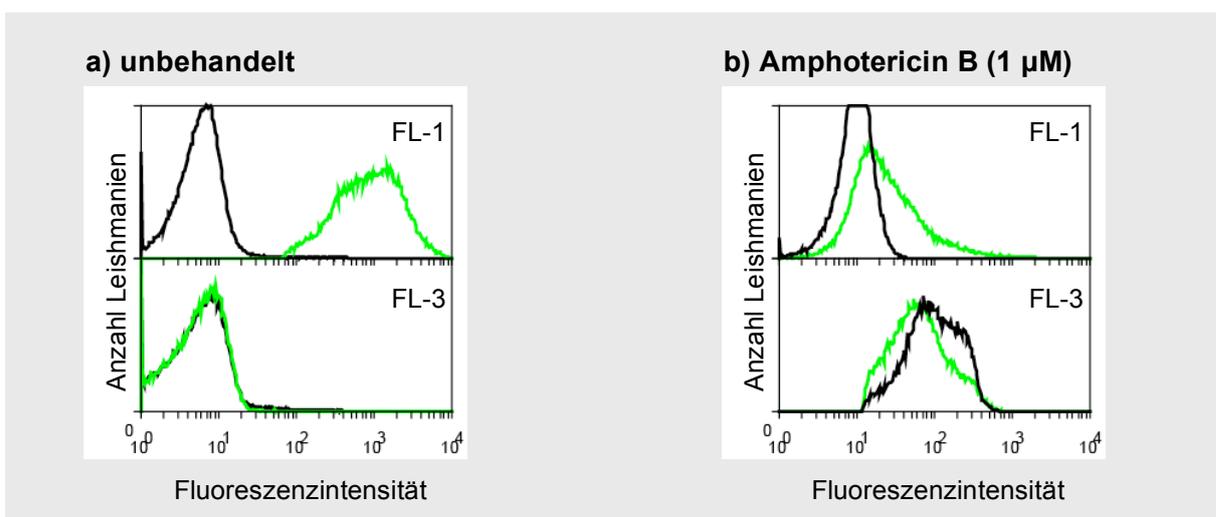


Abb. 3-20. Promastigote *L. major* 24 Stunden nach Amphotericin B - Behandlung

1×10^6 promastigote *L. major* GFP (grün) und *L. major* Wildtyp (schwarz) wurden in 5 ml Polystyrol Rundbodenröhrchen mit Deckel entweder mit $1 \mu\text{M}$ Amphotericin B behandelt (s. Abb. b) oder blieben unbehandelt (s. Abb. a). 30 Sekunden vor dem Vermessen am FACS wurde PI zugegeben. In der Fluoreszenz-1 ist das GFP-Signal zu finden, in der Fluoreszenz-3 das PI-Signal der toten Zellen. Die Abbildungen entsprechen einem von fünf vergleichbaren Versuchen.

3.3.4. GFP-Signal und intrazelluläre Leishmanienlast: Diskriminierung zwischen direkten und indirekten antileishmaniellen Effekten

3.3.4.1. Direkte Abtötung von intrazellulären Leishmanien durch Pentostam®-

Behandlung

Die einfache Testung von Substanzen auf dem extrazellulären Stadium des Parasiten gibt keinen Aufschluss, ob diese in der Lage sind, die Membran der Wirtszelle zu überwinden und in der parasitophoren Vakuole ihre Wirkung zu entfalten. Eine antileishmanielle Wirkung gegen promastigote Leishmanien kann zudem auf generell zytotoxische Eigenschaften zurückzuführen sein. Eine Auskunft, ob und inwieweit Wirtszellen geschädigt werden muss demnach separat untersucht werden. Ein durch Aktivierung der Wirtszelle induzierter Abwehrmechanismus ist bei dieser Art der Testung ausgeschlossen.

Deshalb wurde nach der Betrachtung der antileishmaniellen Wirkung von Amphotericin B auf den extrazellulären Erregern das Augenmerk auf das klinisch relevante, amastigote Stadium gelegt. Dazu wurden BMMΦ mit *L. major* GFP oder *L. major* Wildtyp infiziert. Danach wurden die BMMΦ in Aliquots in Polystyrol Rundbodenröhrchen mit Deckel aufgeteilt. Die Verwendung steriler Röhrchen mit Deckel anstelle von 24 Well Mikrotiterplatten ermöglichte eine vielfach einfachere, schonendere und dadurch verlustfreiere Behandlung der Zellen. So fanden alle folgenden Arbeitsschritte, wie die Inkubation mit Testsubstanzen, das Waschen mit PBS, die PI-Färbung sowie die Messung in den gleichen Röhrchen statt. Nach der Internalisierungsphase von 24 h, in der sich die aufgenommenen promastigoten Leishmanien in den Makrophagen zu amastigoten Leishmanien umwandelten, wurde eine mit GFP-Leishmanien infizierte Probe mit Pentostam® (Natriumstibogluconat, 100 µg Sb⁵⁺/ml Endkonzentration; s. Abb. 3-21. a) behandelt. Pentostam® ist ein Arzneimittel, dem eine Schlüsselstellung bei der Behandlung von Leishmaniosen (Oulette et al., 2004) zukommt. Als Negativkontrollen dienten mit dem Wildtyp bzw. mit dem transfizierten Stamm infizierte unbehandelte Proben (s. Abb. 3-21. b, c). 48 h nach der Behandlung wurde ein Teil der Zellen für das Anfertigen von Zytospinpräparaten und anschließende Diff-Quik® Färbung entnommen. Durch das Zentrifugieren der Zellen auf Objektträger konnten alle Zellen nahezu in einer Schärfenebene mikroskopiert werden. Zellkerne der BMMΦ und Leishmanien färben sich durch die Diff-Quik® Färbung rötlich-violett und das Zytoplasma lichtblau. Die restlichen Zellen wurden mit Propidiumjodid versetzt und am FACS vermessen. Deutliche Unterschiede zwischen den Proben waren dabei nicht zu erkennen.

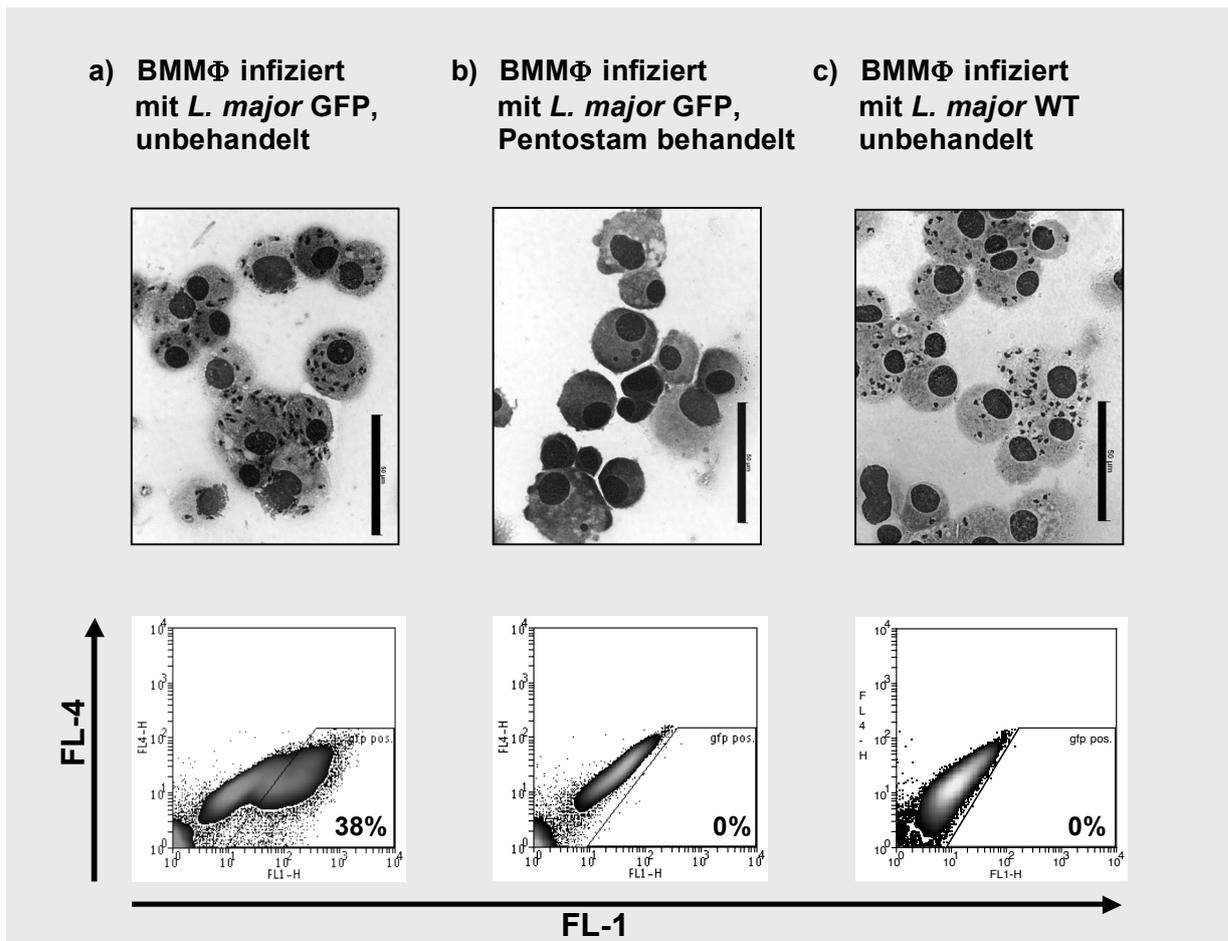


Abb. 3-21. Die Reduktion des GFP-Signals deckt sich mit dem Verschwinden der intrazellulären Leishmanien durch Pentostam® Behandlung

L. major GFP infizierte BMMφ blieben entweder unbehandelt (Abb. a) oder wurden mit Pentostam® (100 µg Sb⁵⁺/ml) 48 h behandelt (Abb. b). Kurz vor der Messung am FACS wurde ein Teil der Zellen zum Anfertigen von Zytospinpräparaten mit Diff-Quik®-Färbung für die anschließende Mikroskopie entnommen. Parallel wurden BMMφ mit dem Wildtyp-Stamm infiziert (Abb. c). 30 Sekunden vor der FACS-Analyse wurde PI zugegeben und die PI-positiven Zellen von der weiteren Betrachtung der Fluoreszenz im Kanal-1 ausgeschlossen. Die graphischen Darstellungen zeigen lebende Makrophagen und ihren GFP-positiven prozentualen Anteil. Der Größenbalken entspricht 50 µm.

Der Anteil PI-positiver, also toter Zellen, wurde vor der Auswertung des GFP-Signals der infizierten Makrophagen ausgeschlossen. In der graphischen Darstellung wurde der Fluoreszenzkanal-1 gegen den Fluoreszenzkanal-4 aufgetragen. Der Kanal-4 war weder durch das PI-Signal noch durch das GFP-Signal belegt und eignet sich deshalb als Zweitkanal für die Auswertung des GFP-Signals. Die FACS-Messung der mit *L. major* GFP infizierten BMMφ zeigte, dass 38% der Makrophagen Fluoreszenz-1 positiv und damit infiziert waren (s. Abb. 3-21. a). Nach Behandlung mit Pentostam® verschwand das GFP-Signal komplett (s. Abb. 3-21. b unten). Die intrazellulären Erreger wurden, wie auch durch die mikroskopische Aufnahme verifiziert werden konnte, abgetötet (s. Abb. 3-21. b oben). Den Nachweis, dass

das Signal im Fluoreszenz-1 Kanal spezifisch für den transfizierten Parasiten war, belegt die Abbildung 3-21. c. Die mikroskopische Aufnahme dokumentiert eine deutliche Infektion von BMM Φ mit *L. major* WT. Die durchflusszytometrische Auswertung zeigt nicht die geringste Beeinflussung der Fluoreszenz im Kanal-1.

3.3.4.2. GFP-Signalreduktion korreliert mit der Elimination der intrazellulären Leishmanienlast in den BMM Φ nach Behandlung mit rIFN- γ und LPS

Nach Betrachtung der direkten antileishmaniellen Wirkung von Pentostam[®] wurde die indirekte Wirkung durch Aktivierung der Makrophagen mit rekombinantem Interferon gamma (rIFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) ermittelt. Rekombinantes IFN- γ wurde verwendet, weil es unter den verschiedenen antileishmaniell wirksamen Makrophagen aktivierenden Zytokinen eine Schlüsselrolle spielt (Murray und Delph-Etienne, 1999). LPS ist ein Hauptbestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Es wird wegen seiner zytokinähnlichen Eigenschaften häufig als Stimulus für Entzündungsprozesse verwendet und ist in diesem Modell ein ausgezeichneter Co-Aktivator für Makrophagen (Mitchell et al., 2004).

In den durchgeführten Versuchen wurden *L. major* GFP infizierte BMM Φ mit rIFN- γ (100 U/ml) alleine oder in Kombination mit LPS (10 ng/ml) 6 h, 24 h und 48 h behandelt. Parallel wurden immer nicht infizierte und infizierte, unbehandelte Makrophagen als Kontrollen mitgeführt. Nach den Inkubationszeiten wurde mittels Durchflusszytometrie im Vorwärts- und Seitwärts-Scatter die Zellgröße und Granularität der Wirtszellen betrachtet (s. Abb. 3-22.). Die infizierten unbehandelten, mit rIFN- γ oder mit rIFN- γ + LPS behandelten Zellen verhielten sich dabei ähnlich wie die Kontrolle von nicht infizierten, unbehandelten Makrophagen. Besonders wichtig aber war, dass weder die mit rIFN- γ noch die mit rIFN- γ + LPS behandelten, infizierten BMM Φ , verglichen mit unbehandelten Zellen, eine gesteigerte Fragmentierung oder Artefaktbildung aufwiesen. Weiter konnte beobachtet werden, dass die nicht infizierten, unbehandelten Makrophagen mit voranschreitender Zeit granulärer wurden (s. Abb. 3-22., 6 h, 24 h vs. 48 h).

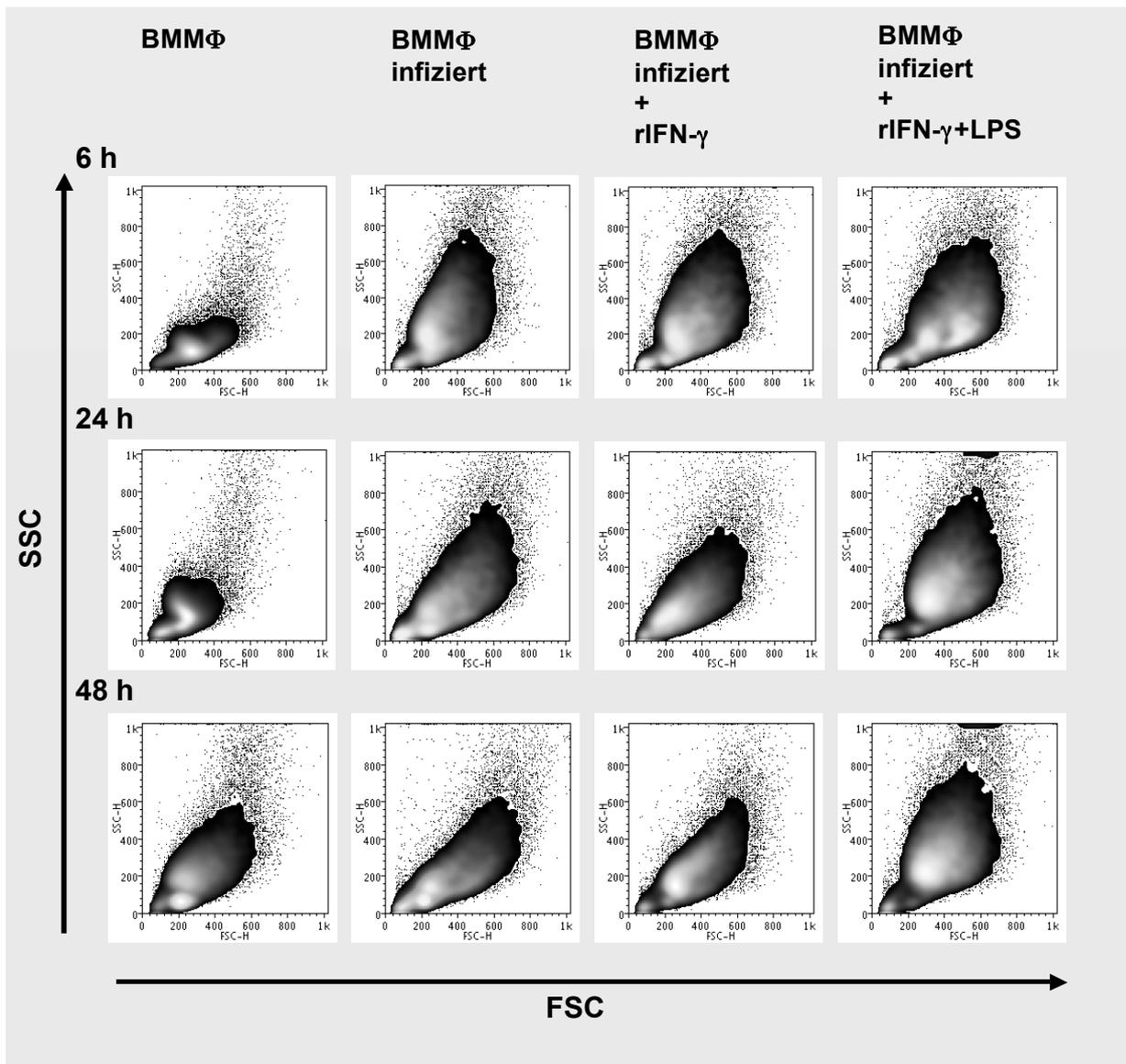


Abb. 3-22. Größe (Forward Scatter, FSC) und Granularität (Side Scatter, SSC) der BMMΦ

Aus Knochenmark ausdifferenzierte Makrophagen wurden mit promastigoten *L. major* GFP (1:8), infiziert und in 5 ml Polystyrol Rundbodenröhrchen mit Deckel überführt. Danach schloss sich eine 24-stündige Ruhephase an, während der sich die Leishmanien in das intrazelluläre amastigote Stadium umwandelten. Parallel wurden nicht infizierte Makrophagen als Kontrollen mitgeführt. Die einzelnen Proben blieben nach der Ruhephase entweder unbehandelt oder wurden weitere 6 h, 24 h und 48 h mit rIFN- γ (100 U/ml), oder rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) aktiviert, bevor ihre Größe (forward scatter, FSC) und Granularität (side scatter, SSC) im FACS bestimmt wurde. Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente mit ähnlichem Ergebnis.

Außer dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurde der prozentuale Anteil PI-positiver, toter Makrophagen in der Fluoreszenz-3 betrachtet. Die relative Anzahl toter Zellen nach 6 h, 24 h und 48 h war bei den nicht infizierten BMMΦ niedrig (4%, 4% und 3% aller Messereignisse)

und stieg bei den mit *L. major* GFP infizierten Zellen (13%, 10% und 18% aller Messereignisse) an (s. Abb. 3-23.).

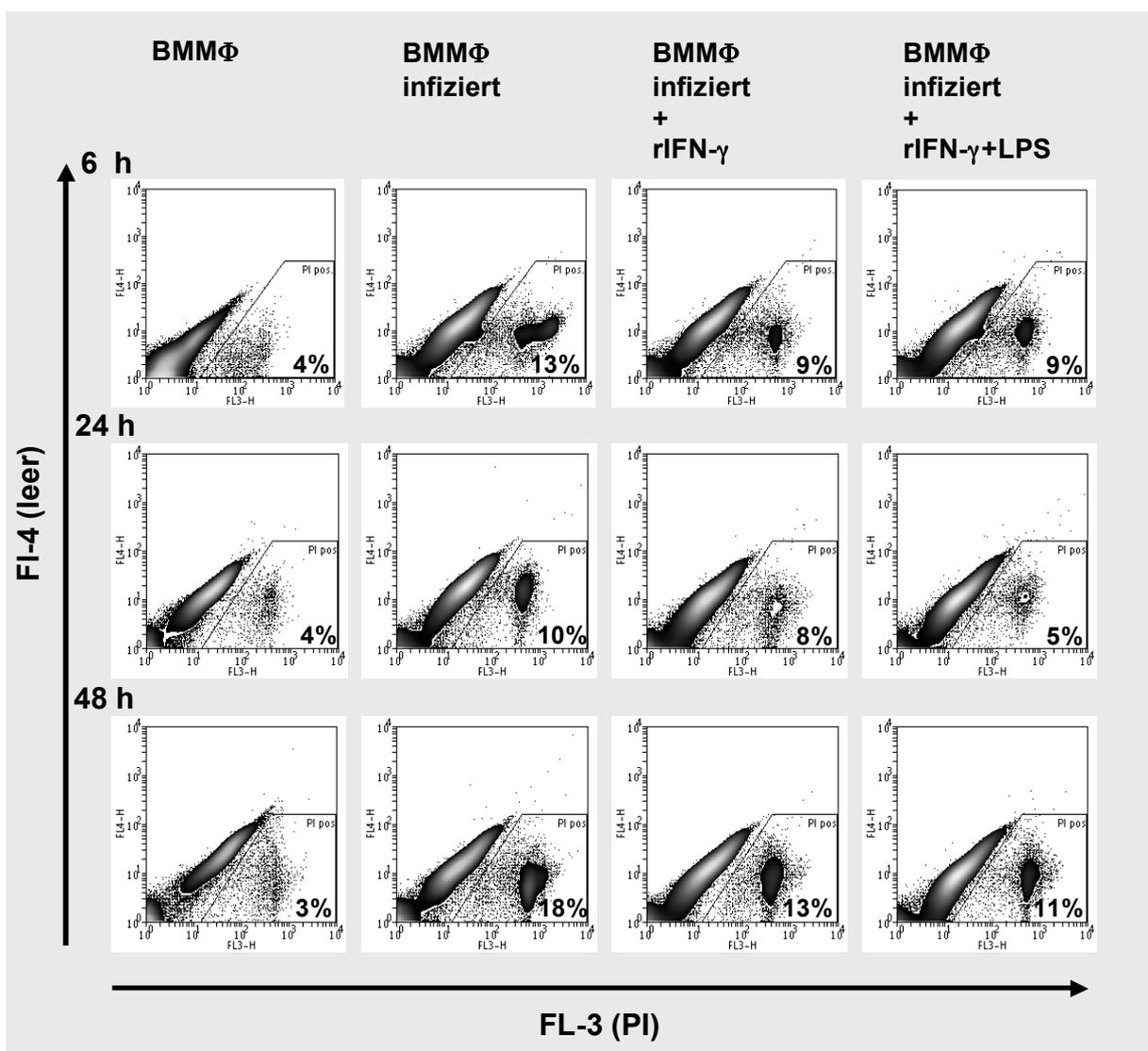
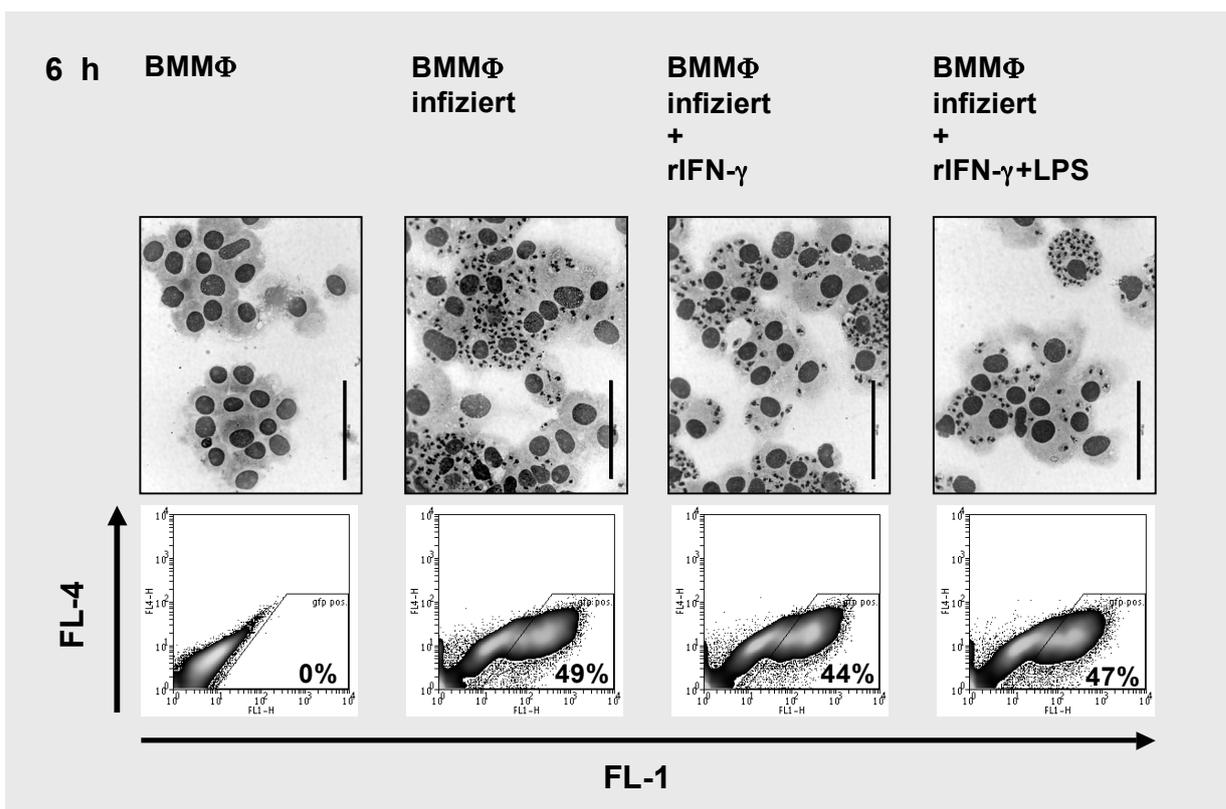


Abb. 3-23. Propidiumjodid positive (tote) vs. PI-negative (lebende) Makrophagen.

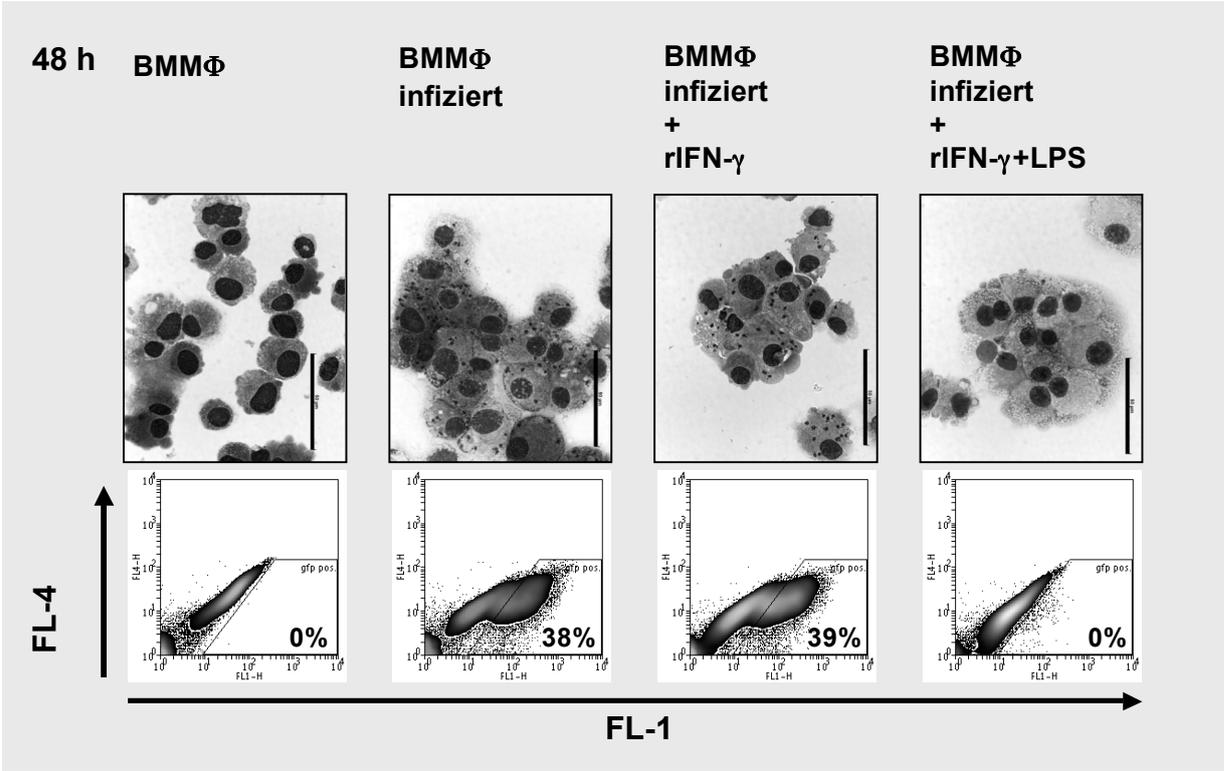
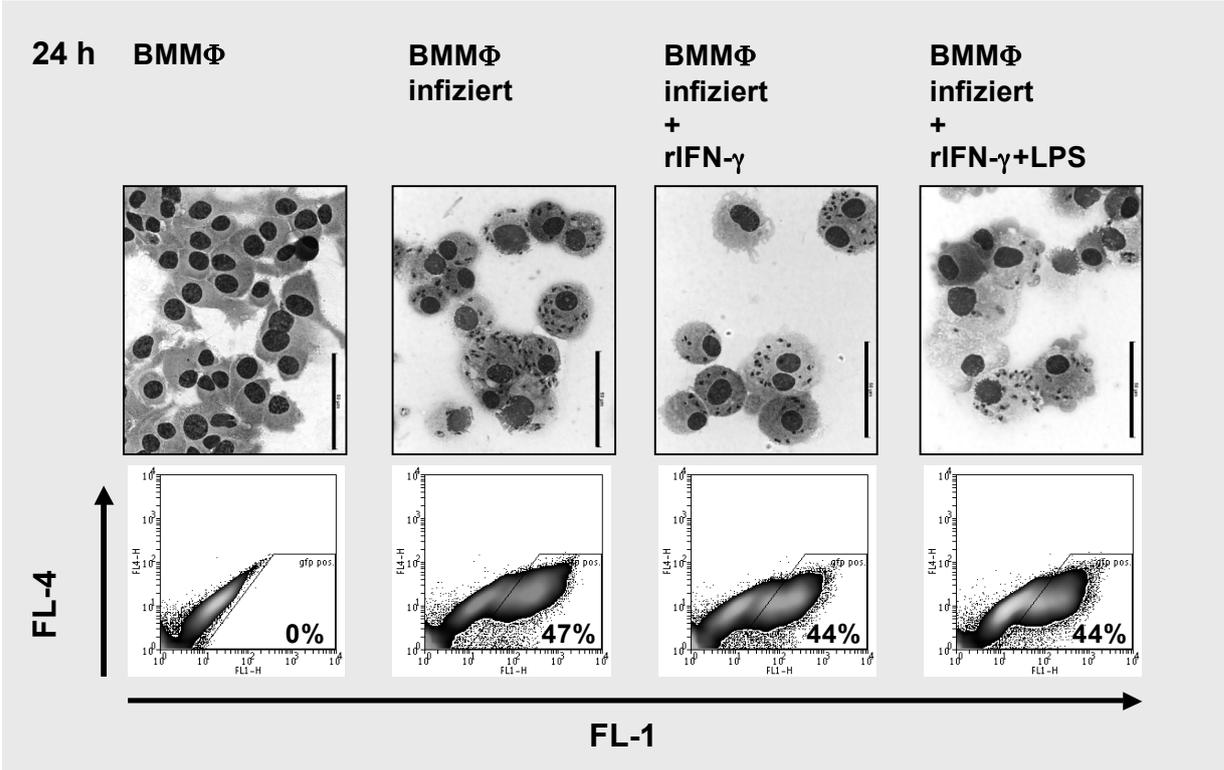
BMMΦ wurden mit promastigoten *L. major* GFP infiziert. Nach 24 h Ruhephase wurden die Proben weitere 6 h, 24 h bzw. 48 h mit rIFN-γ (100 U/ml), oder rIFN-γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. Parallel wurden nicht infizierte Makrophagen als Kontrollen mitgeführt. Unmittelbar vor der Analyse am FACS wurde den Proben PI zur Diskriminierung toter von lebenden Makrophagen zugegeben. Die Abbildungen zeigen den PI-positiven Anteil aller gemessenen Ereignisse. Ähnliche Resultate wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen beobachtet.

Die Behandlung der infizierten BMMΦ mit rIFN-γ oder rIFN-γ + LPS hatte tendenziell eine Reduktion der Anzahl toter Zellen zur Folge. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Infektion selber schon für das Absterben einiger Wirtszellen verantwortlich war und dass die Aktivierung der Wirtszelle die Rate toter Zellen tendenziell verringerte.

Nachdem die Granularität überprüft und der Anteil der toten Zellen ermittelt worden war, richtete sich das Interesse auf das GFP-Signal der Leishmanien im amastigoten intrazellulären Stadium. Die Behandlung mit rIFN- γ (100 U/ml) oder mit der Kombination von rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) beeinflusste den prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen nach 6 h (44% bzw. 47%) bzw. 24 h (44% für beide Behandlungen) kaum. Damit entsprach das GFP-Signal dieser Proben nahezu dem der infizierten unbehandelten Makrophagen (49% nach 6 h, 47% nach 24 h). Das Ergebnis konnte mit mikroskopischen Aufnahmen (s. Abb. 3-24.) untermauert werden. Bereits 24 h später (48 h nach Behandlung) erlosch das GFP-Signal bei den mit rIFN- γ + LPS behandelten nahezu vollständig (1%) (s. Abb. 3-24.). Im Vergleich dazu waren von den unbehandelten infizierten Makrophagen nach 48 h 38% GFP positiv. Die Inkubation mit rIFN- γ bis zu einer Konzentration von 100 U/ml alleine führte zu keiner Aktivierung der infizierten Makrophagen. Diese Beobachtungen bestätigten frühere Publikationen (Kiderlen und Kaye, 1990; Töttemeyer et al., 2006).



(Legende siehe Seite 77)



(Legende siehe Seite 77)

Abb. 3-24. Verschwinden des GFP-Signals und Reduktion der Leishmanien-Last durch Behandlung infizierter BMM Φ mit rIFN- γ und LPS

Nicht Infizierte und mit *L. major* GFP infizierte BMM Φ blieben entweder unbehandelt oder wurden mit rIFN- γ (100U/ml) oder rIFN- γ (100U/ml) + LPS (10 ng/ml) 24 bzw. 48 h inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde vor der Messung am FACS für mikroskopische Aufnahmen entnommen und Diff-Quik[®] Färbung unterzogen. Für die Bestimmung des Anteils toter Zellen wurde kurz vor der Messung am FACS PI zugegeben. Der Anteil der PI-positiven toten Zellen wurde ausgeschlossen und die Infektionsrate über das GFP-Signal bestimmt. Die Größenbalken entsprechen 50 μ m. Die Abbildungen stammen von einem von insgesamt drei durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

3.3.4.3. Verifizierung der am FACS-Gerät ermittelten Infektionsraten durch Mikroskopie

Die am FACS-Gerät über den Anteil GFP-positiver BMM Φ ermittelten Infektionsraten wurden mikroskopisch verifiziert und so die Sensitivität der FACS-basierten Methode ermittelt. Dies war notwendig, weil mittels Durchflusszytometrie nur der relative Anteil infizierter BMM Φ bestimmt werden kann und dies noch keinen Aufschluss auf die Anzahl der Parasiten pro BMM Φ liefert. Ob die FACS-basierte Methode sensitiv genug ist, auch Wirtszellen, die nur einen Parasiten phagozytiert haben, als infizierte (GFP-positive) Zellen zu erfassen, musste noch geklärt werden.

Dazu wurden die Infektionsraten dreier unabhängig durchgeführter Infektionen sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch bestimmt. Als geeignete mikroskopische Färbemethode wurde die Bisbenzimid-Färbung gewählt, die in unserem Arbeitskreis für diesen Zweck etabliert wurde (Laube und Kiderlen, 1998). Durch selektive Anfärbung DNA-haltiger Strukturen sind die nierenförmigen Kinetoplasten und Kerne der Parasiten deutlich zu erkennen und können so einfach und zuverlässig erkannt und ausgezählt werden. Von 300 ausgezählten Wirtszellen wurde der prozentuale Anteil der nur mit einem Parasiten infizierten Zellen, sowie der mit zwei bis fünf, sechs bis zehn bzw. mit mehr als zehn bestimmt und daraus die Infektionsrate errechnet.

Tab. 3-1. Mikroskopisch ermittelte Infektionsraten

Anzahl Parasiten / BMM Φ	1	2 - 5	6 - 10	> 10	Infektionsrate
Experiment 1	25%	30%	10%	3%	68%
Experiment 2	11%	1%	0%	0%	12%
Experiment 3	28%	25%	2%	1%	56%

Am Durchflusszytometer wurden in jedem Versuch 20.000 BMMΦ vermessen und daraus der prozentuale Anteil infizierter Zellen bestimmt.

Tab. 3-2. Durchflusszytometrisch ermittelte Infektionsraten

	Infektionsrate
Experiment 1	67%
Experiment 2	10%
Experiment 3	65%

In allen drei ausgezählten Versuchen war ein deutlicher Anteil der BMMΦ nur mit einem Leishmanium infiziert (25%, 11%, 28%). Der Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigt, dass diese nahezu identisch sind (Standardabweichung: 4%), und somit der FACS-Assay sensitiv genug ist, auch die gering infizierten Wirtszellen zuverlässig zu erfassen.

3.3.4.4. Anteil infizierter Makrophagen in Korrelation zu iNO-Werten nach Kreuztitration mit rIFN-γ, LPS und rTNF-α

Zum Nachweis des instabilen Nitrosyl-Radikals (NO^{\bullet}) wird die Konzentration des daraus unter anderem entstehenden Nitrits (NO_2^-) in den Zellkulturüberständen bestimmt. Es wird angenommen, dass die Menge Nitrit proportional zur produzierten iNO-Menge ist und somit zur Bestimmung geeignet ist. Die Nachweismethode beruht auf einer von Griess (1879) beschriebenen chemischen Reaktion und findet als einfache und schnell durchzuführende Methode routinemäßig Verwendung (Ding et al., 1988; Kiderlen and Kaye, 1990; Guevara et al., 1998). Dabei reagiert Nitrit mit Sulfanilamid und Naphthylethylendiamin im sauren Milieu zu einem roten Diazoniumsalz (s. Abb. 3-25.), welches bei 550 nm im Mikrotiterplatten-Photometer vermessen werden kann.

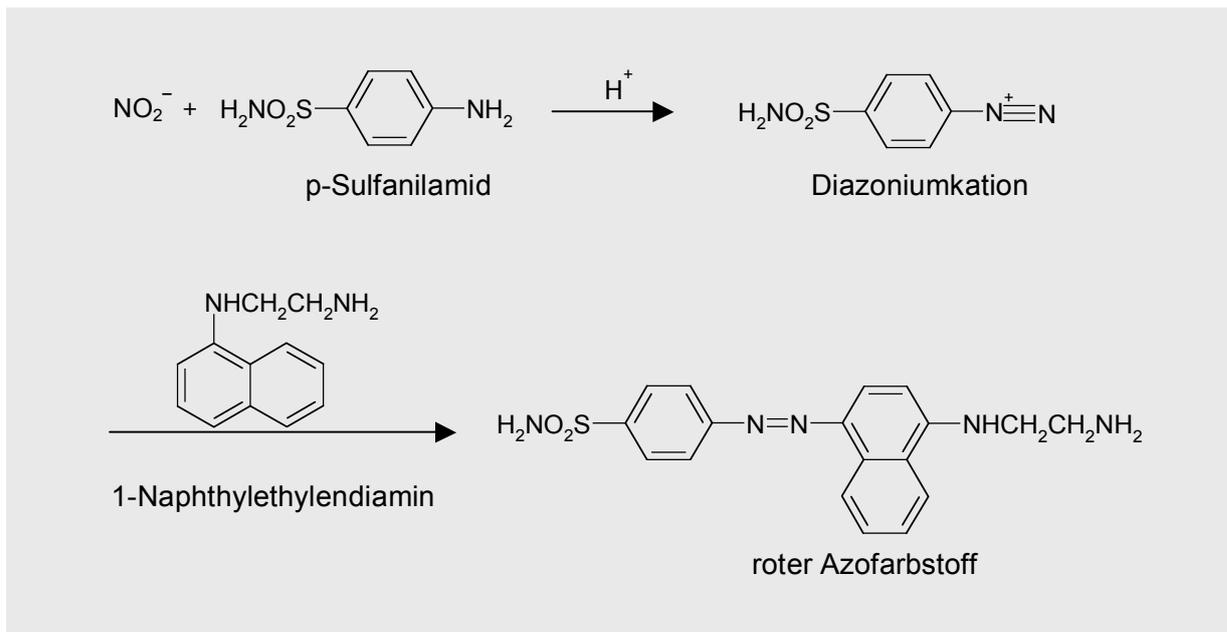


Abb. 3-25. Prinzip des Griess-Assays

Nitrit, ein Folgeprodukt des instabilen Stickstoffmonoxids, reagiert mit p-Sulfanilamid und 1-Naphthylethyldiamin im Säuren zu einer roten Azoverbindung, dessen Absorptionsmaximum bei 550 nm liegt.

In einer Kreuztitration mit aus der Literatur bekannten Standard-Aktivatoren für Makrophagen (rIFN- γ , LPS und rTNF- α) (Liew et al., 1990; Beutler et al., 2001; Mitchell et al., 2007) sollte die Funktionalität des Testsystems zur Ermittlung der Makrophagen-Aktivierung und der damit einhergehenden Reduktion der intrazellulären Leishmanienzahl weiter überprüft werden. Vor allem sollte gezeigt werden, dass der Assay geeignet ist, die zu erwartende Dosisabhängigkeit und die Auswirkung verschiedener Kombinationen von rIFN- γ , LPS und rTNF- α in Bezug auf das GFP-Signal zu ermitteln.

Hierfür wurden BMM Φ mit promastigoten *L. major* GFP infiziert, in 5 ml Polystyrol Rundbodenröhrchen mit Deckel aufgeteilt und nach einer 24-stündigen Ruhephase 48 h mit rIFN- γ (0, 10, 100 U/ml), LPS (0, 1, 10 ng/ml) und/ oder rTNF- α (0, 10, 100 U/ml) in allen möglichen Kombinationen (3^3 Möglichkeiten) inkubiert. Die Behandlungsdauer erschloss sich aus den vorangegangenen Versuchen, in denen gezeigt wurde, dass eine antileishmanielle Wirkung durch Makrophagenaktivierung mit rIFN- γ und LPS erst zwischen 24 und 48 h zu erwarten ist (s. Abb. 3-24.). Parallel wurden immer nicht infizierte, unbehandelte und infizierte mit Pentostam[®] (100 μg Sb⁵⁺/ml) behandelte BMM Φ als Kontrollen mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden vor der FACS-Messung die Überstände der verschiedenen Proben für den Griess-Assay (Ding et al., 1988) abgenommen. Mit Hilfe dieses

Assays wird die durch aktivierte BMM Φ produzierte und in den Zellkulturüberstand abgegebene induzierbare Stickoxid (iNO) Menge, gemessen als Nitrit (NO $_2^-$), bestimmt. Induziertes NO entsteht durch enzymatische Desaminierung der Aminosäure L-Arginin durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und ist unmittelbar an einem leishmaniziden Effekt beteiligt (Green et al., 1990; Lemesre et al., 1997). Nach Abnehmen des Überstandes wurde der Anteil der toten (PI-positiven) und der infizierten (GFP-positiven) Makrophagen am FACS bestimmt. Bei der Ermittlung der Infektionsrate wurden nur die lebenden (PI-negativen) BMM Φ betrachtet. Die Ergebnisse der Balkendiagramme (s. Abb. 3-26. a, b) beschreiben die Korrelation zwischen der Intensität des GFP-Signals und der gemessenen Nitrit-Konzentration, induziert durch Kreuztitration mit rIFN- γ (0, 10, 100 U/ml) und LPS (0, 1, 10 ng/ml).

LPS allein in sehr niedriger Konzentration (1 ng/ml) führte zu keiner Aktivierung der Wirtszelle (keine detektierbare iNO-Produktion) und zeigte auch keinen Einfluss auf die Infektionsrate (s. Abb. 3-26 a). Auch bei Verwendung von 10 ng/ml LPS war keine wesentliche Veränderung in der Intensität des GFP-Signals (76%) zu beobachten. Im Gegensatz dazu führte das Zusammenspiel zweier Stimuli selbst bei Einsatz niedriger Konzentrationen (rIFN- γ 10 U/ml + LPS 1 ng/ml) zu einer deutlichen Reduktion des GFP-Signals (50%) im Vergleich zu den unbehandelten Makrophagen (100%) (s. Abb. 3-26 a). Parallel zur beobachteten Abnahme der intrazellulären Leishmanien war auch ein Anstieg der Nitrit-Konzentration (von 0,1 μ M auf 7,2 μ M) zu verzeichnen (s. Abb. 3-26 b). Bei Erhöhung der LPS-Konzentration auf 10 ng/ml, wieder in Kombination mit rIFN- γ 10 U/ml, kam es nahezu zur kompletten Eradikation der Leishmanien (4% GFP-Signal), was sich auch in den relativ hohen Nitrit-Werten (13,6 μ M) widerspiegelte. Eine weitere Erhöhung der rIFN- γ -Konzentration auf 100 U/ml in Kombination mit LPS 10 ng/ml konnte den schon deutlichen antileishmaniellen Effekt kaum noch steigern (von 4% auf 2% GFP-Signal, von 13,6 μ M auf 16,4 μ M NO $_2^-$ -Konzentration). Dass die Steigerung der rIFN- γ -Konzentration aber durchaus einen Einfluss auf die Makrophagenaktivierung und damit auf die Infektionsrate hatte, wird deutlich, wenn man die Effekte der Behandlung mit rIFN- γ 10 U/ml + LPS 1 ng/ml (50% GFP-Signal) mit denen mit rIFN- γ 100 U/ml + LPS 1 ng/ml (8% GFP-Signal) vergleicht. Von Bedeutung ist zudem die Beobachtung, dass eine Inkubation mit rIFN- γ alleine (10 bzw. 100 U/ml) keine messbare Wirkung induzierte. Dieser Befund deckt sich mit früheren Beobachtungen (Kiderlen et al., 1990). Die mit Pentostam[®] behandelten Kontrollen zeigten in

Einklang mit dem direkten Wirkmechanismus (keine Aktivierung der Wirtszelle) nur eine sehr geringfügige iNO-Produktion. Die Infektion mit den Parasiten selbst hatte auch keine Aktivierung zur Folge, was in Übereinstimmung mit früheren Befunden steht (Ritter et al., 2004).

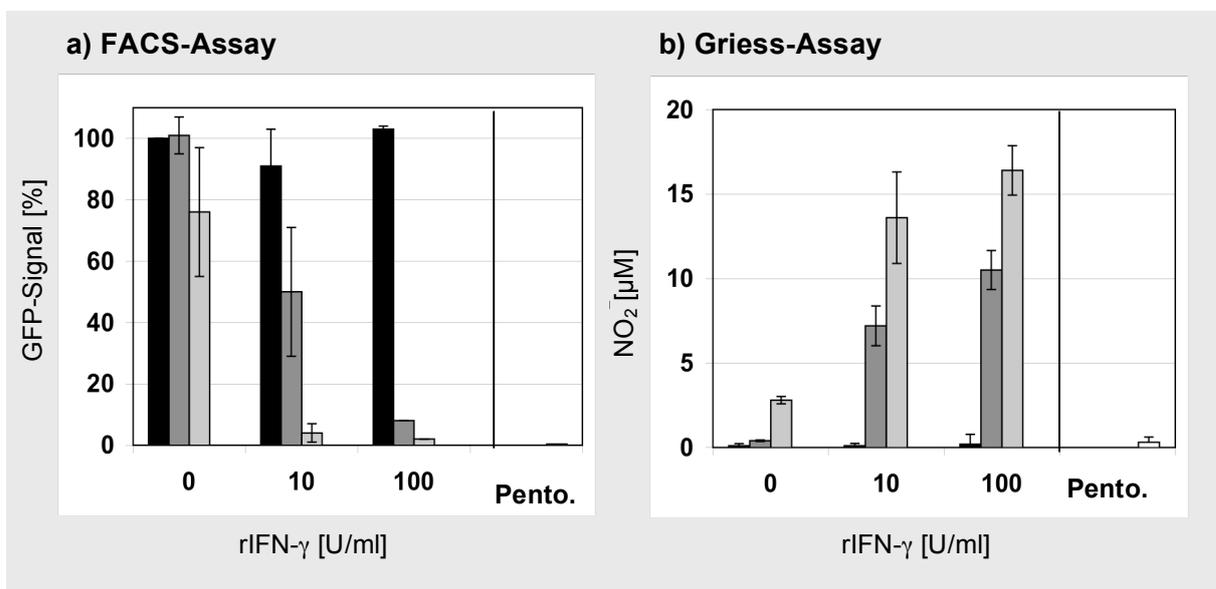


Abb. 3-26. Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in infizierten BMMΦ durch rIFN-γ und LPS Behandlung

L. major GFP infizierte BMMΦ wurden 48 h mit 0 U, 10 U, 100 U rIFN-γ/ml in Kombination mit 0 ng (■), 1 ng (■), 10 ng (■) LPS/ml inkubiert. Vor der Messung der Infektionsrate am FACS (s. Abb. a) wurden die Überstände mittels Griess-Assay auf Nitrit (NO₂) getestet (s. Abb. b). Mit Pentostam® (100 μg/Sb⁵⁺/ml) behandelte Proben wurden als Kontrollen für eine direkte antileishmanielle Wirkung verwendet. Kurz vor der FACS-Analyse wurde den Proben PI zugegeben und der prozentuale Anteil PI-positiver (toter) Zellen bestimmt und vor Bestimmung des GFP-Signals (Infektionsrate) ausgeschlossen. Die Rate infizierter BMMΦ wurde in Prozent bezogen auf die unbehandelten infizierten Makrophagen dargestellt. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung dargestellt.

Die Inkubation mit rTNF-α (0, 10, 100 U/ml) alleine über 48 h hatte weder Einfluss auf die iNO-Produktion, noch auf die Infektionsrate. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Literaturangaben (Liew et al., 1990). Ein synergistischer und konzentrationsabhängiger Effekt war nur in Kombination mit rIFN-γ (100 U/ml) oder in Kombination mit rIFN-γ (10 U/ml) + LPS (1 ng/ml) erkennbar (s. Abb 3-27. a, b). In Kombination mit einer höheren LPS Konzentration (10 ng/ml) schloss sich eine Verstärkung des leishmaniziden Effektes aus, da die beiden Stimuli bereits ohne rTNF-α zu einem fast völligen Verschwinden des GFP-Signals führten (s. Abb. 3-27. a, b).

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass in diesem Modell im Zusammenspiel der Stimuli rIFN- γ , LPS und rTNF- α eine deutliche antileishmanielle Wirkungssteigerung begründet war. Am stärksten fiel dieser Effekt bei der Kombination von rIFN- γ (100 U/ml) mit LPS 1 ng/ml ins Gewicht. rIFN- γ sowie rTNF- α brachten alleine in den betrachteten Konzentrationen keine Wirkung. Ein leichter Effekt durch alleinige LPS-Zugabe (10 ng/ml) konnte beobachtet werden. Durch Kombination sowohl von LPS mit rIFN- γ , als auch von rTNF- α mit rIFN- γ konnte die Wirkung gesteigert werden. Ein konzentrationsabhängiger Synergismus zwischen LPS und rTNF- α konnte allerdings nicht beobachtet werden.

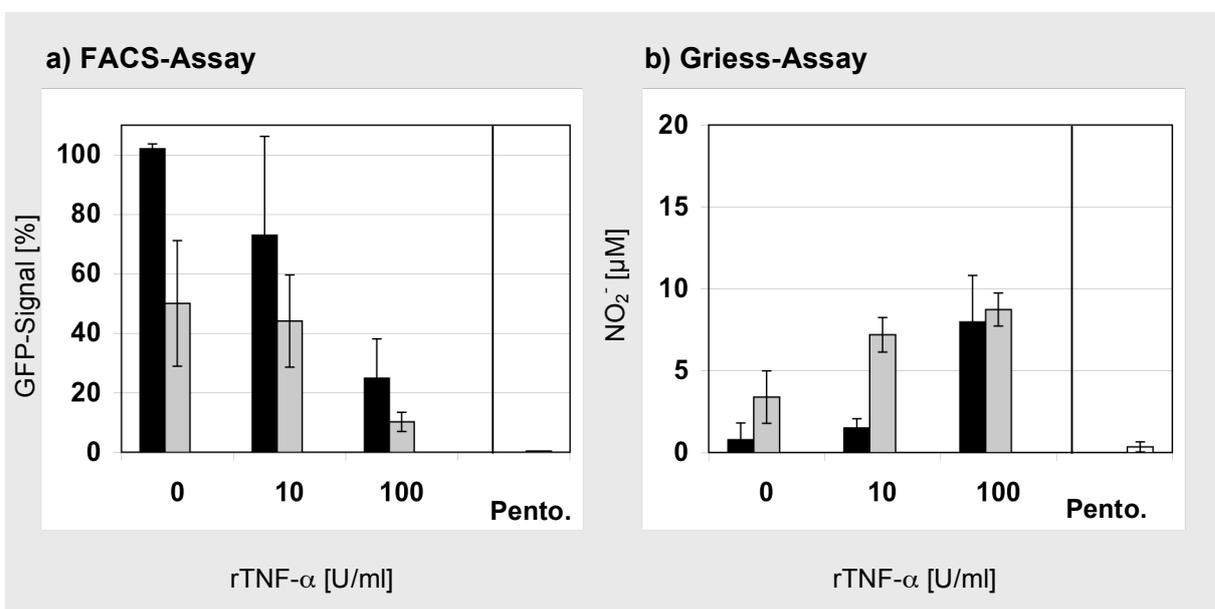


Abb. 3-27. Additiver antileishmanieller Effekt durch Kombinationsbehandlung von rTNF- α mit rIFN- γ oder rIFN- γ + LPS bei der Aktivierung von infizierten BMM Φ

L. major GFP infizierte BMM Φ wurde 48 h mit 0, 10, 100 U/ml rTNF- α in Kombination mit entweder rIFN- γ 100 U/ml (■) oder rIFN- γ 10 U/ml und LPS 1 ng/ml (■) inkubiert. Vor der Messung der Infektionsrate am FACS (s. Abb. a) wurden die Überstände mittels Griess-Assay auf Nitrit (NO $_2^-$) getestet (s. Abb. b). Mit Pentostam[®] (Pento.) (100 μ g/Sb $^{5+}$ /ml) behandelte Proben wurden als Kontrollen für eine direkte antileishmanielle Wirkung verwendet. Der Anteil toter Zellen wurde mittels PI-Zugabe bestimmt und vor Bestimmung des GFP-Signals (Infektionsrate) ausgeschlossen. Die Rate infizierter BMM Φ wurde in Prozent, bezogen auf die unbehandelten infizierten Makrophagen dargestellt. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung abgebildet.

Allen Behandlungsarten, die einen indirekten antileishmaniellen Effekt zur Folge hatten, war gemein, dass sie streng mit den gemessenen NO $_2^-$ -Werten korrelierten. Auf diese enge Wechselbeziehung wurde auch schon vielfach hingewiesen (Liew et al., 1990; Green et al., 1991; Evans et al., 1993; Vouldoukis., et al., 1996).

3.3.5. Antileishmanielle Aktivität von Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde im FACS-Assay als direkt auf den intrazellulären Parasiten wirkendes Arzneimittel nur Pentostam[®] eingesetzt. Deshalb wurden weitere in der Literatur als direkt antileishmaniell wirksame beschriebene Substanzen verwendet, um die Zuverlässigkeit des Testsystems weiter zu untermauern. Eingesetzt wurde das Polyenantibiotikum Amphotericin B, welches bei Resistenzen gegen Pentostam[®] das wichtigste Reservetherapeutikum ist (Chatterjee und Sunder, 2006), sowie das ebenso als sehr potent beschriebene Hydroxynaphthochinon Buparvaquon (Croft et al., 1992) und Licochalcon A (Zhai et al., 1999).

Dazu wurden mit *L. major* GFP infizierte BMM Φ mit den ausgewählten Wirkstoffen in jeweils drei verschiedenen Konzentration (Amphotericin B, Buparvaquon 0,05, 0,1, 0,5 μ M, Licochalcon A 5, 10, 20 μ M) 48 h behandelt. Vor der Messung am FACS-Gerät wurden, wie in den vorangegangenen Versuchen, die Überstände für den Griess-Assay abgenommen. Der Anteil toter Makrophagen wurde durch PI-Diskriminierung und die Infektionsrate über den prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen bestimmt. In allen untersuchten Proben lag der Anteil toter Zellen unter 16%. Amphotericin B und Buparvaquon waren mit IC₅₀-Werten von 0,2 μ M und 0,3 μ M ähnlich potent. Licochalcon A wirkte auch zuverlässig, allerdings erst bei deutlich höheren Konzentrationen (IC₅₀-Wert 12,7 μ M). Allen Substanzen war gemeinsam, dass die NO₂⁻-Werte in den Überständen unterhalb der Detektionsgrenze von 2,5 μ M lagen und damit den Werten der infizierten unbehandelten Zellen entsprachen. Dieses Ergebnis stützt, dass diese Substanzen eine direkte antileishmanielle Wirkung besitzen.

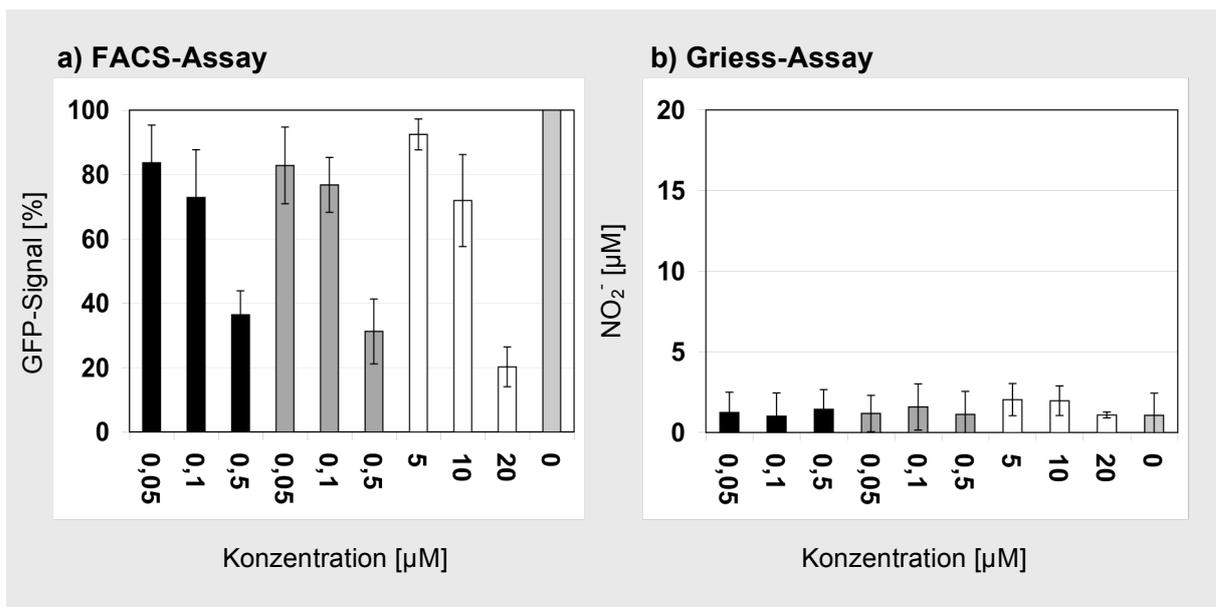


Abb. 3-28. Behandlung infizierter Makrophagen mit Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A in verschiedenen Konzentrationen

L. major GFP infizierte BMMΦ blieben entweder unbehandelt (rechter Balken ■) oder wurden mit Amphotericin B (0,05, 0,1, 0,5 µM, ■), Buparvaquon (0,05, 0,1, 0,5 µM, ■) oder Licochalcon A (5, 10, 20 µM, □) 48 h behandelt. Vor der Messung der Infektionsrate am FACS (s. Abb. a) wurden die Nitrit-Konzentrationen der Überstände mit dem Griess-Assay ermittelt (s. Abb. b). Mittels Propidiumjodid-Zugabe wurden die PI-positiven, toten Zellen bestimmt und von der weiteren Betrachtung der Fluoreszenz im Kanal-1 ausgeschlossen. Die FACS-Auswertungen zeigen lebende Makrophagen und ihren GFP-positiven prozentualen Anteil. Angeben ist die Standardabweichung dreier unabhängiger Versuche.

3.3.5.1. Einfluss des NO-Synthase Inhibitors L-NMMA auf die antileishmanielle

Wirkung von Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A

N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) ist ein unspezifischer Inhibitor der NO-Synthasen (endotheliale NOS, neuronale NOS, induzierbare NOS) (Sakuma et al., 1988; Liew et al., 1990; Feldman et al., 1993). Ziel der nachfolgenden Experimente war es, durch kompetitive Hemmung der iNO-Synthase den Einfluss der iNO-Produktion auf die antileishmanielle Wirkung von Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A aufzuzeigen. Zudem ist zu erwarten, dass bei den mit rIFN-γ + LPS aktivierten Makrophagen die iNO Produktion durch L-NMMA Zugabe deutlich reduziert ist, was sich sowohl in den FACS-Daten als auch in den Ergebnissen des Griess-Assays widerspiegeln sollte.

Das Prinzip des Versuchsaufbaus entspricht der Beschreibung im vorherigen Kapitel (vgl. Abschnitt 3.3.4.1.). So wurden BMMΦ mit *L. major* GFP infiziert und nach einer Ruhephase (24 h) mit Amphotericin B (0,05, 0,1, 0,5 µM), Buparvaquon (0,05, 0,1, 0,5 µM) oder Licochalcon A (5, 10, 20 µM) in Kombination mit 300 µM L-NMMA behandelt.

Als Kontrollen dienten nicht infizierte BMM Φ , infizierte BMM Φ , sowie infizierte BMM Φ aktiviert mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) entweder in Kombination mit der stereochemisch aktiven Form des NO-Synthase Inhibitors (L-NMMA, 300 μ M) oder seiner inaktiven Form (D-NMMA, 300 μ M). 48 h nach der Behandlung der Proben wurden die Zellüberstände für den Griess-Assay abgenommen. Im FACS wurde der Anteil der toten Wirtszellen (prozentualer Anteil PI positiver BMM Φ) und die Infektionsrate über den relativen Anteil GFP-positiver BMM Φ bestimmt.

Im FACS-Assay wurde beobachtet, dass die Hemmung der iNO-Synthase durch L-NMMA die antileishmanielle Wirkung der Substanzen Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A nicht beeinflusste (s. Abb. 3-29. a). Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Wirkung von Amphotericin B keine Aktivierung der Makrophagen notwendig ist. So wirkt Amphotericin B in erster Line durch Interaktion mit dem Membranbestandteil Ergosterol des Parasiten und führt so durch Veränderung der Membranpermeabilität zu zellulären Dysfunktionen, Zellzerstörung und letztendlich zum Zelltod der Leishmanien (Brajtburg J. et al., 1996). Die Wirkung von Buparvaquon ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die Wirkung in Analogie zu Atovaquon und anderen 1,4-Naphtochinonen auf eine Inhibition des Elektronentransports in den Mitochondrien zurückzuführen ist (Croft et al., 1992). Auch die Wirkung von Licochalcon A ist durch selektive Zerstörung der Parasiten-Mitochondrien begründet (Chen et al., 1993; Zai et al., 1999).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die antileishmanielle Wirkung von Buparvaquon und Licochalcon A weder mit einer iNO-Produktion zusammenhängen noch für ihre antileishmanielle Wirkung notwendig sind. Auch die im vorherigen Kapitel für diese Substanzen beschriebenen, kaum messbaren Nitrit-Werte entsprechen diesem Befund.

Bei den mit IFN- γ + LPS + L-NMMA behandelten Proben infizierter BMM Φ wird der Einfluss von L-NMMA deutlich sichtbar. So war die Infektionsrate der mit L-NMMA behandelten BMM Φ (72% s. Abb. 3-29. a, gelber Balken), verglichen mit den mit D-NMMA behandelten Proben (13% s. Abb. XX b, oranger Balken) deutlich höher. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den im Griess-Assay (s. Abb. 3-29. b) gemessenen verminderten Nitrit-Werten (nach L-NMMA Behandlung 10 μ M, nach D-NMMA Behandlung 24 μ M).

Der beschriebene Versuchsaufbau ermöglicht durch Kombination der FACS-Methode mit dem NO-Synthase Inhibitor L-NMMA eine iNO abhängige Wirkung von Substanzen direkt zu belegen. Ein Anstieg toter, also PI-positiver Makrophagen war dabei durch die Behandlung

mit D- bzw. L-NMMA in der Konzentration von 300 μM nicht zu beobachten.

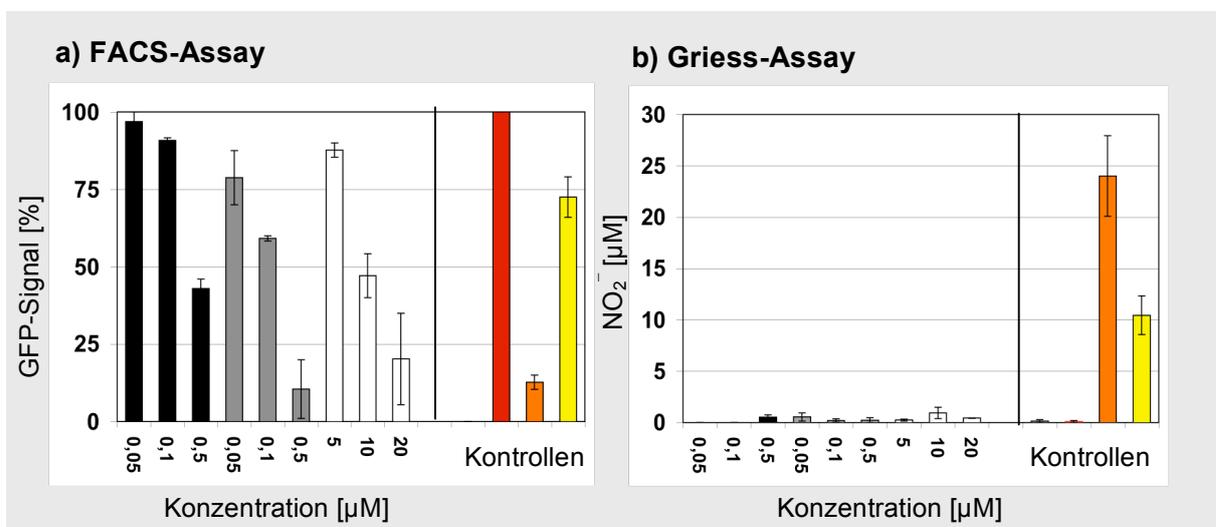


Abb. 3-29. Infizierte Makrophagen behandelt mit Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A in Kombination mit L-NMMA (300 μM)

L. major GFP infizierte BMM Φ wurden mit Amphotericin B (0,05, 0,1, 0,5 μM , ■), Buparvaquon (0,05, 0,1, 0,5 μM , ■) oder Licochalcon A (5, 10, 20 μM , □) 48 h in Kombination mit 300 μM L-NMMA behandelt. Als Kontrollen dienten (von links nach rechts) nicht infizierte BMM Φ ■, infizierte unbehandelte BMM Φ ■, infizierte BMM Φ behandelt mit IFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) + D-NMMA (300 μM) ■, infizierte BMM Φ behandelt mit IFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) + L-NMMA (300 μM) ■. Vor der Messung der Infektionsrate am FACS (s. Abb. a) wurden die Nitrit-Konzentrationen der Überstände mit dem Griess-Assay ermittelt (s. Abb. b). Mittels Propidiumjodid-Zugabe wurden die PI-positiven, toten Zellen bestimmt und von der weiteren Betrachtung der Fluoreszenz im Kanal-1 ausgeschlossen. Die FACS-Auswertungen zeigen lebende Makrophagen und ihren GFP-positiven prozentualen Anteil. Angegeben ist die Standardabweichung dreier unabhängiger Versuche.

3.3.6. Einsatz der RAW 264.7-Zelllinie als alternative Wirtszelle im FACS-Assay

In unserer Arbeitsgruppe wurde der MTT-Test zur Bestimmung antileishmanischer Eigenschaften von Testsubstanzen sowohl mit aus Knochenmark von Mäusen hergestellten Makrophagen (BMM Φ), als auch mit der makrophagenähnlichen Zelllinie RAW 264.7 durchgeführt. Um zu ermitteln, ob die Zelllinie für den FACS-Assay eine Alternative bietet wurden RAW 264.7-Zellen und BMM Φ mit *L. major* GFP infiziert. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Infektionsraten durchflusszytometrisch im Fluoreszenzkanal-1 (grüne Fluoreszenz) erfasst. Zusätzlich zum GFP-Signal wurde durch Propidiumjodid-Zugabe im Fluoreszenzkanal-3 (rote Fluoreszenz) der prozentuale Anteil toter Wirtszellen bestimmt. Die toten Zellen wurden vor der Bestimmung der Infektionsrate ausgeschlossen. Bei Verwendung von RAW 264.7-Zellen betrug der Anteil toter Zellen im Mittel 12% und bei BMM Φ 14%. Als Kontrollen wurden nicht infizierte Zellen eingesetzt, die sich zu den verschiedenen

Messzeitpunkten kaum unterschieden, weshalb hier exemplarisch die 48 h Kontrollen gezeigt werden.

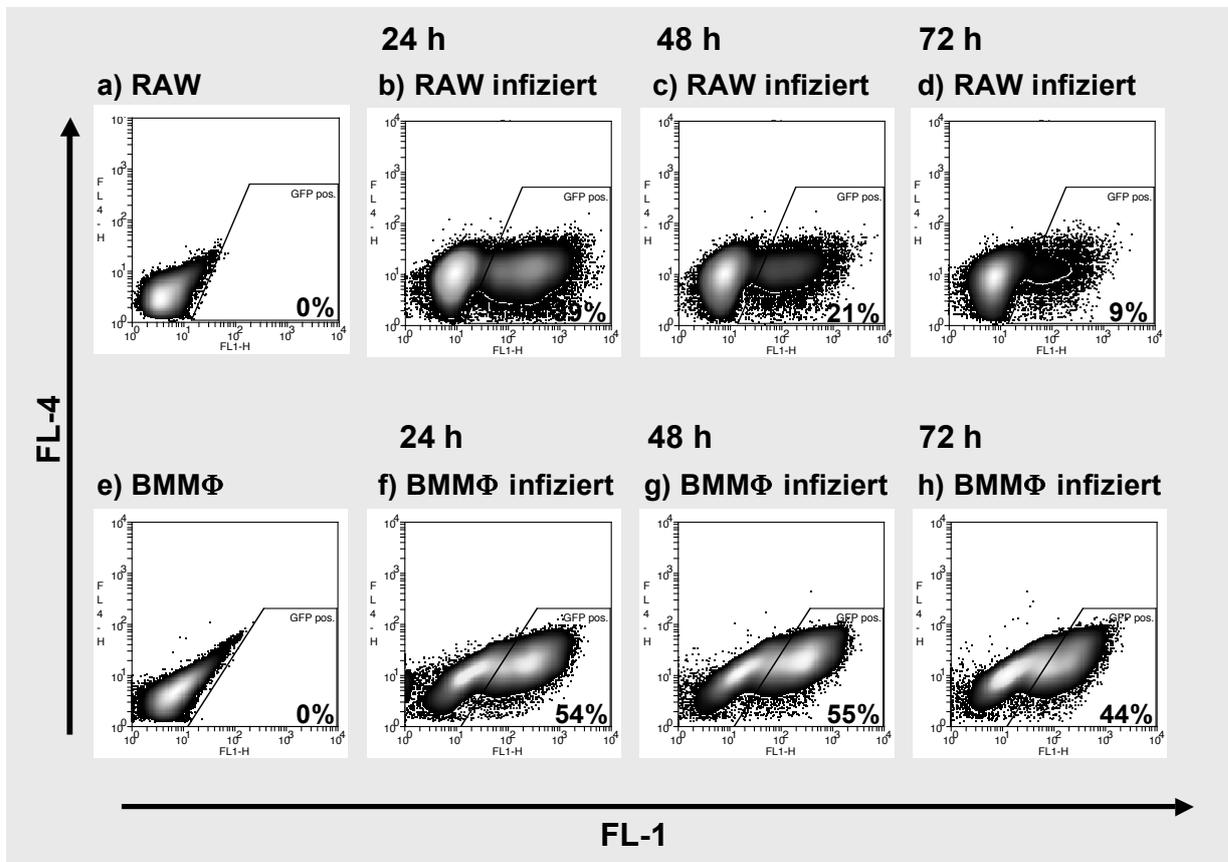


Abb. 3-30. Messung der Infektionsrate von RAW 264.7 und BMMΦ Zellen nach 24, 48 und 72 h

RAW 264.7 bzw. BMMΦ Zellen wurden mit *L. major* GFP infiziert. Als Kontrollen dienten nicht infizierte Zellen (s. Abb. a, e). Der prozentuale Anteil GFP-positiver infizierter Wirtszellen wurde 24, 48, und 72 h nach Infektion am FACS in der Fluoreszenz-1 bestimmt. Je Probe wurden 30.000 Zellen vermessen, der Anteil toter Zellen wurde mit PI-Färbung bestimmt und für die Bestimmung der Infektionsrate von der Betrachtung ausgeschlossen. Die Abbildungen stammen von einem von insgesamt drei durchgeführten Versuchen mit ähnlichem Ergebnis.

Sehr auffällig war, dass sich die Infektionsrate der RAW 264.7-Zellen vom Messpunkt nach 24 h bis zum Messpunkt nach 48 h (s. Abb. 3-30 b, c) in etwa halbierte und eine weitere Halbierung bis zur 72 h Messung eintrat (s. Abb. 3-30 c, d). Von den zu Beginn 39% infizierten Zellen waren nach 72 h nur noch 9% GFP positiv. Dieser Beobachtung liegt die Tatsache zu Grunde, dass die Zelllinie, anders als die BMMΦ, weiter proliferiert und sich so auch das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten Zellen stark verändert. Die Infektionsrate in den aus Knochenmarkstammzellen differenzierten BMMΦ hingegen blieb relativ konstant (s. Abb. 3-30 e - h). Innerhalb von 72 h reduzierte sich der Anteil GFP-

positiver BMM Φ nur von 55 auf 44 %. Im MTT-Assay ist die Proliferation der RAW 264.7-Zellen als eher unproblematisch einzustufen, da hier die Wirtszelle durch Lyse mit SDS zerstört wird. Erst die dann wieder freiliegenden Leishmanien geben Auskunft über die Potenz der Teststoffe. Im FACS-Assay hat die starke Abnahme des GFP-Signals bedingt durch die fortlaufende Zellteilung zur Folge, dass der Unterschied zwischen den unbehandelten infizierten Proben und behandelten infizierten Proben weitaus schwächer wird und so die Wirkung der Testsubstanzen schlechter beurteilt werden kann. Für den FACS-basierten Assay sind deshalb BMM Φ den RAW 264.7-Zellen bzw. allen Zelllinien, die eine hohe Teilungsrate besitzen, vorzuziehen.

3.3.7. Vergleich der antileishmaniellen Effekte ausgewählter Verbindungen im FACS- bzw. MTT-basierten Assay

Die FACS-basierte Methode ermöglichte die Verifizierung verschiedener in der Literatur beschriebener antileishmaniell wirksamer Substanzen und darf demzufolge auch als valide angesehen werden. So wurde in den vorherigen Kapiteln die Wirkung für Pentostam[®], Amphotericin B, Buparvaquon, Licochalcon A und der Makrophagen Aktivatoren rIFN- γ , LPS und rTNF- α aufgezeigt.

3.3.7.1. FACS-basierte Testung der Gallussäure

Interessant erschien nun, inwieweit die Daten aus der FACS-basierten Testung mit denen aus dem herkömmlichen MTT-basierten Assay konform gehen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde zunächst Gallussäure ausgewählt, welche nach bisherigen Arbeiten in unserem Arbeitskreis als Verbindung mit markanten antileishmaniellen Eigenschaften gilt (Kolodziej et al., 2001).

Nach Infektion von BMM Φ mit *L. major* GFP wurden die Zellen mit Gallussäure (600 μ M, 300 μ M, 150 μ M, 75 μ M) 48 h behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte infizierte und nicht infizierte Makrophagen, sowie infizierte mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) oder Buparvaquon (1 μ M) behandelte Makrophagen. Der Anteil lebender Makrophagen wurde durch den Anteil PI-negativer Zellen und die Infektionsrate über den prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen bestimmt.

Die Ergebnisse der FACS-basierten Methode zeigten selbst bei Verwendung hoher Konzentrationen von Gallussäure (600 μ M) überraschender Weise keine antileishmanielle

Wirkung (s. Abb. 3-31. a). Die moderate Reduktion der Leishmanienlast auf 88% bei dieser unphysiologisch hohen Testkonzentration ist bei einem Anteil von nur 39% lebenden Makrophagen (s. Abb. 3-31. b) auf rein toxische Effekte zurückzuführen.

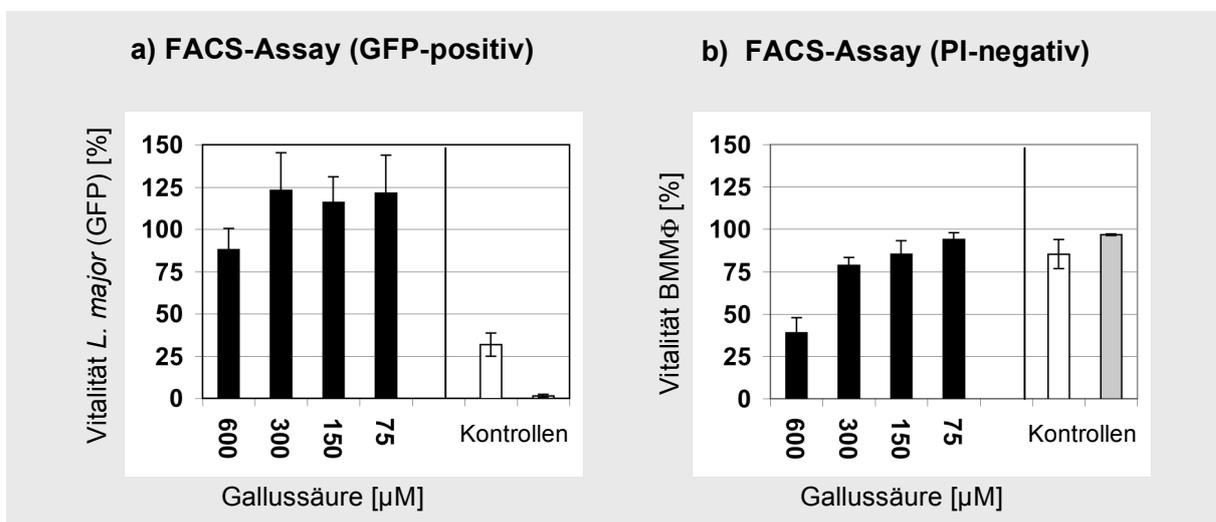


Abb. 3-31. Antileishmanielle Effekte der Gallussäure im FACS-basierten Assay

L. major GFP infizierte BMM Φ wurden mit Gallussäure (600, 300, 150, 75 μM , ■) 48 h behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte, *L. major* GFP infizierte BMM Φ , definiert als 100%, sowie infizierte Zellen behandelt mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) □ oder Buparvaquon (1 μM , ▒). Mittels Propidiumjodid-Zugabe wurden die PI-negativen, vitalen BMM Φ bestimmt (s. Abb. b) und zur weiteren Betrachtung des GFP-Signals der intrazellulären Leishmanien (s. Abb. a) herangezogen. Die FACS-Auswertung zeigt lebende Makrophagen und ihren relativen prozentualen GFP-positiven Anteil. Angegeben ist die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Diskrepanz dieses Ergebnisses im Vergleich zu den bereits veröffentlichten Daten veranlasste eine genauere Betrachtung der Hintergründe. Im Fokus standen zum einen die verwendeten Testsysteme, zum anderen die jeweils eingesetzten Wirtszellen.

3.3.7.2. Abhängigkeit der zytotoxischen Effekte der Gallussäure von der Zellart im MTT-Assay

Die antileishmanielle Wirkung der Gallussäure wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Infektion der RAW 264.7-Zelllinie unter Verwendung des MTT-Assays beschrieben. Um zu ergründen, ob der Effekt von der Zellart abhängt, wurde der MTT-basierte Assay parallel unter Verwendung sowohl der RAW 264.7 Zelllinie als auch mit BMM Φ durchgeführt. Hierzu wurden beide Zellarten mit *L. major* (GFP) infiziert, in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät und nach 24-stündiger Ruhephase mit Gallussäure 48 h inkubiert. Parallel wurde die Infektionsrate vor Behandlung mit der Testsubstanz am FACS-Gerät über das GFP-Signal

ermittelt. Damit wurde ausgeschlossen, dass das Ergebnis durch zu hohe (> 60%) oder niedrige (< 30%) Infektionsraten beeinflusst wurde.

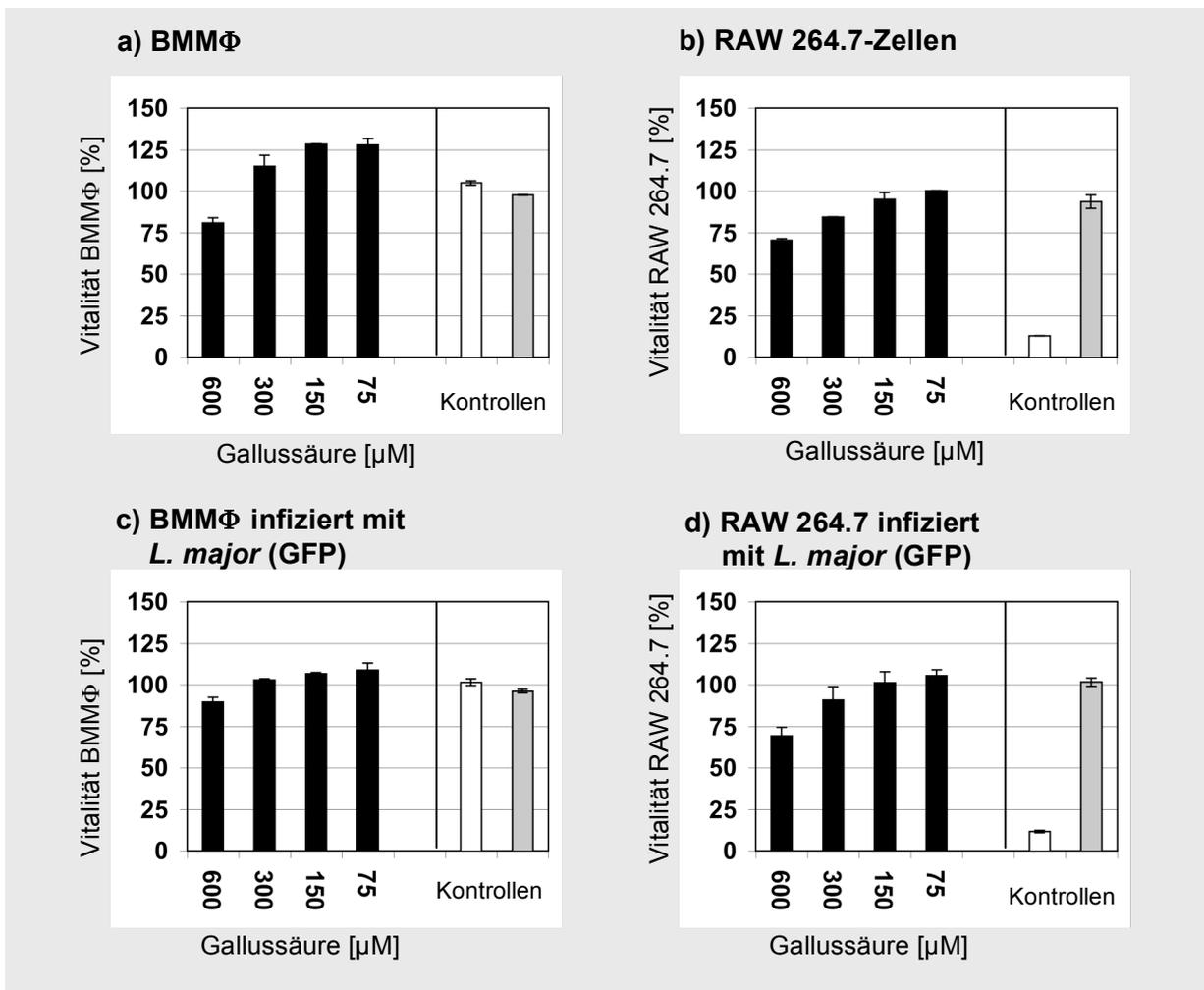


Abb. 3-32. Zytotoxische Effekte der Gallussäure auf infizierte und nicht infizierte BMMΦ und RAW 264.7 Zellen im MTT-Assay

BMMΦ nicht infiziert (s. Abb. a), RAW 264.7 nicht infiziert (s. Abb. b) bzw. *L. major* GFP infizierte BMMΦ und RAW 264.7 Zellen (s. Abb. c und d) wurden mit Gallussäure (600, 300, 150, 75 μM, ■) 48 h behandelt. Als Kontrollen dienen jeweils unbehandelte (als 100% definiert) Zellen oder infizierte Zellen behandelt mit rIFN-γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) □ oder Buparvaquon (1 μM, ■). Im Anschluss an die Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Überstand durch frisches Medium + MTT-Lösung ersetzt und so die Vitalität der Wirtszellen bestimmt. Abgebildet ist die Standardabweichung der Triplikate eines repräsentativen Versuches.

Als Kontrollen dienen nicht infizierte, infizierte unbehandelte Zellen sowie infizierte mit rIFN-γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) oder Buparvaquon (1 μM) behandelte Zellen. Die Toxizität der Substanzen auf die Wirtszellen wurde durch MTT-Zugabe zu infizierten und nicht infizierten BMMΦ und RAW 264.7-Zellen ermittelt. Dabei wurde das alte Medium zur Vermeidung von Interaktionen der Testsubstanzen mit MTT durch frisches ersetzt. Bei der

Ermittlung der zytotoxischen Effekte durch Bestimmung des metabolischen MTT-Umsatzes spielte es keine Rolle, ob nicht infizierte oder infizierte Zellen behandelt wurden. Die Ergebnisse waren in beiden Fällen vergleichbar.

Die Gegenüberstellung zytotoxischer Effekte durch PI-Diskriminierung infizierter und behandelter BMM Φ (s. Abb. 3-31. b) mit denen aus dem MTT-Assay (s. Abb. 3-32. c) zeigte für die Gallussäure im Konzentrationsbereich von 75-300 μ M vergleichbare prozentuale Anteile vitaler Makrophagen (94 - 79% im FACS-Assay bzw. 109 - 103% im MTT-Assay). Lediglich bei der Behandlung der BMM Φ mit 600 μ M Gallussäure unterschieden sich die Ergebnisse beider Methoden deutlich. So war die im FACS-Gerät gemessene Vitalität infizierter Zellen auf 39% reduziert (s. Abb. 3-31. b), im MTT-Assay lag sie bei 89% (s. Abb. 3-32. c) und war damit kaum beeinträchtigt.

Auf den Einsatz der RAW 264.7-Zellen im FACS-Assay wurde bewusst verzichtet, da diese, wie im Kapitel 3.3.6. gezeigt wurde, wegen ihrer hohen Teilungsrate für die Untersuchung antileishmanieller Effekte im FACS-Assay nicht nutzbar waren.

Eine Auffälligkeit beim Vergleich der beiden eingesetzten Zellarten wurde nach Behandlung mit den Makrophagen aktivierenden Substanzen rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) deutlich. Sowohl nicht infizierte als auch infizierte RAW 264.7-Zellen starben zum Großteil nach Aktivierung über 48 h ab (ca. 87% tot). Im Gegensatz dazu war die Vitalität der BMM Φ durch diese Art der Aktivierung nicht beeinträchtigt. Das Absterben der RAW 264.7-Zellen nach Aktivierung wird auf iNO-induzierte Apoptose zurückgeführt (Gotoh et al., 2002). Damit ist diese Zelllinie für die beschriebene Art der Testung von Substanzen auf immunstimulatorische Eigenschaften nur eingeschränkt geeignet, da eine antileishmanielle Wirkung auch auf Apoptose der Wirtszellen beruhen könnte.

3.3.7.3. Antileishmanielle Effekte der Gallussäure im MTT-Assay

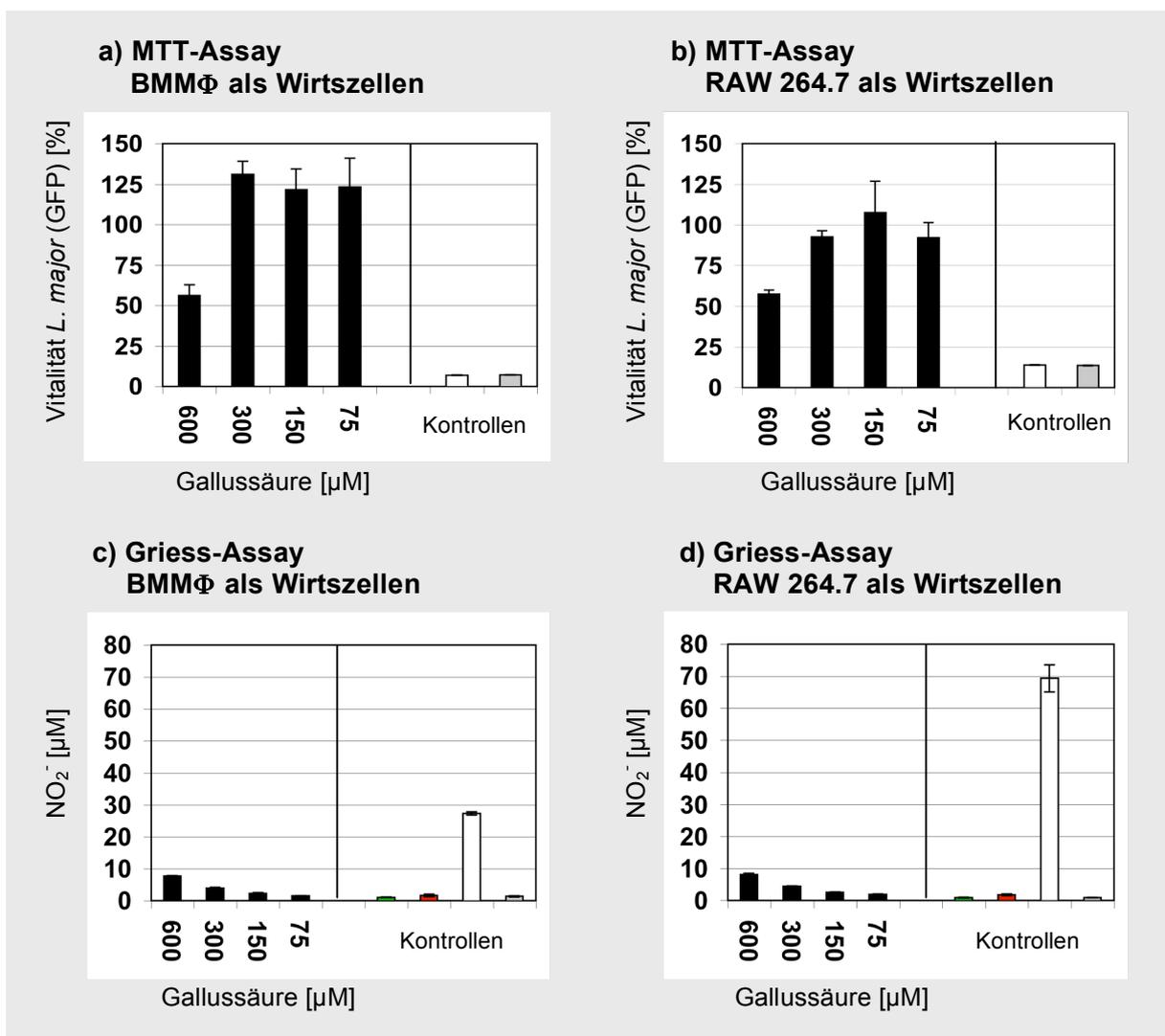


Abb. 3-33. Antileishmanielle Effekte der Gallussäure auf infizierte BMM ϕ und RAW 264.7 Zellen im MTT- und Griess-Assay

L. major GFP infizierte BMM ϕ (s. Abb. a) bzw. RAW 264.7-Zellen wurden mit Gallussäure (600, 300, 150, 75 μM , ■) 48 h behandelt. Als Kontrollen dienen unbehandelte, *L. major* GFP infizierte BMM ϕ (definiert als 100%), sowie infizierte Zellen behandelt mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) (□) oder Buparvaquon (1 μM , ▒). Im Anschluss an die Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Überstand für den Griess-Assay abgenommen. Die Wirtszellen wurden mit SDS lysiert und die Vitalität der Leishmanien nach 4 - 7 Tagen durch Zugabe von MTT-Lösung bestimmt. Abb. c und Abb. d beschreiben die ermittelten Nitrit-Werte (NO_2^-) aus den Überständen behandelter BMM ϕ und RAW-Zellen. Zusätzlich wurden im Griess-Assay die abgebildeten Kontrollen um nicht infizierte unbehandelte (■) und infizierte behandelte Zellen (■) erweitert. Abgebildet ist die Standardabweichung der Triplikate eines repräsentativen Versuches.

Zur Ermittlung antileishmanieller Effekte im MTT-basierten Assay wurden mit *L. major* GFP infizierte BMM ϕ und RAW 264.7-Zellen nach Inkubation mit der Testsubstanz selektiv mit

SDS-Lösung lysiert und die relative Anzahl der überlebenden Parasiten pro Kavität nach vier bis sieben Tagen mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt.

Die Behandlung infizierter BMM Φ mit Gallussäure in der höchsten Konzentration (600 μ M) führte im MTT-Assay, verglichen mit der unbehandelten Zellkontrolle zu einer Reduktion der Leishmanienlast auf ca. 56% (s. Abb. 3-33. b), bei zugleich geringer Toxizität gegenüber den Wirtszellen (nicht infizierte BMM Φ : 81% vital, infizierte BMM Φ : 90% vital) (s. Abb. 3-32. a, c). Zudem war im Griess-Assay eine moderate iNO-Produktion von 8, 4, 2, 1 μ M im Überstand messbar (s. Abb. 33-3. c), welche mit der beobachteten antileishmaniellen Wirkung der Testsubstanz in der höchsten Konzentration im Einklang steht.

3.3.7.4. Einsatz der FACS-basierten Methode zur Testung antileishmanieller und zytotoxischer Eigenschaften verschiedener phenolischer Verbindungen

Die überraschenden Ergebnisse der Gallussäure im FACS-basierten-Assay waren Anlass für eine erste Testung weiterer ausgewählter phenolischer Verbindungen, die in der Vergangenheit von unserer Arbeitsgruppe als potent beschrieben wurden.

Aus der Gruppe der Zimtsäurederivate wurde die Kaffeesäure ausgewählt und aus der Gruppe der Ellagitannine wurden Corilagin, Casuarinin und Geraniin einer Testung unterzogen.

Von den getesteten Substanzen zeigte im FACS-basierten Assay unter Verwendung von BMM Φ als Wirtszellen Corilagin bei moderater Toxizität (65-82%, vital) (s. Abb. 3-34. b) eine antileishmanielle Wirkung. So halbierte sich die Infektionsrate 48 h nach Behandlung der Makrophagen mit Corilagin (80 μ M) (s. Abb. 3-34. b). Die Reduktion des GFP-Signals nach Behandlung mit Geraniin (80 μ M) ist, wie aus der PI-Färbung der BMM Φ hervorgeht (30%, vital) (s. Abb. 3-34. b), auf toxische Effekt zurückzuführen. Die Inkubation mit niedriger gewählten, weniger zytotoxischen Konzentrationen (40 und 20 μ M) hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Infektionsrate. Die Behandlung mit Kaffeesäure zeigte bei allen verwendeten Konzentrationen (80-20 μ M) weder zytotoxische Effekte auf die Wirtszellen, noch hatte sie Einfluss auf die Vitalität des intrazellulären Parasiten. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit Casuarinin zu einer konzentrationsabhängigen Schädigung der BMM Φ (80 μ M, 29% vital, 40 μ M, 49% vital, 20 μ M 64% vital). Die Infektionsraten der nach dieser Behandlung noch vitalen Wirtszellen wurden im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Zellen nicht signifikant beeinflusst (91-100%. GFP-positiv).

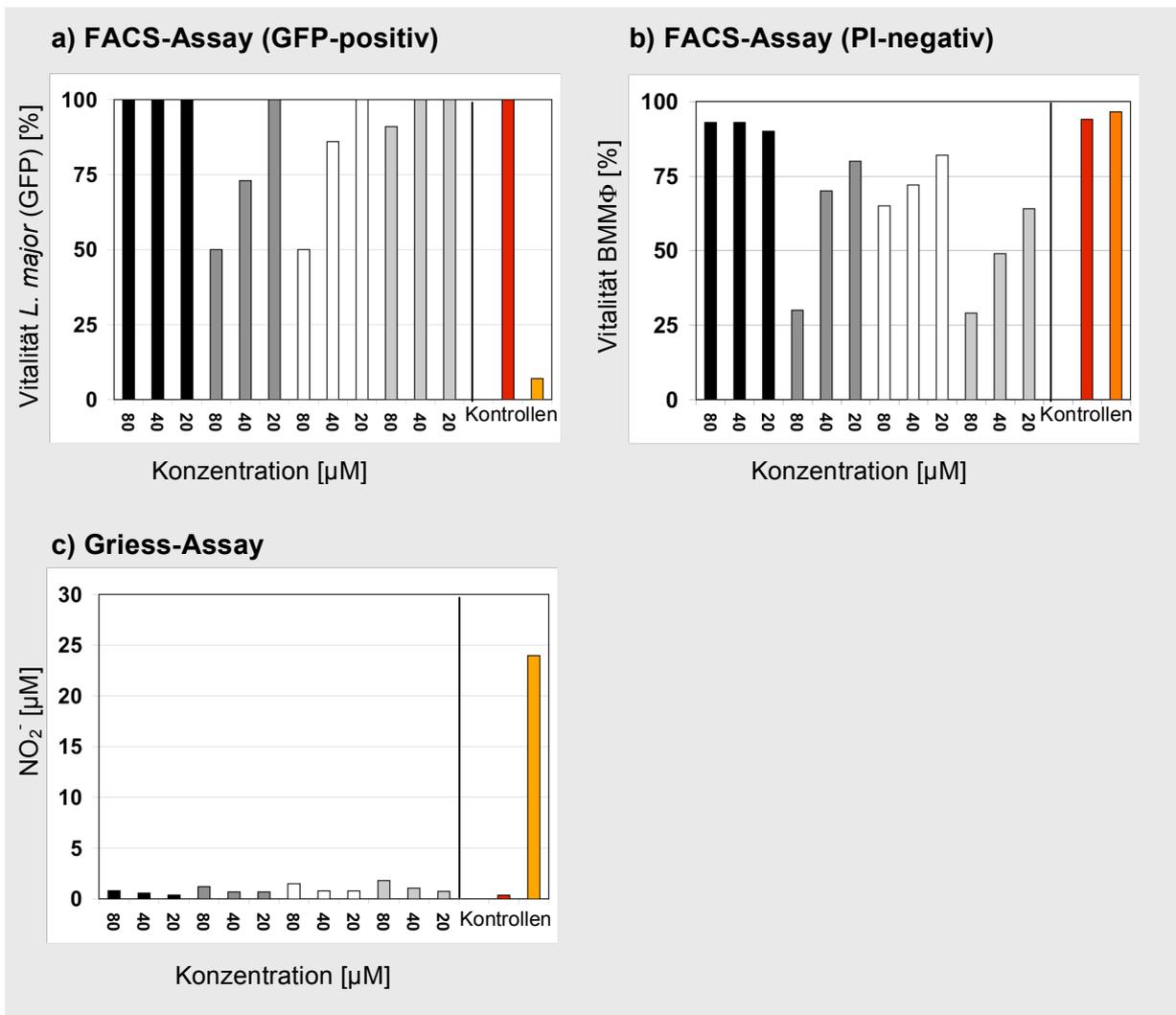


Abb. 3-34. Ausgewählte Gerbstoffe im FACS-basierten Testsystem

L. major GFP infizierte BMM Φ blieben entweder unbehandelt (■) oder wurden mit Kaffeesäure (80, 40, 20 μM , ■), Geraniin (80, 40, 20 μM , ■), Corilagin (80, 40, 20 μM , □) oder Casuarinin (80, 40, 20 μM , ■), 48 h behandelt. Eine weitere Kontrollprobe infizierter Zellen wurde mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) (■) behandelt. Nach 48 -stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen wurde das GFP-Signal lebender intrazellulärer Leishmanien (s. Abb. a) und der Anteil PI negativer, also lebender BMM Φ (s. Abb. b) im FACS-Gerät bestimmt. Die Überstände der Proben wurden im Griess-Assay auf eine stattgefundenen iNO-Produktion überprüft (s. Abb. c).

Die Testung der Überstände im Griess-Assay machte deutlich, dass keine der Testsubstanzen die BMM Φ zu einer Produktion reaktiver Stickstoffspezies in detektierbaren Mengen aktivierte. Diese Tatsache mag allerdings auch an der in der FACS-Methode gering gewählten Zelldichte (5×10^5 BMM Φ / 1,5 ml) liegen, wodurch geringe iNO-Mengen unterhalb der Detektionsgrenze liegen. Lediglich die mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) behandelten Kontrollen zeigten deutliche Nitrit-Werte im Überstand (24 μM) (s. Abb. 3-34. c).

3.3.7.5. Die *trans*-Aconitsäure als nicht phenolische Substanz pflanzlichen Ursprungs im FACS- und MTT-basierten Assay

Eine weitere Substanz pflanzlichen Ursprungs, die in Analogie zur Gallussäure getestet wurde, war die *trans*-Aconitsäure. Diese Tricarbonsäure wurde von Misra et al. (1989) und Kar et al. (1993) als Substanz mit antileishmanieller Wirkung beschrieben und deshalb in die folgenden Versuche als nicht phenolischer Naturstoff mit einbezogen. Dieser Versuch sollte erste Hinweise geben, ob die Diskrepanz zwischen den FACS-basierten und den MTT-basierten Ergebnissen auf die phenolische Struktur der Testsubstanzen oder auf Assay-typische Phänomene zurückzuführen war.

Dazu wurden infizierte BMM Φ mit *trans*-Aconitsäure in verschiedenen Konzentrationen 48 h behandelt. Die hoch anmutenden eingesetzten Konzentrationen (20 mM, 10 mM, 5 mM, 2,5 mM) wurden in Anlehnung an die oben genannten Veröffentlichungen gewählt.

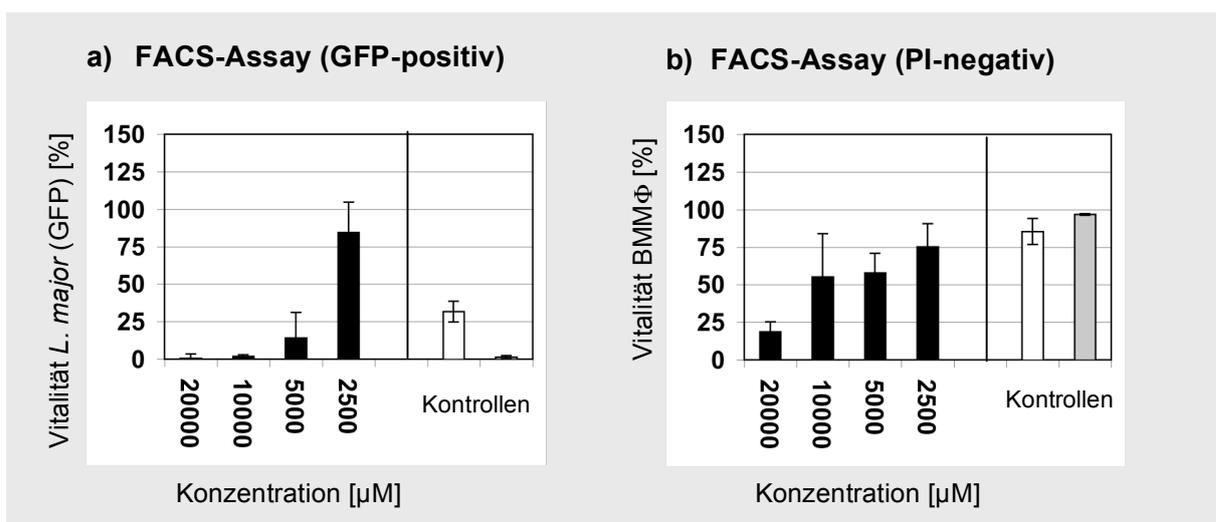


Abb. 3-35. Antileishmanielle Effekte der *trans*-Aconitsäure im FACS-basierten Assay

L. major GFP infizierte BMM Φ wurden mit *trans*-Aconitsäure (20, 10, 5, 2,5 mM, ■) 48 h behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte, *L. major* GFP infizierte BMM Φ , definiert als 100%, sowie infizierte Zellen behandelt mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) (□) oder Buparvaquon (1 μ M, ■). Mittels Propidiumjodid-Zugabe wurden die PI-negativen, vitalen Zellen bestimmt (s. Abb. b) und zur weiteren Betrachtung des GFP-Signals (s. Abb. a) herangezogen. Die FACS-Auswertung zeigt lebende Makrophagen und ihren relativen prozentualen GFP-positiven Anteil. Angegeben ist die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse der mit *trans*-Aconitsäure behandelten Zellen machen deutlich, dass im Konzentrationsbereich von 20 - 5 mM toxische Effekte dominierten (19-58% vital). Erst ab einer Konzentration von 2,5 mM ist der Großteil (75%) der behandelten Makrophagen vital

(PI-negativ) (s. Abb. 3-34 b). Ein deutlicher antileishmanieller Effekt bei dieser Konzentration ist allerdings nicht nachzuweisen (s. Abb. 3-35 a).

3.3.7.6. Zytotoxische Effekte der *trans*-Aconitsäure im MTT-Assay

Wie für die Gallussäure wurde, um zelltypische Unterschiede festzustellen, die Toxizität der *trans*-Aconitsäure im MTT-Assay sowohl für infizierte als auch für nicht infizierte BMM Φ und RAW 264.7-Zellen bestimmt.

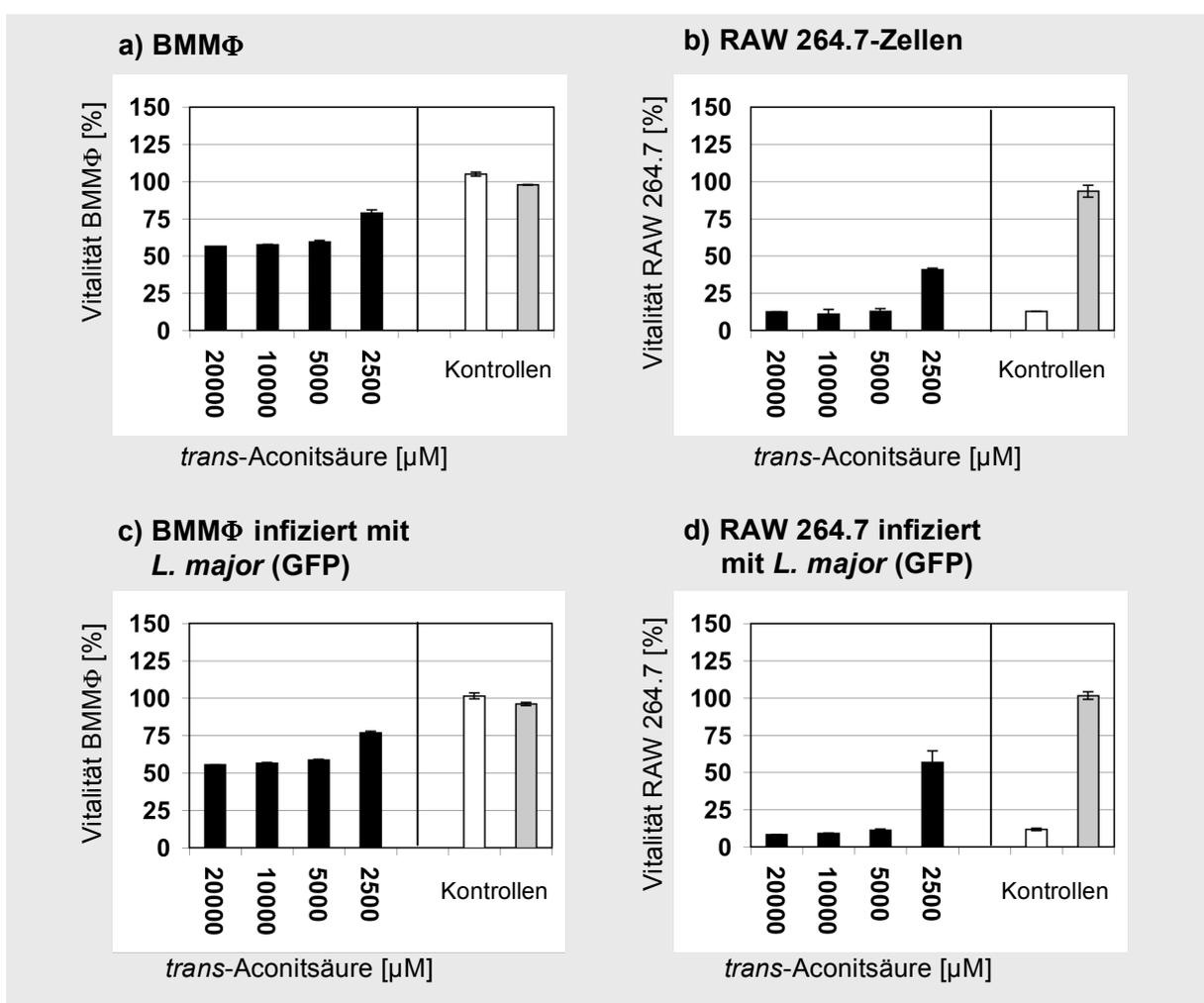


Abb. 3-36. Zytotoxische Effekte der *trans*-Aconitsäure auf infizierte und nicht infizierte BMM Φ und RAW 264.7-Zellen im MTT-Assay

BMM Φ nicht infiziert (s. Abb. a), RAW 264.7 nicht infiziert (s. Abb. b) bzw. *L. major* GFP infizierte BMM Φ und RAW 264.7-Zellen (s. Abb. c und d) wurden mit oder *trans*-Aconitsäure (20, 10, 5, 2,5 mM, ■) 48 h behandelt. Als weitere Kontrollen dienten jeweils unbehandelte (als 100% definiert) und infizierte Zellen behandelt mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) (□) oder Buparvaquon (1 μ M, ■). Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Überstand durch frisches Medium + MTT-Lösung ersetzt und die Vitalität der Wirtszellen bestimmt. Abgebildet ist die Standardabweichung der Triplikate eines repräsentativen Versuches.

Den Ergebnissen ist zu entnehmen (s. Abb. 3-36.), dass die Vitalität durch Infektion der betrachteten Zellarten mit Leishmanien nicht beeinflusst wurde. Deutlich ist allerdings, dass die Vitalität der BMM Φ (55-79% vital) (s. Abb. 3-36. a, c) weitaus weniger durch die Behandlung mit *trans*-Aconitsäure eingeschränkt wurde als dies bei den RAW 264.7-Zellen (8-56% vital) (s. Abb. 3-36. b, d) der Fall war.

3.3.7.7. Antileishmanielle Effekte der *trans*-Aconitsäure im MTT-Assay

In Analogie zur Testung der Gallussäure wurde auch für die *trans*-Aconitsäure die antileishmanielle Wirkung im MTT-Assay durch Behandlung infizierter BMM Φ und RAW 264.7-Zellen betrachtet. Nach der selektiven Lyse der Wirtszellen mit SDS-Lösung wurde die relative Anzahl überlebender Leishmanien nach vier bis sieben Tagen durch Einsatz des MTT-Assays bestimmt.

Die Inkubation infizierter BMM Φ mit *trans*-Aconitsäure reduzierte die Anzahl vitaler Leishmanien (7-21%) im MTT-Assay über einen breiten Konzentrationsbereich (20 – 2,5 mM) deutlich (s. Abb. 3-37. a), wobei im Griess-Assay keine iNO-Produktion nachweisbar war (s. Abb. 3-37. c).

Allerdings müssen diese Ergebnisse kritisch hinterfragt werden. So wurde bei Zugabe dieser hohen Konzentrationen an Säure die Pufferkapazität des Mediums überschritten, worin sowohl die Toxizität (56-59% vital) als auch die antileishmanielle Aktivität über den ganzen Konzentrationsbereich begründet sein kann.

Im Unterschied zu der antileishmaniellen Wirkung der *trans*-Aconitsäure bei Verwendung von BMM Φ als Wirtszellen ergab sich bei Einsatz von RAW 264.7-Zellen in den betrachteten Konzentrationen kein klarer therapeutischer Bereich. Die Reduktion der Leishmanienlast war hier auf zytotoxische Effekte zurückzuführen (s. Abb. 3-36 b,d und s. Abb. 3-37 b).

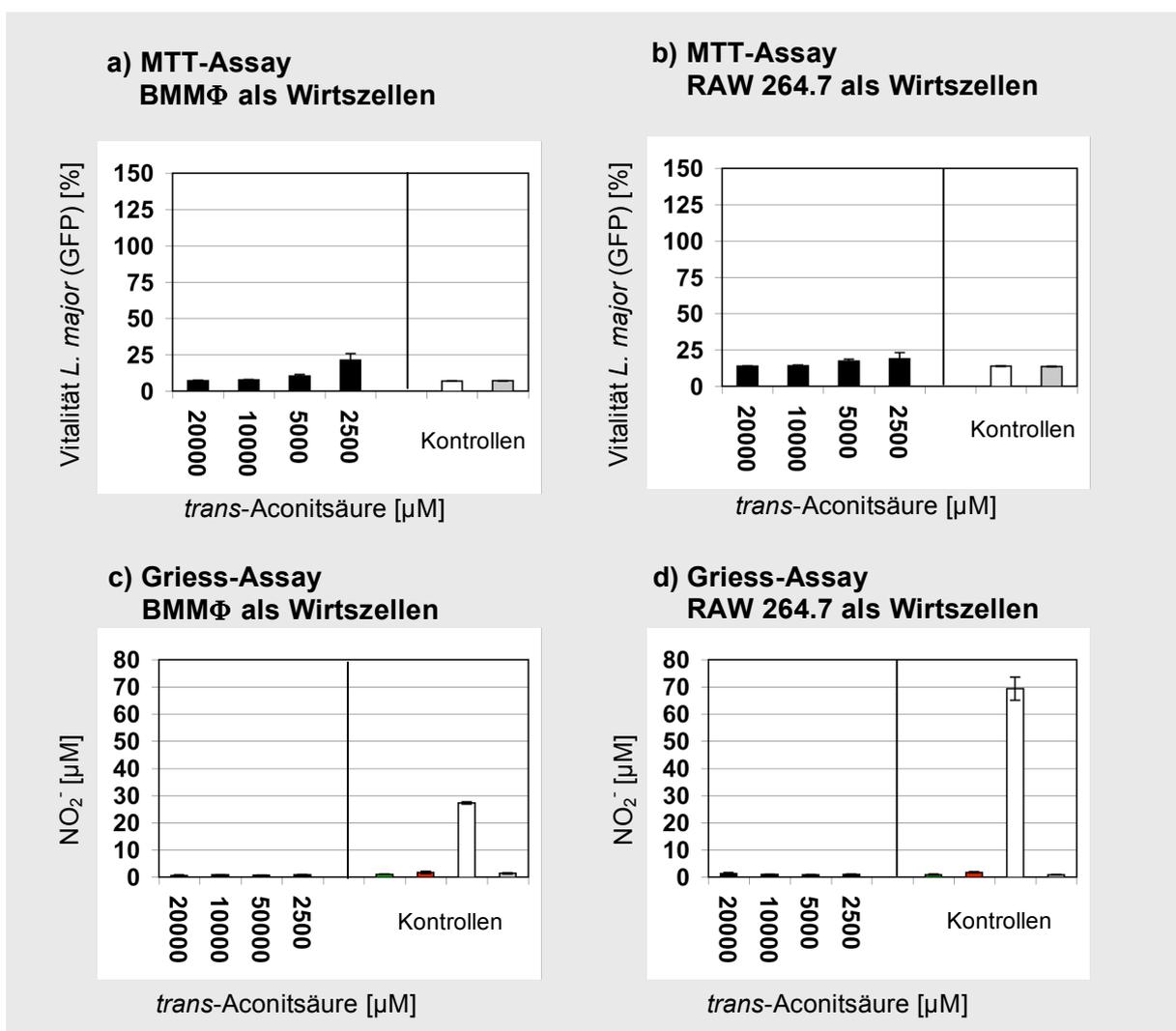


Abb. 3-37. Antileishmanielle Effekte der *trans*-Aconitsäure auf infizierte BMM ϕ und RAW 264.7-Zellen im MTT- und Griess-Assay

L. major GFP infizierte BMM ϕ (s. Abb. a) bzw. RAW 264.7-Zellen wurden mit *trans*-Aconitsäure (20, 10, 5, 2,5 mM, ■) behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte, *L. major* GFP infizierte BMM ϕ (definiert als 100%), sowie infizierte Zellen behandelt mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) (□) oder Buparvaquon (1 μM , ▒). Im Anschluss an die Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Überstand für den Griess-Assay abgenommen. Die Wirtszellen wurden mit SDS lysiert und die Vitalität der Leishmanien nach 4 - 7 Tagen durch Zugabe von MTT-Lösung bestimmt. Abb. c und Abb. d beschreiben die ermittelten Nitrit-Werte (NO_2^-) aus den Überständen behandelter BMM ϕ und RAW 264.7-Zellen. Zusätzlich wurden im Griess-Assay die abgebildeten Kontrollen um nicht infizierte unbehandelte (■) und infizierte behandelte Zellen (■) erweitert. Abgebildet ist die Standardabweichung der Triplikate eines repräsentativen Versuches.

4 DISKUSSION

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro* Testsystem zu entwickeln, welches erlaubte, Testsubstanzen, insbesondere pflanzliche Polyphenole, auf ihr antileishmaniell Potential hin zu untersuchen. Leishmanien sind im Säuger obligat intrazellulär lebende Parasiten. Aus diesem Grund sollte das Testsystem in der Lage sein, die Wirkung der Substanzen gegen das klinisch relevante amastigote Stadium des Erregers aufzuzeigen. Dies sollte durch Behandlung von Leishmanien infizierten Makrophagen mit Testsubstanzen geschehen. Wichtig war zudem, dass mit dem Testsystem auch zytotoxische Effekte gegenüber den Makrophagen als Wirtszellen beurteilt werden konnten. Nur so kann ein therapeutisches Fenster diskutiert werden. Weiter sollte das Testsystem sowohl eine direkte Wirkung der Testsubstanzen auf den intrazellulären Parasiten, als auch eine indirekte durch Aktivierung der Makrophage zur mikrobiziden Effektorzelle aufzeigen können.

4.1. MTT-basierte Assays

Der in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig genutzte MTT-basierte Assay zur Untersuchung zytotoxischer und antileishmanieller Effekte war, wie sich herausstellte, für den Einsatz zur Testung pflanzlicher Polyphenole nur bedingt geeignet.

4.1.1. Kritische Beurteilung des MTT-Vitalitäts-Assays

Das zur Ermittlung zytotoxischer Effekte von Substanzen verwendete Testsystem besitzt ein sehr breites Einsatzspektrum. Es gibt Auskunft über die Vitalität und Aktivierung von Zellen. Zudem ist es einfach in der Durchführung, gesundheitlich unbedenklich, kostengünstig und erlaubt einen hohen Probendurchsatz (Mosmann, 1983).

Zur Bestimmung zytotoxischer Effekte wurden in der vorliegenden Arbeit makrophagenähnliche RAW 264.7-Zellen oder BMM Φ verwendet, nachdem sie den für ihre Zellart typischen Monolayer ausgebildet haben. Nach 48 h Inkubation mit Testsubstanzen wurde den Zellen das Tetrazoliumsalz MTT zugegeben, welches von lebenden Zellen zu einem blauen Formazanfarbstoff reduziert wird. Die Absorptionen wurden nach Solubilisierung der Farbstoffkristalle mit SDS-Lösung am Mikrotiterplattenphotometer bestimmt. Über die Absorptionswerte wurde die Vitalität behandelte Zellen in Bezug auf unbehandelte Zellkontrollen ermittelt und so eine Aussage über zytotoxische Effekte der Testsubstanzen getroffen (vgl. Abschnitt 2.10.). Trotz der oben genannten Vorzüge wurden bei der Untersuchung phenolischer Naturstoffe Grenzen dieses Testsystems festgestellt.

4.1.1.1. Verfälschung der Ergebnisse des Vitalitäts-Assays durch Reduktion von MTT durch Testsubstanzen

Bei Durchführung dieses Vitalitäts-Assays fiel auf, dass nicht nur lebende RAW 264.7-Zellen, sondern auch einige der getesteten phenolischen Naturstoffe MTT konzentrationsabhängig reduzierten. Um abzuklären, inwieweit die chemische Struktur der Verbindungen Einfluss auf den MTT-Umsatz hatte, wurden Vertreter der Benzoesäurederivate, Zimtsäurederivate sowie der Catechine und Ellagitannine einer systematischen Testung unterzogen (vgl. Abschnitt 3.1.1.1.). Es zeigte sich, dass Benzoe- und Zimtsäurederivate ohne oder mit nur einer Hydroxygruppe, unabhängig von der Stellung der funktionellen Gruppe keine Reduktion des Tetrazoliumsalses bewirkten. Im Unterschied dazu wurde gefunden, dass Gallussäure und ihr Methyl- und Ethylester, Kaffeesäure und Vertreter der Catechine (ECG, EGC, EGCG), sowie komplexere Ellagitannine (Geraniin, Corilagin, Carpinusin, Casuarinin) MTT im zellfreien System umsetzten. Am stärksten reduzierten dabei die Ellagitannine das MTT. Eine plausible Erklärung für das ausgeprägte Reduktionsvermögen ist die Anwesenheit von Pyrogallolteilstrukturen sowie von *ortho*-Dihydroxygruppen.

Das Fazit dieser Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehung war, dass alle aromatischen Verbindungen mit wenigstens einer vicinalen Di- bzw. Trihydroxylierung imstande waren MTT zu reduzieren und dass das Reduktionsvermögen mit der Anzahl entsprechender funktioneller Gruppen anstieg.

Diese Ergebnisse werden durch Berichte aus der Literatur bestätigt und ergänzt. So ist dokumentiert, dass die Flavonoide Luteolin und Quercetin (Peng et al., 2005) sowie Dopamin, Adrenalin und weitere Verbindungen mit vicinaler Dihydroxylierung MTT reduzieren (Habtemariam, 1995). Die Beschreibung, dass auch verschiedene wässrige Pflanzenextrakte MTT direkt reduzieren (Shoemaker et al., 2004), unterstreicht das Bild von möglichen falsch positiven Resultaten bei unkritischer Verwendung des MTT-Assays.

4.1.1.2. Vermeidung falscher Ergebnisse im MTT-Vitalitäts-Assay

Um eine direkte Wechselwirkung der Testsubstanzen mit MTT auszuschließen, erwies sich ein genereller Überstandswechsel vor MTT-Zugabe als sinnvoll. Dadurch wurden kritische Substanzen aus dem Zellkulturüberstand entfernt und eine ungewollte Reduktion von MTT

durch diese verhindert. Dies ermöglichte den weiteren Einsatz des Assays zur Bestimmung toxischer Effekte auf Makrophagen.

Eine andere Möglichkeit, eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen, besteht in der Testung der Substanzen im zellfreien System. Stellen sich die Substanzen im Vorfeld als unkritisch heraus, kann bei der weiteren Testung auf den zusätzlichen Überstandswechsel vor der MTT-Zugabe verzichtet werden.

Alternativ bietet sich anstelle des MTT-Assays eine FACS-basierte Methode an (vgl. Kapitel 2.11.1.). Bei ihr wurde den mit Testsubstanzen behandelten Zellen kurz vor der Messung der Farbstoff Propidiumjodid (PI) zugegeben, der mit der DNA toter Zellen interagiert und diese so selektiv markiert. Der prozentuale Anteil toter Zellen resultiert aus dem PI-Signal im Durchflusszytometer (Sasaki et al., 1987). Bei dieser Art der Testung wurde bei allen bis dato untersuchten Substanzen keine Beeinflussung des Messergebnisses beobachtet. Dies macht diese Methode zu einer geeigneten Alternative zum MTT-basierten Vitalitätstest.

4.1.1.3. Einflussnahme des Zugabezeitpunktes der Testsubstanzen auf die Schädigung der RAW 264.7-Zellen

Neben der Reduktion von MTT durch Testsubstanzen mit antioxidativem Potential wurden noch weitere Assay-spezifische Auffälligkeiten beobachtet. Bei der Ermittlung zytotoxischer Effekte phenolischer Testsubstanzen auf die RAW 264.7-Zelllinie wurde festgestellt, dass der Zeitpunkt der Zugabe einiger Testsubstanzen erheblichen Einfluss auf die gemessene Toxizität im MTT-Assay hatte. So zeigten Gallussäure und ihr Methyl- bzw. Ethylester 5 bis 10-fach höhere Toxizitätswerte, wenn die Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe als Suspension vorlagen, also noch nicht ihren typischen Zellmonolayer ausgebildet hatten (vgl. Abschnitt 3.1.1.2.). Um diese Daten mit denen nach Ausbildung eines Zellmonolayers vergleichen zu können, wurden die gemessenen MTT-Umsätze immer in Relation zu unbehandelten Zellkontrollen gesetzt. Damit wurde ausgeschlossen, dass die Zellproliferation während der 24-stündigen Ausbildung bzw. Ruhephase des Monolayers für den höheren MTT-Umsatz ursächlich war.

Eine Erklärung für die gesteigerte Toxizität bei Behandlung der RAW 264.7-Zellen vor Ausbildung des Monolayers könnte in der Interaktion der Testsubstanzen mit der gesamten Zelloberfläche liegen. Im Gegensatz dazu dürfte bei Ausbildung eines dichten Zellmonolayers nur ein Teil der Zelloberfläche mit den Teststoffen in Berührung gekommen sein, wodurch

die Zellen auch weniger geschädigt wurden. Diese Vermutung erscheint plausibel, da die phenolischen Hydroxygruppen und Carbonylfunktionen der untersuchten Gerbstoffe prädestiniert sind, über Ionen- oder Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den Zellmembran-Proteinen der RAW 264.7-Zellen zu reagieren.

Eine Einbeziehung der Toxizität des Gallussäuremethylesters und der p-Hydroxybenzoesäure ermöglichte eine vertiefte Betrachtung (vgl. Abschnitt 3.1.1.3.). Die Gegenüberstellung der Ergebnisse des MTT-Assays mit denen des FACS-basierten PI-Assays zeigte deutlich, dass die Beobachtungen MTT-Assay spezifisch waren. Dieser Schluss folgte aus der Tatsache, dass die FACS-basierte Methode für den Gallussäuremethylester und die p-Hydroxybenzoesäure für beide Behandlungsarten (Zellsuspension und Monolayer) nach verschiedenen Inkubationszeiten vergleichbare Ergebnisse erbrachte. Die durchflusszytometrisch ermittelten Toxizitäten befanden sich dabei im Mittel zwischen denen für die MTT-Suspension- und MTT-Monolayer-Daten.

Eine Erklärung, weshalb in der FACS-Methode keine deutlich differierenden Ergebnisse als Folge der unterschiedlichen Behandlungsarten gefunden wurden, dürfte in seinem Prinzip begründet sein. So dringt PI in Zellen ein, deren Membranintegrität geschädigt wurde (Sasaki et al., 1987; King, 2000). Dabei dürfte es keine große Rolle spielen, ob Testsubstanzen nur einen Teil oder die ganze Membran der Zelle geschädigt haben, um in der FACS-Messung als „tot“ zu erscheinen.

Im Gegensatz dazu misst der MTT-Assay die metabolische Reduktion (im Wesentlichen durch die mitochondrielle Dehydrogenase) des Formazan-Salzes durch vitale Zellen. Diese scheint durch Behandlung mit Gallussäuremethylester nicht nur mit zunehmender Zeit stärker eingeschränkt zu werden, sondern auch von der Größe der Angriffsfläche abzuhängen.

4.1.2. Kritische Beurteilung des MTT-Assays zur Bestimmung antileishmanieller Eigenschaften gegen intrazelluläre, amastigote Leishmanien

Zur Bestimmung antileishmanieller Eigenschaften von Testsubstanzen gegen intrazelluläre amastigote Leishmanien mittels MTT wurden RAW 264.7-Zellen mit *L. major* Parasiten infiziert. Nachdem die Parasiten sich während einer 24-stündigen Ruhephase in ihr intrazelluläres, amastigotes Stadium umgewandelt und die Wirtszellen einen Monolayer ausgebildet hatten, wurden die Proben 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurden die Wirtszellen selektiv mit SDS-Lösung lysiert und so die intrazellulären

Leishmanien wieder freigegeben. Nachdem sich die Leishmanien in ihr promastigotes, extrazelluläres Stadium umgewandelt hatten, schloss sich eine 5-10 Tage lange Inkubationszeit an, in der sich die Parasiten in ihrem promastigoten Stadium vermehren konnten. Die Inkubationszeit hing davon ab, wie schnell sich die Leishmanien in den unbehandelten Zellkontrollen vermehrten und ihre Anzahl damit groß genug war (wenigstens 3×10^5 Parasiten/Well), um zugegebene MTT-Lösung messbar umzusetzen (vgl. Abschnitt 2.10.3.). Auf eine antileishmanielle Wirkung der Testsubstanzen gegen intrazelluläre Leishmanien wurde geschlossen, wenn die Leishmanien der behandelten Proben weniger MTT umsetzten als die unbehandelten Kontrollen.

Als besonders schwierig bei der Durchführung des Assays stellte sich die selektive Lyse der als Wirtszellen eingesetzten Zelllinie RAW 264.7 heraus. Eine Standardisierung dieses Arbeitsschrittes war nicht möglich, da die Zellen, je nach verwendeter Charge, mehr oder weniger schnell durch SDS-Behandlung lysiert wurden. Zudem war die mikroskopische Bestimmung des Endpunktes der Lyse sehr von subjektiven Einschätzungen abhängig. Eine weitere Ursache, die den erfolgreichen Einsatz des Assays erschwerte, könnte auch im Gebrauch der Zelllinie RAW 264.7 selbst gelegen haben, für die dieser Assay ursprünglich nicht etabliert wurde. Denn im Unterschied zu den von Kiderlen et al. (1989) verwendeten murinen Knochenmarkkulturmakrophagen (BMM Φ), die sich nach Ausdifferenzierung nicht weiter teilen, proliferierten die verwendeten RAW 264.7-Zellen auch während der Durchführung des Versuchsansatzes weiter. Daraus resultierten in den verschiedenen behandelten Kavitäten durch Einfluss der Testsubstanzen unterschiedlich dichte Zellrasen, was zu variierenden optimalen Lysezeiten führte.

Als Orientierung für den Endpunkt der Lyse dienten infizierte unbehandelte Zellen. Testsubstanzen, die Einfluss auf die Membranbeschaffenheit der Wirtszellen haben, könnten den optimalen Endpunkt der Lyse für diese Proben verschieben, wodurch die unbehandelte Zellprobe ihre Funktion als Kontrolle nur noch bedingt erfüllen würde. Diese Problematik war in dem ursprünglichen Assay zu vernachlässigen, da dieser BMM Φ als Wirtszellen verwendete und diese durch geringste Mengen rIFN- γ und LPS aktiviert wurden (Kiderlen et al., 1989). Für die Testung von Naturstoffen ist der Assay nicht etabliert worden. Nachteilig war auch die Beobachtung, dass selbst, wenn der Großteil der RAW 264.7-Zellen erfolgreich lysiert worden war die wenigen überlebenden Zellen, vor allem am Rand der Kavitäten, sich auch unter den Kulturbedingungen für die Leishmanien (25 °C, Leishmanien-Kulturmedium)

wieder vermehrten. Eine Auswertung des Assays war also selbst bei Überleben weniger RAW 264.7-Zellen nicht mehr möglich. Im Gegensatz dazu starben BMM Φ , die durch SDS nicht lysiert wurden, kurz danach unter den gegebenen Kulturbedingungen ab. Dies verdeutlicht, dass die Lyse von BMM Φ weniger störungsanfällig ist als die von RAW 264.7-Zellen. Auch die bis zu 10 Tage dauernde Vermehrung der extrazellulären Parasiten bis zur MTT-Zugabe kann eine Fehlerquelle beinhalten. Denn je länger die nötige Zeit der Parasitenvermehrung andauert, desto größer werden auch interne Schwankungen.

In der Literatur werden noch weitere den MTT-Assay negativ beeinflussende Faktoren diskutiert. So berichten Dutta und Mitarbeiter (2005), dass Phenolrot, welches als pH-Indikator häufig Medien zugesetzt wird, die Sensitivität des Testsystems negativ beeinflusst. Die Autoren empfehlen zur Vermeidung eines Sensitivitätsverlustes, den Überstand und damit auch das Phenolrot nach MTT-Umsatz durch Zentrifugation der Proben zu entfernen. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Interferenz des Farbstoffs durch Zugabe angesäuerter SDS-Lösung (pH 4,3 - 4,7) zur Solubilisierung der entstandenen MTT-Kristalle minimiert. Die Ansäuerung des Milieus bedingt den gleichmäßigen Farbumschlag des Indikators in seine gelbe Farbe, die das Testsystem weitaus weniger stört (Kiderlen und Kaye, 1990). Eine weitere Alternative wäre die Verwendung von Phenolrot-freiem Medium. Neben den genannten Faktoren hängt die Stärke des MTT-Umsatzes von der verwendeten Zellart (Chiba et al., 1998), dem herrschenden pH-Wert (Plump et al., 1989), wie auch von der zugegebenen Menge an FKS, Albumin (Rollino et al., 1995), D-Glucose (Vistica et al., 1991; Chiba et al., 1998; Takahashi et al., 2002) und weiterer Medium-Komponenten ab.

Die beschriebenen Einflussfaktoren verdeutlichen die Notwendigkeit einer individuellen Beurteilung des häufig verwendeten MTT-Assays in Bezug auf die geplanten Experimente. Nur so können seine Vorteile genutzt und Fehlinterpretationen vermieden werden. Zudem blieb die Erkenntnis, dass der MTT-basierte Assay zur Bestimmung antileishmanischer Eigenschaften phenolischer Testsubstanzen nicht optimal ist und daher ein alternatives Testsystem wünschenswert war.

4.2. Alternativer Assay zur Bestimmung zytotoxischer und anti-leishmanieller Eigenschaften von Testsubstanzen

Aus den Erkenntnissen bei der Beurteilung des MTT-Assays wurde ein neues Testsystem entwickelt, welches die überlebenden Leishmanien intrazellulär *in situ* bewertet. Damit entfielen die Wirtszellyse mit all ihren Unwägbarkeiten und möglicherweise auch die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen durch das intrinsische Reduktionspotential von Testsubstanzen. Klassische *in vitro* Testsysteme zur Bestimmung antileishmanieller Eigenschaften bzw. von Infektionsraten verwenden Färbeverfahren wie die Giemsa- (Bergman, 1984) Diff-Quik® oder Bisbenzimid-Färbung (Laube et al., 1998). Diese Färbemethoden ermöglichen das mikroskopische Auszählen der Leishmanien in den Präparaten und lassen auch eine visuelle Beurteilung der Wirtszellen zu (vgl. Abschnitt 2.16.4.1. und 2.16.4.2.). Nachteilig ist, dass die verschiedenen mikroskopischen Methoden aufgrund des hohen Arbeitsaufwands für einen hohen Probendurchsatz weniger geeignet sind. Deshalb wurden derartige Färbemethoden in dieser Arbeit nur als Referenz-Methoden verwendet und nicht für eine Routineanwendung zur systematischen Testung von Substanzen. Alternativ zu den klassischen Verfahren bot sich die Durchflusszytometrie als Analysesystem an. Eine wichtige Voraussetzung für den Aufbau eines FACS-basierten Testsystems ist die Fluoreszenzmarkierung des intrazellulären Erregers. Bewährt ist dafür in der FACS-Analytik die Markierung intrazellulärer Erreger durch spezifische Antikörper nach Permeabilisierung der Wirtszellen und Detektion dieser durch Fluorochrom-gebundene Sekundärantikörper. Aus diesem Grund wurde ein Chinchilla-Kaninchen mit attenuierten Leishmanien immunisiert und so ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gewonnen.

4.2.1. Detektion von Leishmanien mit Kaninchen-Antiserum

Als erstes wurde die Spezifität des Kaninchen-Antiserums anhand mikroskopischer Untersuchungen überprüft. Die durchgeführten immunohistochemischen Färbungen extrazellulärer, promastigoter Parasiten mit dem gewonnenen Antiserum und Zweitantikörper (R-Phycoerythrin-Ziege-anti-Kaninchen IgG) zeigten, dass unspezifische Bindungen durch Einsatz des Antiserums ausgeschlossen werden konnten (vgl. Abschnitt 3.2.2.). Nach der extrazellulären Markierung der Leishmanien wurde im nächsten Schritt gezeigt, dass das Antiserum auch für die intrazelluläre Färbung von *in vitro* infizierten Makrophagen geeignet

ist (vgl. Abschnitt 3.2.3.). Die für Makrophagen typische Autofluoreszenz war bei der Auswertung der Präparate nicht hinderlich.

Die Anwendung des Antiserums zum Nachweis antileishmanieller Effekte wurde exemplarisch durch Behandlung infizierter BMM Φ mit Pentostam[®] oder rIFN- γ + LPS überprüft. Pentostam[®] wurde als Beispiel für eine direkt antileishmaniell wirkende Substanz eingesetzt. Für eine indirekte durch Makrophagenaktivierung hervorgerufene leishmanizide Wirkung wurden BMM Φ repräsentativ mit rIFN- γ + LPS aktiviert. Bei Beurteilung der Ergebnisse fiel auf, dass das Signal der gefärbten Leishmanien sowohl nach Behandlung mit dem Arzneimittel Pentostam[®] als auch mit rIFN- γ + LPS lediglich schwächer wurde. Auch die Anzahl der morphologisch eindeutig erkennbaren Leishmanien hatte stark abgenommen (vgl. Abschnitt 3.2.4.). Die dennoch diffus vorhandenen Signale, insbesondere im Bereich der Makrophagenoberflächen, könnten auf eine Bindung des Antiserums an Leishmanien-Antigen zurückzuführen sein, welches typischerweise auf der Oberfläche von Makrophagen präsentiert wird (Denkers und Butcher, 2005).

Der Einsatz des Antiserums ermöglichte demnach nicht wie erhofft die klare Unterscheidung lebender intrazellulärer Leishmanien von abgetöteten Parasiten. Deshalb wurde für die Entwicklung eines FACS-basierten Assays zur Bestimmung antileishmanieller Effekte die Verwendung des Antiserums als ungeeignet eingeschätzt.

Nachdem aber die Färbung extra- und intrazellulärer Leishmanien mit Antiserum gute Ergebnisse lieferte, wurde es in Anlehnung an Kiderlen et al. (2004) auf die Diskriminierung von Leishmanien in Geweben infizierter Mäuse ausgetestet. Hier ermöglichte seine Anwendung die zuverlässige Detektion von Leishmanien und Leishmanien-Antigen in Paraffinschnitten eines mit *L. major* WT infizierten BALB/c Mäusefußes und könnte somit bei *in vivo* Versuchen gute Dienste leisten.

4.2.2. FACS-basierter antileishmanieller Assay

Nachdem das Antiserum für die Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Leishmanien in einem FACS-basierten Assay als wenig erfolgsversprechend eingeschätzt wurde, musste nach alternativen Markierungsmöglichkeiten gesucht werden.

In der Literatur werden über die Verwendung von Antikörper-basierten Markierungen hinaus weitere zur Färbung von Leishmanien geeignete Fluoreszenzmarker, wie

Carboxyfluoreszeindiacetatsuccinimidylester (CFSE), Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat (CM-DiI) oder Chloromethyltetramethylrhodamin (CMTMR) (Chang et al., 2007) aufgeführt. CFSE ist am besten geeignet (Chang et al., 2007), um Leishmanien einer Detektion sowohl im Mikroskop (Konfokales-Laser-Rastermikroskop oder Fluoreszenz-Mikroskop) als auch im FACS-Gerät zugänglich zu machen. Dabei werden die Parasiten zu Beginn eines Versuches mit CFSE inkubiert. Während dieser Zeit bildet der Fluoreszenzfarbstoff stabile Konjugate mit aliphatischen Aminen des Parasiten und markiert ihn so. Typisch für diese Art der Färbung ist, dass sich die Intensität des Signals bei Zweiteilung der Zelle halbiert. Aus diesem Grund ist sie unter anderem ein geeignetes Werkzeug, Zellproliferation zu verfolgen. Weiter ist die Methode geeignet, verschiedenste Zellarten zu markieren. Auch ist die Durchführung relativ einfach. Ein Nachteil dieser Fluoreszenzmarkierung liegt in der schnellen Abnahme des Signals bei Zellen mit kurzen Teilungszeiten. Bei Leishmanien ist alle 24 h mit einer Halbierung der Signalintensität durch Zellteilung zu rechnen. Bei dieser Zeitspanne kann die Proliferation promastigoter, extrazellulärer Leishmanien über 4 bis 5 Tage verfolgt werden (Kamau et al., 2001). Für amastigote, intrazelluläre Leishmanien werden lediglich Zeiten bis etwa 48 h angegeben. (Chang et al., 2007). Nachdem allerdings bis zum Ausbruch einer klinisch manifesten Leishmanien-Infektion bei BALB/c Mäusen wenigstens 3-4 Wochen vergehen, ist diese Methode für Infektionsversuche meist ungeeignet. Selbst im beschriebenen antileishmaniellen MTT *in vitro* Assay vergehen bis zur Lyse der Wirtszellen wenigstens 72 h. 24 h wurden den Leishmanien eingeräumt, ihre intrazelluläre, amastigote Form einzunehmen und weitere 48 h wurden von der Wirtszelle benötigt, die Parasiten nach Aktivierung abzutöten (vgl. Abschnitt 3.3.4.2.). Weil sich bei den notwendigen Inkubationszeiten das Signal der gefärbten Leishmanien bis hin zum Messzeitpunkt stark verringern würde, erschien es für den Einsatz in dieser Arbeit ungeeignet.

Aus diesem Grund sollte die Verwendung eines gentechnisch veränderten Leishmanien-Stammes überprüft werden, der aufgrund intrinsischer Fluoreszenz nicht mehr zusätzlich markiert werden muss.

4.2.2.1. GFP-Signal als Marker für die Vitalität von Leishmanien

Der Einsatz der Reporter-Gen-Technologie wird als aussichtsreiches breit einsetzbares Hilfsmittel diskutiert, welches zur Etablierung diverser Testsysteme prädestiniert ist.

Mittlerweile befinden sich unter den vielen Organismen, die mit Reporter-Genen ausgestattet wurden, auch eine Vielzahl verschiedener Leishmanien-Stämme (Sereno et al., 2007). Ein wegen seiner intrinsischen Fluoreszenz, geringen Toxizität, einfachen Detektion und Quantifizierbarkeit bevorzugter Reporter ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* (Kamau et al., 2001).

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Signalintensität und Stabilität dieses Proteins exprimiert in *L. major* pXG-GFP Parasiten (Ha et al., 1996) sollte erste Hinweise geben, ob es für das angestrebte Testsystem geeignet ist. Die Betrachtung promastigoter, extrazellulärer sowie amastigoter in infizierten BMM Φ befindlichen Leishmanien ergab, dass die GFP-Signale der Parasiten in beiden Stadien klar zu erkennen waren (vgl. Abschnitt 3.3.3.1.). Obwohl das GFP im Vergleich zu anderen in der Zellbiologie verwendeten Reportergenen als sehr stabil eingestuft wird (Jansson, 2003), verblasste in der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung die grüne Fluoreszenz der Leishmanien innerhalb von ca. fünf Minuten unter Lichtexposition (450-490 nm) nahezu komplett (vgl. Abschnitt 3.3.3.1.). Da aber für die mikroskopische Bestimmung der Infektionsraten genügend histo- und zytologische Methoden zur Verfügung standen (z.B.: Bisbenzimidfärbung, Diff-Quik®, Färbung mit Kaninchen-Antiserum) war der beobachtete Bleicheffekt nicht als Nachteil zu werten. Tsien (1998) berichtet in diesem Zusammenhang, dass die meisten GFPs relativ resistent gegen Bleicheffekte sind, es aber große Unterschiede je nach Art des eingesetzten Reporters gibt. Dieser Befund deckte sich weiter mit der Aussage, von Sereno et al. (2007), nach der bis auf wenige Ausnahmen die GFP-Signale transfizierter Leishmanien zu schwach sind, um ihre Signale in Mikroplattenphotometern zu messen. Für diesen Zweck finden multimere Formen des GFP Einsatz (Chan et al., 2003). Für die Detektion der schwächeren GFP-Signale ist die angedachte sensitivere Durchflusszytometrie das Mittel der Wahl (Sereno et al., 2007). Da bei dieser Methode die Zellen nur einer sehr kurzer Lichtexposition ausgesetzt sind, ist auch der in der Mikroskopie beobachtete Bleicheffekt zu vernachlässigen.

Doch noch vor Betrachtung des GFP-Signals im FACS-Gerät war es von Interesse, die neben dem Gen für die GFP-Expression auf dem gleichen Plasmid liegende Geneticin-Resistenz zu überprüfen.

4.2.2.2. Geneticin-Resistenz des Wildtyp- und des GFP-transfizierten Stammes

Ziel dieses Versuchsansatzes war es zu zeigen, dass die dem Dauerkulturmedium der Leishmanien zugegebene Geneticin-Konzentration von 25 µg/ml geeignet ist, Wildtyp-Leishmanien selektiv abzutöten und die GFP-transfizierten Geneticin-resistenten Parasiten zu kultivieren. So kann verhindert werden, dass Leishmanien, denen das eingeführte Plasmid durch lange Kultivierung verloren ging überleben oder sich vermehren. Um dies abzusichern wurden Wildtyp- und GFP-transfizierte Leishmanien mit Geneticin behandelt. Die Dauer der Behandlung erfolgte in Anlehnung an die im Arbeitskreis übliche Kultivierung von Leishmanien über einen Zeitraum von 7 Tagen. Dies entsprach der Zeitspanne bis zur post-logarithmischen Wachstumsphase der Leishmanien und zu deren Verwendung in Experimenten (vgl. Abschnitt 2.3.6.). Die Gegenüberstellung der über MTT-Zugabe ermittelten Vitalität beider Leishmanienstämme nach 7 Tagen in mit Geneticin versetztem Kulturmedium veranschaulichte, dass die gewählte Antibiotikumkonzentration für die Dauerkultur der transfizierten Leishmanien geeignet war (vgl. Abschnitt 3.3.3.2.). So wurden Leishmanien vom Wildtyp nach einwöchiger Kultur in Geneticin-haltigem Medium komplett abgetötet. Im Gegensatz dazu wurde die Vitalität der transfizierten Leishmanien nur geringfügig beeinträchtigt.

Nachdem die eingesetzte Geneticin-Konzentration zur selektiven Kultivierung der GFP-Leishmanien geeignet war und die GFP-Signale der extrazellulären, promastigoten und der intrazellulären, amastigoten Leishmanien mittels Fluoreszenzmikroskopie detektierbar waren, schloss sich die Betrachtung der Parasiten im Durchflusszytometer an.

4.2.2.3. GFP-Signal promastigoter Leishmanien im FACS

Zunächst wurde das extrazelluläre, promastigote Stadium des Parasiten im FACS betrachtet und gefunden, dass das GFP-Signal in direktem Zusammenhang mit der Vitalität des Parasiten steht (vgl. Abschnitt 3.3.3.3.). So erlosch unmittelbar nach Abtötung promastigoter Leishmanien durch Amphotericin B (24 h) die grüne Fluoreszenz, während parallel dazu das PI-Signal in gleichem Maße zunahm. Neben dem GFP-Stamm wurde auch der Wildtyp-Stamm mit Amphotericin B (24 h) inkubiert. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse im Histogramm verdeutlichte, dass der transfizierte Stamm sich über das GFP-Signal klar vom Wildtypstamm trennen lässt. Die Abtötung beider Leishmanien-Stämme führte nach PI-Färbung zu vergleichbaren Fluoreszenzintensitäten.

Die Verwendung eines Leishmanien-Stammes, der nicht über ein gesteigertes (multimeres) GFP-Signal verfügt, war in diesem Zusammenhang von Vorteil. Lange Halbwertszeiten des GFP von ca. 80 h wie für andere transfizierte Leishmanien-Stämme angenommen (Kamau et al., 2001) hätten die Konsequenz, dass der GFP-Marker zur Bestimmung der Vitalität intrazellulärer Leishmanien nicht eingesetzt werden kann.

Veröffentlichungen stützen zusätzlich die Verwendung von GFP-Markern zur Bestimmung der Vitalität von Leishmanien. Allerdings nutzen die Experimentatoren diese Eigenschaft vor allem, um die Wirkung von Testsubstanzen direkt auf extrazellulären Parasiten durchflusszytometrisch zu untersuchen (Kamau et al., 2001; Singh und Dube, 2004; Sereno et al., 2007). Diese Art der Testung bietet sich zwar aufgrund ihrer sehr einfachen und schnellen Durchführung an, besitzt aber nur begrenzte Aussagekraft, denn klinisch relevant ist nur der obligat intrazelluläre, amastigote Erreger. Außerdem sind Substanzen, die gegen extrazelluläre Leishmanien erfolgreich getestet wurden oft nicht in der Lage, die Membran der Wirtszellen zu überwinden, um mit dem Parasiten interagieren zu können. Hinzu kommt noch, dass Substanzen, die nur indirekt über Makrophagenaktivierung wirken, bei solchen Untersuchungen überhaupt nicht erfasst werden. Ein weiterer Nachteil der Testung von Substanzen auf dem extrazellulären Stadium des Parasiten ist, dass sie keine simultane Aussage über mögliche toxische Effekte gegenüber den Wirtszellen zulässt. Hierfür sind weitere Versuche erforderlich, was einen zusätzlichen Zeit- und Kostenaufwand bedeutet.

Aus diesem Grund war es sinnvoll zu überprüfen, ob das GFP-Signal auch genutzt werden kann, Effekte auf den intrazellulären Parasiten bei gleichzeitiger Beurteilung der Vitalität der Wirtszellen darzustellen.

4.2.2.4. Detektion intrazellulärer, amastigoter Leishmanien über das GFP-Signal

Um das GFP-Signal intrazellulärer, amastigoter Leishmanien für die Ermittlung des prozentualen Anteils infizierter Makrophagen verwenden zu können, war es wichtig zu überprüfen, ob das GFP-Signal spezifisch für die transfizierten Leishmanien ist. Außerdem musste der Nachweis erbracht werden, dass das GFP-Signal des intrazellulären, amastigoten Parasiten unmittelbar nach dessen Abtötung erlischt. Die Infektion von BMM Φ mit *L. major* WT oder *L. major* GFP und die anschließende Darstellung des GFP-Signals im FACS zeigte zweifelsfrei, dass das GFP-Signal spezifisch für mit *L. major* GFP infizierte BMM Φ war. In Kontrast dazu zeigten die *L. major* WT infizierten BMM Φ erwartungsgemäß kein GFP-

Signal (vgl. Abschnitt 3.3.4.1.). Die Nachweisbarkeit einer direkt antileishmaniell wirkenden Substanz über das GFP-Signal wurde am Beispiel von Pentostam[®] verdeutlicht. Die Behandlung von infizierten Zellen führte zu einem völligen Erlöschen des GFP-Signals. Da das PI-Signal bei der Untersuchung der intrazellulären Parasiten dem GFP-Signal nicht zur Verifizierung gegenübergestellt werden konnte, sondern einzig der Beurteilung der Vitalität der Wirtszellen diente, wurden zusätzlich mikroskopische Präparate angefertigt. Die Diff-Quik[®] Färbung der Präparate verdeutlichte, dass der Verlust des GFP-Signals der behandelten BMM Φ auf den Tod der Parasiten zurückzuführen war (s. Abb. 3-21).

Die praktische Durchführung der Experimente wurde durch die Verwendung von sterilen Polystyrol Rundbodenröhrchen mit Deckel anstelle von Mikrotiterplatten erheblich erleichtert. In den Röhrchen konnten alle Arbeitsschritte, wie die Behandlung mit Testsubstanzen, die Waschgänge mit PBS bis einschließlich der Messung durchgeführt werden. Außerdem stellte sich diese Art der Durchführung als besonders schonend für die Zellen heraus und könnte einer Automatisierung dieser Arbeitsschritte dienen.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der direkten antileishmaniellen Wirkung sollte mit Hilfe des Testsystems auch ein antileishmanieller Effekt über eine Makrophagenaktivierung aufgezeigt werden.

4.2.2.5. Aktivierung infizierter BMM Φ mit rIFN- γ und LPS zu antileishmaniellen Effektorzellen

Dreh- und Angelpunkt einer immunologischen Abwehr einer Infektion mit Leishmanien ist die Wandlung des Makrophagen von einer Wirtszelle zu einer leishmaniziden Effektorzelle (vgl. Abschnitt 1.7.) (Kiderlen und Kaye, 1990). Die Detektion dieser antileishmaniellen Aktivität mit Hilfe des intrazellulären GFP-Signals wurde durch Behandlung infizierter BMM Φ mit rIFN- γ und / oder LPS überprüft. Parallel neben dem GFP-Signal der Leishmanien wurde außerdem überprüft, ob eine gesteigerte Fragmentierung der BMM Φ durch die Infektion oder Behandlung mit rIFN- γ + LPS aufgetreten war. Weiter wurde durch PI-Zugabe die Vitalität der BMM Φ beurteilt. Die am FACS-Gerät ermittelten Ergebnisse demonstrierten, dass weder die Behandlung noch die Infektion der BMM Φ mit Leishmanien zu einer gesteigerten Fragmentierung der Wirtszellen führten (s. Abb.3-22.). Außerdem blieb der über PI-Diskriminierung dargestellte Anteil toter BMM Φ von der Art der Behandlung und der Dauer der Inkubation (6 h, 24 h, 48 h) unbeeinflusst. Auffällig war jedoch, dass der Anteil

toter Makrophagen bei den infizierten unbehandelten Proben zu allen Zeitpunkten höher war als bei den nicht infizierten (s. Abb. 3-23.). Daher ist davon auszugehen, dass durch die Infektion *per se* ein gewisser Teil der Wirtszellen abstirbt.

Besonders wichtig war die Feststellung, dass der Effekt einer indirekten leishmaniziden Wirkung erst nach Behandlungszeiten von 48 h und mehr deutlich erkennbar war. Diese Beobachtung deckt sich mit Angaben aus der Literatur, nach denen bis zur Zerstörung der intrazellulären Parasiten durch Makrophagenaktivierung auch Inkubationszeiten von wenigstens 48 h eingeräumt werden (Kiderlen et al., 1990; Liew et al., 1990; Ritter et al., 2004).

Die Inkubation mit rIFN- γ als alleiniger Stimulus hatte keine Auswirkung auf die Infektionsrate. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Veröffentlichungen (Kiderlen und Kaye, 1990; Cunha et al., 1993; Töttemeyer et al., 2006), wonach neben rIFN- γ im *in vitro* System ein Zweitstimulus für eine intrazelluläre leishmanizide Aktivität nötig ist. Widersprüchliche Angaben, wie von Ritter et al. (2004), nach denen bereits die alleinige Zugabe von rIFN- γ zu einer deutlichen iNO-Produktion und damit verbundenen Reduktion der Leishmanienlast führen, könnten durch eine mögliche Voraktivierung der Makrophagen, z.B. bei ihrer Isolierung aus der Maus bzw. während der Ausdifferenzierung aus Knochenmarkstammzellen verursacht worden sein. Auch Mediumkomponenten wie Kälberseren enthalten nicht selten minimale LPS-Verunreinigungen, die als Zweitstimulus wirken könnten.

4.2.2.6. Verifizierung der FACS-basierten Infektionsraten durch Mikroskopie

In einem Übersichtsartikel von Sereno et al., (2007) werden limitierende Faktoren der Reportergentechnologie diskutiert. So wird angeführt, dass bei derartigen *in vitro* Methoden mit einer mangelnder Sensitivität bei der Detektion des GFP-Signals der intrazellulären Leishmanien durch die Wirtszellen zu rechnen ist. Dieser mögliche Schwachpunkt wurde deshalb vor dem weiteren Einsatz des Testsystems näher beleuchtet. Der Fokus wurde dabei auf die Fragestellung gerichtet, ob die FACS-Methodik sensitiv genug ist, auch BMM Φ mit nur einer phagozytierten Leishmanie zuverlässig zu erfassen. Der Beleg, dass bereits ein einzelner intrazellulärer Parasit ausreicht, um die Wirtszelle als GFP-positiv zu detektieren, wurde durch den Vergleich von mikroskopisch ausgezählten und per FACS ermittelten Infektionsraten geliefert. Aufschlussreich war hierzu die mikroskopische Auszählung des prozentualen Anteils an Makrophagen, die nur einen einzigen Parasiten enthielten (vgl.

Abschnitt 3.3.4.3.). Wären diese Anteile (25%, 11% bzw. 28%) mittels Durchflusszytometrie nicht zu erfassen gewesen, hätte dies zu einer deutlichen Differenz der Ergebnisse beider Methoden führen müssen.

Nachdem die Sensitivität der FACS-basierte Methode belegt worden war, sollte der Aspekt des Nachweises einer antileishmaniellen Makrophagenaktivierung durch Kombination verschiedener immunologischer Aktivatoren vertieft werden.

4.2.2.7. Aktivierung infizierter BMM Φ mit unterschiedlichen Kombinationen an rIFN- γ , LPS und rTNF- α

In einer Kreuztitration mit rIFN- γ , LPS und rTNF- α wurde die Dosis- und Kombinationsabhängigkeit der Aktivatoren über das GFP-Signal der intrazellulären Parasiten durchflusszytometrisch gezeigt. Parallel dazu wurden die von den Wirtszellen in den Zellkulturüberstand sezernierten reaktiven Stickstoffintermediate, gemessen als Nitrit, mittels Griess-Assay ermittelt (vgl. Abschnitt 3.3.4.4.).

Verdeutlicht wurde durch diesen Versuch, dass das GFP-Signal geeignet ist, die synergistischen biologischen Effekte der verwendeten Aktivatoren darzustellen. Die dabei festgestellte enge Korrelation der gemessenen Nitrit-Werte mit den antileishmaniellen Effekten, die den Ergebnissen zahlreicher Arbeitsgruppen entsprechen (Evans et al., 1993; Green et al., 1991; Liew et al., 1990; Vouldoukis et al., 1996), waren mit der FACS-basierten Methode nachzuvollziehen.

Hervorzuheben ist die Feststellung, dass die Inkubation mit LPS alleine in niedrigen Konzentrationen von 1 ng/ml und 10 ng/ml zu keiner durch Aktivierung der Wirtszelle verbundenen Reduktion der Infektionsrate und zu keiner detektierbaren iNO-Produktion führten. In Kontrast dazu wurde durch Kombination selbst niedriger Konzentrationen an rIFN- γ (10 U/ml) mit LPS (1 ng/ml) die Infektionsrate auf die Hälfte reduziert.

Die Inkubation mit rIFN- γ alleine (10 bzw. 100 U/ml) führte, wie in früheren Versuchen (vgl. Abschnitt 3.3.4.2.) zu keiner Abtötung von Leishmanien. Die Daten des Griess-Assays bestätigen diese Beobachtung, da keine iNO-Produktion nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund deckt sich mit früheren Beobachtungen (Kiderlen et al., 1990).

Auch die Behandlung mit rTNF- α (0, 10, 100 U/ml) ohne Zweitstimulus hatte weder Einfluss auf die iNO-Produktion noch auf die Infektionsrate der untersuchten Proben. Synergistische

und konzentrationsabhängige Effekte waren nur in Kombination mit rIFN- γ (100 U/ml) oder mit rIFN- γ (10 U/ml) + LPS (1 ng/ml) zu ermitteln.

Nachdem ein FACS-basiertes Testsystem zur simultanen *in vitro* Untersuchung zytotoxischer und antileishmanieller Wirkung erfolgreich etabliert worden war, schloss sich die Untersuchung aus der Literatur bekannter antileishmaniell wirksamer Substanzen an. Zudem sollte die Bedeutung der iNO Produktion für eine indirekte Leishmanienabtötung durch Inhibition der iNO-Synthase untermauert werden.

4.2.2.8. Detektion der antileishmaniellen Wirkung von Amphotericin B, Buparvaquon und Licochalcon A im FACS-Assay

Das FACS-basierte Testsystem ermöglichte, die Wirkung bekannter direkt leishmanizider Substanzen konzentrationsabhängig zu erfassen und zu vergleichen. Die Behandlung Leishmanien infizierter BMM Φ mit verschiedenen Konzentrationen von Amphotericin B (0,05, 0,1, 0,5 μ M) (Chatterjee und Sunder, 2006), Buparvaquon (0,05, 0,1, 0,5 μ M) (Croft et al., 1992) und Licochalcon A (5, 10, 20 μ M) (Zhai et al., 1999) führte zur konzentrationsabhängigen Abtötung der intrazellulären Parasiten. Die parallele Bestimmung der Nitrit-Werte aus dem Überstand der Proben ergab, dass alle drei Substanzen selbst in den höchsten Konzentrationen keine merkliche iNO-Produktion induzierten (vgl. Abschnitt 3.3.5.). Damit ist eine direkte leishmanizide Wirkung dieser Verbindungen auch gegen intrazelluläre Parasiten anzunehmen. Um diese Vermutung abzusichern und auszuschließen, dass intrazelluläres, nicht erfassbares iNO bei der antileishmaniellen Wirkung beteiligt war, wurde in weiteren Versuchen die iNO-Synthase der Makrophagen gehemmt. Die kompetitive Hemmung des Enzyms mit L-NMMA zeigte, dass alle drei Substanzen in dem betrachteten Modell unabhängig von einer iNO-Produktion wirkten (vgl. Abschnitt 3.3.5.1). Dies ist nicht selbstverständlich, zumal bei der Verwendung von Amphotericin B als Antimykotikum mehrfach von immunstimulatorischen Effekten berichtet wird (Wolf und Massof, 1990; Brajtburg et al., 1990 & 1996; Coste et al., 2002). Im Unterschied zu den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen aktivierten die zitierten Autoren die Makrophagen entweder *in vivo* oder *in vitro* mit IFN- γ vor (priming). Nach anschließender Behandlung mit Amphotericin B berichten sie über eine gesteigerte Ausschüttung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Dies erklärt auch, dass in dieser Arbeit die Inkubation mit Amphotericin B allein zu keiner iNO-Produktion führte. Weiter wurde durch diesen Versuchsansatz nochmals

gezeigt, dass die alleinige Infektion von Makrophagen mit Leishmanien zu keiner iNO-verbundenen Voraktivierung führt.

4.2.2.9. Einsatz der RAW 264.7 Zelllinie als alternative Wirtszelle im FACS-Assay

In unserer Arbeitsgruppe werden im Infektionsmodell für Leishmanien sowohl die makrophagenähnliche Zelllinie RAW 264.7 als auch die aus murinen Knochenmarkstammzellen vermehrten und ausdifferenzierten BMM Φ als Wirtszellen eingesetzt. Wichtig war es deshalb zu beurteilen, ob im FACS-basierten Testsystem auch die leichter verfügbare Zelllinie eingesetzt werden kann. Damit würde eine zeitaufwändige Ausdifferenzierung von Knochenmarkstammzellen entfallen und der Bedarf an Mäusen könnte reduziert werden. In der Literatur wird gezeigt, dass RAW 264.7-Zellen für eine Infektion mit Leishmanien empfänglich sind und eine makrophagentypische Immunantwort einleiten können (Nandan et al., 1999; Kolodziej et al., 2001; Linares et al., 2008). Daher wurde überprüft, ob die Zelllinie auch die Grundvoraussetzungen für den Einsatz im FACS-Assay erfüllt. Hierzu wurde untersucht, ob eine deutliche Differenzierung infizierter und nicht infizierter Zellen über das GFP-Signal möglich ist, da nur so Veränderungen der Infektionsraten deutlich werden.

Um dies zu ermitteln, wurden RAW 264.7-Zellen und BMM Φ infiziert und die Infektionsraten 24, 48 und 72 h nach Infektion am Durchflusszytometer bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass nicht infizierte von infizierten RAW 264.7-Zellen eindeutig durchflusszytometrisch über das GFP-Signal der intrazellulären Leishmanien unterschieden werden konnten. Festzustellen war allerdings auch, dass sich die Infektionsrate innerhalb von 24 h halbierte und so nach 72 h zum Beispiel von ursprünglich 39% infizierten Zellen nur noch 9% infiziert waren. Im Vergleich dazu nahm der Anteil infizierter BMM Φ kaum ab (vgl. Abschnitt 3.3.6.). Eine Erklärung für die geringe Infektionsrate infizierter RAW 264.7-Zellen nach 72 h, könnte die während des Versuches voranschreitende Proliferation der Zelllinie sein. So findet laut Raschke und Mitarbeitern, (1978) innerhalb von ca. 24 h eine Zweiteilung der Zellen statt. Dies erklärt auch, warum sich die Infektionsrate in diesem Zeitraum in etwa halbierte. Für den Einsatz im FACS-Assay bedeutet dies, dass die RAW 264.7-Zelllinie ungeeignet ist. Die BMM Φ dagegen erfüllen alle notwendigen Kriterien, um als geeignete Wirtszelle in der FACS-basierten Methode zu fungieren.

Nachdem der FACS-Assay optimiert und etabliert war, war nun von Interesse, inwieweit die Daten aus der FACS-basierten Testung mit denen aus dem herkömmlichen MTT-basierten Assay konform gehen. Für diesen Zweck wurde Gallussäure, welche in unserem Arbeitskreis in der Vergangenheit mehrfach auf antileishmanielle Aktivität getestet worden war, in beiden Testsystemen untersucht.

4.2.2.10. Vergleich antileishmanieller und zytotoxischer Effekte der Gallussäure im FACS- und MTT-basierten Assay

In früheren Untersuchungen zeigte Gallussäure in unserem Arbeitskreis im MTT-basierten Assay auf RAW 264.7-Zellen antileishmanielle Potenz (Kolodziej et al., 2001). In Kontrast dazu stehen Daten des FACS-basierten antileishmaniellen Assays auf BMM Φ , wonach keine antileishmanielle Wirkung für die Gallussäure im Konzentrationsbereich von 75 - 600 μ M festgestellt wurde (vgl. Abschnitt 3.3.7.1.). Um mögliche Anhaltspunkte für die differierenden Ergebnisse zu finden, wurden die zytotoxischen und antileishmaniellen Effekte der Gallussäure im MTT-Assay unter Verwendung von RAW 264.7-Zellen und BMM Φ bestimmt und einander gegenübergestellt. Als Positivkontrollen dienten die im FACS-Assay als indirekt antileishmaniell beschriebene Kombination rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) (vgl. Abschnitt 3.3.4.4.) und die direkt gegen Leishmanien wirkende Substanz Buparvaquon (1 μ M) (vgl. Abschnitt 3.3.5.1.). Bei Betrachtung der Vitalität beider Zellarten waren weder für infizierte noch für nicht infizierte RAW 264.7-Zellen und BMM Φ nach Gallussäurebehandlung deutliche Unterschiede festzustellen. Ein antileishmanieller Effekt der Gallussäure konnte im MTT-Assay im Unterschied zum FACS-Assay bei einer Konzentration von 600 μ M für beide Zell-Populationen gleichermaßen gezeigt werden (vgl. Abschnitt 3.3.7.3.). Allerdings ist zu vermuten, dass dieses „therapeutische Fenster“ auf die geringere Sensitivität des MTT Vitalitäts-Assays im Vergleich zur PI-Färbung für die FACS-Messung bei der Bestimmung toxischer Effekte gegenüber den Wirtszellen zurückzuführen war.

Auffällig war außerdem, dass viele der RAW 264.7-Zellen nach Aktivierung mit rIFN γ + LPS abstarben. So ging der Anteil vitaler RAW 264.7-Zellen 48 h nach Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten, nicht aktivierten Zellen (100%) auf 39% zurück. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob die Zellen infiziert oder nicht infiziert waren (vgl. Abschnitt 3.3.7.2.). Eine Aktivierung von BMM Φ mit rIFN γ + LPS hatte dagegen keinen negativen Einfluss auf deren Vitalität. In der Literatur werden verschiedene Hinweise für die Abnahme des MTT-

Umsatzes nach Aktivierung von RAW 264.7-Zellen gefunden. So beschreiben die „Urheber“ der RAW 264.7-Zelllinie eine konzentrationsabhängige Inhibition des Wachstums durch LPS-Behandlung (Raschke et al., 1978). Dieser Befund wurde auch für weitere makrophagenähnliche Zelllinien beschrieben (Ralph und Nokin, 1977). Jüngere Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass nicht nur das Wachstum der RAW 264.7-Zelllinie inhibiert wird, sondern die Zellen nach Aktivierung eine iNO-vermittelte Apoptose einleiten (Hortelano et al., 2002; Gotoh et al., 2002; Seminara et al., 2007).

Im Griess-Assay zeigte sich zudem, dass die RAW 264.7-Zellen auf Stimulation mit rIFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) mit deutlich höherer iNO-Produktion als BMM Φ reagierten (RAW 264.7: 69 μ M iNO vs. BMM Φ : 27 μ M iNO).

4.2.2.11. Antileishmanielle und zytotoxische Untersuchung verschiedener phenolischer Verbindungen im FACS-basierten Assay

Nach Testung der Gallussäure wurden weitere bereits im Arbeitskreis untersuchte phenolische Testsubstanzen einer ersten antileishmaniellen Testung im FACS- und Griess-Assay auf *L. major* GFP infizierten BMM Φ unterzogen. Ausgewählt wurden die phenolischen Substanzen Kaffeesäure, Corilagin, Geraniin und Casuarinin (Kolodziej et al., 2001). Im durchgeführten FACS-Assay hatte die Kaffeesäure im eingesetzten Konzentrationsbereich von 20 - 80 μ M weder eine antileishmanielle Wirkung noch schädigte sie die infizierten BMM Φ oder induzierte eine iNO-Produktion. Für die Kaffeesäure publizieren Tasdemir et al. (2006) eine deutliche Wirkung gegen Leishmanien (IC₅₀ 6 μ g/ml bzw. 33,3 μ M). Allerdings zeigen die Autoren die Wirkung der Kaffeesäure im Unterschied zu der in dieser Arbeit angewendeten Methode nur auf extrazellulären promastigoten Leishmanien. Deshalb kann spekuliert werden, dass die Kaffeesäure zwar eine direkte antileishmanielle Wirkung besitzt, aber nicht in die Wirtszelle bzw. die parasitophore Vakuole zu den obligat intrazellulären Parasiten vordringen und damit nicht gegen das klinisch relevante intrazelluläre Amastigotenstadium therapeutisch wirken kann. Von den weiteren untersuchten Testsubstanzen Corilagin, Geraniin und Casuarinin besaß nur Corilagin im FACS-Assay einen therapeutischen Effekt in Konzentrationen zwischen 40 und 80 μ M. Die in der Vergangenheit beschriebenen antileishmaniellen Aktivitäten für Geraniin und Casuarinin konnten in diesem Assay nicht verifiziert werden. Zur Relativierung der unterschiedlichen Ergebnisse ist anzumerken, dass die in der Literatur beschriebenen antileishmaniellen Aktivitäten von Casuarinin und

Corilagin auf infizierten RAW 264.7-Zellen gezeigt werden und nicht etwa, wie im FACS-Assay, auf BMM Φ (Kolodziej et al., 2001 und 2005). Weiter wird von den Autoren angenommen, dass die Wirkung der Polyphenole vor allem auf Aktivierung der RAW 264.7-Zelllinie beruht. In dieser Arbeit wurde beispielhaft für die Standard-Aktivatoren rIFN γ + LPS gezeigt, dass sie RAW 264.7-Zellen zu deutlich höherer iNO-Produktion anregen als BMM Φ (s. Abb. 3-33 c, d). Daher ist zu vermuten, dass sich die RAW 264.7-Zelllinie auch durch Behandlung mit Casuarinin und Corilagin leichter aktivieren lässt als BMM Φ . Die Aktivierung könnte auch eine Apoptose der RAW 264.7-Zelllinie zur Folge haben, wodurch auch intrazelluläre Parasiten absterben würden.

4.2.2.12. Vergleich antileishmanieller und zytotoxischer Effekte der *trans*-Aconitsäure im FACS- und MTT-basierten Assay

Als nicht phenolischer pflanzlicher Naturstoff mit antileishmanieller Wirkung (Misra et al., 1989; Kar et al., 1993) wurde *trans*-Aconitsäure im FACS- und MTT-Assay näher betrachtet. Die analoge Testung dieser Verbindung sollte erste Hinweise geben, ob die Diskrepanz der FACS-basierten Ergebnisse mit den MTT-basierten auf die phenolische Struktur der Testsubstanzen oder auf Assay-typische Phänomene zurückzuführen war.

Die Behandlung *L. major* GFP infizierter BMM Φ mit *trans*-Aconitsäure im Konzentrationsbereich von 2,5 - 20 mM tötete im FACS-basierten Assay in einem großen Konzentrationsbereich von 5 - 20 mM die intrazellulären Leishmanien nahezu komplett ab. Allerdings wurden bei diesen Konzentrationen auch die BMM Φ erheblich geschädigt (PI-Assay). Ein aussichtsreiches therapeutisches Fenster konnte deshalb hier nicht gezeigt werden (vgl. Abschnitt 3.3.7.5.).

Im MTT-basierten Assay führte die Behandlung infizierter BMM Φ mit *trans*-Aconitsäure, ähnlich wie im FACS-Assay zu einer deutlichen Reduktion der intrazellulären Parasiten. Im Unterschied zum FACS-Assay war allerdings die leishmanizide Wirkung der *trans*-Aconitsäure bis zur Konzentration von 2,5 mM zu beobachten (s. Abb. 3-37.).

Die Behandlung von RAW 264.7-Zellen führte im MTT-Assay im Vergleich zu BMM Φ zu stärkeren toxischen Effekten, unabhängig davon ob infizierte oder nicht infizierte Zellen verwendet wurden. Ein eindeutiger therapeutischer Bereich konnte daher nicht ausgemacht werden (s. Abb. 3-36).

Strittig ist allerdings der Einsatz solcher hoher Konzentrationen an *trans*-Aconitsäure in den verwendeten *in vitro* - Assays, weil dadurch die Pufferkapazität der Medien überschritten wurde. Damit könnten sowohl toxische Effekte auf die Wirtszellen als auch leishmanizide Effekte auf eine reine pH-Verschiebung zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann auch bei der Testung der *trans*-Aconitsäure festgestellt werden, dass je nach Auswahl des Testsystems (FACS- bzw. MTT-Assay) mit unterschiedlichen Ergebnissen gerechnet werden muss. So war im FACS-Assay bei Inkubation infizierter BMM Φ mit *trans*-Aconitsäure (2,5 mM) nur eine schwache Reduktion der Infektionsrate (84%) bezogen auf unbehandelte Kontrollen (100%) zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist im MTT-Assay im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen die Anzahl der Parasiten auf 21% reduziert. Auffällig war auch der Unterschied zwischen den eingesetzten Zellarten bei der Beurteilung der zytotoxischen Effekte. Die Möglichkeit, dass es sich um ein Phenol-typisches Phänomen handeln könnte, hat sich durch diese Versuche nicht erhärtet. Vielmehr waren die beobachteten Diskrepanzen auf die Art des verwendeten Testsystems bzw. die Zellart zurückzuführen.

4.3. Fazit und Ausblick

Die übernommene routinemäßig verwendete MTT-basierte Methode zur Bestimmung intrazellulärer antileishmanieller Effekte stellte sich für die Testung phenolischer Naturstoffe als unzureichend heraus. Die Hauptproblematik war die selektive Lyse der Wirtszelle mit SDS. Neben dem Umstand, dass dieser Arbeitsschritt kaum standardisierbar war, kam noch hinzu, dass durch die Zerstörung der Wirtszelle eine weitergehende Analyse nicht mehr möglich war. Aus diesen Gründen wurde nach einem Weg gesucht, die Lyse der Wirtszelle zu umgehen. Die Idee war, ein Testsystem zu entwickeln, welches die Beurteilung leishmanizider Effekte auf dem klinisch relevanten intrazellulären, amastigoten Parasiten zulässt, ohne die Wirtszelle dabei zu zerstören.

Durch Infektion von BMM Φ mit GFP-transfizierten Leishmanien und durch Einsatz der Durchflusszytometrie war es möglich sowohl die Vitalität der Wirtszellen mittels PI-Färbung, als auch die prozentuale Infektionsrate mit Leishmanien über das GFP-Signal der Parasiten zu bestimmen. Die Gegenüberstellung der mikroskopisch ermittelten Infektionsraten mit den im FACS gemessenen zeigte, dass das neue Testsystem sensitiv genug war, selbst BMM Φ mit nur einem phagozytierten Parasiten als infiziert zu detektieren. Die Behandlung

extrazellulärer, promastigoter und intrazellulärer, amastigoter *L. major* GFP mit Amphotericin B oder Pentostam[®] demonstrierte, dass das GFP-Signal nach dem Abtöten der Parasiten erlischt. Diese Korrelation des GFP-Signals mit der Vitalität der Leishmanien war eine notwendige Voraussetzung, um antileishmanielle Effekte von Testsubstanzen nachzuweisen. Die Kombination des FACS-Assays mit dem Griess-Assay bzw. mit dem Enzyminhibitor L-NMMA ermöglichte außerdem die Differenzierung zwischen einem direkten und einem indirekten durch Makrophagenaktivierung hervorgerufenen antileishmaniellen Effekt. Die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten des Assays wurden anhand direkt antileishmaniell wirksamer Arzneistoffe, durch Kombinationen verschiedener Makrophagenaktivatoren (rIFN- γ , rTNF- α , LPS) und durch Behandlung mit verschiedenen phenolischen und nicht phenolischen pflanzlichen Substanzen aufgezeigt. Neben dieser Vielseitigkeit des FACS-Assays wurden durch den Verzicht der Lyse im Gegensatz zum MTT-Assay, aufwändige Arbeitsschritte eingespart (s. Übersichtsabbildung 3-38.).

Kritisch beurteilt werden kann der Einsatz eines gentechnisch veränderten Leishmanien Stamms, da letztendlich nicht bewiesen werden kann, inwieweit die Transfektion, Selektion und Dauerkultivierung die Eigenschaften des Erregers verändern. Vorstellbar könnte sein, dass der transfizierte Leishmanien Stamm sich im Unterschied zum Wildtyp in seiner Virulenz oder Empfindlichkeit gegenüber leishmaniziden Effekten anders verhält. Dies kann insbesondere dann prekär sein, wenn die vorhandene Geneticin-Resistenz des transfizierten Stamms zu einer Kreuzresistenz mit potentiellen Testsubstanzen führt. Dadurch könnten antileishmanielle Substanzen dem Testsystem entgehen. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass sie auf GFP-transfizierte Stämme angewiesen ist und demzufolge keine frischen Parasiten-Isolate mit ihr untersucht werden können.

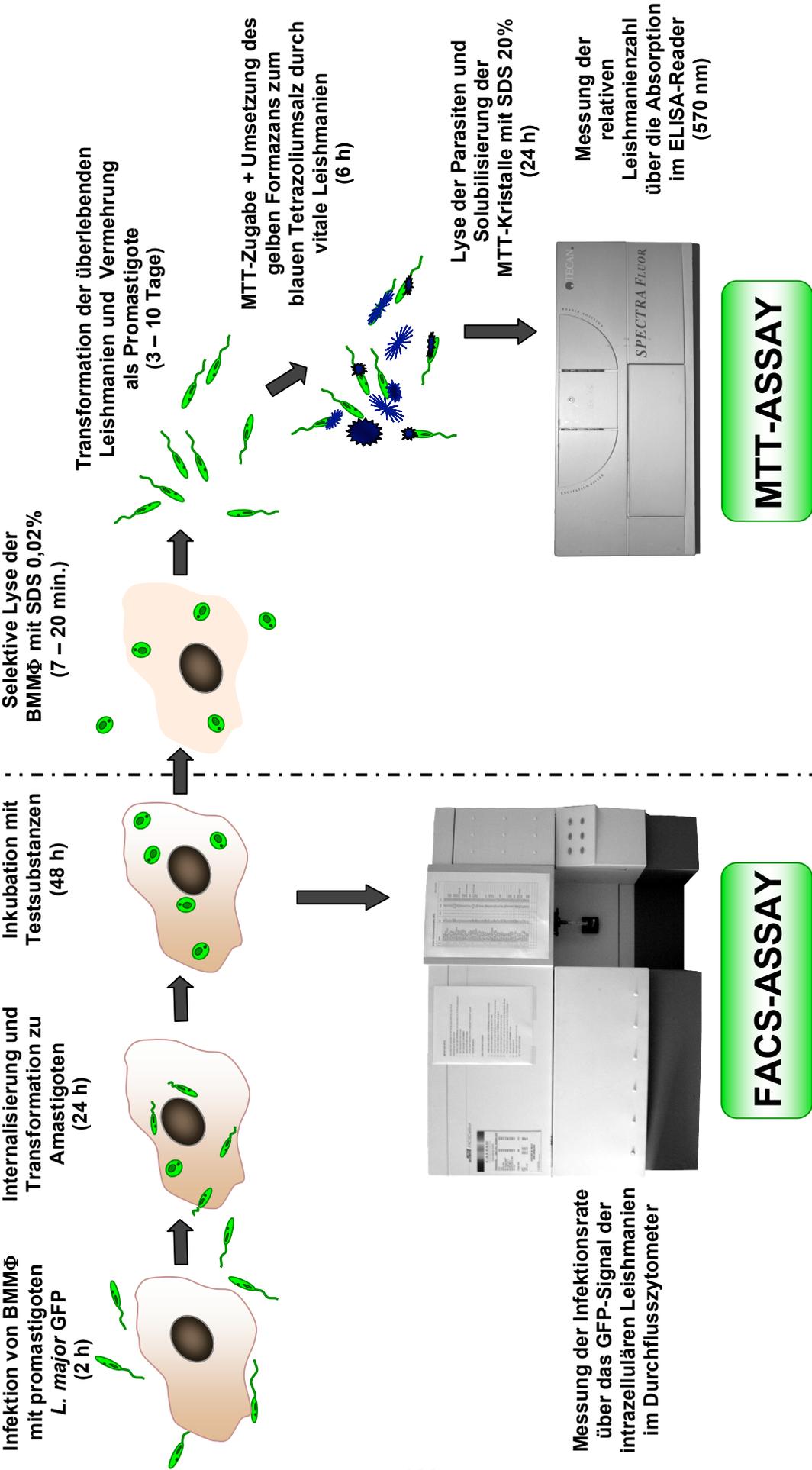


Abb. 3-38. Prinzip des FACS- und MTT-basierten Assays

Trotz dieser Nachteile bietet das FACS-basierte Testsystem noch viel versprechende Ausbaumöglichkeiten. Dadurch, dass die Wirtszelle nicht mehr lysiert werden muss, könnte im Gegensatz zum MTT-basierten Assay im FACS-Assay die Wirtszelle noch genauer untersucht werden. Vorstellbar wäre, Makrophagen parallel zur Messung ihrer Infektionsrate und Vitalität auf Funktionsindikatoren zu analysieren. Besonders interessant dürfte in diesem Fall die Darstellung möglicher Unterschiede (Oberflächenrezeptoren, Zytokinproduktion etc.) zwischen infizierten und nicht infizierten BMM Φ derselben Probe sein.

5 Zusammenfassung

ZUSAMMENFASSUNG

In vitro Testsysteme bieten vielseitige Analysemöglichkeiten bei der Suche nach neuen antiparasitären Wirkstoffen, so auch gegen im Säuger obligat intrazellulär lebende *Leishmania* Parasiten. Entscheidend für die pharmakologische Relevanz ist ihre infektionsbiologische Nähe zum *in vivo* Geschehen. Zudem sollten sie auch Aussagen über (Neben-) Wirkungen der Testsubstanzen auf die Wirtszelle selbst erlauben.

Das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* Leishmaniosemodell zur Testung von Naturstoffen auf ihr antileishmaniellles Potential bedient sich der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse). *L. major* Parasiten, transfiziert mit einem Gen für grün fluoreszierendes Protein (GFP), ließen sich mit dieser Methode innerhalb ihrer Wirtszelle detektieren und quantifizieren. Gleichzeitig wurde die Vitalität der Wirtszelle anhand ihrer Aufnahme von Propidiumjodid (PI) gemessen. Ein älteres Leishmaniosemodell, bei dem parasitierte und behandelte Wirtszellen lysiert und überlebende Leishmanien über ihren Umsatz des Tetrazoliumsalzes MTT quantifiziert werden, wurde speziell hinsichtlich der Testung von Polyphenolen kritisch beurteilt.

Verschiedene Autoren hatten bereits auf die Möglichkeit hingewiesen, dass MTT nicht nur von lebenden Zellen, sondern auch von zu testenden Substanzen umgesetzt werden kann. Von den hier untersuchten phenolischen Naturstoffen traf dies insbesondere auf aromatische Verbindungen mit vicinaler Di- bzw. Trihydroxylierung zu, während Substanzen ohne oder mit nur einer phenolischen Hydroxygruppe – unabhängig von deren Position - mit MTT nicht reagierten. Der MTT-Vitalitätsassay war daher für phenolische Verbindungen mit ausgeprägtem Reduktionspotential in seiner bisherigen Form nicht geeignet. Um falsch-positive Vitalitätsbefunde zu vermeiden und den Assay weiter verwenden zu können, wurde vor MTT-Zugabe der Zellkulturüberstand gewechselt.

Makrophagen als typische Wirtszellen für *Leishmania* Parasiten sind durch ihre Adhärenz an Zellkulturgefäße gekennzeichnet. Die Zytotoxizität von phenolischen Verbindungen wie Gallussäure, Gallussäuremethylester und Gallussäureethylester lag für makrophagenähnliche RAW 264.7-Zellen signifikant höher – gemessen als verringerter MTT-Umsatz – ,wenn diese noch in Suspension behandelt wurden als wenn sie zum Zeitpunkt der Behandlung bereits adhärent vorlagen. Vergleichsuntersuchungen im FACS (PI-Assay) zeigten diesen Unterschied nicht.

Die selektive Lyse der Wirtszellen mittels SDS (Natriumlaurylsulfat) ohne Schädigung der Parasiten war ein weiterer neuralgischer Punkt des vielfach genutzten MTT-Assays. Der Fortgang der Lyse wird mikroskopisch bestimmt und ihre Effizienz ist von vielen Faktoren abhängig, so z.B. auch vom Teststoff selbst. Der größte Nachteil der Lysemethode lag jedoch darin, dass eine gleichzeitige Analyse der Wirtszelle auf zytotoxische Effekte durch die Testsubstanz nicht möglich war.

Es wurde daher nach einer Methode gesucht, welche es erlaubt sowohl die Parasitenlast als auch den Zustand der Wirtszellen zu erfassen. Die Methode sollte zudem einen großen Probendurchsatz bei geringem Arbeitsaufwand ermöglichen. Zuerst wurde *L. major*-spezifisches Kaninchen-Antiserum produziert und hiermit – nach Permeabilisierung der Wirtszellen – Leishmanien intrazellulär markiert und mittels fluoreszierender Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Es zeigte sich jedoch, dass mit dieser Methode nicht ausreichend zwischen intrazellulär überlebenden und toten Leishmanien unterschieden werden konnte, weshalb die Methodik für ihren ursprünglichen Zweck verworfen wurde. Andererseits war das Antiserum sehr gut geeignet, Leishmanien im Gewebeschnitt nachzuweisen.

Alternativ wurde ein konstitutiv GFP exprimierender *L. major* Stamm eingesetzt. Das GFP-Signal erwies sich in pro- und amastigoten Leishmanien für die FACS-Analyse als ausreichend stabil. Unterschiedliche Infektionsraten waren somit objektiv erfassbar, bis hinab zu einem Parasiten pro Zelle. Entscheidend für die mögliche Anwendung in einem Leishmanizidie-Assay war jedoch der Befund, dass tote Leishmanien sehr rasch ihr Fluoreszenzsignal verlieren. In der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wurde zudem gezeigt, dass die Autofluoreszenz der Wirtszellen die Detektion des GFP-Signals nicht behindert. Allerdings war hierbei ein Ausbleichen des GFP innerhalb von fünf Minuten zu beobachten.

Das Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) ist der wichtigste immunologische Aktivator antimikrobieller Makrophagenfunktionen. *In vitro* bewirkt die Kombination IFN- γ plus bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), dass Makrophagen ihre intrazellulären *Leishmania* Parasiten hocheffizient mit Hilfe toxischer Stickoxidmetabolite (iNO) abtöten. In parallelen Versuchsserien wurden *in vitro* mit *L. major*-parasitierte Makrophagen aus murinen Knochenmarkkulturen (BMM Φ) unter anderem mit IFN γ + LPS oder dem Standardmedikament gegen Leishmaniosen, Pentostam[®], behandelt. Die relative Anzahl

überlebender Leishmanien wurde sowohl mikroskopisch (Diff-Quik®-Färbung) als auch im FACS bestimmt. Die Ergebnisse beider Methoden stimmten überein. Die FACS-basierte Methode erfuhr so eine weitgehende Validierung. Parallel zur Parasitenlast wurde mittels Griess-Assay der Nitritgehalt im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Rolle von iNO in der immunologischen Parasitenabwehr wurde durch Zugabe des Enzyminhibitors L-NMMA verdeutlicht. In dessen Gegenwart war auch nach Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ + LPS die produzierte NO-Menge deutlich reduziert (Griess-Assay) und die Parasiten wurden nicht vollständig abgetötet (FACS-Assay).

Der FACS-Assay zur Testung von Naturstoffen auf ihr antileishmaniell Potential umgeht gravierende Schwachpunkte des existierenden auf Wirtszelllyse und MTT-Umsatz basierenden Testsystems. Die Methode ist zudem objektiv und für einen großen Probendurchsatz geeignet. Die Kombination aus FACS-Assay (Parasitenlast) und iNO-Messung (Makrophagenaktivierung) erlaubt es abzuschätzen, ob eine Testsubstanz direkt oder indirekt durch Aktivierung der natürlichen Abwehrmechanismen der Wirtszelle wirkt. Durch Zugabe von PI ist zeitgleich eine erste Aussage über die allgemeine Zytotoxizität einer Testsubstanz und somit über ihr therapeutisches Fenster möglich.

6. SUMMARY

In vitro test systems offer a wide range of analytical possibilities in the search for new antiparasitic compounds, including such against obligate intracellular *Leishmania* parasites. The pharmacological relevance of the individual assay depends on how closely it mimics the *in vivo* situation. Equally important is the assessment of (side-) effects on the host cell.

An *in vitro* model of leishmaniasis was established for testing natural products for their antileishmanial potential using flow cytometry (FACS-Analysis). The assay enabled the detection and quantification of green fluorescent protein (GFP) gene-transfected *L. major* parasites within their host cell. Simultaneously, the viability of the macrophage host cell was measured via their uptake of propidium iodide (PI). The older "*Leishmania* Retrieval-Assay" in which parasitized and treated macrophages are lysed and surviving *Leishmania* quantified by their metabolism of the tetrazolium salt MTT, was less suitable than the FACS-based method, especially when testing polyphenols.

Various authors have already pointed out, that MTT is not only metabolized by living cells but also converted by certain chemicals. Among the tested natural phenols, this was especially the case for vicinal di- or tri-hydroxylated aromatic compounds, whereas compounds with no or only one phenolic hydroxyl group – independent of its position – did not react with MTT. The MTT assay in its simple form was therefore not suited for measuring cell viability in the presence of phenolic compounds with strong redox potential. However, false-positive results could be largely avoided by replacing culture supernatants by fresh medium without phenols before adding MTT.

Macrophages are the natural host cells for *Leishmania* parasites and characterized by adherence to plastics. Cytotoxicity of phenolic compounds such as gallic acid, gallic acid methyl ester, and gallic acid ethyl ester for macrophage-like RAW 264.7 cells was conspicuously higher – assessed as reduction of MTT metabolism – when the cells were treated while still in suspension, than when the cells were first allowed to adhere. Viability assessment by FACS (PI-method) did not show this phenomenon.

Selective lysis of host cells with SDS (sodium dodecyl sulfate) without harming intracellular parasites was a further critical point of the *Leishmania* retrieval assay. The progression of lysis – visually monitored under an inverted microscope – depends on many factors, including

the tested compounds themselves. The basic deficit of this method, however, lay in its inability to simultaneously test antileishmanial and cytotoxic effects of a compound.

A test system was needed that avoided the deficits of the MTT-assay, and SDS-lysis and that quantified both intracellular antileishmanial effects and cytotoxicity for the host cell. Furthermore, it should be suitable for high-throughput screening. In a first approach, *L. major*-specific antiserum was produced in rabbits in order to mark *Leishmania* within saponin-permeabilized macrophages. Bound antibody was detected by fluorescent secondary antibodies and fluorescence- or confocal laser scanning-microscopy. Unfortunately, this method could not sufficiently distinguish dead from living *Leishmania*. The antiserum, however, proved to be highly useful in histology of *Leishmania*-infected tissues.

In a second approach, a *L. major* strain was used that constitutively accumulates GFP in its cytoplasm. Its green fluorescence was sufficiently stable to detect by FACS both the extracellular promastigote and the intracellular amastigote form of the parasite. Different infection/ survival rates were easily detected down to one parasite per macrophage. Decisive for the usefulness of GFP-*Leishmania* in screening for leishmanicidal compounds, however, was the rapid disappearance of the GFP signal in dead parasites. Furthermore, the GFP-fluorescence was sufficiently distinguishable from macrophage autofluorescence. In conventional fluorescence microscopy, GFP exhibited severe bleaching within minutes, but this had no negative effect on FACS-analysis.

The cytokine interferon- γ (IFN- γ) is the most important immunological activator of macrophage antimicrobial functions. *In vitro*, the combination of IFN- γ and bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulates macrophages to produce toxic nitric oxides (iNO) and thus to efficiently kill intracellular *Leishmania* parasites. Murine bone marrow culture-derived macrophages (BMM Φ) were infected *in vitro* with GFP-*L. major* and treated with IFN- γ + LPS or the standard antileishmanial Pentostam[®]. Surviving intracellular *Leishmania* were counted under a microscope after staining with Diff-Quik[®] or assessed by FACS. Both procedures provided virtually identical results, thus validating the GFP/FACS-method. In parallel to the parasite load, the amounts of iNO released into the supernatants was measured via Griess-assay. The decisive role of iNO in cytokine-induced killing of *Leishmania* was highlighted by adding L-NMMA, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase (iNOS). In the absence of L-NMMA, IFN- γ + LPS-treated BMM Φ produced abundant iNO and killed all

intracellular *L. major* parasites. In its presence, only little iNO could be detected and most parasites survived.

This GFP/FACS-based method for testing natural products for their antileishmanial potential avoids critical drawbacks (SDS-lysis, MTT-assay) of the *Leishmania* retrieval-method. It is semi-automated and thus objective and suitable for high-throughput screening. The combination of GFP/FACS-assay (detection of viable intracellular parasites) and Griess-assay (detection of iNO-release and macrophage activation) gives a clear indication, whether an antileishmanial compound acts directly against the parasite or indirectly by activating antimicrobial mechanisms of the host cell. Furthermore, by adding PI directly before FACS analysis, it is possible to assess the general cytotoxicity of tested compounds and thus give a first estimate on its potential therapeutic window.

7 LITERATURVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS

- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT I – induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nature Immunology*. 2002; 6: 549-557
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage. Wiley-VCH. 2004; 1594
- Alexander J, Bryson K. T helper (h) 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*. 2005; 99: 17-23
- Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* spezies: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*. 1999; 112: 2993-3002
- Álvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13: 167-195
- Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology*. 1994; 24: 672-676
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*. 2004; 119: 238-258
- Berens L, Marr JJ. An easily prepared defined medium for cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Parasitology*. 1978; 64: 160
- Bergman JD. *Leishmania tropica*: quantitation of in vitro activity of antileishmanial agents by Giemsa staining, viability, and 3H-formycin B incorporation. *Journal of Parasitology*. 1984; 70: 561-562
- Bergman JD, Gallalee JV, Best JM. Sodium stibogluconat (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochemical Pharmacology*. 1987; 36: 197-201
- Beutler B, Poltorak A. The sole gateway to endotoxin response: How *LPS* was identified as *TLR4*, and its role in innate immunity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2001; 29: 474-478
- Bradford MM. A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72: 248-254
- Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990; 34: 183-188
- Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of Amphotericin B. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996; 9: 512–531

- Bray PG, Barret MP, Ward SA, Konging HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*. 2003; 19: 232-239
- Brugisser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*. 2002; 68: 445-448
- Chan MM, Bulinski JC, Chan KP, Fong D. A microplate assay for *Leishmania amazoniensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. *Parasitology Research*. 2002; 89: 266-271
- Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*. 2001; 18: 674-688
- Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander TG, Kharazmi A, Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1993; 37: 2550-2556
- Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*. 1998; 12: 251-258
- Chondhury K, Zander D, Kube M, Reinhard R, Clos J. Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38: 1411-1423
- Coste A, Linas MD, Cassaing S, Bernad J, Chalmeton S, Séguéla JP, Pipy B. A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 49: 731-740
- Croft SL, Hogg J, Gutteridge WE, Hudson AT, Randall AW. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1992; 30: 827-832
- Cunha FQ, Assreuy J, Moncada S, Liew FY. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology*. 1993; 79: 408-411
- Denkers EY, Butcher BA. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends in Parasitology*. 2005; 21: 35-41
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology*. 1988; 141: 2407-2412
- Disease Watch, News and Analysis. Leishmaniasis. www.nature.com/reviews/micro, 2004; 2: 692-693

- Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*. 2005; 54: 119-112
- Eibl H, Engel J. Synthesis of hexadecylphosphocholine (miltefosin). *Progress in Experimental Tumor Research*. 1992; 34: 1-5
- Ellwart JW, Kremer JP, Dörmer P. Drug testing in established cell lines by flow cytometric vitality measurements *versus* clonogenic assay. *Cancer Research*. 1988; 48: 5722-5725
- Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *Journal of Immunology*. 1993; 151: 907-915
- Fadili KE, Imbeault M, Messier N, Roy G, Gourbal B, Bergeron M, Tremblay MJ, Lègarè D, Ouellette M. Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-*Leishmania* pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52: 526-533
- Fang FC. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99: 2818-2825
- Feldman PL, Griffith OW, Hong H, Stuehr DJ. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *Journal of Medical Chemistry*, 1993; 36: 491-496
- Fyfe PK, Oza SL, Fairlamb AH, Hunter WN. *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 25: 17672-17680
- Gerlier D, Thomasset D. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*. 1986; 94: 57-63
- Gotoh T, Oyadomari, Mori K, Mori M. Nitric oxide-induced in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 14: 12343-12350
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 2005; 35: 1169-1180
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology*. 1990; 144: 278-283
- Green SJ, Nacy CA, Meltzer MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: A protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *Journal of Leukocyte Biology*. 1991; 50: 93-103
- Griess JP. Deutsche Chemische Gesellschaft-Berlin. 1879; 12: 426

- Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34: 433-444
- Ha DS, Schwarz KJ, Turco SJ, Beverley SM. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996; 77: 57-64
- Habtemariam S. Catechols and quercetin reduce MTT through iron ions: A possible artefact in cell viability assays. *Phytotherapy Research*. 1995; 9: 603-605
- Hammoda NA, Negm AY, Hussein ED, el-Temshahy MM, Rashwan EA. *Leishmania major*: leishmanicidal activity of activated macrophages by interferon gamma or tumour necrosis factor. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 1996; 26: 555-566
- Handman E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14: 229-243
- Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with host macrophage. *Trends in Parasitology*. 2002; 18: 323-334
- Harms-Zwingenberger GH, Bienzle U. Leishmaniosen – Importierte Krankheiten. *Deutsches Ärzteblatt*. 2000; 31-32: 2098-2100
- Harms-Zwingenberger GH, Bienzle U. Nach Deutschland importierte Leishmaniosen. *Deutsches Ärzteblatt*. 2007; 45: 2639-2644
- Hoover DL, Nacy CA, Meltzer MS. Human monocyte activation for cytotoxicity against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes: induction of microbicidal activity by interferon-gamma. *Cellular Immunology*. 1985; 94: 500-511
- Hortelano S, Zeini M, Castrillo A, Alvarez AM, Boscá L. Induction of apoptosis by nitric oxide in macrophages is independent of apoptotic volume decrease. *Cell Death and Differentiation*. 2002; 9: 643-650
- Jansson JK. Marker and reporter genes: illumination tools for environmental microbiologists. *Current Opinion in Microbiology*. 2003; 6: 310-316
- Kamau SW, Grimm F, Hehl AB. Expression of green fluorescent protein as a marker for effects of antileishmanial compounds *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45: 3654-3656
- Kar S, Kar K, Bhattacharya PK, Ghosh DK. Experimental visceral leishmaniasis: Role of *trans*-aconitic acid in combined chemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993; 37: 2459-2465
- Kiderlen AF, Kaye PM. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *Journal of Immunology*. 1990; 127: 11-18

- Kiderlen AF, Kayser O, Ferreira D, Kolodziej H. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages *in vitro*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 2001; 56c: 444-454
- Kiderlen AF, Laube U. *Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amebic encephalitis, infects the brain via olfactory nerve pathway. *Parasitology Research*. 2004; 94: 49-52
- King MA. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2000; 243: 155-166
- Kram D, Thäle C, Kolodziej H, Kiderlen AF. Intracellular parasite kill: Flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between antileishmanial activity and macrophage activation. *Journal of Immunological Methods*. 2008; 333: 79-88
- Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen AF. Proanthocyanidins and related compounds: Antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2001; 24: 1016-1021
- Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitized RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*. 2005; 66: 2056-2071
- Kolodziej H, Burmeister A, Trun W, Radtke OA, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Foo LY. Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expression in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 2005; 13: 6470-6476
- Laube U, Kiderlen AF. Detection of parasites with DNA-binding bisbenzimidazole H33258 in *Pneumocystis carinii*- and *Leishmania*-containing materials. *Parasitology Research*. 1998; 84: 559-564
- Lemesre JL, Sereno D, Daulouede S, Veyret B, Brajon N, Vincendeau P. *Leishmania* spp.: nitric oxide – mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote form. *Experimental Parasitology*. 1997; 86: 58-68
- Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Deutsche Apotheker Zeitung*. 1995; 36: 4785-4791
- Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. *Journal of Immunology*. 1990; 71: 556-559
- Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *Journal of Immunology*. 1990; 145: 4306-4310

- Liew FY, Li Y, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-Arginine. *Journal of Immunology*. 1990; 144: 4794-4797
- Linares E, Giorgio S, Augusto O. Inhibition of *in vivo* leishmanicidal mechanisms by tempol: nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 15: 1668-1676
- Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, Bellas C, Perez-Corral F, Alvar J. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998; 58: 436-443
- Malla N, Mahajan RC. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. *Indian Journal of Medical Research*. 2006; 123: 267-274
- Martyn DC, Jones DC, Fairlamb AH, Clardy J. High-throughput screening affords novel and selective trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007; 17: 1280-1283
- Maarouf M, Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research*. 1997; 232: 339-348
- Miller MW, Nowakowski RS. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Research*. 1988; 457: 44-52
- Misra S, Sabyal T, Sarkar D, Bhattachary PK, Ghosh DK. Evaluation of antileishmanial activity of *trans*-aconit acid. *Biochemical Medicine and metabolic Biology*. 1989; 42: 171-178
- Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *Journal of Endocrinology*. 2007; 193: 323-330
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65: 55-63
- Murray HW, Delph-Etienne S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbial mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Infection and Immunity*. 2000; 68: 288-293
- Nacy CA, Diggs CL. Intracellular replication of *Leishmania tropica* in mouse peritoneal macrophages: Comparison of amastigote replication in adherent and nonadherent macrophages. *Journal of Infection and Immunity*. 1981; 34: 310-313

- Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cellular Microbiology*. 2008; 10: 301-308
- Nandan D, Lo R, Reiner NE. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*. 1999; 67: 4055-4063
- Noben-Trauth N, Lira R, Nagase, H, Paul WE, Sacks DL. The relative contribution of IL-4 receptor signalling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *Journal of Immunology*. 2003; 170: 5152-5158
- Ouellette M, Drummel-Smith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: Drug in clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*. 2004; 7: 257-266
- Paris C, Loiseau PM, Bories C, Bréard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48: 852-859
- Park AY, Scott P. IL12: keeping cell-mediated immunity alive. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2001; 53: 529-532
- Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005; 45: 108-111
- Piscopo TV, Azzopardi CM. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*. 2006; 82: 649-657
- Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research*. 1989; 49: 4435-4440
- Ralph P, Nakoinz I. Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. *Cancer Research*. 1977; 37: 546-550
- Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen BE. Amphotericin B kills unicellular Leishmaniasis by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *Journal of Membrane Biology*. 1996; 152: 65-75
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Funktional macrophage cell lines transformed by Abelson Leukemia Virus. *Cell*, 1978; 15: 261-267
- Ritter U, Mattner J, Rocha JS, Bogdan C, Körner H. The control of *Leishmania major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes and Infection*. 2004; 6: 559-565
- Roach TI, Kiderlen AF, Blackwell JM. Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from Lshs and Lshr congenic mouse strains. *Infection and Immunity*. 1991; 59: 3935-3944

- Roberts LJ, Handman E, Foote SJ. Leishmaniasis. *British Medical Journal*. 2000; 321: 801-804
- Roberts WL, Bergman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995; 39: 1234-1239
- Rollino C, Borsa S, Bellone G, Piccoli G, Emanuelli G. False positive results with MTT assay. *Journal of Immunological Methods*. 1995; 185: 141-143
- Ronet C, Voigt H, Himmelrich H, Doucey, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Tacchini-Cottier F, Bron C, Louis J, Launois P. *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c Mice. *Journal of Immunology*. 2008; 180: 4825-4835
- Sacks DL, Pimenta PFP, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. 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*. 1995; 181: 685-697
- Sasaki DT, Dumas SE, Engelman EG. Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry*. 1987; 8: 413-420
- Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C, Levi R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1988; 85: 8664-8667
- Schlein Y. *Leishmania* and sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*. 1993; 9: 255-258
- Seminara AR, Ruvolo PP, Murad F. LPS/IFN γ -induced RAW 264.7 apoptosis is regulated by both nitric oxide-dependent and -independent pathways involving JNK and the Bcl-2 family. *Cell Cycle*. 2007; 6: 1772-1778
- Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Quaissi A, Lemesre JL. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45: 2064-2069
- Sereno D, Silva AC, Mathieu-Daude F, Ouaiissi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology International*. 2007; 56: 3-7
- Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. Fourth Edition, John Wiley & Sons Hoboken New Jersey, USA. 2003; Chapter 1.5: 49-58
- Shoemaker M, Cohen I, Campbell M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 93: 381-384
- Singh N, Dube A. Short report: Fluorescent *Leishmania*: Application to anti-leishmanial drug testing. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004; 71: 400-402

- Soto J, Soto P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Future Drugs*. 2006; 4: 177-185
- Stark D, Pett S, Marriott D, Harkness J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 44: 1178-1180
- Stenger S, Donhauser N, Thüring H, Röllinghoff M, Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*. 1996; 183: 1501-1514
- Sudar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities. *Indian Journal of Medical Research*. 2006; 123: 345-352
- Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca^{2+} through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 25120-25132
- Takahashi S, Abe T, Gotoh J, Fukuuchi Y. Substrate-dependence of reduction of MTT: A tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry International*. 2002; 40: 441-448
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50: 1352-1364
- Thäle C, Kiderlen AF. Sources of interferon gamma (IFN-gamma) in early immune response to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology*. 2005; 210: 673-683
- Töttemeyer S, Sheppard M, Lloyd A, Roper D, Dowson C, Underhill D, Murray P, Maskell D, Bryant C. IFN- γ enhances production of nitric oxide from macrophages via a mechanism that depends on nucleotide oligomerization domain-2. *Journal of Immunology*. 2006; 176: 4804-4810
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annual Reviews Biochemistry*. 1998; 67: 509-544
- Unger C, Eibel H. Arzneimittelentwicklung aus Phospholipiden. *Onkologie*. 2001; 24: 18-23
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Michael RB. Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research*. 1995; 9: 603-605
- Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L, Dugas B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996; 40: 253-256

- Wagman GH, Testa RT, Marquez JA, and Weinstein MJ. Antibiotic G-418, a new *micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: fermentation, isolation, and preliminary characterization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1974; 6: 144-149
- Wilson AP. Cytotoxicity and viability assays in animal cell culture: a practical approach. *Animal Cell Culture*. 2000; 3rd ed. 1: 175-219
- Wing MG, Montgomery AMP, Songsivilai S, Watson JV. An improved method for detecting of cell surface antigens in sample of low viability using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1990; 126: 21-27
- Wolf JE, Massof SE. In vivo activation of macrophage oxidative burst activity by cytokines and Amphotericin B. *Infection and Immunity*. 1990; 58: 1296-1300
- Zhai L, Chen M, Blom J, Theander TG, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999; 43: 793-803

8. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass diese Arbeit noch in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt wurde. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 01.12.2008

Dominic Kram

Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten